



## Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201630594	
Fecha de recepción:	06 mayo 2016, 14:26 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.1173	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN "IN SITU" DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DEL CARBONO EN HOJAS	
Documentos enviados:	Reivindicaciones-1.pdf (3 p.) Dibujos.pdf (5 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) Descripcion.pdf (19 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.) OTRO-1.pdf (3 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	06 mayo 2016, 14:26 (CEST)	
Codificación del envío:	2E:8A:33:6B:3D:E1:34:95:FB:A3:91:D7:C5:A3:15:F1:64:42:3A:B7	

---

## AVISO IMPORTANTE

Las tasas pagaderas al solicitar y durante la tramitación de una patente o un modelo de utilidad son las que se recogen en el Apartado "Tasas y precios públicos" de la página web de la OEPM ([http://www.oepm.es/es/propiedad\\_industrial/tasas/](http://www.oepm.es/es/propiedad_industrial/tasas/)). Consecuentemente, si recibe una comunicación informándole de la necesidad de hacer un pago por la inscripción de su patente o su modelo de utilidad en un "registro central" o en un "registro de internet" posiblemente se trate de un fraude.

La anotación en este tipo de autodenominados "registros" no despliega ningún tipo de eficacia jurídica ni tiene carácter oficial.

En estos casos le aconsejamos que se ponga en contacto con la Oficina Española de Patentes y Marcas en el correo electrónico [informacion@oepm.es](mailto:informacion@oepm.es).

---

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA.

Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

/Madrid, Oficina Receptora/



(1) MODALIDAD:	<b>PATENTE DE INVENCION</b> <b>MODELO DE UTILIDAD</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL:  UNIVERSIDAD PÚBLICA  NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME:  DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:  MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:  INVENCIÓN LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN:  PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ ]  España ES Q2818002D  C/ Serrano, nº 117 Madrid 28 Madrid 28006 España ES  <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>  100,00 %
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	Sahrawy Barragán Mariam España ES
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	Serrato Recio Antonio Jesús España ES
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE:	Rojas González José Antonio

NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	España ES
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:	MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN "IN SITU" DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DEL CARBONO EN HOJAS
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPOSITO: REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS: LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR: FECHA:	
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(15) AGENTE DE PROPIEDAD INDUSTRIAL: APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE: NÚMERO DE PODER:	PONS ARIÑO ÁNGEL 0499/5 20081765
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN: DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):  -OTRO1.pdf FIGURAS A COLOR	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 19 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 21 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 10 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 3
(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:	<input type="checkbox"/>

<p style="text-align: right;">DOC COPIA DNI:</p> <p>DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS:</p> <p style="text-align: center;">DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES:</p> <p style="text-align: center;">DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA:</p> <p style="text-align: center;">DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA:</p> <p style="text-align: center;">DOC COPIA OTROS:</p>	<p>[ ] N.º de páginas:</p>
<p>(18) NOTAS:</p> <p style="text-align: center;">1) FIGURAS A COLOR :</p>	<p>Se adjunta un juego de figuras 1 a 6 en color para un mejor entendimiento de la invención.</p>
<p>(19) FIRMA:</p> <p style="text-align: center;">FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:</p> <p style="text-align: center;">LUGAR DE FIRMA:</p> <p style="text-align: center;">FECHA DE FIRMA:</p>	

### Identificación

Ejercicio: 2016  
Nro Justificante: 7915111623106

### Sujeto Pasivo

NIF:

Apellidos y Nombre o Razón Social:

### Agente o Representante legal (1):

NIF: 50534279J

Apellidos y Nombre o Razón Social: ÁNGEL PONS ARIÑO

Código de Agente o Representante (2): 0499

### Autoliquidación

Titular del expediente si es distinto del pagador: CSIC

Modalidad Expediente: P Número Expediente: Tipo (3):

Clave: IE01 Año: 2016 Concepto: SOL. DE INVENCION O REAHABILITACIÓN POR INTERNET

Unidades: 1 Importe: 63,68



Referencia OEPM: 88133781952

909992100200188133781952

### Declarante

Fecha: 6/05/16 14:04

Firma: ÁNGEL PONS ARIÑO

### Ingreso

Importe en euros: 63,68

Adeudo en cuenta:

NRC Asignado: 7915111623106000000001

Modelo 791

- (1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.  
(2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.  
(3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.



<b>OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS</b>		
<b>Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad</b>		
<b>1. REFERENCIA DE SOLICITUD</b>	<b>ES1641.1173</b>	
<b>2. TASAS</b>	<b>Importe (en euros)</b>	
<b>Concepto</b>	<b>Código de barras asignado</b>	<b>Importe</b>
IE01 Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	88133781952	63,68
IE02 Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
IE04 Petición IET		0,00
IE06 Prioridad extranjera (0)		0,00
El solicitante se acoge al aplazamiento de tasas previsto en el art. 162 de la Ley 11/1986 de Patentes	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input type="checkbox"/>	
	<b>Importe total</b>	63,68
	<b>Importe abonado</b>	63,68

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

**Método para la determinación “*in situ*” de actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del carbono en hojas**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se refiere a un método para la determinación *in situ* en hojas de plantas de un conjunto de actividades enzimáticas específicas relacionadas con el metabolismo del carbono en plantas, específicamente actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de azúcares, y más específicamente la determinación de la actividad de la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa). Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un kit y todos los componentes necesarios para llevar a cabo el método aquí descrito.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15

Una de las principales características para determinar la calidad de los frutos se establece en gran parte por las cantidades relativas de azúcares y ácidos orgánicos presentes en los mismos, que dan lugar a los rasgos nutricionales, organolépticos y de sabor de dichos frutos. Así, uno de los principales objetivos en el cultivo de frutales, hortalizas y verduras, es la obtención de variedades comerciales que muestren un incremento en la concentración de los principales metabolitos, vinculados a los parámetros de calidad de las frutas, hortalizas y verduras, en general, dando lugar a variedades que presentan un mejoramiento de los mismos. En este sentido, los mejoradores han dirigido sus actividades hacia el cruzamiento de variedades de frutales cuyas características específicas una vez combinadas dan lugar a nuevas variedades mejoradas esencialmente en sus aspectos organolépticos, relacionados con el sabor de los frutos, hortalizas y verduras. Esta mejora está asociada a la modificación de las vías metabólicas y biosintéticas que son activas durante el proceso de crecimiento de la planta y la maduración de las frutas y que se concreta en un incremento del contenido en azúcares y ácidos orgánicos en los frutos. La mayor parte de los azúcares acumulados en los frutos son transportados por el floema desde las hojas, la principal fuente de carbono (azúcares) en plantas.

20

25

30

35

En el caso del metabolismo carbonado, se sabe que está regulado a distintos niveles, incluyendo la transcripción, la traducción y la modificación post-traducciona. Está bien documentado que las actividades enzimáticas reflejan el estado real y final del

proceso metabólico, y como consecuencia puede aportar mucha más información acerca de la síntesis de los azúcares en plantas, que la determinación indirecta de dicha actividad mediante la medición de los niveles de mRNA o de proteína de las propias enzimas implicadas en estos procesos.

5

La localización *in situ* de la actividad de las enzimas a base de una reacción histoquímica ofrece información espacial y temporal detallada que complementa y amplía otros conjuntos de datos. El análisis espacio temporal de las actividades enzimáticas asociadas al metabolismo del carbono usando métodos histoquímicos *in situ* ha sido realizado con éxito en el caso de embriones de Arabidopsis (Baud and Graham, 2006, Plant J 46:155-169). En este caso, los ensayos se basaron en reacciones enzimáticas asociadas a la reducción de NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> o FAD y la subsecuente reducción y precipitación de una sal de tetrazolio (NBT) (Baud and Graham, 2006, Plant J 46:155-169). A pesar de los buenos resultados para la localización espacio temporal de la actividad enzimática, este método no permite cuantificar dicha actividad de forma fiable, no pudiendo relacionarse ésta con el contenido de azúcares en frutos.

10

15

20

25

Por otro lado, también se ha llevado a cabo la medida de las actividades enzimáticas en extractos o “pools” proteicos obtenidos de órganos de plantas, tales como hojas. Generalmente, la determinación de cada una de las actividades enzimáticas se basa en ensayos específicos, con sustratos específicos, y en el uso de reacciones asociadas de reducción de NADP<sup>+</sup> a NADPH que se pueden determinar en un espectrofotómetro a una longitud de onda concreta. Dicho sistema de medida dependiendo del tipo de planta del que proceda el extracto, será más o menos exacto.

30

35

Es conocido que en extractos de plantas de guisante la determinación enzimática es bastante exacta, mientras que en extractos de otras plantas, tales como por ejemplo, las fresas, dicha determinación es incorrecta ya que en los extractos de plantas de fresa existe un alto contenido en polifenoles y polisacáridos que enmascaran los resultados y dan lugar a precipitados que impiden la determinación de la actividad enzimática correctamente. Para solucionar estos problemas se han diseñado y utilizado distintas soluciones tampón a distintos pH, así como la purificación de las muestras mediante filtración, pero no ha sido posible solventar los problemas anteriormente mencionados.

A la vista de lo anterior, sigue existiendo la necesidad en el estado de la técnica de desarrollar nuevos métodos capaces de determinar actividades enzimáticas específicas, preferentemente relacionadas con la síntesis de azúcares, capaces de predecir el contenido de azúcares en frutos, verduras, hortalizas o árboles y así  
5 utilizarlas en los programas de mejora vegetal. Específicamente, existe la necesidad de nuevos métodos capaces de determinar dichas actividades enzimáticas en aquellas plantas que presenten altos contenidos en compuestos tales como polifenoles y polisacáridos, los cuales enmascaran e impiden la correcta determinación de dicha actividad enzimática.

10

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La invención se basa en la determinación *in situ*, directamente sobre hojas de plantas, y específicamente sobre hojas de plantas de fresa, de la cinética de actividades  
15 enzimáticas específicas relacionadas con la síntesis de azúcares, siendo capaces mediante dicha determinación de predecir el contenido de azúcares en frutos de dichas plantas. Las principales enzimas implicadas en la síntesis de azúcares analizadas en la presente invención, y que son idóneas para la predicción del contenido de azúcares solubles en los frutos en los que se analiza, han sido, glucosa-6P-deshidrogenasa  
20 (G6PDH), fosfoglucosa isomerasa (PGI), hexoquinasa (HK), UDP glucosa pirofosforilasa (UGPasa), ADP glucosa pirofosforilasa (AGPasa), fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) y maltasa (Mal).

Como se ha mencionado previamente, la determinación de la actividad enzimática en  
25 *pools* o extractos proteicos de plantas de fresa es muy inestable e incorrecta al comprender dichas plantas, y por lo tanto también un extracto de las mismas, un alto contenido en polifenoles y polisacáridos que enmascaran los resultados y dan lugar a precipitados que impiden la determinación enzimática correcta. Mediante el método *in situ* y el kit descrito en la presente invención se soluciona dicho problema y se puede  
30 determinar fielmente la actividad enzimática directamente sobre muestras de hojas de plantas de fresa, permitiendo además asociar la actividad enzimática analizada en las hojas, con el contenido en azúcares que presentarán los frutos de dichas plantas.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in situ* de  
35 determinación de la actividad enzimática, directamente en tejido vegetal y más específicamente sobre muestras de hojas de plantas de fresa, que permite en base a

la actividad enzimática determinada mediante dicho método, pronosticar el contenido de azúcares en el fruto de las plantas analizadas. La determinación de la actividad enzimática mediante el método descrito en la presente invención es útil para los programas de mejora de cultivos de interés agronómico, ya que la selección de las plantas y/o variedades que muestren una alta actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de azúcares, ayudará a seleccionar dichas plantas al presentar características organolépticas específicas y deseadas, como consecuencia del incremento de la actividad de las enzimas de interés.

Por lo tanto, el primer aspecto de la invención se refiere a un método para la determinación *in situ* de la actividad de la enzima FBPasa en una muestra vegetal, preferentemente en una muestra vegetal obtenida de plantas de fresa, que comprende:

- a) Incubar la muestra vegetal en una solución fijadora,
- b) Contactar la muestra fijada de la etapa a) con una solución de reacción que comprenda las enzimas auxiliares PGI y G6PDH, los cofactores NAD(P)<sup>+</sup> y ATP, bajo condiciones que permitan la conversión de dicho NAD(P)<sup>+</sup> a NADPH,
- c) Reaccionar el NAD(P)<sup>+</sup> o un análogo del mismo en presencia de una solución de detección que comprende el sustrato de la enzima FBPasa, un compuesto colorante en un estado oxidado, en condiciones tales que el compuesto colorante en un estado oxidado se convierte en un estado reducido con la emisión de fluorescencia y producción de color; y
- d) Determinar la actividad de dicha FBPasa midiendo la fluorescencia y/o color emitido por dicho compuesto colorante reducido.

En una realización preferida del método de la invención, este se caracteriza por que el compuesto colorante comprendido en la solución de detección de la etapa c) es la resazurina, y el compuesto colorante obtenido tras la reacción de reducción de la resazurina es resorufina. También preferiblemente, la solución de detección de la etapa c) comprende al menos un catión divalente (por ejemplo, Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>), y preferiblemente a una concentración de al menos 1 mM, más preferiblemente al menos 3 mM.

5 Específicamente, el método descrito en la presente invención mide la cantidad de NAD(P)<sup>+</sup> producido por la reacción bioquímica catalizada por la enzima cuya actividad se está determinando, y acoplado al color y/o fluorescencia generada por la reducción del compuesto colorante/fluorescente, específicamente resazurina o un análogo colorante/fluorescente del mismo. Así, la forma reducida de NAD(P)<sup>+</sup> o de un análogo del mismo, es decir, NAD(P)H o análogo del mismo, se utiliza a continuación para facilitar la conversión de un colorante desde un estado oxidado a un estado reducido. El colorante tiene un estado oxidado y un estado reducido, y el estado reducido puede ser distinguido del estado oxidado en que el estado reducido se asocia con la emisión de fluorescencia, y con un color diferente, mientras que el estado oxidado está sustancialmente libre de emisión de fluorescencia y presenta un color diferente al del estado reducido. Como se ha indicado anteriormente, el colorante en estado oxidado es resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) o una sal o análogo del mismo. La resazurina, que tiene un color azul oscuro y está libre de emisión de fluorescencia, pero en presencia de NAD(P)H se reduce a resorufina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona) que muestra un color rosa y emite fluorescencia que puede detectarse en un fluorímetro a una determinada longitud de onda, preferiblemente a 587 nm de longitud de onda (la resorufina cuando es excitada a una longitud de ondas de 540 nm emite una señal a 590 nm, que se puede cuantificar en un fluorímetro). Tanto la medición cualitativa como cuantitativa de la fluorescencia emitida por la resorufina da una indicación de la actividad de la enzima que se ensaya. De la misma manera, una escala de color basada en una curva patrón permite determinar cualitativa y cuantitativamente también, la actividad de la enzima ensayada.

25 El método descrito en la presente invención es aplicable a todas las enzimas implicadas en el metabolismo del carbono y la síntesis de azúcares en los frutos de vegetales y que lleven asociadas la producción de NAD(P)H, directa o indirectamente.

30 En una realización preferida, el método de la invención se caracteriza por que la muestra vegetal procede de una planta de fresa. En otra realización más preferida aún, el método de la invención se caracteriza por que la muestra vegetal es una muestra de hoja.

35 En otra realización más preferida del método de la invención, la muestra vegetal se incuba en la etapa a) en una solución fijadora durante un rango de tiempo que varía

de entre 60-240 minutos, preferentemente entre 120-200 minutos y más preferentemente 150 minutos.

5 En otra realización más preferida del método de la invención, este se caracteriza por que la solución fijadora comprende paraformaldehído a una concentración de entre 1-5%, preferentemente a una concentración del 2%; polivinilpirrilodona 40 (PVP40) a una concentración de entre 1-5%, preferentemente a una concentración del 2%, y donde dicha solución fijadora presenta un pH de entre 6-8, preferentemente un pH 7.

10 En otra realización más preferida del método de la invención, este se caracteriza por que el sustrato de la enzima FBPasa es la fructosa-1,6-bisfosfato (FBP).

15 En otra realización más preferida del método de la invención, éste se caracteriza por que la enzima auxiliar necesaria para determinar la actividad enzimática de la enzima FBPasa mediante el método descrito aquí es la PGI.

20 En otra realización más preferida del método de la invención, este se caracteriza por que comprende además la determinación de la actividad de las enzimas seleccionadas de la lista que consiste en: G6PDH, PGI, HK, UGPasa, AGPasa, Mal y/o cualquier combinación de las mismas.

25 En otra realización más preferida aún, el método de la invención se caracteriza por que la determinación de todas las actividades enzimáticas mencionadas previamente se realiza de forma simultánea.

30 En otra realización más preferida aún, el método de la invención se caracteriza por que para la determinación simultánea de todas las actividades enzimáticas, la solución de reacción descrita en la etapa b) del método, comprende las enzimas auxiliares necesarias para determinar la actividad enzimática de cada una de dichas enzimas.

35 En otra realización más preferida aún, para la determinación de las actividades G6PDH y PGI mediante el método de la presente invención se utiliza como sustrato la G6P para ambas actividades, y en estos casos particulares no es necesaria la aportación de enzimas auxiliares. Para la determinación de las actividades AGPasa y UGPasa los sustratos específicos son ADP-glucosa y UDP-glucosa respectivamente, y la enzima auxiliar para la determinación de ambas actividades es fosfoglucomutasa

(PGM). Para la determinación de la actividad HK el sustrato es la glucosa y no es necesaria la aportación de ninguna enzima auxiliar, y para la determinación de la actividad Mal el sustrato es la maltosa y las enzimas auxiliares son HK y G6PDH.

5 En otra realización preferida del método de la invención este se caracteriza por que la reacción de la etapa c) se produce en presencia de una solución de detección que comprende cada uno de los sustratos específicos de las enzimas mencionadas y además, diaforasa y como se ha mencionado previamente, al menos un catión divalente. En otra realización preferida, los cationes divalentes se seleccionan de la  
10 lista que consiste en  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y/o combinaciones de los mismos. En otra realización más preferida aún, el catión divalente es preferentemente  $Mg^{2+}$ .

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un kit o dispositivo útil para llevar a cabo el método descrito en la presente invención. Por lo tanto, la presente  
15 invención también describe un kit para la determinación de la actividad de cualquiera de las enzimas seleccionadas de la lista que consiste en FBPasa, G6PDH, PGI, HK, UGPasa, AGPasa, Mal y/o cualquier combinación de las mismas, caracterizado por que comprende (1) una solución de reacción que comprende al menos una de las enzimas auxiliares necesarias para la determinación de la actividad de la enzima de  
20 interés, tales como PGI, G6PDH, PGM y HK mencionadas anteriormente y/o cualquier combinación de las mismas, cofactores  $NAD(P)^+$  y/o ATP, y un colorante en estado oxidado, preferentemente resazurina o una sal del mismo; (2) una solución de detección que comprende cada uno de los sustratos específicos de las enzimas de  
25 de dichos cationes divalentes (por ejemplo,  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ). En otra realización más preferida aún, el catión divalente preferido es  $Mg^{2+}$ .

En una realización más preferida aún, los sustratos se seleccionan de la lista que consiste en FBP, G6P, glucosa, UDP glucosa, ADP glucosa y/o maltosa.

30

En otra realización preferida, el kit descrito en la presente invención contendrá en un vehículo o contenedor compartimentado, los reactivos mencionados anteriormente. El vehículo puede ser un contenedor o soporte, en forma de, por ejemplo, bolsa, caja, tubo, frasco, estante, y está opcionalmente compartimentada. El vehículo puede  
35 definir un confinamiento cerrado por motivos de seguridad durante el transporte y almacenamiento.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso del kit aquí descrito para la determinación de cualquiera de las actividades enzimáticas seleccionadas de la lista que consiste en FBPasa, G6PDH, PGI, HK, UGPasa, AGPasa, Mal y/o cualquier combinación de las mismas, preferentemente en una muestra vegetal y más preferentemente en una muestra de hoja, preferentemente de plantas de fresa.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIGURA 1.** Curva patrón de la reacción de oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> acoplada a la reacción de resazurina a resorufina determinada en el fluorímetro. El eje X indica la concentración de NADPH expresada en  $\mu\text{M}$  y en el eje Y la fluorescencia analizada expresada como 1/s.

**FIGURA 2.** Cinética de la actividad FBPasa analizada mediante el método *in situ* de la invención. En **(A)** se muestra los resultados del test colorimétrico y en **(B)** los resultados del test fluorimétrico.

**FIGURA 3.** Cinética de la actividad AGPasa analizada mediante el método *in situ* de la invención. En **(A)** se muestra los resultados del test colorimétrico y en **(B)** los resultados del test fluorimétrico. Cada valor es la media de seis determinaciones independientes, cada una con 5 discos de hojas de fresa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Se indican las diferencias significativas con respecto a la variedad Niebla considerada la línea control (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; según t-Student).

**FIGURA 4.** Cinética de la actividad UGPasa analizada mediante el método *in situ* de la invención. En **(A)** se muestra los resultados del test colorimétrico y en **(B)** los resultados del test fluorimétrico. Cada valor es la media de seis determinaciones independientes, cada una con 5 discos de hojas de fresa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Se indican las diferencias

significativas con respecto a la variedad Niebla considerada la línea control (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ ; según t-Student).

5 **FIGURA 5.** Cinética de la actividad HK analizada mediante el método *in situ* de la invención. En **(A)** se muestra los resultados del test colorimétrico y en **(B)** los resultados del test fluorimétrico. Cada valor es la media de seis determinaciones independientes, cada una con 5 discos de hojas de fresa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Se indican las diferencias significativas con respecto a la variedad Niebla considerada la línea control (\*  $p < 0,05$  según t-Student).

10 **FIGURA 6.** Cinética de la actividad Mal analizada mediante el método *in situ* de la invención. En **(A)** se muestra los resultados del test colorimétrico y en **(B)** los resultados del test fluorimétrico. Cada valor es la media de seis determinaciones independientes, cada una con 5 discos de hojas de fresa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Se indican las diferencias significativas con respecto a la variedad Niebla considerada la línea control (\*\*  $p < 0,01$  según t-Student).

15 **FIGURA 7.** Valores de los °Brix determinados en las variedades de fresa Primoris, Antilla, Niebla y Rábida a lo largo del tiempo. En el eje X se muestra el periodo de tiempo en el que se llevó a cabo el análisis y en el eje Y los °Brix.

20 **FIGURA 8.** Valores de los °Brix en los frutos de las variedades de fresa Primoris, Antilla, Niebla y Rábida analizados durante el mes de Abril donde los frutos muestran un mayor nivel de °Brix.

**FIGURA 9.** Actividad FBPasa (eje Y) analizada mediante el método de la invención para cada una de las variedades de fresa Primoris, Antilla, Niebla y Rábida (eje X).

25 **FIGURA 10.** Cinética de la actividad FBPasa o G6PDH a lo largo del tiempo analizado en un extracto proteico de hojas de plantas de fresa y midiendo en un espectrofotómetro la absorbancia producida por el NADPH generado. En el eje X se muestra el tiempo expresado en minutos y en el eje Y se muestra la actividad FBPasa.

### 30 **EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del método de la invención.

35 **Ejemplo 1. Determinación de la actividad enzimática *in situ* en hojas de plantas de fresa.**

Para la determinación de la actividad enzimática *in situ* de diferentes enzimas directamente sobre hojas de plantas de fresa se utilizaron cuatro variedades diferentes de plantas de fresa, concretamente las variedades Antilla, Primoris, Niebla y 5 Rábida. Dichas variedades vegetales pertenecen a la empresa Fresas Nuevos Materiales S.A. (FNM) con sede en Huelva (España).

Las actividades enzimáticas analizadas, relacionadas con el metabolismo del carbono y elegidas como marcadores enzimáticos idóneos para la predicción del contenido de 10 azúcares solubles en frutos han sido: G6PDH, PGI, HK, UGPasa, AGPasa, FBPasa y Mal.

Tal y como se ha mencionado a lo largo del presente documento, el método aquí descrito se basa en la detección de NADH o NADPH liberado tras la reducción de 15  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  llevada a cabo por las enzimas analizadas. Para permitir el seguimiento visual de dichas reacciones de reducción se ha acoplado una reacción colorimétrica gracias al uso del sistema resazurina-diaforasa que en presencia de NADPH induce un cambio de color de la resazurina (color azul oscuro) a resorufina (color rosa), cuando se oxida el NADPH a  $\text{NADP}^+$ . Así, una escala de color permite 20 valorar visualmente *in situ* el grado de actividad de cada una de las actividades enzimáticas analizadas en función de la tonalidad que se obtenga en dicha reacción de oxidación. De manera alternativa, el sistema resazurina-diaforasa también permite una cuantificación más precisa utilizando un fluorímetro, ya que la resorufina emite fluorescencia a una longitud de onda de 587 nm cuando es excitada a 540 nm. La 25 actividad enzimática para cada una de las enzimas analizadas mediante el método aquí descrito se relacionará posteriormente con el contenido de azúcar de los frutos determinado en forma de °Brix mediante un refractómetro (ATAGO-PR-35).

Para llevar a cabo el método para la determinación *in situ* de las actividades 30 enzimáticas mencionadas previamente, se hace uso de un sacabocados de diámetro fijo (aproximadamente 6mm) para obtener muestras de las hojas de cada variedad de planta de fresa analizada, Antilla, Primoris, Niebla y Rábida. Se obtuvieron seis muestras de cada variedad para determinar de manera óptima las cinéticas para cada una de las enzimas analizadas. El tamaño de las muestras de hoja seleccionado, 35 6mm, es el adecuado para introducirlas directamente en los pocillos de las placas

multipocillo *microtiter* utilizadas, pero dicho tamaño se adecuará al soporte utilizado para llevar a cabo el método aquí descrito.

5 La recogida de dichas muestras de cada variedad de fresa se llevó a cabo a lo largo del periodo de cultivo que comprendió los meses de enero a mayo. Se realizaron las recogidas de muestras y los análisis de las actividades enzimáticas *in situ*, para cada una de las variedades de fresa mencionadas en tres fases diferentes durante el periodo de cultivo del año 2015 comprendido entre los meses de enero a mayo. Específicamente las recogidas de las muestras se llevaron a cabo en el inicio de la  
10 campaña (27.01.2015 al 09.03.2015), en plena campaña (11.03.2015 al 13.04.2015) y al final de campaña (21.04.2015 al 26.05.2015).

Con la finalidad de determinar específicamente la actividad de cada una de las enzimas, y evitar que se detecte ruido procedente de la determinación enzimática  
15 relacionada con otros procesos diferentes a los de interés, se sometió a los discos de las hojas a un tratamiento previo para fijar las muestras de hojas de las variedades de fresa. Brevemente, tras cortar los discos de las hojas de las variedades de fresa mencionadas arriba estos se sumergen en una solución fijadora tampón que comprende 2% de paraformaldehído, 2% de polivinilpirrolidona 40 (PVP 40) y pH 7.  
20 Tras dos horas y media de incubación y varios lavados en agua se garantiza que el material vegetal está fijado y que se han eliminado todos los metabolitos que pudieran interferir en las determinaciones de las actividades enzimáticas de interés.

Tras la etapa de fijación, las muestras se introducen en los pocillos de las placas en  
25 las que se va a realizar la determinación de la actividad enzimática específica, llevándose a cabo tres repeticiones de las muestras de discos de hojas para cada medida de cada actividad enzimática analizada y por cada variedad de fresa. Bien a continuación, o previamente a la introducción de los discos en los pocillos, se añaden 200 µL de la solución de reacción, específica para cada actividad enzimática, y que  
30 comprende como elementos comunes para todas las actividades analizadas, el colorante resazurina (2mM), cofactores específicos tales como por ejemplo, NAD(P)<sup>+</sup> y ATP, y las enzimas auxiliares para cada enzima analizada. En función de la actividad enzimática analizada las enzimas auxiliares necesarias son:

- para el análisis de la actividad FBPasa: 0,8 µl de PGI 500U/ml y G6PDH 350  
35 U/ml, en presencia de una solución tampón que asegura que se mantenga el pH adecuado para que se dé la reacción (Tabla 1);

- para el análisis de la actividad HK y Mal: G6PDH 350 U/ml en presencia de una solución tampón que asegura que se mantenga el pH adecuado para que se dé la reacción (Tabla 1);
- 5     • para el análisis de la actividad AGPasa: 0,2 µl PGM 1800 U/ml; G6PDH 350 U/ml en presencia de una solución tampón que asegura que se mantenga el pH adecuado para que se dé la reacción (Tabla 1);
- para el análisis de la actividad UGPasa: 0,2 µl PGM 1800 U/ml y G6PDH 350 U/ml en presencia de una solución tampón que asegura que se mantenga el pH adecuado para que se dé la reacción (Tabla 1);
- 10   • para el análisis de la actividad PGI y G6PDH: G6PDH 350 U/ml en presencia de una solución tampón que asegura que se mantenga el pH adecuado para que se dé la reacción (Tabla 1).

15     Como se puede observar, esta solución de reacción comprende los elementos necesarios para determinar cada una de las actividades enzimáticas específicas que se quieren analizar en la presente invención y además, las enzimas auxiliares necesarias para determinar la actividad enzimática concreta, las soluciones tampón para asegurar las condiciones de pH, así como el colorante resazurina necesario para la posterior determinación colorimétrica. A continuación, se añade otra solución, que  
20     se denomina de manera general solución de detección que comprende el sustrato específico para cada enzima analizada, diaforasa (0,008 U/ml) y los cationes divalentes específicos, preferentemente magnesio.

25     Los sustratos específicos para cada enzima a ensayar son: para la determinación de la actividad FBPasa se añaden 12 µl de FBP (200 mM); para la determinación de la actividad HK se añaden 12 µl de glucosa (1M); para la determinación de la actividad AGPasa se añaden 32 µl de ADP glucosa (16 mM) y para la determinación de la actividad UGPasa se añaden 30 µl de UDP glucosa (100 mM).

30     Se mantiene en agitación suave a una temperatura de 25 °C hasta que aparezca el color. Una vez que aparece el color, se retiran los discos de hojas y se fotografía la placa para analizar la intensidad del color y/o se cuantifica la fluorescencia en un fluorímetro. La tonalidad del color que aparezca en cada caso y/o la intensidad de la fluorescencia que se mida, indicará según la escala una mayor o menor actividad de  
35     la enzima ensayada. En todos estos análisis se incluyen controles negativos.

En la Tabla 1 se describe la composición de las soluciones de reacción y de detección en función de la actividad enzimática concreta analizada.

**Tabla 1.** Composición de las soluciones de reacción y detección necesarias para determinar la actividad enzimática según el método de la invención.

<b>Actividad enzimática</b>	<b>Solución de reacción</b>	<b>Solución de detección</b>
FBPasa	NADP <sup>+</sup> 1mM G6PDH 1U PGI 1U Resazurina 0,04 mM	Tris HCl pH 8 200 mM FBP 12mM MgCl <sub>2</sub> 5mM Diaforasa 0,0002U/ml
HK	NADP <sup>+</sup> 1 mM G6PDH 1U ATP 0,25 mM Resazurina 0,04 mM	Hepes pH7,5 100 mM Glucosa 100 mM MgCl <sub>2</sub> 4 mM Diaforasa 0,0002 U/ml
AGPasa	NADP <sup>+</sup> 1 mM BSA 0,2mM G6PDH 1U PGM 1U PPi 1mM Resazurina 0,04 mM	Hepes pH 7,5 60mM MgCl <sub>2</sub> 4 mM ADP-Glucosa 2,5mM Diaforasa 0,0002 U/ml
UGPasa	NADP <sup>+</sup> 0,5 mM G6PDH 1U PGM 1U PPi 1mM Resazurina 0,04 mM	Tris HCl pH 7 150mM UDP-Glucosa 15mM Diaforasa 0,0002 U/ml MgCl <sub>2</sub> 2 mM

10 Para poder extrapolar los valores de fluorescencia de las muestras objeto de estudio es necesario medir previamente la producción de NADP<sup>+</sup> en una curva patrón con cantidades conocidas de NADPH. Para ello, se preparó una curva que consta de doce puntos de concentración creciente de NADPH, que variarán desde 0 a 100 μM. Se parte de un stock de NADPH (1mM). Los valores de concentración de NADPH son exactamente 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μM (Tabla 2).

15

La obtención de los valores de la curva patrón de NADPH se lleva a cabo en dos etapas. En primer lugar se añade el NADPH a las concentraciones mencionadas en la Tabla 2, en cada uno de los pocillos de la placa donde se encuentran también las muestras de hojas. A continuación, se añade el volumen de agua según se indica en

la Tabla 2 y posteriormente se añaden los volúmenes indicados en la Tabla 2 del tampón patrón que comprende:

	Resazurina 2 mM .....	49,2 (μl)
	Diaforasa 0.008 U/ml .....	61,5 (μl)
5	Tampón Tris HCL (1M) pH 8.....	246,0 (μl)
	MgCl <sub>2</sub> (1M).....	9,8 (μl)
	Agua destilada.....	1847,5 (μl)

El proceso de obtención de la curva patrón se realiza en frío y en agitación suave y a una temperatura de 25°C hasta la obtención del color. Una vez obtenido dicho color, se retiran los discos, se fotografía la placa y/o se cuantifica en un fluorímetro. En la Figura 1 se muestra la curva patrón de la reducción de resazurina a resofurina acoplada a la oxidación del NADPH generado.

15 **Tabla 2.** Curva patrón de producción de NADPH

NADPH (μM)	Vol. H <sub>2</sub> O (μl)	Tampón patrón (μl)
0	20	0
5	19	1
10	18	2
20	16	4
30	14	6
40	12	8
50	10	10
60	8	12
70	6	14
80	4	16
90	2	18
100	0	20

De esta manera se determinaron las cinéticas para cada actividad enzimática descrita anteriormente, tanto de forma colorimétrica, como fluorimétrica. En la Figura 2 se muestra el análisis de la actividad FBPasa llevada a cabo según el método descrito en la presente invención, tanto de forma colorimétrica como fluorimétrica. La actividad FBPasa va principalmente dirigida a la síntesis de sacarosa y almidón.

35

De manera general, se va a describir en detalle el método para la determinación *in situ* de la actividad de la enzima FBPassa, para que sirva como ejemplo para el resto de los análisis de las actividades enzimáticas descritas en el presente documento. Así, la determinación de la actividad enzimática FBPassa en una muestra de 5 discos de hoja y un volumen final de 200 µl se lleva a cabo de la siguiente manera.

En primer lugar, las muestras de discos de hoja se lavan y se sumergen durante aproximadamente 150 min en la solución de fijación (2% de paraformaldehído, 2% de PVP 40 y pH 7). Tras dos horas y media de incubación y varios lavados en agua se garantiza que el material vegetal está fijado y que se han eliminado todos los metabolitos que pudieran interferir en las determinaciones de las actividades enzimáticas de interés. Durante este tiempo se prepara en un tubo *ependorf* frío la solución de reacción, que se mantiene en agitación suave y en frío:

<b>Solución de reacción</b>	<b>Volumen (µl)</b>
Solución tampón Tris-HCl pH 8	178,0
Enzima auxiliar PGI 500 U/mL	0,4
Enzima auxiliar G6PDH 350 U/ml	0,6
Resazurina 2mM	4,0

En paralelo, se prepara también la solución de detección que comprende:

<b>Solución de detección</b>	<b>Volumen (µl)</b>
Diaforasa 0,008U/ml	5,0
MgCl <sub>2</sub>	9,8

Se mezclan ambas soluciones, la solución de reacción y la solución de detección, y se mantienen en frío. Transcurrido el tiempo de fijación, las muestras de hojas se introducen en el pocillo de la placa Petri y se añaden 188 µl de la mezcla de la solución de reacción y la de detección. Posteriormente, se añaden 12 µl del sustrato específico de la actividad enzimática ensayada, en este ejemplo particular, se añaden 12 µl de FBPassa para que se desencadene la reacción enzimática. Como control negativo

se añade el mismo volumen de agua destilada en lugar del sustrato específico de la actividad enzimática analizada.

5 Se incuba la placa a una temperatura aproximada de 25°C para que se desarrolle la reacción. Transcurrido el tiempo, cuando aparezcan los cambios de color y estos se mantengan estables, se retiran los discos de hoja y se cuantifica colorimétricamente y/o fluorimétricamente la actividad enzimática analizada.

10 Como se puede observar en la Figura 2, las variedades Niebla y Rábida son las que mayor actividad FBPasa muestran, mientras que la variedad Antilla es la que menos actividad presenta. No existen diferencias significativas en cuanto a la actividad FBPasa entre las variedades Niebla y Rábida vs Antilla y Primoris.

15 De la misma manera que se ha llevado a cabo el análisis de la actividad FBPasa mediante el método *in situ* descrito en la presente invención, se determinan las actividades cinéticas de las enzimas AGPasa, UGPasa y HK, teniendo en cuenta que cada una de ellas utiliza sus enzimas auxiliares y sustratos específicos (Tabla 1).

20 En la Figura 3 se muestra el análisis de la actividad AGPasa llevada a cabo según el método descrito en la presente invención. Dicha actividad enzimática va principalmente dirigida a la síntesis de almidón. Como se puede observar en dicha Figura 3, las variedades Niebla y Rábida son las que mayor actividad AGPasa muestran, y Antilla la que menos. Los valores corresponden a la media de seis determinaciones independientes, cada una con 5 discos de hojas de fresa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Se muestran las diferencias significativas en la figura 3 para las variedades Primoris y Antilla con respecto a la variedad Niebla considerada la línea control.

30 En la Figura 4 se muestra el análisis de la actividad UGPasa llevada a cabo según el método descrito en la presente invención. La actividad UGPasa va principalmente dirigida a la síntesis de sacarosa. Como se puede observar en dicha Figura 4, la variedad Niebla es la que mayor actividad UGPasa muestra y Antilla la que menos. Los valores corresponden a la media de seis determinaciones independientes, cada una con 5 discos de hojas de fresa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Se muestran las diferencias significativas en la figura 4 para las

35

variedades Primoris y Antilla con respecto a la variedad Niebla considerada la línea control.

5 En la Figura 5 se muestra el análisis de la actividad HK llevada a cabo según el método descrito en la presente invención, mediante el test colorimétrico y mediante la determinación de la fluorescencia utilizando un fluorímetro. La actividad HK va principalmente dirigida a la glucólisis. Como se puede observar en dicha Figura 5, la variedad Rábida es la que mayor actividad HK muestra, y la que menos, la variedad Antilla. Los valores corresponden a la media de seis determinaciones independientes, cada una con 5 discos de hojas de fresa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Se muestran las diferencias significativas en la figura 5 para la variedad Rábida con respecto a la variedad Niebla considerada la línea control.

15 En la Figura 6 se muestra el análisis de la Mal llevada a cabo según el método descrito en la presente invención, mediante el test colorimétrico y mediante la determinación de la fluorescencia utilizando un fluorímetro. La actividad Mal va principalmente dirigida a la síntesis de glucosa. Como se puede observar en dicha Figura 6, la variedad Primoris es la que mayor actividad Mal muestra, mientras que la variedad Antilla es la que menor actividad Mal tiene. Los valores corresponden a la media de seis determinaciones independientes, cada una con 5 discos de hojas de fresa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Se muestran las diferencias significativas en la figura 6 para la variedad Primoris y Antilla con respecto a la variedad Niebla considerada la línea control.

25 Como se ha indicado anteriormente, en los frutos de las plantas de las que se obtuvieron las muestras de hojas se determinaron los °Brix mediante un refractómetro para ver si la actividad enzimática analizada se relaciona con el contenido en azúcares en los frutos. Por un lado se determinaron los °Brix de todas las variedades de fresa analizadas en el inicio de campaña (27.01.2015 al 09.03.2015), en plena campaña (11.03.2015 al 13.04.2015) y al final de campaña (21.04.2015 al 26.05.2015). En la Figura 7 se muestran los valores de °Brix de todas las variedades de fresa analizadas a lo largo de toda la campaña.

35 También se analizaron los °Brix para cada una de las variedades de fresa analizadas en el presente documento durante el mes de abril que fue el mes de mayor

producción. Como se muestra en la Figura 8 la variedad Rábida es la que mayor °Brix presenta, seguida de Primoris, Antilla y por último Niebla. Además, la actividad FBPassa analizada en el presente documento mediante el método de la invención está asociada con el incremento de los °Brix en fruto (Figura 9), siendo por tanto el incremento en dicha actividad enzimática, analizado mediante el método descrito en la presente invención, un marcador potencial de predicción del mayor contenido de azúcares solubles en dichas plantas.

A continuación, se llevó a cabo un análisis estadístico de componentes principales (PCA) dando lugar a tres componentes principales (PC1, PC2 y PC3) cuyos valores principales están por encima de la unidad. El PC1 explica por sí solo un 44,8%, el PC2 23,4% y el PC3 el 17,8% y la varianza total explicada es del 85,9%. Dicho análisis estadístico (PCA) mostró que los contenidos de azúcares en hojas están correlacionados de forma negativa a los °Brix y al contenido de azúcares en fruto. Poniéndose en evidencia la importancia del transporte de azúcares desde las hojas donde ocurre la fotosíntesis, hacia los frutos (Tabla 3)

**Tabla 3.** Matriz de correlación entre la presencia °Brix y el contenido de azúcares en hojas respecto a frutos.

Matriz de correlación			
	Glucosa (hojas)	Fructosa (hojas)	Sacarosa (hojas)
Glucosa (hojas)	1,000	0,580	0,125
Fructosa (hojas)	0,580	1,000	0,451
Sacarosa (hojas)	0,125	0,451	1,000
Glucosa (frutos)	0,234	-0,342	0,066
Fructosa (frutos)	0,210	-0,372	-0,005
Sacarosa (frutos)	0,472	0,045	0,284
°Brix	0,182	-0,217	-0,140

De igual manera, dicho análisis estadístico demostró que los °Brix en fruto se asocian de forma positiva a la actividad FBPasa, UGPasa y AGPasa, contrariamente a lo que ocurre con la enzima HK.

5

Todos estos resultados ponen de manifiesto que el mejor marcador para predecir el contenido de azúcar en los frutos de las plantas, en etapas anteriores a la producción es la enzima FBPasa. Adicionalmente, otros marcadores útiles son la UGPasa, ADPasa y en menor grado la Mal.

10

Para demostrar la eficacia del método *in situ* para la determinación de la actividad enzimática en hojas de plantas de fresa descrito en la presente invención, frente a los métodos utilizados comúnmente en la técnica, tales como la determinación de la actividad enzimática en extractos o “*pools*” de hojas de plantas de fresa, se llevó a cabo la determinación de la actividad de la FBPasa en un extracto proteico de hojas de plantas de fresa. Como se muestra en la Figura 10, el análisis de dicha actividad a lo largo del tiempo indica una irregularidad que hace imposible determinar de manera estable la actividad enzimática, impidiendo por tanto utilizar ese método para la determinación de la actividad enzimática, y menos aún asociar la actividad enzimática con el contenido de azúcares en los frutos de las plantas analizadas.

15

20

## REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación *in situ* de la actividad de la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) en una muestra vegetal obtenida de plantas de fresa que comprende:
  - a) Incubar la muestra vegetal en una solución fijadora,
  - b) Contactar la muestra fijada en la etapa a) con una solución de reacción que comprende las enzimas auxiliares fosfoglucoasa isomerasa (PGI) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y los cofactores  $\text{NAD(P)}^+$  y ATP,
  - c) Reaccionar el  $\text{NAD(P)}^+$  o un análogo del mismo en presencia de una solución de detección que comprende el sustrato de la enzima FBPasa y resazurina o una sal del mismo, y
  - d) Determinar la actividad de dicha FBPasa midiendo la fluorescencia emitida y/o color producido en la reacción de reducción de resazurina a resorufina de la etapa anterior.
2. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que el sustrato de la enzima FBPasa es fructosa-1,6-bisfosfato.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que además comprende la determinación de la actividad de cualquiera de las enzimas seleccionadas de la lista que consiste en: G6PDH, PGI, hexoquinasa (HK), UDP glucosa pirofosforilasa (UGPasa), ADP glucosa pirofosforilasa (AGPasa), maltasa (Mal) y/o cualquier combinación de las mismas.
4. Método según la reivindicación 3 caracterizado por que la solución de reacción la etapa b) comprende además las enzimas auxiliares específicas para la determinación de dichas actividades enzimáticas.
5. Método según la reivindicación 3 caracterizado por que la solución de detección de la etapa c) comprende además el sustrato específico para la determinación de dichas actividades enzimáticas.

6. Método según la reivindicación 4 donde las enzimas auxiliares se seleccionan de la lista que consiste en: fosfoglucomutasa (PGM), HK, G6PDH y/o cualquier combinación de las mismas.
- 5 7. Método según la reivindicación 5 donde el sustrato de la G6PDH y de la PGI es glucosa-6-fosfato (G6P), el sustrato de la HK es glucosa, el sustrato de la UGPasa es UDP glucosa, el sustrato de la AGPasa es ADP glucosa y el sustrato de la Mal es la maltosa.
- 10 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la solución de detección de la etapa c) comprende además diaforasa y al menos un catión divalente.
- 15 9. Método según la reivindicación 8 donde los cationes divalentes se seleccionan de la lista que consiste en:  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y/o combinaciones de los mismos.
- 20 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde las actividades enzimáticas FBPasa, G6PDH, PGI, HK, UGPasa, AGPasa, Mal y/o cualquier combinación de las mismas, se determinan simultáneamente.
- 25 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde la solución fijadora comprende: paraformaldehído a una concentración de entre 1 a 5%, preferiblemente a una concentración del 2%; polivinilpirrilodona 40 a una concentración de entre 1-5%, preferentemente a una concentración del 2% y donde dicha solución fijadora presenta un pH de entre 6-8, preferentemente pH 7.
- 30 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la solución fijadora comprende paraformaldehído a una concentración del 2%, polivinilpirrilodona a una concentración del 2% y pH 7.
- 35 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde la muestra vegetal de la etapa a) se mantiene al menos 120 minutos en la solución fijadora.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde la muestra vegetal de la etapa a) se mantiene al menos 150 minutos en la solución fijadora.
- 5 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 donde la muestra vegetal es una muestra de hoja.
- 10 16. Kit para la determinación de la actividad de cualquiera de las enzimas seleccionadas de la lista que consiste en: FBPasa, G6PDH, PGI, HK, UGPasa, AGPasa, Mal y/o cualquier combinación de las mismas, caracterizado por que comprende: (1) una solución de reacción que comprende cofactores NAD(P)<sup>+</sup> y/o ATP, enzimas auxiliares y resazurina o una sal del mismo; y (2) una solución de detección que comprende los sustratos específicos para cada actividad enzimática analizada y/o cualquier combinación de los mismos, diaforasa, y al menos un catión divalente.
- 15 17. Kit según la reivindicación 16 donde los sustratos se seleccionan de la lista que consiste en FBP, G6PDH, glucosa, UDP glucosa, ADP glucosa, maltosa y/o cualquier combinación de los mismos.
- 20 18. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17 donde las enzimas auxiliares se seleccionan de la lista que consiste en PGM, HK, G6PDH y/o cualquier combinación de las mismas.
- 25 19. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 donde los cationes divalentes se seleccionan de la lista que consiste en Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y/o combinaciones de los mismos.
- 30 20. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 para la determinación de cualquiera de las actividades enzimáticas seleccionadas de la lista que consiste en FBPasa, G6PDH, PGI, HK, UGPasa, AGPasa, Mal y/o cualquier combinación de las mismas, en una muestra vegetal de plantas de fresa.
- 35 21. Uso según la reivindicación 20 donde la muestra vegetal es una muestra de hoja.

## DIBUJOS

FIGURA 1

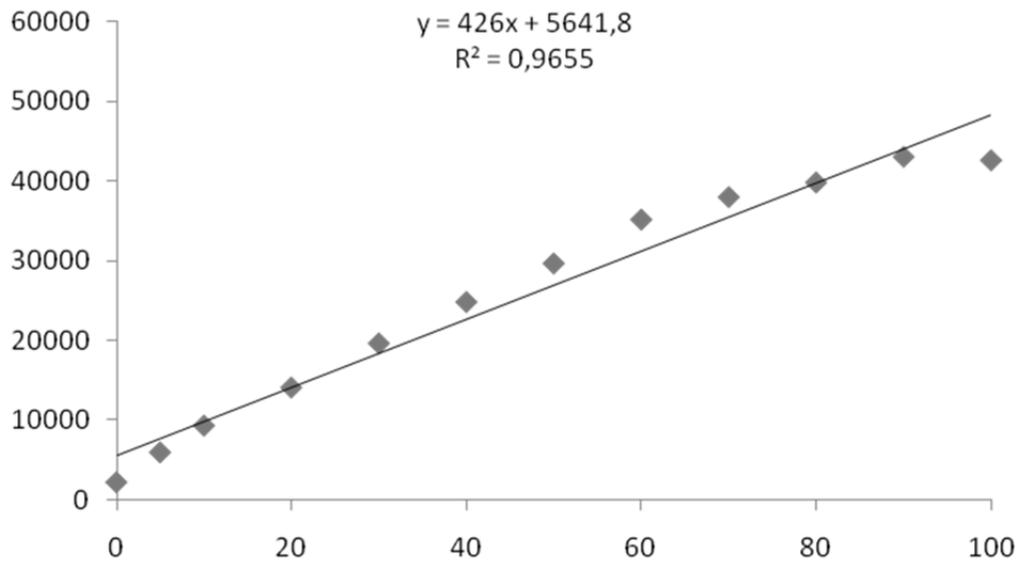
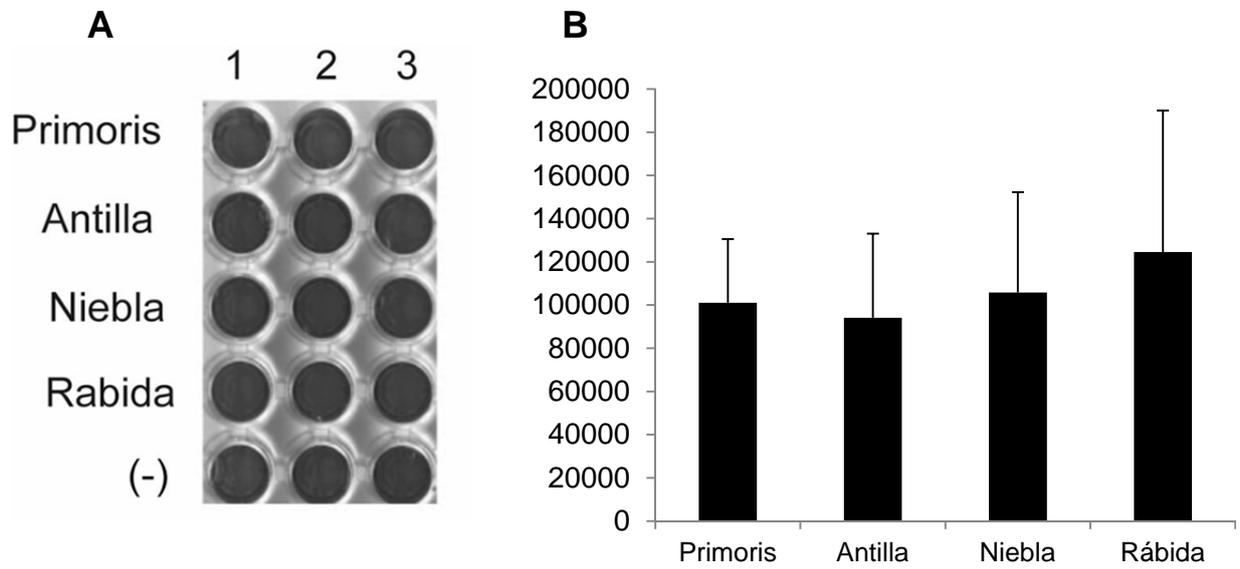
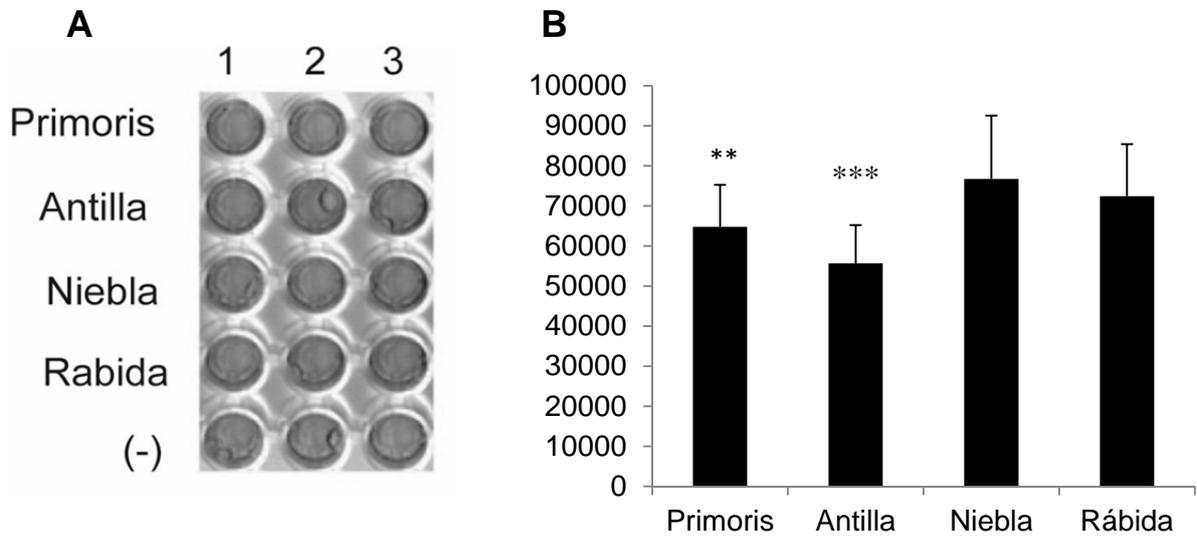


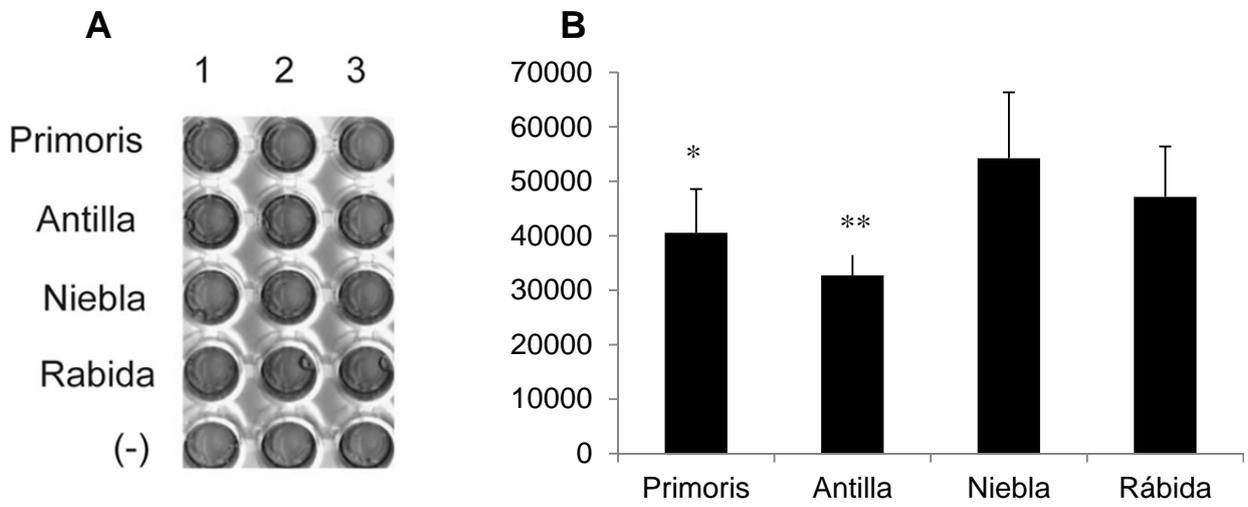
FIGURA 2



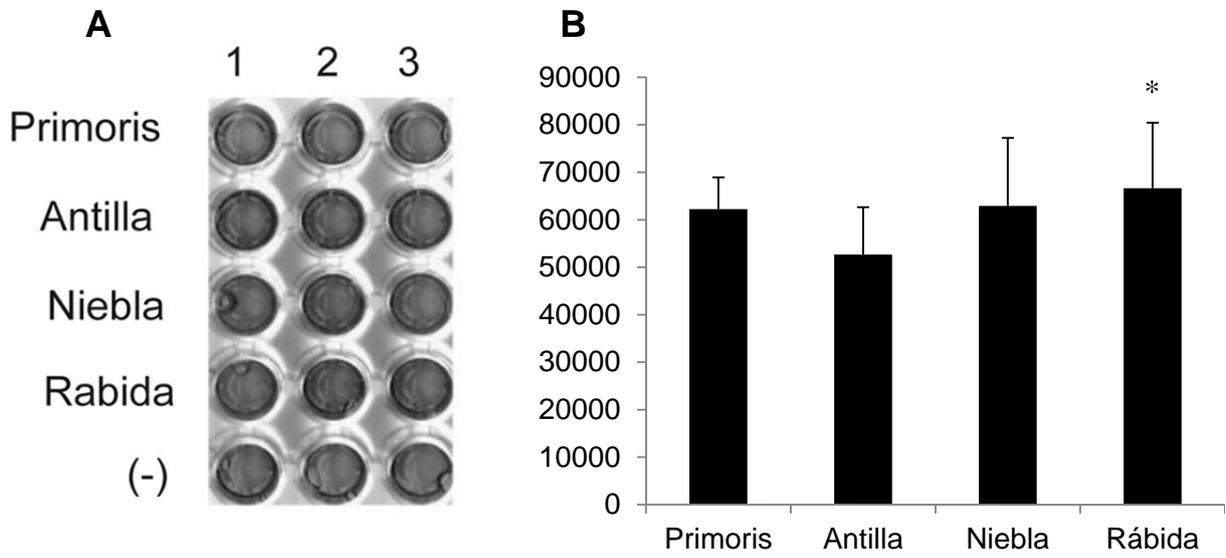
**FIGURA 3**



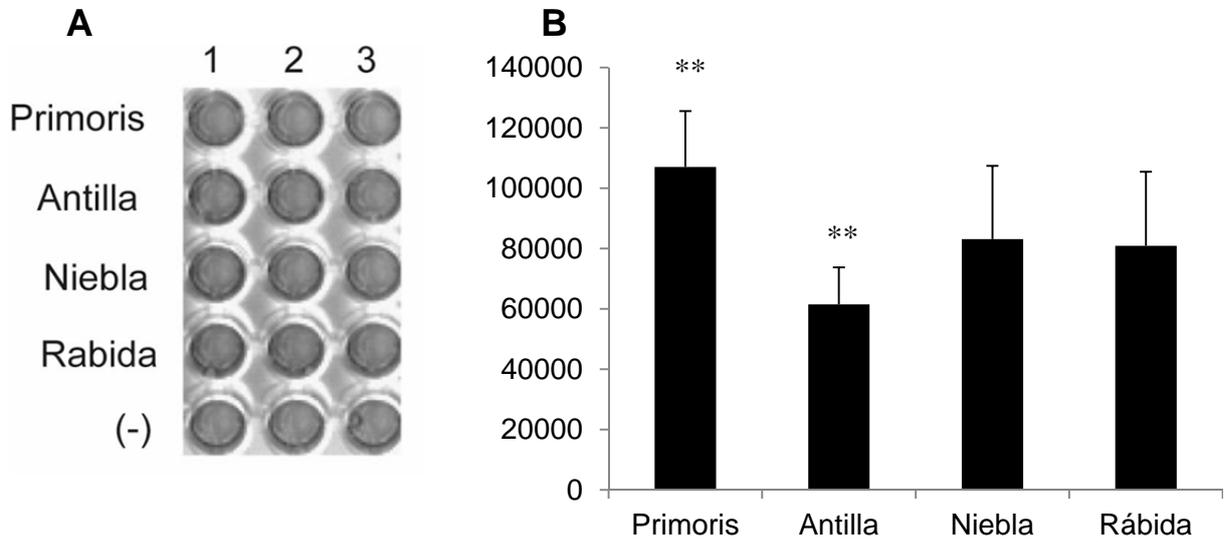
**FIGURA 4**



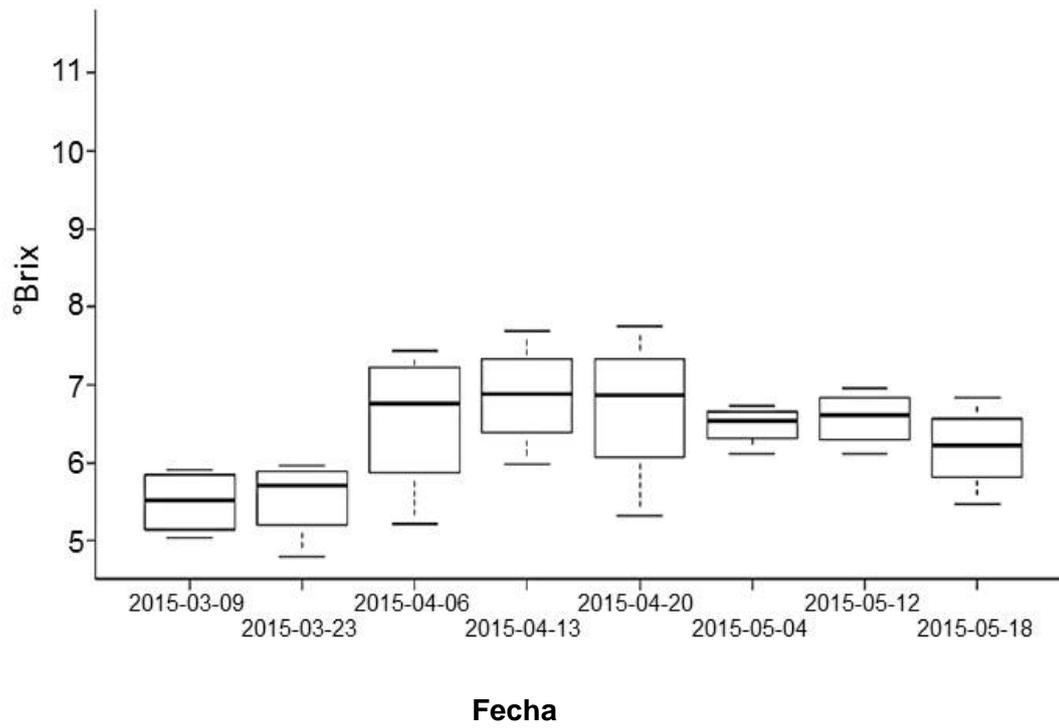
**FIGURA 5**



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**

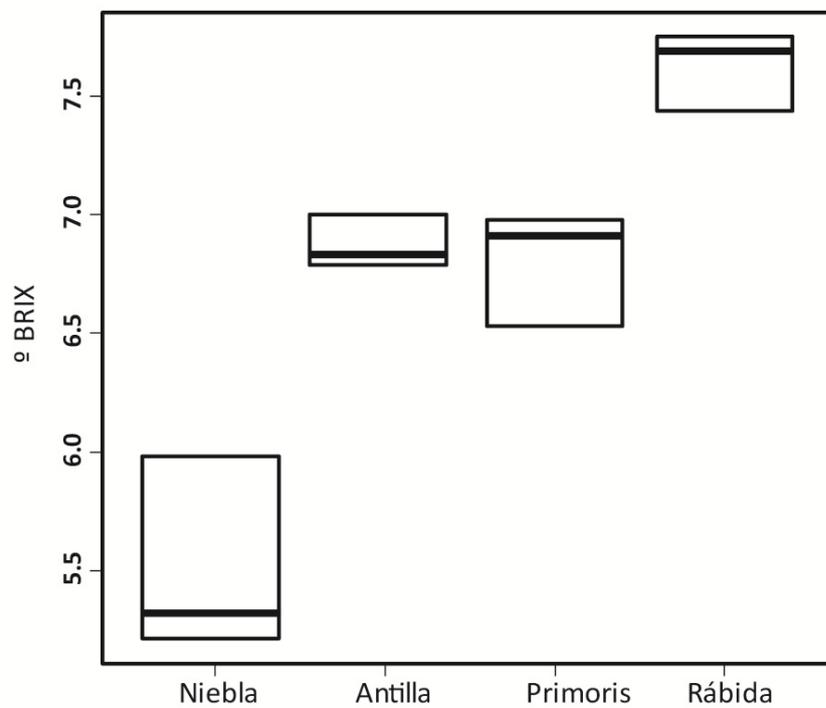


FIGURA 9

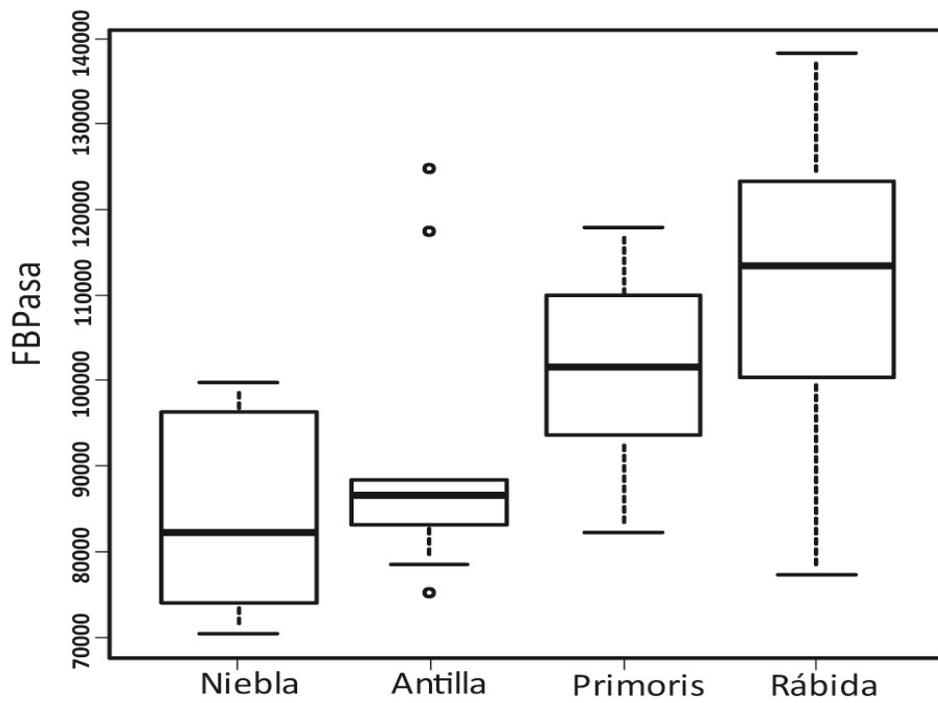
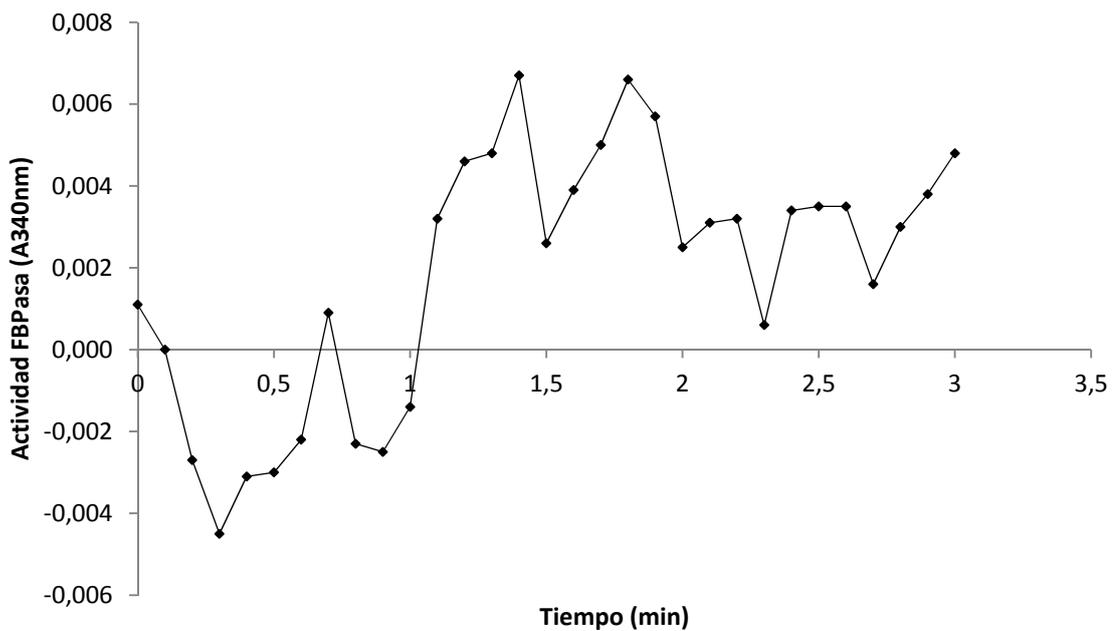


FIGURA 10



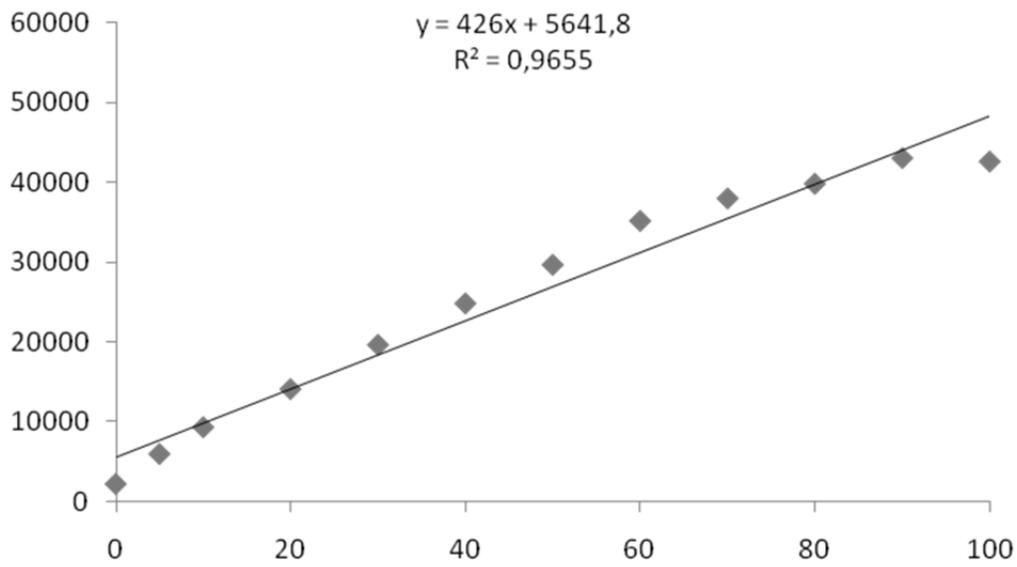
## RESUMEN

### **Método para la determinación *in situ* de actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del carbono en plantas**

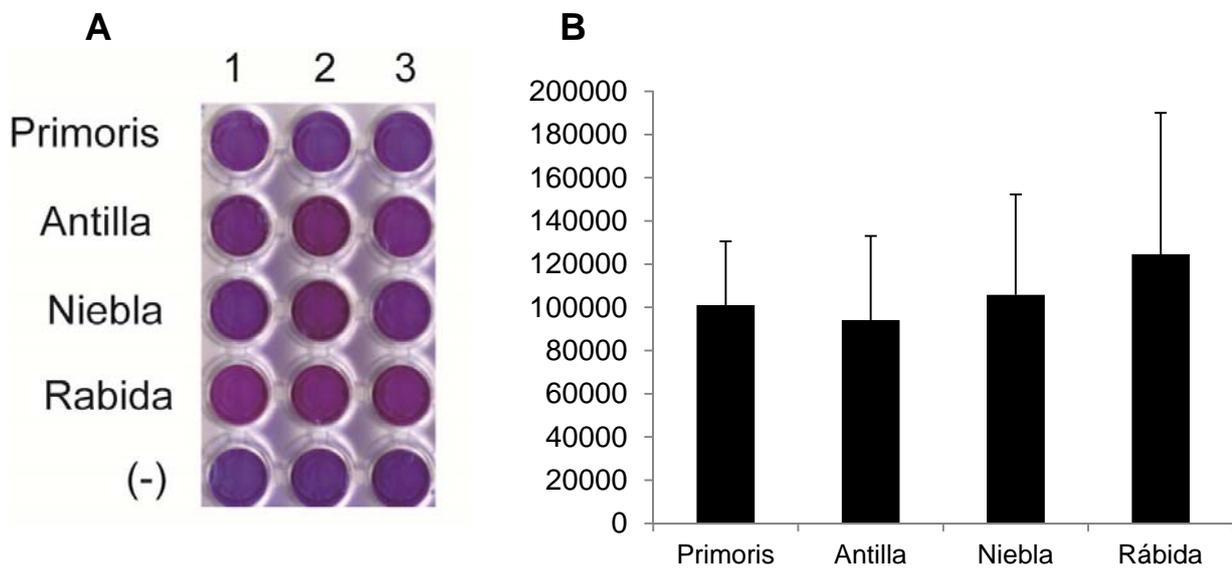
La presente invención describe un método para la determinación *in situ* de un conjunto de actividades enzimáticas específicas relacionadas con el metabolismo del carbono en plantas, específicamente actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de azúcares, y más específicamente, en las hojas de las plantas. Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un kit y todos los componentes necesarios para llevar a cabo el método aquí descrito.

## FIGURAS

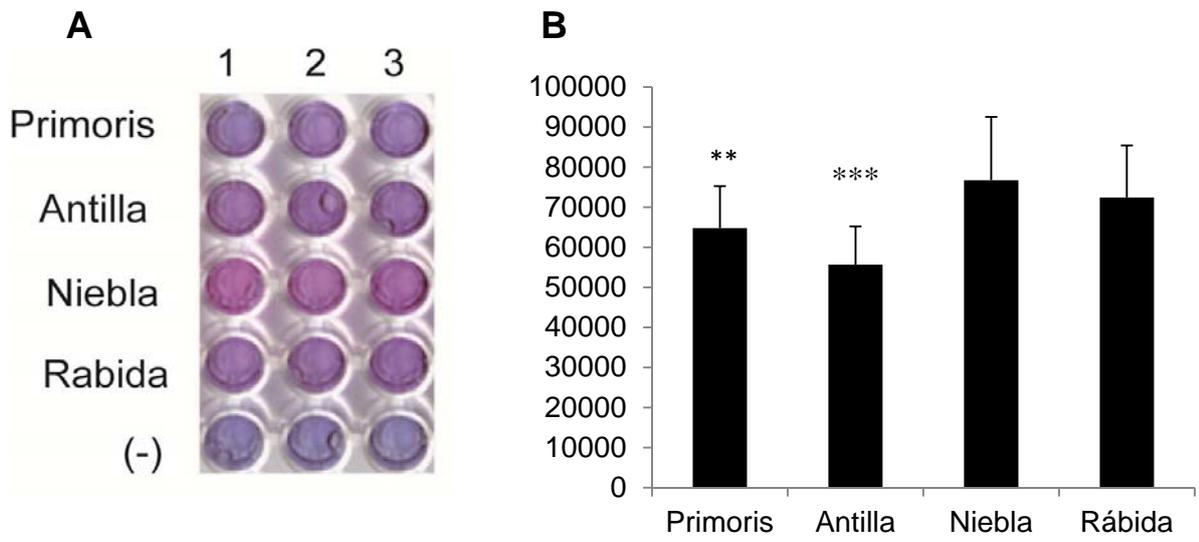
### FIGURA 1



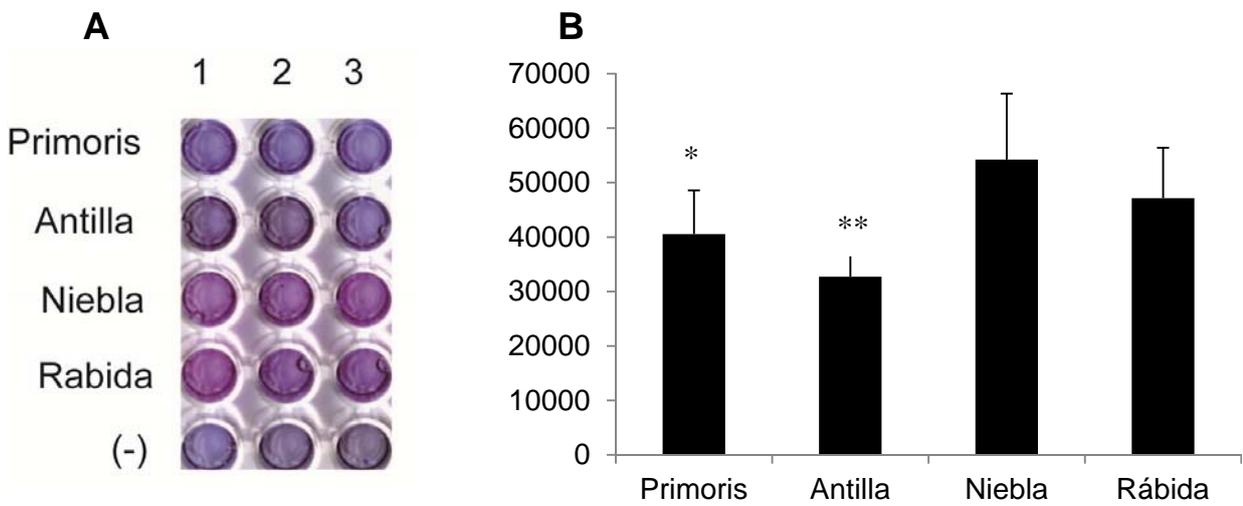
### FIGURA 2



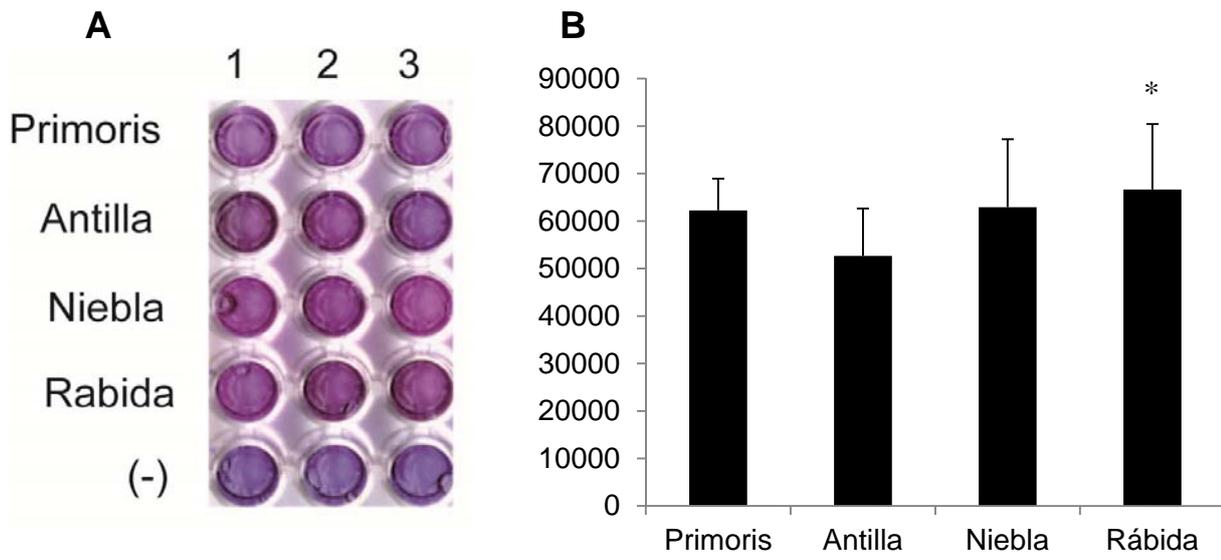
**FIGURA 3**



**FIGURA 4**



**FIGURA 5**



**FIGURA 6**

