



Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular
Universidad de Sevilla-CSIC

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ELEMENTOS IMPLICADOS EN EL INICIO DE LA SÍNTESIS DE ALMIDÓN EN PLANTAS.

Trabajo realizado para optar al grado de doctor por la
Universidad de Sevilla por la Licenciada

Paula Ragel de la Torre

Director de Tesis
Dr. Ángel Mérida Berlanga
Científico titular

Tutor de Tesis
Dr. Agustín Vioque Peña
Catedrático de la Universidad de Sevilla

Agradecimientos.

Me gustaría empezar mostrando mi agradecimiento a todas las personas que, de uno u otro modo, han hecho posible este trabajo.

En primer lugar, a mi director de tesis, Dr. Ángel Mérida, por la confianza que ha depositado en mí, por guiar mi trabajo durante estos años y sobre todo por haberme permitido vivir unos años increíbles. Y al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de la beca predoctoral que me ha permitido llevar a cabo este trabajo.

En segundo lugar, a toda la gente del IBVF, por la ayuda y/o la amistad: Sandy, Isaac, Emilio, Bea, Julia, Yoli, Tania, Belén, Fran, Ignacio, Mauro, Javi, Migel Ángel, Elvira...; a mis amigos JuanMa, JuanAn, Víctor, Andrea, ...; y a mis chicas Patri, Cecilia, Gloria y Zaida.

En tercer lugar a los grupos del Dr. Christophe d'Hulst, el Dr. Javier Romero-Pozueta y la Dra. Mariam Sahrawy.

Y por último, a mi familia, que siempre ha estado ahí, y a Jorge, que ha tenido la paciencia de aguantarme durante los últimos meses.

Índice.

AGRADECIMIENTOS.	1
ÍNDICE.	5
OBJETIVOS.	15
INTRODUCCIÓN.	19
El ALMIDÓN.	21
Estructura del gránulo de almidón.....	22
Almidón transitorio y almidón de reserva.	26
Almidón transitorio.	27
Almidón de reserva.	28
Síntesis de almidón en plantas.	28
Síntesis del donador glucosídico.....	29
Elongación y ramificación de las cadenas de glucosa.	32
Adquisición de la estructura de la amilopectina.	33
Inicio del gránulo de almidón.	34
Degradación del almidón en plantas.	34
Solubilización de la superficie del gránulo.....	34
Degradación del almidón transitorio.....	35
Degradación del almidón de reserva.	37
Regulación del metabolismo del almidón en plantas.....	38
Regulación de la síntesis de almidón transitorio.....	38
Regulación de la degradación del almidón transitorio.....	40
Formación de complejos multiproteicos y fosforilación de proteínas.	41
Regulación transcripcional de los genes del metabolismo del almidón.	42
El origen de la acumulación de almidón como polímero de reserva.	43
LAS ALMIDÓN SINTASAS.	47
Características de la almidón sintasa unida a gránulo (GBSS).....	50
Características de las almidón sintasas solubles.	51
Relación evolutiva entre las GSs de cianobacterias y las SSs.	54
EL INICIO DEL GRÁNULO DE ALMIDÓN.	58
Necesidad de un mecanismo de cebado. La glucogenina.	58

Proteínas tipo glucogenina en plantas.....	59
Otras posibles enzimas implicadas en la síntesis de almidón.....	60
ALMIDÓN SINTASA IV.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
MATERIAL BIOLÓGICO.....	67
<i>Arabidopsis thaliana</i>	67
Condiciones de cultivo de <i>A.thaliana</i>	68
<i>Escherichia coli</i>	68
Cultivo de <i>E.coli</i> en medio líquido.....	69
Cultivo de <i>E.coli</i> en medio sólido.....	69
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	69
Cultivo de <i>A.tumefaciens</i> en medio líquido.....	69
Cultivo de <i>A.tumefaciens</i> en medio sólido.....	70
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
Cultivo de <i>S.cerevisiae</i> en medio líquido.....	70
Cultivo de <i>S.cerevisiae</i> en medio sólido.....	71
OBTENCIÓN DE MUTANTES DOBLES Y TRIPLES.....	72
Cruce de plantas parentales.....	72
Selección de la progenie.....	72
MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN VEGETAL.....	73
Curvas de crecimiento.....	73
Tinción de hojas con lugol.....	73
Determinación del contenido de almidón en hojas.....	73
Determinación del contenido de azúcares.....	75
Extracción y cuantificación de pigmentos.....	75
Clorofilas y carotenoides.....	75
Antocianinas.....	76
Técnicas de microscopía electrónica.....	76
Análisis mediante microscopía óptica de cloroplastos aislados.....	76
Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía óptica de secciones de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	76

Análisis mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión de gránulos de almidón aislados.....	77
Determinación de parámetros fotosintéticos.....	78
Análisis del intercambio de gases mediante IRGA.....	78
Análisis de las curvas AQ.....	79
Análisis de las curvas A/Ci.....	81
Análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila mediante PAM.....	83
Medidas de estrés oxidativo.....	86
Inmunodetección de carbonilos.....	86
Determinación del contenido en peróxido de hidrógeno.....	87
Determinación de los niveles de peroxidación lipídica.....	87
FRACCIONAMIENTO CELULAR.....	89
Aislamiento de cloroplastos.....	89
Fraccionamiento cloroplastídico.....	89
PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS.....	91
Inducción de BL21 (DE3) Δ glgCAP. Preparación de extractos crudos bacterianos.....	91
Preparación de extractos crudos vegetales.....	91
DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.....	93
Determinación de la actividad Almidón Sintasa Soluble (SS).....	93
Ensayo radiactivo.....	93
Ensayo no radiactivo.....	94
Determinación de la actividad Almidón Sintasa Unida a Gránulo (GBSSI).....	95
Determinación de la actividad almidón ramificante (SBE).....	96
Determinación de la actividad ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPasa).....	96
Determinación de la actividad α -amilasa.....	97
Determinación de la actividad β -amilasa.....	98
Determinación de la actividad almidón fosforilasa.....	98
MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	100
Cuantificación de la concentración de proteínas.....	100
Concentración de fracciones proteicas.....	100
Separación de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes.	100
Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida con azul Coomassie.....	101

Tinción de proteínas con plata.	101
Zimogramas.	101
Zimograma de la actividad almidón sintasa.	102
Zimograma de la actividad fosforilasa.	102
Zimograma de las actividades modificantes del almidón y de la β -limite dextrina.	102
Zimograma de la actividad pululanasa.	102
Inmunodetección de proteínas (Inmunoblots).	103
Tinción de proteínas en membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau.	104
Técnicas de cromatografía.	104
Cromatografía de afinidad: His-Trap.	104
Cromatografía de intercambio iónico.	105
Cromatografía de exclusión molecular.	106
Identificación de proteínas.	107
Ensayo de autoglicosilación.	107
Tratamiento con tripsina.	107
Ensayo de doble híbrido en levadura.	108
Análisis informático de secuencias proteicas.	109
MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE DNA.	110
Vectores utilizados.	110
Aislamiento de plásmidos de <i>E.coli</i>	110
Aislamiento de plásmidos a pequeña escala.	110
Aislamiento de plásmidos a mediana escala.	111
Aislamiento de DNA total de tejidos vegetales.	111
Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	111
Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.	112
Restricción del DNA.	112
Ligación de DNA.	112
Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	112
Sistema Gateway.	113
Secuenciación automática de DNA.	114
MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE RNA.	115
Trabajando con RNA.	115
Aislamiento de RNA total de tejidos vegetales.	115
Reacción de retrotranscripción (RT).	115

Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).....	116
MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.....	118
<i>Escherichia coli</i>	118
Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.	118
Transformación de <i>E. coli</i> BL21 Δ gIgCAP mediante electroporación.....	118
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	119
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
<i>Arabidopsis thaliana</i>	120
Transformación por inmersión floral.....	120
Selección de transformantes. Fumigación.	121
Selección de líneas genéticas.	121
RESULTADOS.....	123
OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES ALMIDÓN SINTASA (SS).....	125
Obtención y caracterización de los mutantes dobles de almidón sintasas (SS).	125
Curvas de crecimiento en condiciones de día largo (DL).....	127
Curvas de acumulación de almidón.....	128
Análisis mediante técnicas de microscopía.....	129
Obtención de los mutantes triples <i>sslsslssIII</i> y <i>sslsslssIV</i>	131
Curvas de crecimiento en condiciones de día largo (DL).....	132
Curvas de acumulación de almidón.....	133
Análisis mediante técnicas de microscopía.....	134
Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del almidón de los mutantes SS.....	137
Actividad almidón sintasa soluble de los mutantes SS.....	137
Actividad Almidón Sintasa Unida a Gránulo.....	138
Otras actividades relacionadas con el metabolismo del almidón.	139
Determinación de los niveles de pigmentos.....	142
Análisis de la síntesis <i>de novo</i> de gránulos de almidón en los diferentes mutantes.	145
Caracterización del doble mutante <i>sslsslssIV</i>	148
Comparación del crecimiento en día largo (DL), día corto (DC) y luz continua (LC).....	148
Análisis del contenido de almidón en cotiledones y raíces.....	151
Contenido en azúcares.....	154
Análisis del intercambio de gases mediante IRGA.	155

Análisis de la emisión de fluorescencia mediante PAM.	161
Niveles de estrés oxidativo.	164
OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL TRIPLE MUTANTE <i>aps1ssIIssIV</i>.	165
Obtención del triple mutante.	166
Curva de crecimiento en condiciones de día largo (DL).	166
Ausencia de almidón en el triple mutante <i>aps1ssIIssIV</i>	166
Determinación de los niveles de pigmentos.	167
Análisis del intercambio de gases mediante IRGA.	169
Curvas de respuesta a luz del triple mutante <i>aps1ssIIssIV</i>	169
Curvas de respuesta a Ci del triple mutante <i>aps1ssIIssIV</i>	171
Análisis de la emisión de fluorescencia mediante PAM.	174
Rendimiento cuántico máximo del PSII.	174
Curvas de inducción-relajación de NPQ ('Quenching' no fotoquímico).	174
Curvas de luz.	175
ALMIDÓN SINTASA DE CLASE IV (SSIV) <i>IN VIVO</i>.	177
Detección de SSIV <i>in vivo</i>	177
Aproximación al estudio del "complejo SSIV"	178
Confirmación de la existencia del complejo SSIV.	178
Posible regulación redox del complejo.	179
Existencia del complejo a lo largo del ciclo día-noche.	180
Posible anclaje al gránulo de almidón del complejo SSIV.	181
Localización subcloroplástica de SSIV.	184
ALMIDÓN SINTASA DE CLASE IV (SSIV) <i>IN VITRO</i>.	186
Clonación de SS1, SS2, SS3 y SS4.	186
Inducción de las proteínas recombinantes SS1, SSII, SSIII y SSIV.	187
Actividad almidón sintasa de las proteínas recombinantes SS1, SSII, SSIII y SSIV.	188
Puesta a punto de las condiciones de inducción de SSIV.	189
Purificación de SSIV desde cultivos de <i>E.coli</i> inducidos.	190
Estudio del "complejo SSIV" <i>in vitro</i>	192
Purificación de SSIV mediante cromatografía de exclusión molecular.	192
Ensayo de doble híbrido.	195
Ensayos de auto-glucosilación.	196
Determinación de la constante de Michaelis-Menten (Km) de SSIV para la ADP-Glucosa y la amilopectina.	198

ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LA SSIV.....	200
Análisis de la secuencia polipeptídica de SSIV.	200
ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO DE LA SSIV.	206
Estudios de complementación de la mutación <i>ssIV</i> por los dominios amino y carboxilo de SSIV.	206
Obtención de los plásmidos pCTAPi_SS4tN y pCTAPi_SS4tC.....	206
Obtención de líneas transgénicas.	207
Caracterización de las líneas transgénicas.....	207
Estudio <i>in vitro</i> de diferentes versiones truncadas de SSIV.....	209
Clonación de las versiones truncadas SS4.....	209
Inducción de las versiones truncadas de SSIV.....	211
Actividad almidón sintasa de las versiones truncadas de SSIV.....	214
Obtención de las Kms para ADP-Glucosa y amilopectina de las versiones truncadas de SSIV.....	215
DISCUSIÓN.	219
EL PAPEL FUNDAMENTAL DE SSIV EN EL INICIO DE LA SÍNTESIS DEL GRÁNULO DE ALMIDÓN.	221
SSIV es necesaria y suficiente para la síntesis del número correcto de gránulos de almidón en hojas de <i>A.thaliana</i>	221
Los gránulos de almidón iniciados en ausencia de SSIV difieren de los gránulos normales.	222
SSIV es necesaria para la síntesis de almidón en raíces de <i>A.thaliana</i>	223
Posible papel de SSIV en el inicio de la síntesis de almidón.	224
Síntesis estocástica de almidón en ausencia de SSIV.	225
Síntesis estocástica de almidón en cotiledones.....	227
Importancia de SSIII en ausencia de SSIV.....	227
LA ACUMULACIÓN DE ADP-GLC PRINCIPAL RESPONSABLE DE LOS EFECTOS PLEIOTRÓPICOS OBSERVADOS EN LOS MUTANTES CARENTES DE SSIV.	229
Efecto de la ausencia de SSIV sobre el metabolismo del almidón.....	229
Efecto de la ausencia de SSIV sobre la tasa de crecimiento.	232
Efecto de la ausencia de SSIV sobre la acumulación de azúcares.	233
Efecto de la ausencia de SSIV sobre el contenido de pigmentos.....	234

Efecto de la ausencia de SSIV sobre la fotosíntesis.	235
La acumulación de ADP-Glc en los mutantes carentes de SSIV es responsable de las alteraciones fenotípicas de los mismos.	236
Explicación del fenotipo de los mutantes carentes de SSIV. Caracterización del mutante <i>ssIIIssIV</i>	239
ANÁLISIS DEL DOMINIO N-TERMINAL DE SSIV.	242
EL COMPLEJO SSIV Y SU ANCLAJE A LAS MEMBRANAS TILACOIDALES.	244
CONCLUSIONES.	247
BIBLIOGRAFÍA.	251

Objetivos.

- Identificación del elemento/os responsables de la síntesis de los gránulos de almidón observados en el mutante de *Arabidopsis thaliana* carente de actividad SSIV (mutante *ssIV*, Roldán *et al.*, 2007b).
- Obtención y caracterización de diferentes mutantes dobles y triples carentes de SSIV y una o dos de las demás SSs solubles en *Arabidopsis thaliana*.
- Estudio de las características fenotípicas de los mutantes carentes de SSIV de *Arabidopsis thaliana*.
- Estudio de SSIV *in vivo*: actividad y localización de la proteína.
- Estudio de SSIV *in vitro*: obtención de la Km para ADP-Glucosa y amilopectina, actividad autoglucosilante y posible interacción consigo misma.
- Análisis de la funcionalidad del dominio N-terminal de SSIV en el inicio del gránulo de almidón.

Introducción.

EL ALMIDÓN.

El almidón es el principal polisacárido de reserva de carbono y energía de plantas terrestres, algas (supergrupo *Archaeplastida* del dominio *Eukarya*) y algunas cianobacterias (subgrupo V), organismos en los cuales juega un importante papel fisiológico. La acumulación de almidón dentro de la célula tiene lugar en el interior de los plastos de algas verdes y plantas terrestres (linaje *Chloroplastida*) y en el citosol de algas rojas y glaucofitas (linajes *Rhodophyceae* y *Glaucophyta* respectivamente) (Ball *et al.*, 2011).

Típicamente, el almidón se asocia con los órganos de reserva, como las semillas, las raíces y los tubérculos, ya que éstos son las principales fuentes de carbohidratos en la dieta humana. No obstante, el almidón es también sintetizado en hojas como producto final de la fotosíntesis (junto con la sacarosa), permitiendo el almacenamiento transitorio de carbono y energía durante el día para suplir, durante la noche, las necesidades de la planta (Zeeman *et al.*, 2010).

El almidón es el componente principal de algunos de los cultivos de mayor importancia en nuestra sociedad: patata, maíz, trigo, arroz,... constituyendo la principal fuente de carbohidratos en la dieta humana y es, también, una importante materia prima a nivel industrial. Muchos de los órganos de reserva de almidón (como las semillas de cereales, las raíces de mandioca o los tubérculos de patata) son alimentos de primera necesidad que constituyen hasta el 80 % de la ingesta calórica diaria (Santelia & Zeeman, 2011). Desde el punto de vista industrial, es una materia prima barata y renovable, con propiedades fisicoquímicas únicas y una creciente explotación tanto en el sector agroalimentario (industria alimenticia) como en diversos procesos de manufactura (industria no alimenticia). Además, el uso del almidón como materia prima para la obtención de biocombustibles (bioetanol; Smith, 2008) es una de las vías de investigación actuales para la obtención de combustibles alternativos. Todo ello hace del almidón un polisacárido muy importante en la sociedad actual y hace sorprendente el hecho de que, a día de hoy, aún no se conozca completamente su estructura, cómo se sintetiza y qué determina la cantidad acumulada por las plantas.

Para su uso industrial, el almidón es extraído principalmente del maíz, pero también de un amplio rango de otras especies como el arroz, el trigo, la mandioca o la patata. Los almidones de diferentes orígenes tienen diferentes propiedades fisicoquímicas que determinan el rango de aplicaciones para las que serán empleados. El cambio físico más importante que tiene lugar durante el procesamiento industrial del almidón es su gelatinización, mediante calentamiento en un exceso de agua, y posterior solubilización de la amilosa y la amilopectina (ver página 22). La amilosa difunde fuera del gránulo gelatinizado y, al enfriarse, forma una fase continua de gel. Los gránulos enriquecidos en amilopectina gelatinizados agregan en partículas de gel, generando una solución viscosa. Esta estructura en dos fases, llamada pasta de almidón, es deseada en aquellas aplicaciones donde los almidones procesados son utilizados como

espesantes o aglutinantes. La mayoría de aplicaciones industriales del almidón requieren, sin embargo, modificaciones tales como oxidación, esterificación, hidroximetilación,... (Santelia & Zeeman, 2011). Estos almidones modificados tienen innumerables aplicaciones tanto en la industria alimenticia (yogures, quesos, sopas, salsas, pasteles, helados,...), como en la no alimenticia (adhesivos, papel, plásticos reciclables, productos farmacéuticos,...). Las modificaciones físicas y químicas del almidón son costosas y frecuentemente emplean tratamientos químicos agresivos. Por ello, muchas investigaciones se centran en la búsqueda de modos de producción de almidones con propiedades potenciadas directamente *in planta*. Un ejemplo son los mutantes waxy de maíz que producen almidón sin amilosa, que da lugar a una pasta de almidón mejorada más estable después de tratamientos de congelación-descongelación (Shure *et al.*, 1983; Jobling, 2004). Los nuevos almidones así producidos aún requieren de modificaciones para su óptima funcionalidad. La obtención de cultivos con una mayor producción de almidón y de almidones con características funcionales mejoradas, los cuales no requieran de tratamientos posteriores, es uno de los objetivos biotecnológicos actuales.

Los avances en el entendimiento de la biosíntesis de almidón como resultado de la investigación básica en *Arabidopsis*, permiten desarrollar nuevos caminos para la obtención de nuevos almidones y de cultivos con una mayor producción de almidón.

Estructura del gránulo de almidón.

El almidón es un polisacárido formado por residuos de α -D-glucosa, simple en composición, pero complejo en estructura. Al igual que el glucógeno (polisacárido de reserva en animales, hongos y bacterias), el almidón es un homopolímero (un glucano) de moléculas de α -D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos. Sin embargo, ambos polímeros presentan estructuras y propiedades diferentes. Así, mientras el glucógeno es un polímero soluble en agua, el almidón se organiza en grandes gránulos insolubles, inactivos osmóticamente, en los cuales las cadenas de glucosas presentan un empaquetamiento denso y altamente ordenado que confiere una presión osmótica prácticamente nula al gránulo. La inactividad osmótica de los gránulos de almidón permite a las plantas almacenar grandes cantidades de glucosa sin perturbar el equilibrio hídrico de las células (Ball & Morell, 2003).

El almidón en plantas se acumula como gránulos semi-cristalinos de estructura y organización compleja (Buleon *et al.*, 1997), en los cuales pueden distinguirse dos tipos de polímeros: la amilosa y la amilopectina (Figura 3). En ambos polímeros, las unidades de glucosa están conectadas a través de enlaces glucosídicos α -(1,4) formando cadenas lineales, las cuales conectan entre ellas a través de enlaces glucosídicos α -(1,6), que constituyen los denominados puntos de ramificación (Figura 1). La amilosa constituye aproximadamente el 25% del peso del gránulo de almidón y está constituida principalmente por cadenas lineales de glucosa (posee pocos puntos de ramificación). La amilopectina constituye aproximadamente el

75 % restante del peso del gránulo de almidón y posee un mayor número de puntos de ramificación: aproximadamente un 5 % de sus azúcares presentan enlaces glucosídicos α -(1,6) (Buleon *et al.*, 1998). La Tabla 1 resume las principales propiedades de ambos polímeros.

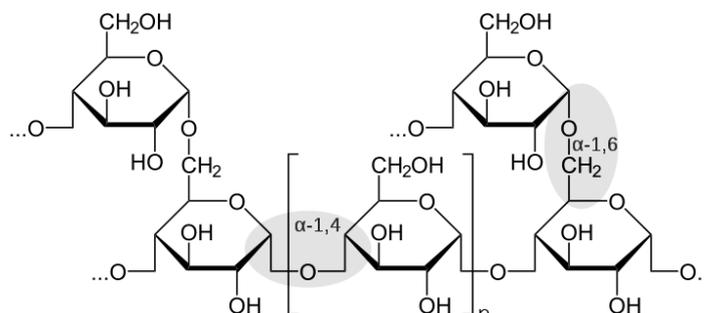


Figura 1. Unión de las moléculas de glucosa mediante enlaces glucosídicos α -(1,4) (cadenas lineales) y α -(1,6) (puntos de ramificación).

	Amilosa	Amilopectina
Peso del gránulo	15 – 35 %	65 – 85 %
Ramificaciones	< 1 %	4 - 6 %
Masa Molecular	10^4 - 10^5	10^7 - 10^8
Longitud media de la cadena	3 – 1000	3 - 50
Grado medio de polimerización*	10^2 - 10^3	10^3 - 10^4
$\lambda_{\text{máx}}^{**}$	630 - 660 nm	530 - 570 nm
Afinidad por yodo (g · 100 mg⁻¹)	19 - 20,5	0 - 1,2

Tabla 1. Propiedades de la amilosa y la amilopectina. *Tamaño medio de la molécula (unidades de glucosa). **En presencia de lugol (I₂/KI)

Está ampliamente aceptado que las moléculas de amilopectina se orientan radialmente dentro de los gránulos de almidón. Cada molécula tiene un extremo reductor (carbono anomérico libre) único localizado en el centro del gránulo (hilum), y extremos no reductores dirigidos hacia la superficie del mismo (Figura 2). El alargamiento de las cadenas de glucosa se produce a partir de los extremos no reductores. Dentro de la molécula de amilopectina, las cadenas de glucosa se pueden clasificar en: cadenas-A, las cadenas externas, no ramificadas, formadas por 6 a 16 unidades de glucosa y que se unen a otras cadenas por su extremo reductor; cadenas-B, más largas que las anteriores y con uno o más puntos de ramificación; y cadenas-C, la única cadena-B de la molécula que posee un extremo reductor libre (Figura 2). Los modelos actuales sugieren que la molécula de amilopectina presenta una arquitectura racémica, es decir, que las cadenas (de entre 12 y 20 unidades de glucosa) se organizan en racimos, los cuales se unen a cadenas de mayor longitud (40 o más unidades de glucosa) que abarcan varios racimos. Esta distintiva distribución polimodal de las cadenas en la molécula de amilopectina según su longitud, permite la organización del polímero en gránulos insolubles y semi-cristalinos. En el gránulo, las cadenas cortas adyacentes en los racimos forman dobles

hélices que se empaquetan juntas en series ordenadas dando lugar a las denominadas lamelas cristalina (Figura 2 y Figura 3). Dentro de las lamelas cristalinas, las dobles hélices pueden empaquetarse de una forma densa, "tipo A", o de una forma más flexible, "tipo B" (Figura 3). Algunos almidones contienen una mezcla de tipo A y B y se designan como "tipo C". El tipo de empaquetamiento parece estar determinado por la estructura subyacente de la amilopeptina (Zeeman *et al.*, 2010). Entre las lamelas cristalinas aparecen las lamelas amorfas, correspondientes a los puntos de ramificación. La alternancia de lamelas cristalinas y amorfas tiene una periodicidad de 9 nm (Figura 2 y Figura 3) independientemente de la procedencia del almidón (Jenkins *et al.*, 1993).

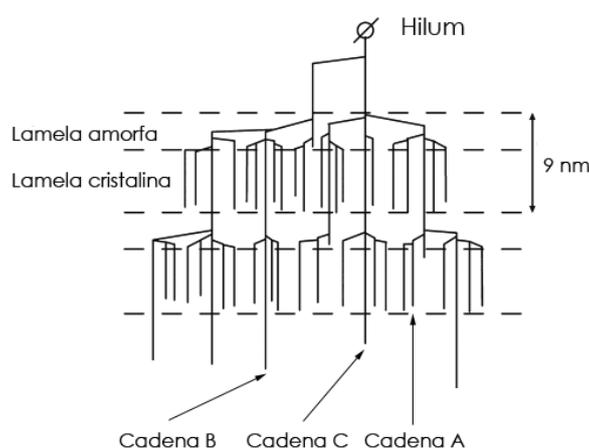


Figura 2. Esquema de la estructura racémica de la molécula de amilopeptina (adaptado de D'Hulst & Mérida, 2010). Cada molécula tiene un extremo reductor único (hilum), localizado en el centro del gránulo, y extremos no reductores dirigidos hacia la superficie del mismo. Las cadenas de glucosa se pueden clasificar en: cadenas-A, las cadenas externas, no ramificadas, formadas por 6 a 16 unidades de glucosa; cadenas-B, más largas que las anteriores y con uno o más puntos de ramificación; y cadenas-C, la única cadena-B de la molécula que posee un extremo reductor libre. La amilopeptina presenta una arquitectura racémica, la cual permite que las cadenas cortas, adyacentes en los racimos, formen dobles hélices que se empaquetan juntas en series ordenadas dando lugar a las denominadas lamelas cristalina. Entre las lamelas cristalinas aparecen las lamelas amorfas que contienen la mayoría de los puntos de ramificación. La alternancia de lamelas cristalinas y amorfas tiene una periodicidad de 9 nm.

En los gránulos de almidón de gran tamaño pueden observarse además los denominados anillos de crecimiento (estructuras de orden superior que se asemejan a los anillos de crecimiento de los árboles; Figura 3). Los anillos de crecimiento se puede observar fácilmente en las grandes gránulos de almidón de reserva (Pilling & Smith, 2003), pero aún no está claro si reflejan el crecimiento periódico de los gránulos o, simplemente, son una característica estructural de los mismos. Los anillos de crecimiento son típicamente visualizados mediante tinción con lugol y microscopía óptica o mediante microscopía electrónica de barrido después de la digestión parcial de los gránulos de almidón con ácido o enzimas amilolíticas. Generalmente, no se observan anillos de crecimiento en los gránulos de almidón transitorio; debido al pequeño tamaño de los mismos, es posible que posean un único anillo de crecimiento (Zeeman *et al.*, 2002b).

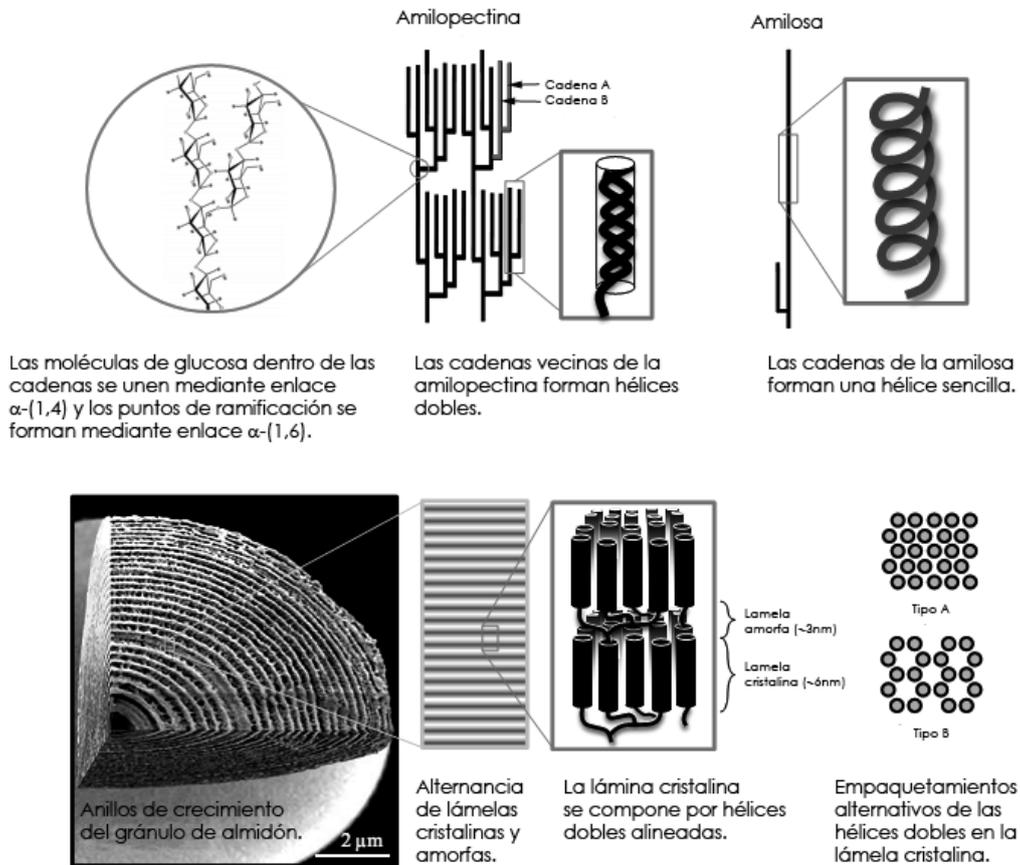


Figura 3. Estructura del gránulo de almidón. Adaptado de Zeeman *et al.*, 2010. Arriba: modelo de la estructura en racimo de la amilopectina y de la estructura en hélices simples de la amilosa. Abajo: Visión de los anillos de crecimiento en una imagen de microscopía electrónica y esquema de la organización de las láminas cristalinas y amorfas.

La molécula de amilosa se cree que adopta una estructura helicoidal sencilla (Figura 3). Su conformación en la parte interior del gránulo de almidón no está totalmente clara, se piensa que la amilosa se dispondría al azar dentro de la lamela amorfa. Se podría considerar como un "relleno" de los espacios de la matriz de amilopectina (Kozlov *et al.*, 2004). Muchos estudios han demostrado que la amilosa no es requerida para la formación del gránulo de almidón (para la adquisición de su estructura cristalina) - mutantes con la síntesis de amilosa suprimida todavía forman gránulos de almidón (Tsai, 1974; Shure *et al.*, 1983); mientras que si lo es la amilopectina (no existen gránulos de almidón sin amilopectina). El papel fisiológico de la amilosa no está claro, pero se ha propuesto que, dada la conservación de la GBSS (enzima responsable de la síntesis de amilosa, ver página 50) en el reino vegetal, la amilosa podría estar implicada en el incremento de la estabilidad del gránulo o de la eficiencia en la acumulación de glucanos (Zeeman *et al.*, 2010).

Los gránulos de almidón varían en tamaño, morfología, composición y propiedades fisicoquímicas dependiendo de la especie de donde se aísle, existiendo además una serie de características propias de cada una de ellas (Pilling & Smith, 2003). El tamaño puede variar desde 1-2 μ m en cloroplastos de *Arabidopsis* hasta 100 μ m en órganos de reserva tales como los tubérculos de patata. En cuanto a la morfología podemos encontrar desde gránulos

poligonales, como los del arroz, hasta gránulos suaves y redondeados, como los de la papa (Jane *et al.*, 1994). Los gránulos de almidón de las hojas de muchas especies son lenticulares o discoides. Los factores que rigen las diferencias en la forma y el número de gránulos no han sido completamente aclarados. Además de los glucanos constitutivos, los gránulos de almidón pueden contener (dependiendo de la fuente de almidón) trazas de proteínas, lípidos e iones.

Al igual que en el almidón, en el glucógeno las moléculas de glucosa se unen mediante enlaces glucosídicos α -(1,4) formando cadenas lineales, que se ramifican a través de enlaces α -(1,6). La diferencia es que el glucógeno no es una mezcla de dos polímeros estructuralmente diferentes, sino un único polímero homogéneo, con un mayor grado de ramificación que la amilopectina (aproximadamente un 9 %) y una distribución regular de los puntos de ramificación (un enlace α -(1,6) cada cuatro residuos de glucosa y una longitud media de cadena de entre 11–15 moléculas de glucosa (D'Hulst & Mérida, 2010). Estas diferencias en distribución de las ramificaciones hacen que el glucógeno no forme una estructura similar a la del almidón. De hecho, tanto las observaciones *in vivo* como los modelos matemáticos demuestran que el glucógeno tiene un tamaño limitado (su diámetro nunca excede los 40 nm) debido a impedimentos estéricos, mientras que en el gránulo de almidón, la molécula de amilopectina podría en teoría elongarse indefinidamente.

Almidón transitorio y almidón de reserva.

En plantas superiores pueden distinguirse dos tipos de polímeros de almidón según su función y localización: el almidón de reserva y el almidón transitorio. Ambos son sintetizados y acumulados en los plastos, orgánulos autorreplicativos rodeados de una doble membrana y presentes en la mayoría de las células de los eucariotas fotosintéticos. Existen diferentes tipos de plastos, entre ellos los cloroplastos y los amiloplastos. Los cloroplastos se localizan en los tejidos fotosintéticos, hojas principalmente, y en ellos se sintetiza el almidón transitorio. Los amiloplastos se localizan en órganos de reserva no fotosintéticos (como el tubérculo de patata o el endospermo de semillas) y acumulan el almidón de reserva (Sivak *et al.*, 1998). Las características fisicoquímicas del almidón de reserva y el almidón transitorio son ligeramente diferentes y están recogidas en la siguiente tabla (Tabla 2):

	Almidón de reserva	Almidón transitorio
Tamaño del gránulo (diámetro)	15-100 μm	Más pequeño, delimitado por el espacio disponible en el cloroplasto.
Forma del gránulo	Ovalada, muy variable entre especies.	Discoidea, poco variable entre especies.
Contenido medio de amilosa	30 % (variable entre especies: 11-37 %)	15 %
Grado de polimerización (dp) de la amilopectina	Menor (entre 12 y 15 en el endospermo de guisante).	Mayor (entre 19 y 21 en hojas de guisante).
Masa molecular	Tanto la amilosa como la amilopectina de cloroplastos poseen una menor masa molecular que las de órganos de reserva.	
Estructura del gránulo	La organización en lamelas cristalinas y amorfas es la misma en ambos tipos, sin embargo, los anillos de crecimiento no son visibles en el almidón transitorio.	

Tabla 2. Características fisicoquímicas del almidón de reserva y el almidón transitorio (Jane *et al.*, 1994; Matheson, 1996; Shannon *et al.*, 1984; Tomlinson *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Zeeman *et al.*, 2002b).

Almidón transitorio.

El almidón transitorio es sintetizado en los cloroplastos de tejidos fotosintéticos como uno de los productos primarios de la fijación fotosintética de CO_2 atmosférico. El almidón transitorio se acumula a modo de 5-7 gránulos insolubles por cloroplasto durante el día, gránulos que son degradados durante la noche asegurando una disponibilidad constante de azúcares a toda la planta. Funciona, por tanto, tamponando los cambios en la disponibilidad de fotoasimilados como consecuencia del ciclo diurno de luz-oscuridad. El mayor dinamismo de la síntesis y degradación de este tipo de almidón (síntesis durante el día y degradación durante la noche subsecuente) es el responsable de su nombre. La cantidad de fotoasimilados que son dirigidos a la síntesis de almidón transitorio varía de unas especies a otras. En el caso de *Arabidopsis*, se ha descrito que la mitad de los fotoasimilados son destinados a la síntesis de almidón (Zeeman & ap Rees, 1999).

La correcta regulación de la síntesis y degradación del almidón transitorio es necesaria para un crecimiento normal en un fotoperiodo de luz-oscuridad (Gibon *et al.*, 2009). Además, se ha propuesto que la síntesis y degradación del almidón transitorio afecta al tiempo de floración, a la apertura y el cierre de estomas (Caspar *et al.*, 1985; Caspar *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1988a; Bernier *et al.*, 1993; Eimert *et al.*, 1995), al proceso de llenado de semillas (Schulze *et al.*, 1994) y al mantenimiento de la tasa fotosintética (Ludewig *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999).

Almidón de reserva.

Se denomina almidón de reserva al almidón acumulado en tejidos no fotosintéticos, como las semillas, las raíces y los tubérculos. Es sintetizado en los amiloplastos de células heterotróficas y funciona como reserva de energía a medio o largo plazo, suministrando la energía necesaria para procesos como la germinación o la formación de tallos desde tubérculos. Los amiloplastos contienen uno o más gránulos de almidón que crecen en tamaño a medida que el órgano se desarrolla.

En *Arabidopsis*, aunque existen varios tipos celulares no fotosintéticos que acumulan almidón, no existe un órgano de reserva comparable con las raíces de la yuca (*Manihot esculenta*) o los tubérculos de patata (*Solanum tuberosum*). Las semillas de *Arabidopsis* solo acumulan almidón de forma transitoria durante su desarrollo, la semilla madura acumula lípidos como reserva de carbono (Andriotis *et al.*, 2010; Li-Beisson *et al.*, 2010).

Un tipo especial de almidón de reserva es el sintetizado en células especializadas (denominadas estatocistos) del ápice de la raíz (células de la columela), de la endodermis de los brotes y del hipocotilo. Estos gránulos de almidón se denominan estatolitos y están relacionados con la percepción de la gravedad por parte de la planta. Los amiloplastos de los estatocistos sedimentan en función de la gravedad debido a la alta densidad del almidón que contienen (alrededor de 1,5 g/cm³) en comparación con el citoplasma circundante. De este modo, cambios en la orientación de la planta son detectados como cambios en la sedimentación de los amiloplastos de los estatocistos. Aunque el mecanismo por el cual este reposicionamiento se detecta todavía está en discusión, se ha demostrado que existe una buena correlación entre los niveles de almidón de los estatocistos y la sensibilidad de la respuesta a la gravedad por parte de raíces (Caspar *et al.*, 1985; Kiss *et al.*, 1996), tallos (Weise & Kiss, 1999) e hipocotilos (Kiss & Edelmann, 1999).

Síntesis de almidón en plantas.

En la síntesis del gránulo de almidón se pueden distinguir varios procesos: síntesis del donador del grupo glucosilo, inicio del gránulo de almidón, elongación de las cadenas glucosídicas en crecimiento y ramificación y modificación del polímero de amilopectina para la adquisición de la estructura final del gránulo. Aunque la síntesis de almidón es un proceso ampliamente estudiado y alguno de los pasos son perfectamente conocidos, existe cierta controversia acerca de si las rutas tradicionalmente aceptadas (y demostradas) son exclusivas o, por el contrario, existen rutas alternativas de síntesis. A continuación se detallan los conocimientos actuales sobre la síntesis de almidón.

Síntesis del donador glucosídico.

La síntesis de almidón en plantas utiliza ADP-glucosa (ADP-Glc) como donador de grupos glucosilos para la elongación del gránulo de almidón, siendo en este sentido más parecida a la síntesis de glucógeno en bacterias que en animales (los cuales utilizan UDP-glucosa). La síntesis de ADP-Glc en tejidos fotosintéticos conecta con el ciclo de Calvin a través de tres reacciones reversibles que tienen lugar en el interior del cloroplasto (Zeeman *et al.*, 2007b): en primer lugar, la fructosa 6-fosfato (F6P; intermediario del ciclo de Calvin) es isomerizada a glucosa-6-fosfato (G6P) por la fosfoglucomutasa (PGI, EC 5.3.1.9) (Neuhaus *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 2000); a continuación, la fosfoglucomutasa (PGM, EC 5.4.2.2), cataliza la conversión de G6P en glucosa 1-fosfato (G1P) (Caspar *et al.*, 1985; Lytovchenko *et al.*, 2002); y, por último, la G1P es usada como sustrato por la ADP-Glc pirofosforilasa (AGPasa, EC 2.7.7.27) junto con ATP para la síntesis de ADP-Glc y pirofosfato (PPi) (Figura 4A). Aunque las tres reacciones son reversibles *in vitro*, la última resulta metabólicamente irreversible pues *in vivo* el PPi es hidrolizado a ortofosfato (Pi) por la pirofosfatasa alcalina plastídica (Weiner *et al.*, 1987; George *et al.*, 2010). En los órganos no fotosintéticos, el almidón se sintetiza en los amiloplastos a partir de la sacarosa importada de las hojas (Figura 4B) (Smith, 2001). En la mayoría de los casos, la sacarosa es rota en UDP-Glc y fructosa por acción de la sacarosa sintasa (SuSy, EC 2.4.1.13), en una reacción que requiere UDP. La UDP-Glc es transformada en G1P por la UDP-Glc pirofosforilasa (UGPasa, EC 2.7.7.9) y la G1P, a su vez, es convertida en G6P por la PGM; la fructosa es fosforilada por la fructokinasa (EC 2.7.1.4) e isomerizada a G6P por la PGI. Todas estas reacciones tienen lugar en el citosol. La G6P es transportada a los amiloplastos donde se convierte en G1P (Harrison *et al.*, 1998; Hill & Smith, 1991; Kammerer *et al.*, 1998; Neuhaus *et al.*, 1993; Tauberger *et al.*, 2000), que es usada, al igual que se ha descrito para cloroplastos, por la AGPasa para la síntesis de ADP-Glc.

Aunque las vías descritas son las más aceptada y apoyadas por los datos genéticos y bioquímicos, la existencia de pequeñas cantidades de almidón en mutantes clásicamente considerados "starchless" (carentes de almidón), como *pgm1* (que carece de la fosfoglucomutasa plastidial; Caspar *et al.*, 1985; Kofler *et al.*, 2000) o *adg1* (que carece de la subunidad pequeña de la AGPasa, APS1; Lin *et al.*, 1988b) implica la existencia de otra u otras fuentes de precursores para la síntesis del mismo (Vitha *et al.*, 2000; Streb *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2009) y ha reabierto el debate sobre la existencia de vías alternativas de síntesis de almidón en hojas y tejidos heterotróficos.

Existen autores que señalan la posibilidad de una ruta alternativa de síntesis de ADP-Glc tanto en tejidos fotosintéticos como en tejidos heterotróficos (Baroja-Fernandez *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2006). En esta ruta alternativa, la ADP-Glc sería sintetizada en el citosol gracias a SuSy y transportada al interior del plasto. Esta teoría se apoya en la presencia de pequeñas cantidades de almidón en los mutantes *pgm1* y *adg1*, así como en la presencia de contenidos normales de ADP-Glc en los mismos (Muñoz *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque SuSy es capaz de producir ADP-Glc y fructosa, a partir de sacarosa y ADP, *in vitro* (Delmer, 1972),

se considera que su función normal *in vivo* es la producción de UDP-Glc y fructosa (Streb *et al.*, 2009).

Diferentes teorías podrían explicar la síntesis de pequeñas cantidades de almidón en los mutantes *adg1* y *pgm1*. Por ejemplo, se ha demostrado que algunas isoformas de la subunidad grande de la AGPasa (reguladoras) podrían tener cierto nivel de actividad catalítica (Ventriglia *et al.*, 2008), lo cual podría explicar la presencia de pequeñas cantidades de almidón en el mutante *adg1* (pero no en *pgm1*), aunque no se ha detectado actividad AGPasa en dicho mutante (Lin *et al.*, 1988b; Ventriglia *et al.*, 2008).

La situación es diferente en el endospermo de semillas en desarrollo de cereales (por ejemplo, *Zea mays*). En este caso, la ADP-Glc se sintetiza en el citosol y es transportada al interior del amiloplasto por la proteína Brittle1 (BT1), en un antiporte con ADP (Kirchberger *et al.*, 2007). Sin embargo, una forma citosólica de AGPasa, y no SuSy, es responsable de la producción de ADP-Glc en estos tejidos. Esta vía citosólica parece ser específica de cereales - no hay evidencia de actividad AGPasa citosólica en *Arabidopsis* y el homólogo más cercano de la BT1 (AtBT1) transporta AMP, ADP y ATP, pero no ADP-Glc (Kirchberger *et al.*, 2008).

Por otra parte, el uso de otros sustratos importados al interior del plasto desde el citosol ha sido demostrado en tipos celulares diferentes a células del mesófilo. Por ejemplo, se ha descrito la importancia del transportador GPT (transportador cloroplastídico de G6P) en células guarda y células de la columela de la raíz en guisante (*Pisum sativum*) (Overlach *et al.*, 1993; Kammerer *et al.*, 1998) o la capacidad de importar eficientemente G1P por parte de los plastos de las células del parénquima del tubérculo de patata (*Solanum tuberosum*) (Fettke *et al.*, 2010). La entrada de G1P desde el citosol podría explicar las pequeñas cantidades de almidón observado en el mutante *pgm1*, pero no en *adg1*. En semillas de arroz, se ha demostrado que la disminución del contenido de almidón en ausencia de la fosforilasa plastidial (Pho1) es mayor que en ausencia de la AGPasa (Sato *et al.*, 2008) y, en el tubérculo de patata, el uso de la G1P permite la síntesis de niveles normales de almidón, incluso en ausencia de actividad fosfoglucomutasa plastidial, gracias a la actividad de Pho1 (Fettke *et al.*, 2010); indicando que el uso de G1P juega un papel clave en la síntesis de almidón en órganos de reserva. El papel de Pho1 en la síntesis de almidón no está totalmente claro y probablemente se trate de un enzima versátil con diferentes papeles fisiológicos según la especie, las condiciones de crecimiento y el tipo celular (ver páginas 35 y 58).

Con todo ello, mientras la mayoría de los datos apoyan las rutas clásicas de síntesis de ADP-Glc en el interior del plasto y el uso de la misma como donador de grupos glucosilos para la síntesis de almidón, es evidente que esta vía no está totalmente caracterizada y que pueden existir rutas alternativas minoritarias que apoyen la síntesis del mismo, las cuales podrían ser exclusivas o tener mayor relevancia en tipos celulares y/o especies concretas.

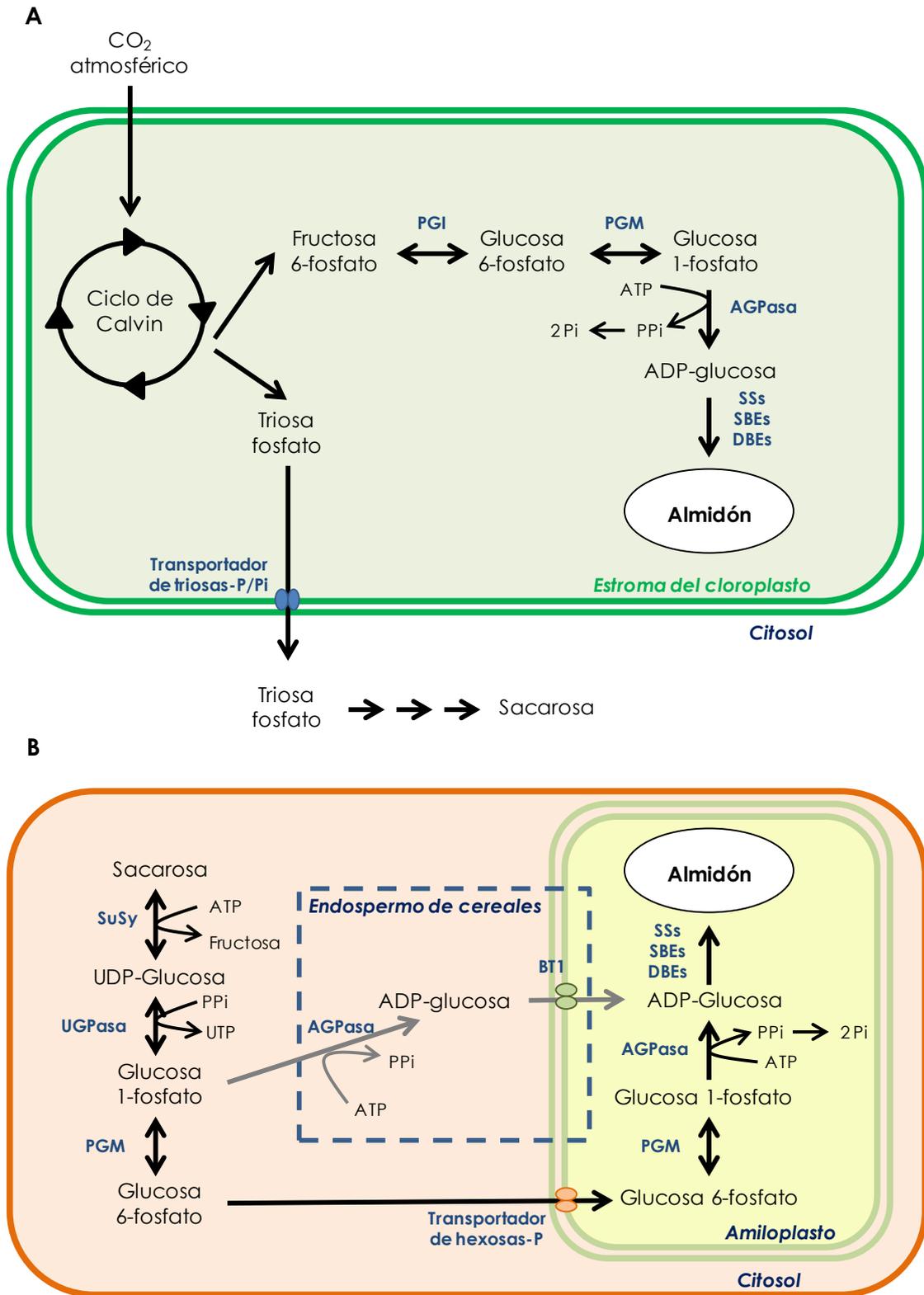


Figura 4. Rutas de síntesis de almidón en cloroplastos de células fotosintéticas (A) y en células heterotróficas (B). PGI es la fosfoglucosa isomerasa; PGM, la fosfoglucomutasa; AGPasa, la ADP-Glc pirofosforilasa; SuSy, la sacarosa sintasa; UGPasa, la UDP-Glc pirofosforilasa; BT1, es el transportador de ADP-Glc Brittle1; y SSs, SBEs y DBEs son las almidón sintasas, las enzimas ramificantes y las enzimas desramificantes respectivamente.

Elongación y ramificación de las cadenas de glucosa.

Una vez sintetizado el donador del grupo glucosilo, el siguiente paso en la ruta biosintética del almidón es la transferencia de la molécula de glucosa de la ADP-glucosa al extremo no reductor de una cadena del polímero en crecimiento. Aunque las enzimas que participan en el proceso son conocidas, poco se sabe del modo por el cual la actividad de las mismas es orquestada para dar lugar a la estructura del gránulo, particularmente la estructura de la amilopectina y su organización en lamelas cristalinas y amorfas.

Las cadenas de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -(1,4) son elongadas desde el extremo no reductor por las almidón sintasas (EC 2.4.1.21), que catalizan la transferencia del grupo glucosilo de la ADP-glucosa al polímero en crecimiento mediante la formación de un nuevo enlace glucosídico y con liberación de ADP (Mukerjea *et al.*, 2002). Existen cinco clases de almidón sintasas en base a los análisis de sus secuencias de aminoácidos, cuatro de ellas conocidas como almidón sintasas solubles (SSI, SSII, SSIII y SSIV) y una quinta denominada almidón sintasa unida a gránulo (GBSS) (Li *et al.*, 1999b; Dian *et al.*, 2005; Patron & Keeling, 2005). Estas cinco clases están conservadas en todas las especies vegetales analizadas, lo cual sugiere que cada una de ellas posee una función específica que ha sido seleccionada evolutivamente (Szydlowski *et al.*, 2009). La GBSS es la única responsable de la síntesis de amilosa (Denyer *et al.*, 2001a), mientras que las SSS solubles son únicamente responsables de la elongación de las cadenas de amilopectina (Zeeman *et al.*, 2010). De las características funcionales de las diferentes clases de almidón sintasa se hablará más adelante (página 47).

Dos teorías diferentes han sido propuestas para la síntesis de amilosa (van de Wal *et al.*, 1998; Zeeman *et al.*, 2002a): (1) el uso de malto-oligosacáridos (MOS), de entre 2 y 7 unidades de glucosa, como cebador de la GBSS; y (2) el uso de cadenas de la amilopectina como cebador de la GBSS y posterior rotura de las cadenas elongadas. La segunda teoría ha sido propuesta a partir de experimentos realizados *in vitro* con almidón extraído de *Chlamydomonas reinhardtii* (van de Wal *et al.*, 1998), sin embargo, aunque hay evidencias de la elongación de cadenas de amilopectina por la GBSS *in vivo*, no se ha demostrado que la rotura de las cadenas para formar amilosa tenga lugar en otras especies. Por el contrario, se ha demostrado que este hecho no tiene lugar en hojas de *Arabidopsis*, donde la síntesis tiene lugar a partir de MOS (Zeeman *et al.*, 2002a).

La síntesis de almidón (principalmente, la síntesis de amilopectina) requiere además la actividad de las enzimas ramificantes (SBE, EC 2.4.1.18). Las enzimas ramificantes son glucanotransferasas, que generan puntos de ramificación mediante el corte de una cadena de glucosas existente y transferencia del fragmento cortado a otra cadena lineal (o a la misma) a través de la formación de un enlace glucosídico α -(1,6) (Borovsky *et al.*, 1976). Estas enzimas requieren una longitud mínima de la cadena a cortar de 12 unidades de glucosa y transfieren un fragmento de seis o más (Takeda *et al.*, 1993). Existen dos clases de SBEs en plantas superiores (Burton *et al.*, 1995), designadas como SBEI (o clase B) y SBEII (o clase A). Diferentes estudios concluyen que la SBEI transfiere cadenas más largas que la SBEII (Takeda *et al.*, 1993; Guan *et al.*

al., 1997; Morell *et al.*, 1997; Rydberg *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2010). El genoma de *Arabidopsis* codifica para dos SBEs de clase II, pero para ninguna SBE de clase I.

Adquisición de la estructura de la amilopectina.

Aunque inicialmente se pensaba que las actividades SBEs y SBEs eran las únicas requeridas para la síntesis de la amilopectina y la formación del gránulo, actualmente se sabe que algunas de las enzimas desramificantes (DBEs) son también necesarias para la correcta formación de éste. Prueba de la necesidad de otras actividades enzimáticas para la síntesis del gránulo es que la expresión de SBEI y SBEIIb de maíz en células de *E.coli* deficientes en la enzima ramificante del glucógeno, da lugar a la síntesis de glucanos más parecidos al glucógeno que a la amilopectina (Guan *et al.*, 1995). Existen dos clases de DBEs en plantas, las llamadas isoamilasas (ISA, EC 3.2.1.68) y las dextrinasas-limite (LDA, EC 3.2.1.41; también conocidas como pululanastas). Ambas clases pueden hidrolizar los enlaces glucosídicos α -(1,6) (puntos de ramificación), pero muestran diferente especificidad de sustrato, lo cual determina que jueguen papeles diferentes en el metabolismo del almidón. Las LDAs tienen preferencia por sustratos con ramificaciones muy cortas y, a diferencia de las ISAs, son capaces de degradar el pululano (polisacárido fúngico formado por unidades de maltotriosas unidas a través de enlaces α -(1,6)). Las ISAs pueden dividirse, a su vez, en tres subfamilias: ISA1, ISA2 e ISA3 (Hussain *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis* encontramos un gen de cada subfamilia de isoamilasas y otro para la pululanasa. Se ha visto que las enzimas ISA1 e ISA3 son DBEs funcionales, pero ISA2 carece de aminoácidos críticos de su centro activo (Hussain *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que, en todas las especies estudiadas hasta la fecha, ISA1 está implicada en la síntesis de almidón (Ishizaki *et al.*, 1983; Beatty *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 1999; Dauvillee *et al.*, 2001; Delatte *et al.*, 2005). La ausencia de ISA1 provoca la disminución de la producción de gránulos de almidón (insolubles) y el incremento de la producción de fitoglucógeno (soluble). El fitoglucógeno es similar en composición a la amilopectina, pero posee un mayor grado de ramificación, una mayor cantidad de cadenas cortas y, probablemente, una menor distancia entre puntos de ramificación. Los modelos actuales sobre la implicación de las DBEs en la síntesis de almidón proponen que ISA1 actuaría eliminando los puntos de ramificación mal posicionados, evitando así que interfieran en la adquisición de la estructura cristalina del almidón (Ball *et al.*, 1996; Myers *et al.*, 2000; Streb *et al.*, 2008). La distancia entre los puntos de ramificación parece tener una fuerte influencia sobre la capacidad de formación de las dobles hélices. Se ha propuesto que ISA2 tendría un papel regulatorio de la función de ISA1 (Zeeman *et al.*, 1998; Hussain *et al.*, 2003; Bustos *et al.*, 2004; Delatte *et al.*, 2005; Wattedled *et al.*, 2005) y se ha visto, además que ISA1 e ISA2 forman un heteromultímero (Bustos *et al.*, 2004; Delatte *et al.*, 2005).

Inicio del gránulo de almidón.

Al igual que las GSs, las SSs requieren de un extremo no reductor al cual añadir moléculas de glucosa desde el donador glucosílico (UDP-glucosa o ADP-glucosa respectivamente) (Ball & Morell, 2003). Dicho requerimiento implica la existencia de un mecanismo de síntesis del cebador glucosídico. Al comienzo de este trabajo, poco o nada se sabía acerca de dicho mecanismo, aunque diversas teorías habían sido propuestas. Un trabajo previo de nuestro grupo (Roldán *et al.*, 2007b) mostró, por primera vez, la implicación de una SS, la almidón sintasa de clase IV, en la iniciación del gránulo de almidón. Sobre las enzimas que han sido propuestas como responsables del inicio del gránulo de almidón se discutirá más adelante (ver página 58).

Degradación del almidón en plantas.

Los mecanismos de degradación de almidón difieren entre órganos de una misma planta. Actualmente, se tiene un mayor conocimiento de los procesos de degradación del almidón en hojas (almidón transitorio) y del almidón en endospermo de cereales (almidón de reserva). Aunque algunas de las enzimas que intervienen en el proceso son comunes, la ruta de degradación es diferente en cloroplastos y endospermo de semillas germinadas de cereales. Aquí nos centraremos en los mecanismos de degradación del almidón transitorio, los cuales permiten la degradación casi completa del mismo al final del periodo de oscuridad.

La mayoría de los estudios indican que la degradación del almidón transitorio ocurre a una tasa más o menos constante durante toda la noche, suministrando azúcares a la planta durante este periodo. La degradación no tiene lugar a través de una ruta lineal, sino que implica una red de reacciones (Figura 5). Los principales productos de la degradación del almidón son maltosa y glucosa, las cuales son exportadas desde el cloroplasto al citosol para su posterior metabolismo (Lloyd *et al.*, 2005; Zeeman *et al.*, 2007a; Zeeman *et al.*, 2010); y glucosa 1-fosfato (G1P), que es metabolizada en el cloroplasto.

Solubilización de la superficie del gránulo.

La degradación del almidón ocurre a nivel de superficie (Roldán *et al.*, 2007b) y existen múltiples evidencias de que la solubilización de la misma es requerida para que las enzimas degradativas puedan actuar. La ruptura de la estructura de la amilopectina a nivel de superficie del gránulo parece implicar mecanismos de fosforilación transitoria (Zeeman *et al.*, 2010). La fosforilación de las cadenas de la amilopectina sería llevada a cabo por las enzimas dikinasas GWD1 (α -glucan water dikinase; EC: 2.7.9.4) y PWD (*phosphoglucan water dikinase*; EC: 2.7.9.5), provocando la rotura de las hélices dobles y la solubilización de la superficie del gránulo (Ritte *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2001) necesaria para la actuación de las β -amilasas y DBEs (Edner *et al.*, 2007). Estudios recientes han demostrado la necesidad de la eliminación posterior de los grupos fosfato para la completa degradación del gránulo, lo cual probablemente esté relacionado con el

hecho de que las β -amilasas no pueden actuar sobre glucanos fosforilados cerca del extremo no reductor (Kötting *et al.*, 2009). *Arabidopsis* contiene dos fosfoglucono fosfatasa, SEX4 (*Starch Excess 4*) y LSF2 (*Like Sex Four 2*), las cuales son capaces de desfosforilar la amilopectina (Zeeman *et al.*, 2010; Santelia *et al.*, 2011).

Degradación del almidón transitorio.

Tras la solubilización de la superficie del gránulo, las enzimas hidrolíticas degradan los enlaces glucosílicos α -(1,4) y α -(1,6). En cloroplastos de *Arabidopsis*, las enzimas más importantes en la degradación del almidón son probablemente las β -amilasas (BAMs) y las enzimas desramificantes (DBEs). Las BAMs se encargan de la hidrólisis de los glucanos lineales (enlaces α -(1,4)), son exo-amilasas que liberan maltosa desde el extremo no reductor. Las DBEs hidrolizan enlaces α -(1,6) - por tanto, son requeridas para la degradación de la amilopectina - y liberan malto-oligosacáridos lineales cortos. El malto-oligosacárido más corto sobre el que pueden actuar las BAMs es la maltotetraosa.

En *Arabidopsis*, hay nueve genes que codifican para BAMs, al menos cuatro de las cuales (BAM1-BAM4) se localizan en el cloroplasto. BAM1 y BAM3 son enzimas activas y con función parcialmente redundante, BAM2 no es funcional y BAM4 podría estar implicada en el control de la tasa de degradación a través de la detección de los niveles de maltosa (Zeeman *et al.*, 2010).

Existen dos DBEs implicadas en la degradación de almidón en cloroplastos *Arabidopsis*, ISA3 y LDA (Zeeman *et al.*, 2010). Ambas eliminan preferentemente ramificaciones cortas (y tienen su mayor afinidad por dextrinas β -limite), siendo la clase LDA las únicas capaces de degradar pululano (como se comentó en la página 33). Existe cierto solapamiento en la función de ISA3 y LDA y la importancia de cada una de ellas podría depender de la especie.

Otras enzimas implicadas en la degradación de almidón son las α -amilasas (EC: 3.2.1.1), las α -glucano fosforilasas (EC: 2.4.1.1) y las enzimas desproporcionantes (EC: 2.4.1.25). Las α -amilasas son endo-amilasas que liberan oligosacáridos lineales y ramificados. El genoma de *Arabidopsis* codifica para tres α -amilasas (AMY1-AMY3), pero solo AMY3 parece poseer péptido de tránsito al cloroplasto y su función no parece ser esencial para el correcto metabolismo del almidón (Yu *et al.*, 2005).

Las α -glucano fosforilasas catalizan de manera reversible la adición de un grupo glucosilo al extremo no reductor de un glucano desde la G1P, liberando Pi. La dirección de la reacción depende de las concentraciones relativas de G1P y Pi y se ha argumentado que las bajas concentraciones de G1P y los altos niveles de Pi presentes en la célula vegetal favorecerían la reacción en el sentido degradativo (Rathore *et al.*, 2009). En general existen dos isoformas de α -glucano fosforilasas: Pho1 y Pho2 (denominadas PHS1 y PHS2 respectivamente en *Arabidopsis*), pero solo la primera tiene localización plastidial y se relaciona, por tanto, con el metabolismo del almidón. Pho1 posee una alta afinidad por MOS pequeños y lineales, mientras que Pho2 posee mayor afinidad por glucanos altamente ramificados. Aunque su función, se asocia clásicamente

con la degradación de almidón (Wirtz *et al.*, 1980 ; Kruger *et al.*, 1983), al igual que ocurre con AMY3, Pho1 no parece esencial para dicho fin. De hecho, en tejidos fotosintéticos, no existen evidencias directas que impliquen a Pho1 ni en la síntesis ni en la degradación del almidón transitorio. Su ausencia, tanto en hojas de *Arabidopsis* como en hojas de patata, no parece tener ningún efecto sobre el metabolismo del almidón (Zeeman *et al.*, 2004b; Sonnewald *et al.*, 1995). En *Arabidopsis* se ha descrito que las plantas deficientes en PHS1 son más sensibles al estrés hídrico y salino, lo que ha permitido sugerir que dicha proteína sería activada en respuesta a estrés abiótico. La activación de PHS1, bajo condiciones de estrés, dispararía la degradación del almidón y suministraría sustratos a la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (Zeeman *et al.*, 2004b; Lloyd *et al.*, 2005). El debate sobre la función de las α -glucano fosforilasas permanece abierto, las evidencias permiten suponer que juegan un papel diferente en tejidos fotosintéticos y tejidos de reserva, en los cuales, como se explicará más adelante (página 60) podría estar implicada en la iniciación de la síntesis del almidón (Satoh *et al.*, 2008).

La acción combinada de las β -amilasas, α -amilasas y las DBEs sobre el gránulo de almidón libera al estroma maltosa y malto-oligosacáridos. Los malto-oligosacáridos son metabolizados por las β -amilasas y la fosforilasa liberándose maltosa, maltotriosa y maltotetraosa (puesto que maltotriosa y maltotetraosa no pueden ser empleados como sustratos por las β -amilasas y la fosforilasa respectivamente). Los maltooligosacáridos cortos pueden ser metabolizados por la enzima desproporcionante (DPE). Las DPEs son glucanotransferasas con capacidad para catalizar diferentes reacciones: transfieren una parte de un glucano lineal a otro o a una molécula de glucosa. La acción conjunta de las β -amilasas, DPE1 (Critchley *et al.*, 2001) y PHS1 en cloroplastos de *Arabidopsis* resulta en la producción de maltosa y, en menor cantidad, glucosa y G1P. Interesantemente, DPE1 no puede usar maltosa ni como donador ni como aceptor, de modo que el único destino de la maltosa producida durante la degradación del almidón es la exportación al citosol (Lin & Preiss, 1988). Como se comentó al principio de esta sesión (página 34), maltosa y glucosa son exportadas al citosol, mientras que la G1P es metabolizada en el interior del cloroplasto, donde sirve de sustrato para la glucólisis o la ruta de las pentosas fosfato (Zeeman *et al.*, 2004a; Weise *et al.*, 2006). La salida del cloroplasto de la glucosa y la maltosa es posible gracias a la existencia de transportadores en la membrana interna del cloroplasto que facilitan la difusión de estos azúcares.

Con todo ello, se ha propuesto que la degradación del almidón transitorio en hojas de *Arabidopsis* tendría lugar a través del conjunto de reacciones esquematizado en la Figura 5 (Zeeman *et al.*, 2007a). Esta red de reacciones podría ser diferente en otras especies e incluso cambiar en función de las condiciones ambientales, prueba de ello es la presencia de las actividades α -glucosidasa y maltosa fosforilasa en cloroplastos de guisante, actividades que están ausentes en cloroplastos de *Arabidopsis* (Zeeman *et al.*, 2004a).

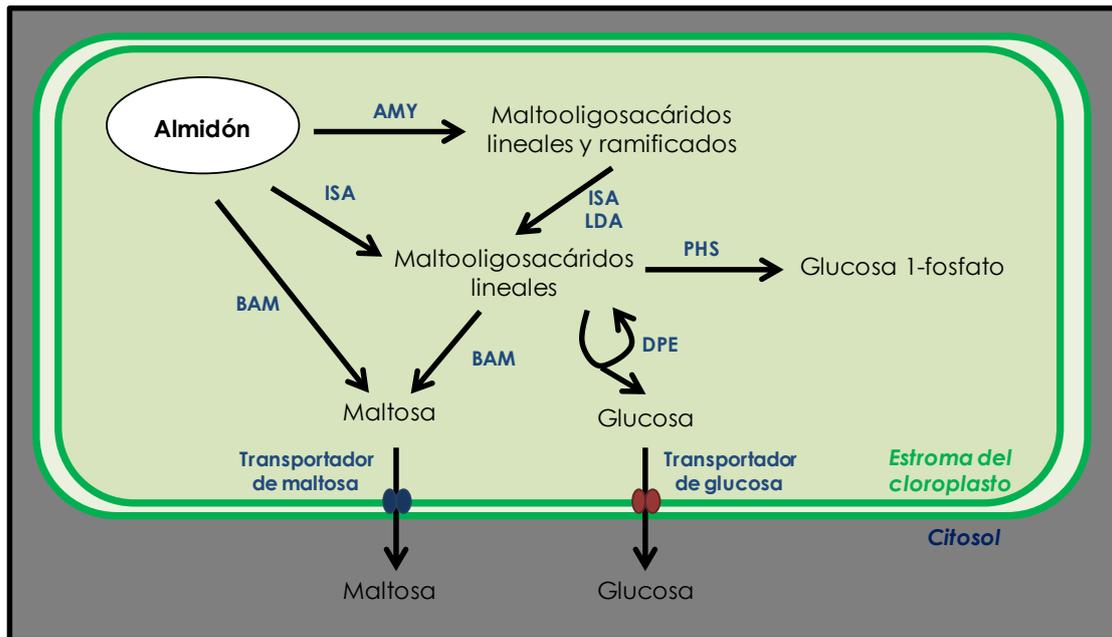


Figura 5. Modelo de las rutas de degradación de almidón en hojas de *Arabidopsis* (adaptado de Zeeman *et al.*, 2007a). AMY es la α -amilasa; ISA, la isoamilasa; BAM, la β -amilasa; LDA, la pululanasa; PHS, la fosforilasa; y DPE, la enzima desproporcionante.

Degradación del almidón de reserva.

Cómo se dijo al principio de este apartado, el caso más estudiado es el de la degradación del almidón en el endospermo de las semillas de los cereales, proceso que tiene lugar en un entorno físico totalmente diferente al de la célula mesófilo (Zeeman *et al.*, 2010). En el momento de la germinación, el endospermo (dónde se acumula el almidón) está muerto. La integridad celular se pierde durante la fase de secado de la semilla y el tejido se compone principalmente de las paredes celulares, los gránulos de almidón y las proteínas de reserva. Las enzimas que degradan el almidón son liberados dentro el endospermo desde el escutelo o la aleurona (capa de células vivas que rodea el endospermo) o, en el caso de β -amilasa, son depositadas en el endospermo durante el desarrollo de la semilla y activadas durante la germinación por acción de las proteasas liberadas desde la aleurona. El producto de degradación del almidón es principalmente glucosa, que es absorbida por las células vivas del embrión.

Los estudios bioquímicos revelan la presencia en el endospermo de cuatro enzimas relacionadas con la degradación del almidón: α -amilasa, β -amilasa, LDA y maltasa. La estructura y la función de estas enzimas se han estudiado en detalle, sin embargo, se sabe relativamente poco sobre la importancia de cada una de ellas en el proceso de degradación del almidón.

Regulación del metabolismo del almidón en plantas.

Además de las diferencias recogidas en la Tabla 2, el almidón de reserva se caracteriza porque los procesos de síntesis y degradación del mismo tienen lugar en fases diferentes del desarrollo, de manera que las enzimas implicadas en la degradación del almidón pueden no estar presentes durante la fase de acumulación del almidón (Zeeman *et al.*, 2010). En contraste, el almidón transitorio es sintetizado cada día y movilizado cada noche, de modo que las enzimas responsables de su degradación están presentes y pudieran ser activas en el cloroplasto durante la síntesis diurna del almidón (Zeeman y cols., 2002). Puesto que mi trabajo se centra en la síntesis de almidón en hojas de *Arabidopsis*, esta sección se referirá exclusivamente a los conocimientos actuales sobre la regulación del metabolismo del almidón transitorio.

Regulación de la síntesis de almidón transitorio.

Está extensamente documentado que, aunque la asimilación fotosintética del carbono ocurre solo durante el día, el crecimiento vegetal y los procesos de mantenimiento celulares requieren aporte de carbono (azúcares) durante todo el ciclo día-noche (Smith & Stitt, 2007a). La disponibilidad de carbono durante la noche es posible gracias a que la asimilación durante el día es suficiente no solo para mantener la demanda inmediata, sino también para permitir la acumulación de compuestos en la hoja que serán movilizados durante la noche para suplir los requerimientos durante este periodo. En *Arabidopsis* (Caspar *et al.*, 1985; Gibon *et al.*, 2004b; Lu *et al.*, 2005) y muchas otras especies (Geiger & Servaites, 1994; Geiger *et al.*, 2000) los productos inmediatos de la asimilación fotosintética del carbono durante el día son la sacarosa (disponible para los requerimientos inmediatos: crecimiento durante el día) y el almidón, el cual es acumulado en la hoja durante el día y degradado durante la noche para producir sacarosa (que suple los requerimientos durante este periodo: crecimiento durante la noche).

La cantidad de fotoasimilados que son destinados a la síntesis de almidón es muy variable dentro del reino vegetal. En algunas especies, como *Glycine max* (soja), *Beta vulgaris* (remolacha azucarera) o *Arabidopsis*, el almidón es la principal forma de reserva, mientras que en otras, como *Phaseolus vulgaris* (frijol) o *Spinacia oleracea* (espinaca), tanto la sacarosa como el almidón son acumulados en hojas durante el día (Zeeman *et al.*, 2007b). En algunas especies, como *Pisum sativum* (guisante) o *Spinacia oleracea*, el almidón es acumulado cuando la síntesis de sacarosa excede tanto la demanda de los tejidos sumidero como la capacidad de acumulación de la hoja, de modo que la síntesis de almidón incrementa durante el día cuando la síntesis de sacarosa decae. Sin embargo, en otras especies, como *Arabidopsis*, el reparto de fotoasimilados entre síntesis de sacarosa y síntesis de almidón es constante a lo largo del día y es regulado por las condiciones ambientales, principalmente por la longitud del día. Así, en estas especies, mientras más larga es la noche, mayor es la proporción de fotoasimilados dirigidos a la síntesis de almidón, con objeto de suplir las necesidades de azúcares durante este periodo. En el caso de *Arabidopsis*, hasta la mitad de los fotoasimilados son destinados a la síntesis de almidón (Zeeman & ap Rees, 1999).

El patrón aparentemente simple de acumulación de almidón durante el día y degradación (casi completa) durante la noche, esconde un complejo y flexible sistema de control (Smith & Stitt, 2007a) que permite a la planta tanto mantener el balance del suministro de azúcares durante el ciclo día-noche, como responder a alteraciones ambientales, tales como cambios del fotoperíodo o cambios en la disponibilidad del carbono, mediante modificación de las tasas de síntesis y degradación de almidón y de la tasa de crecimiento. Así, la tasa de síntesis se ajusta al fotoperíodo para anticipar las necesidades nocturnas y la tasa de degradación, tanto al contenido de almidón como a la longitud de la noche, permitiendo el suministro constante de carbono durante toda la noche (y evitando que se consuma completamente antes de tiempo). Ante una prolongación del periodo de oscuridad y un agotamiento de las reservas de almidón, la planta disminuye la tasa de crecimiento, permitiendo una mayor acumulación de almidón en el subsecuente día que le permita afrontar la mayor duración de la noche. En resumen, cambios en las condiciones ambientales resultan en ajustes finos de la asimilación de carbono, la tasa de crecimiento y la acumulación de almidón permitiendo el mantenimiento de este patrón básico de síntesis y degradación del mismo (Smith & Stitt, 2007a).

Se piensa que el control de la tasa de síntesis de almidón (y, por tanto, la regulación del reparto de fotoasimilados entre síntesis de sacarosa y síntesis de almidón) es llevado a cabo a través de la AGPasa cloroplastídica, cuya actividad es fuertemente regulada a través de mecanismos alostéricos y control redox. La AGPasa es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades pequeñas y dos subunidades grandes. El genoma de *Arabidopsis* codifica para dos subunidades pequeñas: APS1 (Lin *et al.*, 1988b) y APS2 (aunque se cree que APS2 no es funcional; Crevillén *et al.*, 2003); y cuatro subunidades grandes: APL1 (Lin *et al.*, 1988a), APL2, APL3 y APL4 (Ventriglia *et al.*, 2008). Distintas combinaciones de las subunidades confieren propiedades cinéticas y regulatorias diferentes al heterotetrámero (Crevillén *et al.*, 2003). En general, APS1 es la subunidad catalítica y las cuatro isoformas de APL funcionan regulando su actividad, aunque, recientemente se demostró que las isoformas APL1 y APL2 presentan actividad catalítica cuando APS1 es mutada (Ventriglia *et al.*, 2008). La isoforma predominante en hojas es APL1.

La AGPasa es activada alostéricamente por 3-fosfoglicerato (3PGA) e inhibida por Pi (Iglesias *et al.*, 1993). El 3-PGA es un intermediario del ciclo de Calvin y un indicador de la asimilación fotosintética de carbono. Una alta tasa 3PGA:Pi activa a la AGPasa, promoviendo la síntesis de almidón (Preiss, 1988). Este mecanismo juega un papel importante en el reparto de fotoasimilados entre síntesis de sacarosa y síntesis de almidón en muchas plantas (Stitt & Quick, 1989), puesto que cuando la tasa de asimilación fotosintética permite un exceso de síntesis y acumulación de sacarosa, la exportación de triosas-fosfato (TP) a través del transportador TP/Pi se reduce, provocando el aumento de los niveles de TP y la disminución de los de Pi en el interior del cloroplasto, lo cual da lugar a la activación alostérica de la AGPasa.

La AGPasa es también regulada a través de la oxidación/reducción de residuos de cisteína presentes en la región N-terminal de las subunidades pequeñas. La oxidación de estos residuos da lugar a la formación de un puente disulfuro y a una forma del enzima menos activa.

Cuando el puente disulfuro es reducido (roto) el enzima es activado y la Km por sus sustratos disminuye (Fu *et al.*, 1998). Es ampliamente aceptado que la activación redox de la AGPasa ocurre en respuesta a luz (presumiblemente mediado por las tiorredoxinas, que toman el poder reductor desde el PSII) y en respuesta a azúcares (probablemente mediado por la NADP-tiorredoxina reductasa C, NTRC; Michalska *et al.*, 2009), lo cual permitiría el control fino de la actividad de la misma en el cambio día-noche. Sin embargo, un trabajo reciente (Li *et al.*, 2012) muestra que ni NTRC ni las tiorredoxinas plastidiales (Trx) ni la modificación redox de la AGPasa son las principales responsables de la regulación de la acumulación de almidón en respuesta a luz en hojas de *Arabidopsis* (y que la monomerización de APS1 solo depende de NTRC en situaciones de estrés oxidativo).

Por otro lado, se ha propuesto la posibilidad de que la SSIII tenga un papel regulatorio en la síntesis de almidón (Zhang *et al.*, 2005a), dado que su ausencia provoca un incremento de la acumulación del mismo. Se cree que la función regulatoria de SSIII reside en la presencia de un motivo de reconocimiento de proteínas 14-3-3 (Sehnke *et al.*, 2001). Las proteínas 14-3-3 son proteínas de unión a fosfoserina/treonina que participan en procesos regulatorios, mediados por fosforilación, en respuesta a cambios ambientales. Se ha demostrado que la reducción de los niveles de proteínas 14-3-3 del subgrupo ϵ de *Arabidopsis*, provoca un incremento en la acumulación de almidón relacionado con un incremento en la tasa de síntesis, y no con una disminución de la tasa de degradación del mismo, de modo similar a lo descrito para mutantes carentes de SSIII. Se ha propuesto, que las proteínas 14-3-3 serían responsables de la inhibición de la síntesis de almidón en condiciones de luz continua (Sehnke *et al.*, 2001). Sin embargo, la secuencia de SSIII disponible actualmente en la TAIR (At1g11720.1) no posee el motivo de reconocimiento 14-3-3 descrito por Sehnke y cols. (RYGSYP), ni existen, a día de hoy, evidencias directas de la interacción entre SSIII y las proteínas 14-3-3. Curiosamente el motivo RYGSYP (Sehnke *et al.*, 2001) si aparece en la secuencia de SSIV (At4g18240.1).

Regulación de la degradación del almidón transitorio.

Como se comentó al comienzo de este apartado, existen múltiples evidencias de que tanto la síntesis como la degradación de almidón son procesos finamente regulados. La tasa de degradación parece ajustarse tanto al contenido de almidón como a la longitud de la noche, permitiendo el suministro constante de carbohidratos durante toda la noche y evitando que se consuma completamente antes de tiempo, lo cual dispararía las "respuestas de hambre" de la planta. A continuación se citan algunas de las ideas actuales sobre cómo podría estar regulada la degradación del almidón.

En general, se acepta que la degradación del almidón transitorio no tiene lugar durante el día (Zeeman *et al.*, 2002b; Streb *et al.*, 2009) - salvo en ciertas situaciones (Kruger *et al.*, 1983; Häusler *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2002) -, evitándose la aparición de un ciclo fútil de síntesis y degradación de almidón. Este hecho, lleva a pensar que las enzimas degradativas (presentes durante el todo el ciclo día-noche) deben ser inactivas durante día. El trabajo de Delatte y cols. (Delatte *et al.*, 2005) sugiere que las β -amilasas son activas durante el día y muestra, además,

que mutantes que acumulan fitoglucógeno no son capaces de adaptar la tasa de degradación a la longitud de la noche. Estos datos sugieren que los mecanismos de regulación son dependientes de la presencia del gránulo y que un posible paso de regulación sería la solubilización de la superficie del gránulo (ver página 34), de modo que, aunque las β -amilasas sean activas, no podrían actuar sobre el gránulo insoluble (Zeeman *et al.*, 2004a). De ser así, la regulación de la degradación podría ocurrir a través de las enzimas implicadas en la liberación de glucanos solubles desde el gránulo insoluble, mientras que el resto de enzimas podrían no estar reguladas. En este sentido, se ha sugerido que GWD1 podría estar sujeta a regulación redox (Mikkelsen *et al.*, 2005), pero no hay ninguna evidencia de que esto ocurra *in vivo* ni del mecanismo por el que ocurriría.

Frecuentemente, tras el paso de luz a oscuridad, se observa un retraso en el comienzo de la degradación del almidón (Gordon *et al.*, 1980; Fondy & Geiger, 1982; Zeeman & ap Rees, 1999) y se ha sugerido que la disminución del contenido de azúcares de la hoja (más que la propia oscuridad) sería la señal que da lugar al inicio de la degradación (Gordon *et al.*, 1980; Zeeman & ap Rees, 1999). De ser así, los mecanismos de detección de azúcares jugarían un papel importante (Rolland *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta la fecha, no hay ningún dato concluyente que vincule la detección de la disminución de azúcares y los mecanismos de degradación de almidón.

También se ha sugerido que GWD1 (Hejazi *et al.*, 2009) y SEX4 (Hejazi *et al.*, 2010) podrían estar sujetas a inhibición por producto (largos glucanos solubles), sin embargo, no existe ninguna evidencia directa al respecto.

Formación de complejos multiproteicos y fosforilación de proteínas.

Cada vez son más las evidencias de que la formación de complejos multiproteicos juega un papel fundamental en el metabolismo del almidón. Prueba de ello, son los complejos formados por parte de las enzimas de la ruta de biosíntesis de almidón en endospermo de maíz y trigo (Tetlow *et al.*, 2004; Tetlow *et al.*, 2008; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2009). Los diferentes ensayos coinciden en incluir las SSs de clase I, II y III y la SBE, junto con otras proteínas (conocidas o no) dentro de diferentes complejos de alto peso molecular. Tetlow y cols. describen dos complejos en amiloplastos de trigo, uno de 260 KDa y otro de 180 KDa. En el primero identifican a SSI, SSIIa y SBE (no identifican si SBElIa o SBElIb) y suponen que diferentes combinaciones de estas proteínas serían posibles. En el segundo identifican solo a SBE y predicen que el complejo sería en realidad un homodímero de alguna de las dos isoformas (SBElIa o SBElIb). Hennen-Bierwagen y cols. describen la existencia de dos tipos de complejos en amiloplastos de maíz, uno de 600 KDa y otro de 300 KDa. El primero incluiría a SSIII, SSIIa, SBElIa y SBElIb junto con otras proteínas, entre ellas: la AGPasa (ADP-Glc pirofosforilasa) y la PPK (piruvato ortofosfato dikinasa); el segundo, a SSIIa, SBElIa y BEIIb. En *Arabidopsis* no se han descrito hasta la fecha la formación de complejos similares. El papel de la formación de estos complejos multiproteicos es aún desconocido, pero se piensa que podrían funcionar como canalizadores de sustratos, mejorando la eficiencia de síntesis del polímero, es decir dentro de

un mismo complejo el producto de una reacción sería el sustrato de otra (Tetlow *et al.*, 2004). La interacción proteína-proteína podría alterar las características cinéticas de las enzimas, a través de cambios conformacionales, o impedir el acceso al polímero por parte de las enzimas degradativas o facilitar la cristalización de la amilopectina. Futuras investigaciones explicarán la importancia de la formación de complejos multiproteicos en el metabolismo del almidón.

Se ha demostrado que, al menos en el caso del endospermo de trigo (Tetlow *et al.*, 2004), la formación del complejo multiproteico es dependiente de fosforilación. La fosforilación es un mecanismo común de control de la función de proteínas y varias proteínas del metabolismo del almidón han sido identificadas como posibles fosfoproteínas (PGI, PGM1, AGPasa, SSIII,...) mediante estudios de fosfoproteómica en *Arabidopsis* (Kotting *et al.*, 2010). La fosforilación podría jugar un papel importante en la regulación del almidón tanto a nivel de formación de complejos como a nivel de función de proteínas individuales. Aunque las consecuencias de la fosforilación sobre la función de estas proteínas es aún desconocida en la mayoría de los casos, es razonable suponer que alguna de estas modificaciones pueda tener un papel regulatorio.

Regulación transcripcional de los genes del metabolismo del almidón.

Recientemente (Smith *et al.*, 2004) ha sido llevado a cabo un análisis de los cambios diurnos de los transcritos de todos los genes implicados en el metabolismo del almidón en hojas de *Arabidopsis*. Este estudio muestra la alta complejidad de la regulación de la expresión de dichos genes, pues la mayor parte de los transcritos de genes implicados en una misma ruta no muestran un patrón similar de cambios a lo largo del ciclo día-noche.

En cuanto a los genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis de almidón, no se observan cambios en la expresión diurna de PGI1, APS1, SS1, SS3, SS4, SBE1 o LDA1. Los niveles de transcritos de APL1 y PGM1 varían relativamente poco, pero parecen disminuir durante la noche e incrementarse durante el día. Mientras que los transcritos de SBE3 e ISA3 presentan un patrón de expresión próximo al observado en algunos genes relacionados con la degradación del almidón (ver abajo). Los transcritos de GBSS1 muestran los cambios diurnos más dramáticos. Estos cambios ya fueron descritos previamente, tanto en *Arabidopsis* (Tenorio *et al.*, 2003a) como en otras especies (Mérida *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999), y se ha propuesto que estos cambios reflejan la necesidad de resintetizar la proteína después de la degradación nocturna del almidón. GBSS1 aparece exclusivamente asociada al gránulo de almidón (ver página 50) y su estabilidad parece depender de la matriz de amilopectina. Se piensa que al ser liberada, durante la degradación del almidón, el enzima sería degradado también (Tenorio *et al.*, 2003a). Se ha demostrado además que los cambios en la expresión de GBSS1 están sujetos a control circadiano, pues la sobreexpresión de los factores de transcripción CCA1 (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) o LHY (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*), implicados en el control circadiano de la expresión génica (Wang & Tobin, 1998; Schaffer *et al.*, 1998), elimina el patrón diurno de expresión de GBSS1 (Tenorio *et al.*, 2003a). Los cambios en la expresión de SS2 muestran un patrón similar al de GBSS1 y es posible que el motivo sea el mismo (Smith *et al.*, 2004), puesto que

se ha demostrado que gran parte de esta proteína queda encerrada en el interior del gránulo (ver página 52).

Los transcritos de los genes que codifican para enzimas implicadas en la degradación del almidón muestran también un amplio rango de perfiles de expresión. Varios de ellos (GWD1, GWD2, DPE1, DPE2, PHS1) presentan un patrón de expresión similar, con un pico al final del día, previo al inicio del proceso de degradación (Smith *et al.*, 2004), sugiriendo la regulación coordinada de los mismos. Sin embargo, ninguno de los nueve genes BAM presenta un patrón coordinado de expresión.

Aunque algunos de los genes implicados en el metabolismo del almidón presenten un patrón de expresión diurna, en mucho de los casos se ha comprobado que los niveles de proteínas permanecen relativamente constantes a lo largo del día (Tenorio *et al.*, 2003a; Smith *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005), indicando que la regulación posttranscripcional juega un papel más importante que los cambios en la expresión génica en la regulación del metabolismo del almidón. El mantenimiento de los niveles de proteína podría ser el resultado de los niveles de expresión génica y la estabilidad de la proteína, de modo que los cambios de expresión de un gen concreto serían el reflejo de la tasa de recambio de la misma. Los cambios en la expresión génica no explicarían tampoco la rápida adaptación de las tasas de degradación a los cambios en el fotoperiodo.

El origen de la acumulación de almidón como polímero de reserva.

La capacidad de sintetizar almidón se asocia al origen endosimbiótico del cloroplasto. Un ancestro de las actuales cianobacterias fue fagocitado por una célula eucariota heterotrófica, estableciéndose entre ambos una relación simbiótica basada, presumiblemente en la exportación de fotoasimilados desde el "cianobionte" (cianobacteria endosimbionte) al citosol del hospedador. A medida que el cianobionte se convertía en un verdadero orgánulo, fue perdiendo la mayoría de sus genes no relacionados ni con la fotosíntesis ni con las funciones esenciales de mantenimiento y división, y una parte de los genes que quedaron fueron transferidos al núcleo. La endosimbiosis del plástido introdujo la capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica dentro del mundo eucariota (Ball *et al.*, 2011). Tres linajes de eucariotas surgieron durante o después de la integración del plástido: *Chloroplastida* (que incluye a las algas verdes y las plantas terrestres), *Rhodophyceae* (algas rojas) y *Glaucophyta* (algas glaucófitas), que son englobados dentro del supergrupo *Archaeplastida* del dominio *Eukarya*. Los tres linajes de este subgrupo se caracterizan por poseer el plástido "original", con una doble envoltura. Algunas células antecesoras de estos linajes fueron, a su vez, internalizados (probablemente fagocitados) por otros eucariotas heterotróficos, y generaron plástidos secundarios, los cuales aparecen siempre rodeados por más de dos membrana (generalmente

cuatro). Estas segundas endosimbiosis generaron el resto de líneas de eucariotas fotosintéticos (algas pardas, diatomeas, dinoflagelados, criptofitas, haptofitas,...) (Figura 6).

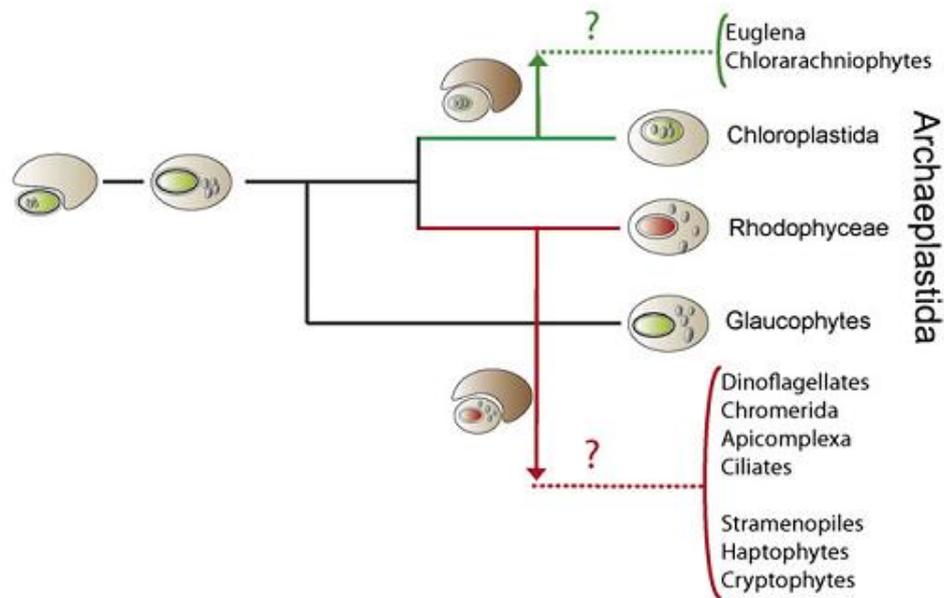


Figura 6. Esquema de las endosimbiosis que dieron lugar a los plastos (de Ball *et al.*, 2011). Los eucariotas fotosintéticos derivaron de un mismo suceso: la fagocitosis de un ancestro de las actuales cianobacterias por una célula eucariota heterótrofa, que llevó al establecimiento de la simbiosis entre ambas células. El supergrupo *Archaeplastida* engloba a los linajes de eucariotas fotosintéticos que surgieron de este evento: *Chloroplastida*, *Rhodophyceae* y *Glaucophytes*. Las glaucofitas son algas unicelulares de agua dulce que contienen un plástido llamado cianela. Las cianelas son plastos que retienen características típicas de las cianobacterias (por ejemplo, poseen una pared residual de peptidoglicano y carboxisomas) no presentes en los plastos de rodofitas (rodoplastos) o algas verdes y plantas terrestres (cloroplastos). Rodoplastos y cloroplastos pueden diferenciarse por su estructura y la composición de sus pigmentos antenas (los primeros aún poseen ficobilinas, mientras los segundos poseen clorofila b). El almidón es acumulado en el citosol de algas glaucofitas y rojas, mientras que, en algas verdes y plantas terrestres, lo hace en el interior de los plástidos. La idea actual es que la cianobacteria ancestral acumulaba almidón, mientras que la eucariota heterótrofa acumulaba glucógeno en su citosol. La habilidad para sintetizar almidón fue transmitida al citosol del hospedador y perdida por el cianobionte (cianobacteria endosimbionte obligada). Más tarde, el metabolismo del almidón se redirigió al interior de los plastos en los cloroplastos. Algunos miembros de *Archaeplastida* fueron, a su vez, fagocitados por otros linajes de eucariotas heterótrofos (endosimbiosis secundaria), generando los plástidos secundarios característicos del resto de líneas de eucariotas fotosintéticas (algas pardas, diatomeas, dinoflagelados, criptofitas, haptofitas,...). La capacidad de acumular almidón no se ha conservado en todas las líneas fruto de endosimbiosis secundarias, pero sí en algunas.

Además de la fotosíntesis, los eucariotas relacionados con el supergrupo *Archaeplastida* ganaron otra serie de características bioquímicas, entre ellas la capacidad de acumular almidón. Los eucariotas del supergrupo *Archaeplastida* y algunos, no todos, de sus derivados por una segunda endosimbiosis acumulan almidón. Sin embargo, mientras algas verdes y plantas terrestres lo acumulan en el interior de los plastos (cloroplastos y amiloplastos), las algas rojas, las algas glaucofitas, los dinoflagelados y los apicomplexa, lo hacen en el citosol y las criptofitas, en el espacio periplastidial, que corresponde al citosol del alga arqueoplastidial que fue internalizada tras una segunda endosimbiosis (Ball *et al.*, 2011). Al almidón sintetizado en el citosol o en el espacio periplastidial se le denomina históricamente almidón florideano (Viola *et al.*, 2001).

El descubrimiento reciente de la acumulación de verdadero almidón (con amilosa y amilopectina formando gránulos) en una cianobacteria unicelular marina denominada *Cgl1*, relacionada con los géneros *Cyanobacterium* y *Crocospaera* del subgrupo V de

cianobacterias, ha supuesto la evidencia definitiva del origen cianobacteriano de la síntesis de almidón (Deschamps *et al.*, 2008). Trabajos anteriores habían descrito la presencia de glucógeno modificado o estructuras parecidas a la amilopectina en otras cianobacterias del subgrupo V (Nakamura *et al.*, 2005). Un ejemplo, son los estudios de Schneegurt y cols. (Schneegurt *et al.*, 1994) que describieron que el tamaño de las moléculas de glucógeno en la cepa *Cyanothece sp.* ATCC51142 (perteneciente también al subgrupo V de cianobacteria) sobrepasaban el límite teórico que puede alcanzar una molécula con la estructura del glucógeno. Trabajos posteriores (Nakamura *et al.*, 2005; Deschamps *et al.*, 2008) mostraron que la cepa *Cyanothece sp.* ATCC51142 posee gránulos de amilopectina (sin amilosa).

Todas las cianobacterias que acumulan polímeros semicristalinos parecidos al almidón pertenecen al subgrupo V de cianobacterias (usando la clasificación basada en el RNAr 16 S, Honda *et al.*, 1999). Las cianobacterias de este subgrupo son diazotróficas unicelulares, carentes de la formación de heterocistos, debido a su incapacidad de formar filamentos. Los heterocistos permiten el funcionamiento de la nitrogenasa, separandola espacialmente de las concentraciones de oxígeno celulares, que la inactivarían rápidamente (la nitrogenasa es especialmente sensible al daño oxidativo). Las cianobacterias del subgrupo V presentan una separación temporal de los procesos de fijación de nitrógeno y fotosíntesis oxigénica: la fijación de nitrógeno ocurre exclusivamente durante la noche. Se ha propuesto que, en las cianobacterias del subgrupo V la presión selectiva habría favorecido la síntesis de un poliglucano que permitiese una mayor acumulación de carbono y energía, debido a la necesidad de separar temporalmente estos procesos (Deschamps *et al.*, 2008). En este sentido, la acumulación de almidón presenta ventajas frente a la acumulación de glucógeno, pues permite acumular grandes cantidades de carbohidrato en una forma osmóticamente inerte durante el día y ser degradado durante la noche (como se ha demostrado que ocurre con los gránulos de *Cyanothece sp.* ATCC51142; Schneegurt *et al.*, 1994; Schneegurt *et al.*, 1997).

Deschamps y cols. (Deschamps *et al.*, 2008) demostraron recientemente que la presencia de amilosa en *Clg1* se corresponde con la presencia de GBSS en dicha cianobacteria; ha sido la primera vez que se ha descrito la presencia de GBSS en una cianobacteria y apoya los estudios previos que indicaban la relación filogenética de GBSS y la GS de origen cianobacteriano. La presencia de almidón verdadero y actividad GBSS dentro del subgrupo V de cianobacterias ha permitido postular que un ancestro de algunas de las cianobacterias actuales de este subgrupo habría sido el endosimbionte que dió lugar a los plastos de los eucariotas fotosintéticos.

El metabolismo del almidón surge de la fusión de los respectivos metabolismos de acumulación de polisacáridos del cianobionte (almidón) y la célula hospedadora (glucógeno). Prueba de ello es que, filogenéticamente, las rutas de síntesis y degradación están formadas por un mosaico de enzimas de distinto origen (ver Tabla 3 en página 54): el hospedador o el cianobionte (o *Chlamydia*, según recientes estudios, como se comentará más adelante).

Se cree (y la mayoría de las evidencias lo apoyan) que la evolución del orgánulo, desde el momento de establecerse la endosimbiosis hasta su estado actual debió implicar dos fases. En

la primera fase, se pudo haber establecido algún tipo de simbiosis metabólica entre la cianobacteria y la célula hospedadora, simbiosis que llevó a la primera a convertirse en un parásito obligado, a través de la pérdida algunos genes (los no relacionados con la fotosíntesis o las funciones esenciales de mantenimiento y división) y la transferencia de otros al núcleo de la célula hospedadora, proceso denominado *endosymbiotic gene transfer* (EGT). La pérdida de la capacidad de acumular polisacáridos es una característica evidenciada de los endosimbiontes obligados (Henrissat *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2004). La expresión de los genes transferidos al núcleo habría permitido la síntesis de almidón en el citosol de la célula hospedadora (Deschamps *et al.*, 2008; Ball *et al.*, 2011). La segunda fase en la evolución del orgánulo consistiría en la aparición de un sistema sofisticado y efectivo de direccionamiento (*targeting*) de proteínas al futuro orgánulo, que permitiese la reorganización final de las funciones del hospedador y el simbiote. Esta segunda fase generaría los genomas de los plástidos actuales y sería el momento en que los tres linajes de *Archaeplastida* se diversificaron. En algas rojas y glaucocitas, la síntesis se mantuvo en el citosol. En ambas, la síntesis de almidón ha evolucionado hacia el uso preferente de UDP-Glc, probablemente como consecuencia de la pérdida de la AGPasa. En algas verdes y plantas terrestres (*Chloroplastida*), sin embargo, la ruta de síntesis se basa en el uso exclusivo de ADP-Glc, de modo que tanto las enzimas que producen ADP-Glc como las que la usan como sustrato para la elongación presentan filogenia bacteriana (Deschamps *et al.*, 2008). En ellos se llevó a cabo un nuevo traslado de la acumulación de almidón, de vuelta al interior del orgánulo, que supuso el marcaje de todas las proteínas implicadas en el metabolismo del almidón con señales de transporte al cloroplasto (péptido de tránsito al cloroplasto, CTP). Los motivos por los que se selecciono la acumulación de almidón en este linaje continúan siendo un misterio.

Recientes estudios han mostrado la existencia de relación filogenética entre numerosos genes de *Chlamydia* y *Archaeplastida*, principalmente genes con funciones plastidiales. La aparición de estos genes se ha relacionado con la existencia de transferencia horizontal de genes desde *Chlamydia* a la célula eucariota hospedadora (Moustafa *et al.*, 2008). Dentro del metabolismo del almidón, existen dos candidatos que podrían haber sido transferidos desde *Chlamydia*: las isoamilasas (a las cuales, además, no se les había podido asociar hasta ahora un origen filogenético) y una SS soluble (que habría sido en ancestro de las actuales clases III y IV de SSs) (Ball *et al.*, 2011).

LAS ALMIDÓN SINTASAS.

Cómo se explicó previamente (página 32), la elongación de las cadenas de moléculas de glucosa es llevada a cabo por las almidón sintasas (EC 2.4.1.21), que catalizan la transferencia del grupo glucosilo de la ADP-glucosa al extremo no reductor de una cadena en crecimiento mediante la formación de un nuevo enlace glucosídico α -(1,4) y con liberación de ADP (Mukerjea *et al.*, 2002). En base al análisis de sus secuencias de aminoácidos, se pueden diferenciar cinco clases de almidón sintasas, cuatro de ellas conocidas como almidón sintasas solubles (SSI, SSII, SSIII y SSIV) y una quinta denominada almidón sintasa unida a gránulo (GBSSI) (Ball & Morell, 2003; Li *et al.*, 2003; Dian *et al.*, 2005; Patron & Keeling, 2005; Leterrier *et al.*, 2008). Estas cinco clases están presentes en todas las especies vegetales estudiadas hasta la fecha y, los proyectos de secuenciación de algas unicelulares muestran que la mayoría de ellas están presentes en algas, lo que sugiere que los procesos de duplicación génica que dieron lugar a las cinco clases de SSs ocurrieron antes de la evolución de las plantas superiores (Leterrier *et al.*, 2008). La conservación de estas cinco clases, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, apoya la idea de que cada una de ellas posee una función única en la síntesis de almidón que ha sido seleccionada evolutivamente. En *Arabidopsis thaliana* encontramos una única representante de cada clase (GBSSI, SSI, SSII, SSIII y SSIV), mientras que en arroz se han descrito 10 isofosmas de SSs: dos de GBSS (GBSSI y GBSSII), una de SSI, tres de SSII (SSIIa, SSIIb y SSIIc, también llamadas SSII-3, SSII-2 y SSII-1 respectivamente), dos de SSIII (SSIIIa y SSIIIb, también denominadas SSIII-2 y SSIII-1 respectivamente) y dos de SSIV (SSIVa y SSIVb o SSIV-1 y SSIV-2 respectivamente) (Hirose & Terao, 2004). Esta multiplicidad intra-clase se ha descrito también para otras especies de cereales, mientras que en dicotiledóneas no se han descrito más de un gen para cada clase. Sin embargo, aún no está claro si la presencia de varias isoenzimas de cada clase es una característica de cereales en particular o de monocotiledóneas en general, o si, de manera alternativa, es una característica de plantas con alta acumulación de almidón en órganos de reserva (Hirose & Terao, 2004).

Los diez genes de SSs de arroz han sido clasificados por diferentes autores según su patrón temporal de expresión durante el desarrollo del grano. Hirose y Terao (Hirose & Terao, 2004) dividieron a las SSs en tres grupos: (1) expresores tempranos (SSII-2, SSIII-1 y GBSSII), que son expresados en la fase temprana de llenado del grano (1-5 días después de la floración, DAF); (2) expresores tardíos (SSII-3, SSIII-2 y GBSSI), que son expresados en la fase media-tardía del llenado del grano (con un pico de expresión el 5º DAF); y (3) expresores estables (SSI, SSII-1, SSIV-1 y SSIV-2), cuyos niveles de expresión son relativamente constantes durante el llenado del grano. Posteriormente, Ohdan y cols. (Ohdan *et al.*, 2005) analizó la expresión de todos los genes relacionados con la biosíntesis de almidón durante el desarrollo de la semilla de arroz, estableciendo cuatro grupos en función del patrón temporal y el nivel de expresión. El grupo 1 incluye a los genes con un nivel de expresión muy alto en los primeros estados de desarrollo de la semilla y un pico entre los días 3 y 5 después de la floración. Dentro de este grupo se incluye a

la SSIII-1. El segundo grupo corresponde a los genes con una expresión media en las primeras fases del desarrollo, que alcanzan el pico de máxima expresión el 5° DAF y, a continuación, decaen gradualmente hasta el 10° DAF. En este grupo se incluyen SSI (cuya expresión aumenta levemente entre los días 10 y 15 después de la floración) y SSIV-2 (que continúa decayendo entre los días 10 y 15 después de la floración). El grupo 3 presenta niveles muy bajos o basales de expresión en las primeras fases del desarrollo de la semilla e incrementan rápidamente entre los días 5 y 7 después de la floración, tras lo cual los niveles son mantenidos relativamente altos hasta la maduración de la semilla. En este grupo se encuentran SSII-3, SSIII-2 y GBSSI. El cuarto grupo se caracteriza por un nivel de expresión bajo al principio (1-5 DAF) y una disminución posterior hasta niveles basales. Dentro de este grupo se incluyen SSII-2, SSII-1, SSIV-1 y GBSSII.

Los patrones de expresión temporal parecen además asociados a patrones espaciales de expresión en tipos celulares concretos. En general, los genes incluidos en el grupo de expresores tempranos de Hirose y Terao (Hirose & Terao, 2004) - o grupos 1 y 4 de Ohdan y cols. (Ohdan *et al.*, 2005) - se expresan más o exclusivamente (dependiendo del caso) en tejidos fotosintéticos (hojas o pericarpo de la semilla, donde entre los días 1 y 3 después de la floración tiene lugar la síntesis de almidón transitorio), mientras que los expresores tardíos - o grupos 2 y 3 - lo hacen en tejidos de reserva (endospermo) (Hirose & Terao, 2004; Ohdan *et al.*, 2005). Los genes denominados expresores estables aparecen en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos: SSI se expresa por igual en ambos tejidos e independientemente del momento del desarrollo (Ohdan *et al.*, 2005); los niveles de transcritos de SSII son muy bajos tanto en hojas como en endospermo (Ohdan *et al.*, 2005); y SSIV-1 y SSIV-2 se expresan tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintético, aunque la expresión de SSIV-1 es mayor en endospermo que en hojas y la de SSIV-2 es mayor en hojas que en endospermo (Dian *et al.*, 2005; Leterrier *et al.*, 2008), siendo los transcritos de SSIV-2 en ambos tejidos más abundantes que los de SSIV-1. Evidencias de este patrón de expresión espacial de las diferentes isoenzimas de una misma clase se han obtenido, además de en arroz (Hirose & Terao, 2004), en maíz (Harn *et al.*, 1998) y en cebada (Nakamura *et al.*, 1998). Un patrón de expresión similar es observado en las enzimas ramificantes (SBElIa y SBElIb) de arroz y maíz (Mizuno *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 1997). Se ha sugerido que la participación de diferentes isoenzimas en la síntesis de almidón en diferentes órganos sería la responsable de las diferencias observadas entre el almidón transitorio y el almidón de reserva (Tomlinson *et al.*, 1998).

Los estudios de expresión génica durante el llenado de las semillas de *Arabidopsis* (oleaginosa) revelan que la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos ocurre en las primeras fases de dicho proceso, de modo similar a lo descrito para los expresores tempranos en arroz, mientras que en las siguientes etapas del llenado de las semillas, se expresan los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos (Ruuska *et al.*, 2002). Este dato apoyaría la idea de que los expresores tempranos están relacionados con la síntesis de almidón transitorio y los expresores tardíos con la del almidón de reserva (Dian *et al.*, 2005).

Varios estudios de mutantes carentes de amilosa de diferentes especies de plantas superiores han demostrado que la GBSS es la única clase responsable de la síntesis de amilosa

(Tetlow, 2006), mientras que SSI, SSII, SSIII y SSIV están implicadas en la síntesis de amilopectina (Ball & Morell, 2003; Li *et al.*, 2003). La GBSS se encuentra exclusivamente unida al gránulo de almidón, inmersa en el mismo (Denyer *et al.*, 2001a; Li *et al.*, 2003), mientras las denominadas SS solubles pueden encontrarse tanto en la fracción soluble (estroma) como asociadas al gránulo. SSIII y SSIV se encuentran exclusivamente en el estroma, mientras que SSI y SSII se distribuyen en ambas fracciones (Li *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2006; Roldán *et al.*, 2007b). La diferente distribución de las diferentes clases de SSs podría influenciar en sus diferentes comportamientos cinéticos debido a la diferente interacción con los sustratos y con otras enzimas de la síntesis de almidón.

Todas las almidón sintasas poseen tres regiones diferentes: un péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) amino-terminal, un dominio amino, característico de cada clase, y un dominio carboxi-terminal, con una alta homología a las glucógeno sintasas (GSs).

La actividad metabólica básica de las SSs y de las GSs es definida por una región altamente conservada compartida por estas enzimas. Dicha región supone el dominio carboxi-terminal de las SSs vegetales (aproximadamente 60 kDa de longitud) y prácticamente toda la secuencia proteica de las GSs de procariontes. La principal variación de esta región entre las SSs es una extensión de 20 aminoácidos presente solo en la GBSS (Edwards *et al.*, 1999a). Dentro de esta región conservada se encuentra el dominio catalítico del almidón (GT-5) y el dominio glucosiltransferasa 1 (GT-1) característicos de la superfamilia de glucosiltransferasa GT5 (Edwards *et al.*, 1999a). El dominio GT-5 es característico de las glucosiltransferasas que usan ADP-Glc como sustrato, mientras que el dominio GT-1 se encuentra en proteínas que transfieren azúcares unidos a UDP, ADP, GDP o CMP a diferentes sustratos y no es exclusivo de las GSs o las SSs. Dentro del dominio GT-5 se localiza el motivo K-X-G-G-L (motivo KXGGL amino), altamente conservado e implicado en la catálisis y/o la unión del sustrato (Leterrier *et al.*, 2008). Un motivo similar a K-X-G-G-L (motivo XXGGL carboxilo) ha sido descrito en la región carboxi-terminal del dominio carboxilo (Furukawa *et al.*, 1990; Edwards *et al.*, 1999a). Estudios de modelado predicen que los motivos KXGGL amino y XXGGL carboxilo quedarían próximos en la estructura de las proteínas y se ha propuesto que las diferencias en estos motivos entre las diferentes SSs podrían ser una de las razones de sus diferentes características catalíticas y son empleadas a la hora de crear árboles filogenéticos.

A diferencia del dominio carboxi-terminal, el dominio amino-terminal no muestra homología de secuencia entre las diferentes SSs y no parece estar directamente implicado en la actividad catalítica de las mismas. El dominio amino-terminal es característico de cada clase de SS, posee regiones altamente conservadas entre diferentes especies, y podría ser responsable de las características cinéticas y/o la interacción con el sustrato, así como de la capacidad de las diferentes SSs para formar complejos enzimáticos (mediante interacción con otras enzimas de la síntesis de almidón), lo cual parece ser un factor determinante en la síntesis de la amilopectina (Leterrier *et al.*, 2008).

Características de la almidón sintasa unida a gránulo (GBSS).

La almidón sintasa unida a gránulo (GBSS) es la única responsable de la síntesis de amilosa (Tsai, 1974; Rahman *et al.*, 1995; Denyer *et al.*, 2001a; Tetlow, 2006) y se encuentra exclusivamente asociada al gránulo de almidón, quedando encerrada en el interior del mismo y no unida a su superficie. Plantas mutantes de diferentes especies carentes de GBSS1 sintetizan solo amilopectina (Denyer *et al.*, 2001a; Szydłowski *et al.*, 2011a), indicando que ninguna de las SSs solubles puede complementar su función, pese a que algunas de ellas (SSI y SSII) aparecen también asociadas al gránulo. Existen múltiples evidencias de que, al menos parte de la GBSS encerrada en el gránulo es activa y de que la ADP-Glc puede penetrar en el interior del gránulo (Denyer *et al.*, 2001b). Cuando los gránulos son rotos, la actividad de la GBSS1 se ve incrementada, probablemente por un mejor acceso a la ADP-Glc. La síntesis de amilosa por la GBSS en el interior de la matriz de amilopectina no parece ocurrir de forma homogénea como pequeñas cantidades distribuidas por todo el gránulo, sino que, más bien es confinada en la zona central del mismo, estando la zona periférica libre de amilosa. Esto podría deberse a que los niveles de síntesis de GBSS no son tan altos como el crecimiento de la matriz de amilopectina, de modo que llegado a un punto no hay GBSS que se una a la amilopectina recién formada. Acorde con esta idea, los niveles de expresión génica de GBSS1 en *Arabidopsis* presentan un patrón diurno con un máximo en las primeras horas del día (Tenorio *et al.*, 2003b).

Existen diferentes ideas acerca de cuáles son las propiedades exclusivas de la GBSS que hacen que sea la única responsable de la síntesis de amilosa. En primer lugar, al ser sintetizada en el interior del gránulo (Visser *et al.*, 1991; Tatge *et al.*, 1999; Glaring *et al.*, 2006), la amilosa no es accesible a la modificación por las enzimas ramificantes (entre otras), lo cual podría explicar que permanezca lineal. Sin embargo, el hecho de que otras SSs aparezcan en el interior del gránulo (como SSII, con la cual se ha comparado frecuentemente) y sean incapaces de suplir la síntesis de amilosa en ausencia de GBSS, indica que estar en el interior del gránulo no es el único requerimiento para la síntesis de amilosa. La GBSS debe tener otras características que le permitan ser la única SS responsable de la síntesis de amilosa.

Se ha demostrado que la GBSS puede usar como cebador tanto malto-oligosacáridos (MOS) (Denyer *et al.*, 1996; Zeeman *et al.*, 2002a) como cadenas laterales de la molécula de amilopectina (Denyer *et al.*, 1996; Maddelein *et al.*, 1994; van de Wal *et al.*, 1998; Denyer *et al.*, 1999b; Fulton *et al.*, 2002). Sin embargo, la elongación de las cadenas de la amilopectina por la GBSS no parece estar implicada, al menos en hojas de *Arabidopsis* (Zeeman *et al.*, 2002a), en la síntesis de amilosa (ver página 32), a diferencia de lo propuesto para *Chlamydomonas reinhardtii* (van de Wal *et al.*, 1998). El modelo propuesto para la síntesis de amilosa por la GBSS supone que los MOS, al igual que la ADP-Glc difundiría a través de la matriz de amilopectina y sería usado como cebador para la síntesis de amilosa (Denyer *et al.*, 2001a). En este sentido, aunque las SSs solubles (en particular las localizadas también en el interior del gránulo) podrían también usar los MOS como sustratos, se ha demostrado que el modo de acción de la GBSS difiere del de las SSs solubles, siendo la primera la única SS que actúa de modo procesivo, es

decir, la única que se une a un MOS (glucano cebador) y lo elonga generando cadenas no ramificadas de cientos de moléculas de glucosa (Denyer *et al.*, 1999b). Este hecho, junto con la mayor afinidad por los MOS de la GBSS frente a las SSs solubles, podría ser responsable de que solo la GBSS sea capaz de sintetizar amilosa (Denyer *et al.*, 2001a). Se ha demostrado también que la afinidad de GBSS1 por los MOS y su procesividad son dependientes de la presencia de amilopectina (Denyer *et al.*, 1999a), hecho que parece determinado tanto por su motivo XXGGL carboxilo como por su "cola" carboxi-terminal (exclusiva de esta enzima, Figura 82) (Edwards *et al.*, 1999b).

A medida que el gránulo crece, la GBSS1 va quedando encerrada en su interior y su actividad se hace dependiente de la difusión de la ADP-Glc y los MOS desde el estroma hacia el interior del gránulo (Denyer *et al.*, 2001a). Se ha demostrado que tanto la expresión del gen GBSS1 como la actividad de la proteína están sujetos a regulación circadiana (ver página 42), mientras que los niveles de proteínas permanecen constantes a lo largo del día (Tenorio *et al.*, 2003a). La disminución de la actividad a lo largo del día podría deberse a su dependencia de la difusión de la ADP-Glc al interior del gránulo: a medida que el gránulo crece, una mayor cantidad del enzima queda inactiva por no tener ADP-Glc a su disposición. En este sentido, debe considerarse, además, la menor afinidad por la ADP-Glc de la GBSS frente a las SSs solubles.

Características de las almidón sintasas solubles.

Las almidón sintasas solubles (SSI, SSII, SSIII y SSIV) se encuentran predominantemente en el estroma y se encargan de la elongación de las cadenas de la amilopectina (Zeeman *et al.*, 2010). Estudios de mutantes simples carentes de las diferentes clases de SSs han mostrado que cada una de ellas tiene preferencia por la elongación de cadenas de una determinada longitud, de modo que la pérdida de una clase en particular de SS provoca un cambio específico en la estructura de la amilopectina (Zeeman *et al.*, 2007b). La SS de clase I (SSI) elonga preferentemente cadenas cortas (9-10 unidades de glucosa; Delvallé *et al.*, 2005b; Fujita *et al.*, 2006); la SS de clase II (SSII), cadenas intermedias (13-22 unidades de glucosa; Craig *et al.*, 1998; Morell *et al.*, 2003); y la SS de clase III (SSIII), cadenas largas (más de 25 unidades de glucosa; Zhang *et al.*, 2005a). Un trabajo previo de nuestro grupo (Roldán *et al.*, 2007b) mostró que la ausencia de la SS de clase IV (SSIV) no provoca ningún cambio en la estructura del almidón (contenido de amilosa, distribución de longitud de cadenas,...), aunque su ausencia provoca la acumulación de un único gránulo por cloroplasto de mayor tamaño que los presentes en plantas silvestres. La especificidad de sustrato y las características cinéticas de las diferentes SSs solubles podrían ser la explicación a las limitaciones de tamaño de las cadenas de la amilopectina, siendo de este modo responsables (junto con las enzimas ramificantes y desramificantes) de la distribución bimodal de las longitudes de las cadenas de la amilopectina y de la morfología del gránulo. Es importante tener presente que la contribución cuantitativa y cualitativa de una determinada isoforma de SS está determinada, al menos en parte, por la

estructura del glucano que tenga como sustrato, la cual dependerá de la presencia o ausencia del resto de enzimas presentes implicadas en la síntesis. Prueba de ello es el diferente efecto que puede tener la eliminación de una determinada clase de SS en función del fondo genético (Edwards *et al.*, 1999b).

Todas las SSs solubles poseen un dominio amino mayor que el de la GBSS1, el cual, como se mencionó anteriormente (ver página 49), es característico de cada clase. El dominio amino-terminal no muestra homología de secuencia entre las diferentes SSs y no parece estar directamente implicado en la actividad catalítica de las mismas, sino en la modulación de la actividad y/o la interacción con el sustrato, así como en la capacidad de las diferentes SSs para formar complejos enzimáticos (mediante interacción con otras enzimas de la síntesis de almidón), lo cual parece ser un factor determinante en la síntesis de la amilopectina (Leterrier *et al.*, 2008).

La SSI se localiza tanto en el estroma como asociada al gránulo y, aunque inicialmente se pensó que su dominio amino era importante para su unión al gránulo (Imparl-Radosevich *et al.*, 1998), posteriormente se demostró (Commuri & Keeling, 2001), que tanto el dominio amino como el dominio carboxilo son responsables de la afinidad del enzima por el glucano. SSI es incapaz de elongar cadenas de glucanos de más de 20 unidades de glucosa y usa como cebador preferente cadenas de menos de 10 unidades, sin embargo presenta una mayor afinidad por glucanos largos que cortos (la afinidad incrementa linealmente para glucanos de 14 a 20 unidades de glucosa). Todo ello ha llevado a proponer que SSI actúa principalmente rellenando las cadenas de los *clusters*, siendo incapaz de sintetizar cadenas lo suficientemente largas como para ser sustrato de las enzimas ramificantes o unir diferentes *clusters* (Commuri & Keeling, 2001; Delvallé *et al.*, 2005b). La alta afinidad del enzima por las cadenas de mayor longitud sería responsable de que SSI quede inmersa en el gránulo dónde, al ser rodeada por cadenas de más de 20 unidades de glucosa, sería prácticamente inactiva. Estas características de la SSI explicarían además su incapacidad de síntesis de amilosa. La elongación de las cadenas sintetizadas por SSI, necesaria para la síntesis de la amilopectina (uso por las enzimas ramificantes y conexión de los diferentes *clusters*), sería llevada a cabo por otras SSs (SSII o SSIII), de modo que la competición de SSI con éstas podría ser el mecanismo que regulara el crecimiento y tamaño de las cadenas de la amilopectina (Delvallé *et al.*, 2005b).

La SSII fue descrita inicialmente como una GBSS (Edwards *et al.*, 1995) debido a su predominio en el interior del gránulo, aunque poco después (Edwards *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1999a) se demostró su presencia tanto en gránulo como en el estroma. Pese a su similitud con GBSS, SSII no es capaz de sintetizar amilosa y, aunque existen múltiples hipótesis al respecto (Edwards *et al.*, 1999a), no existen evidencias directas que demuestren ninguna de ellas. Algunos de los motivos podrían ser su incapacidad de elongar de manera procesiva los MOS y su menor afinidad por estos respecto a la GBSS en presencia de amilopectina. El dominio amino de SSII parece no determinar sus propiedades catalíticas y se cree que estaría implicado en el reparto de la misma entre el estroma y el interior del gránulo (Edwards *et al.*, 1999a). Los análisis de la distribución bimodal de las longitudes de las cadenas de la amilopectina en mutantes carentes de SSII

implican a esta enzima en la síntesis de cadenas de longitud intermedia necesarias para la formación de las láminas cristalinas (Craig *et al.*, 1998; Morell *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

La SSIII se encuentra exclusivamente en la fracción soluble (Zhang *et al.*, 2008b), aunque su dominio N-terminal posee tres dominios de unión a almidón (SBD; Valdez *et al.*, 2008a) que le permiten su interacción con el mismo. Los SBDs son módulos no catalíticos pertenecientes a la familia CBM (módulos de unión a carbohidratos). El dominio amino de SSIII (en particular sus SBDs) modula las propiedades catalíticas de este enzima a través de la interacción de los dominios carboxilo y amino (Wayllace *et al.*, 2010a). Se ha propuesto que SSIII sería la responsable de la síntesis de las cadenas de glucosa que unen los *clusters* en la molécula de amilopectina (Tetlow, 2006) y que su función sería parcialmente solapante con SSII, pero no con SSI. De este modo, en ausencia de SSII, SSIII sería capaz de llevar a cabo la síntesis de las cadenas de longitud intermedia, lo cual explicaría el efecto sinérgico observado en ausencia de ambas (Zhang *et al.*, 2008b). Estudios con plantas carentes de las actividades SSII y SSIII (Edwards *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 2008b) muestran que ambas enzimas son capaces de realizar funciones parecidas (al menos en ausencia la una de la otra) en la formación de la estructura de la amilopectina, de modo que las características del gránulo de almidón en ausencia de ambas no pueden ser predicha a partir de los efectos individuales de la ausencia de cada una de ellas (son mucho más drásticos de lo esperado). Estas observaciones apoyan la idea de que la distribución bimodal de las longitudes de las cadenas de la amilopectina es determinada en gran parte por la competición de las diferentes SSs en su unión a los glucanos cebadores junto con la capacidad específica de cada una de ellas para elongar cadenas de una determinada longitud (Zhang *et al.*, 2008b). También se ha propuesto que SSIII funcionaría como un regulador negativo, pues su eliminación promueve una mayor acumulación de almidón en hoja durante el día (Zhang *et al.*, 2005a). Varias teorías han sido propuestas al respecto, aunque ninguna ha sido confirmada. Por un lado, SSIII podría tener un efecto negativo sobre otras SSs, de modo que en su ausencia, el resto serían más activas. Por otro lado, la ausencia de SSIII podría provocar la formación de una molécula de amilopectina más ramificada que sería un sustrato más eficiente para el resto de SSs. Además, también se ha propuesto que SSIII actuaría como un regulador negativo de la síntesis de almidón a través de su interacción con proteínas 14-3-3 (Sehnke *et al.*, 2001).

Como se comentó anteriormente (ver página 41), la formación de complejos macromoleculares por parte de las enzimas de la ruta de biosíntesis de almidón ha sido descrita en endospermo de maíz y trigo (Tetlow *et al.*, 2004; Tetlow *et al.*, 2008; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2009). Los diferentes ensayos coinciden en incluir las SSs de clase I, II y III, junto a la SBE y otras otras proteínas (conocidas o no) dentro de diferentes complejos de alto peso molecular. La interacción de SSIII con otras proteínas podría ocurrir a través de las regiones *coiled-coil* descritas y conservadas también en su dominio amino (Hennen-Bierwagen *et al.*, 2009), lo cual ha llevado a la búsqueda de otras proteínas cloroplásticas que posean este tipo de dominios (Lohmeier-Vogel *et al.*, 2008b). Una proteína con una fuerte predicción de dominio *long coiled-coil* es, precisamente, SSIV (ver página 63). La SSIV no fue detectada en

ninguno de los estudios sobre la formación de complejos macromoleculares en endospermo de maíz y trigo, pero ninguno de ellos contó tampoco con anticuerpos específicos frente a ella. En *Arabidopsis* no se han descrito hasta la fecha la formación de complejos similares.

La ausencia de SSIV no tiene ningún efecto sobre la estructura del almidón (contenido de amilosa, distribución de longitud de cadenas,...), aunque, como se demostrará en esta tesis, al menos en ciertas condiciones, es capaz de contribuir a la síntesis de amilopectina (Szydlowski *et al.*, 2009). Un trabajo previo de nuestro grupo (Roldán *et al.*, 2007b) mostró que la ausencia de la SSIV provoca la acumulación de un único gránulo por cloroplasto en hojas de *Arabidopsis thaliana*, de mayor tamaño que los presentes en plantas silvestres. Estos resultados fueron la primera evidencia directa de la implicación de una SS en el proceso de iniciación del gránulo de almidón y, sobre ello, se tratará más adelante (ver página 63).

Relación evolutiva entre las GSs de cianobacterias y las SSs.

Como se explicó anteriormente (ver página 43), el metabolismo del almidón surge de la fusión de los respectivos metabolismos de acumulación de polisacáridos del cianobionte (almidón) y la célula hospedadora (glucógeno). Filogenéticamente, las rutas de síntesis y degradación están formadas por un mosaico de enzimas de distinto origen: el hospedador o el cianobionte. Hoy en día el origen de la mayoría de las enzimas implicadas en el metabolismo del almidón es conocido (Tabla 3), aunque algunos puntos permanecen en discusión. Aquí se expondrá únicamente la idea actual sobre el origen evolutivo de las diferentes SSs.

Activity	Cyanobacteria (<i>Crocospaera watsonii</i>)	Eukaryotes (<i>Entamoeba histolytica</i>)	Common ancestor	Green lineage (<i>Ostreococcus tauri</i>)	Red lineage (<i>Cyanidioschizon merolae</i>)
ADP-glucose pyrophosphorylase	1	0	1	2	0
Soluble starch synthase (ADPG) SSIII-SSIV	2	0	1	3	0
Soluble starch synthase (ADPG) SSI-SSII			1	2	
Soluble starch synthase (UDPG)	0	1	1	0	1
GBSS I	1	0	1	1	1
Branching enzyme	3	1	1	2	1
Isoamylase	1	0	2	3	2
Indirect debranching enzyme	0	1	0	0	0
Phosphorylase	2	2	2	2	1
Glucanotransferase	1	0	1	1	0
Transglucosidase	0	2	1	1	1
β -Amylase	0	4	1	2	1
Glucan water dikinase	0	?	1	3	1
Phosphoglucan water dikinase	0	?	1	2	1
Laforin or Sex4 type phosphatases	0	1	1	1	1

Tabla 3. Número de isoformas encontradas para cada clase de enzimas del metabolismo del glucógeno/almidón y las hipotetizadas en el ancestro común (*Common ancestor*) de *Archaeplastida* (de Ball *et al.*, 2011). *Crocospaera watsonii*, *Entamoeba histolytica*, *Cyanidioschizon merolae* y *Ostreococcus tauri* fueron elegidos como organismos modelos de, respectivamente, cianobacterias (*cyanobacteria*), eucariota heterotrofo (*heterotrophic eukaryotes*), algas rojas (*red algae*) y plantas verdes (algas verdes y plantas terrestres, *green plants*). Los colores indican el origen de cada isoforma predicho filogenéticamente: azul para las de origen cianobacteriano, naranja para las de origen eucariota y rosa para las de origen clamidial. Sombreadas en gris, las de origen incierto.

La identificación de GBSS en cianobacterias diazotróficas acumuladoras de almidón (Deschamps *et al.*, 2008) revela el origen cianobacteriano de esta enzima y confirma los análisis

filogenéticos previos. La GBSS cianobacteriana muestra una fuerte preferencia por ADP-Glc, preferencia que ha sido mantenida por la GBSS de algas verdes y plantas terrestres, pero no por la GBSS de algas rojas y glaucofitas (Ball *et al.*, 2011). En rodofitas y glaucofitas, la GBSS presenta una mayor preferencia por UDP-Glc que por ADP-Glc (la preferencia es mayor en el caso de la GBSS de rodofitas que en la de glaucofitas). La secuencia de la GBSS cianobacteriana (con preferencia por ADP-Glc) aparece más relacionada filogenéticamente con la de la GBSS de glaucofitas (con preferencia por UDP-Glc) que con las de algas verdes y plantas terrestres (con preferencia por ADP-Glc) o rodofitos (con preferencia por UDP-Glc) (Figura 7; Deschamps *et al.*, 2008). Se cree que el cambio en la preferencia de la GBSS en rodofitas y glaucofitas ocurrió a través de la acumulación de mutaciones favorecidas cuando la síntesis de almidón pasó a tener lugar en el citosol de la célula hospedadora.

Al igual que en el caso de la GBSS, las SSs solubles de los diferentes linajes de *Archaeplastida* presentan diferente preferencia por sustrato. Sin embargo, la situación es diferente en las SSs solubles. Las del linaje *Chloroplastida* son específicas de ADP-Glc y, filogenéticamente, agrupan con enzimas cianobacterianas (pertenecen a la superfamilia de glucosiltransferasa GT5). Las de los linajes *Rhodophyceae* y *Glaucophyta* son específicas de UDP-Glc y, filogenéticamente, son más cercanas a una de las dos familias de GSs presentes en eucariotas heterótrofos no *Opisthokonts* (Deschamps *et al.*, 2008; Ball *et al.*, 2011), que a las SSs de *Chloroplastida*. Actualmente se cree que el ancestro común de los eucariotas debía poseer dos tipos de GSs específicas de UDP-Glc, una perteneciente a la superfamilia GT3 y otra a GT5. Los *Opisthokonts* perdieron la GS tipo GT5 y actualmente solo poseen de tipo GT3, sin embargo es posible encontrar GS de tipo GT5 en otros eucariotas heterótrofos (por ejemplo, en *Archamoebas*). El ancestro de *Archaeplastida* (la célula eucariota que estableció simbiosis con la cianobacteria ancestral) debió poseer, inicialmente, tres tipos de almidón/glucógeno sintasas (ver Tabla 3): dos GT5 con preferencia por ADP-Glc (de origen cianobacteriano) y una GT5 con preferencia por UDP-Glc (originaria del eucariota hospedador). En rodofitas y glaucofitas, las GT5 con preferencia por ADP-Glc se habrían perdido y, la única SS soluble presente en los mismos, sería la de origen eucariota. En algas verdes y plantas terrestres, la GT5 del hospedador se habría perdido y las cuatro clases de SSs solubles, presentes en todos ellos, habrían derivado de las dos SSs solubles cianobacterianas presentes en el ancestro de los tres linajes. Dos curiosidades acerca de las SSs solubles de rodofitas y glaucofitas son, por un lado, que la única SS soluble presente en estos linajes es suficiente para realizar la misma función que en *Chloroplastida* requiere cuatro clases de SSs y, por otro lado, el hecho de que la actividad de las GSs específicas de UDP-glucosa estudiadas presentan dependencia del cebado por glucogenina (Ball *et al.*, 2011), al igual que las GSs de la superfamilia GT3, mientras que las GSs bacterianas (superfamilia GT5 específicas de ADP-Glc) presentan actividad autoglucosilante (ver página 58).

En cuanto a las cuatro clases de SSs solubles presentes en *Chloroplastida*, los árboles filogenéticos muestran una clara separación en dos grupos: por un lado aparecen SSIII y SSIV, que están claramente relacionadas con una de las dos SSs encontradas en cianobacterias, y por otro, SSI y SSII, que no tienen más relación con las anteriores que con el resto de GSs

bacterianas (Figura 7). SSI y SSII presentan una mayor relación filogenética con GBSSI que con SSIII y SSIV.

La separación de las SSs en dos grupos puede explicarse en parte por las diferencias en longitud y secuencia de sus dominios GT-1 (ver página 49), la sustitución de aminoácidos claves y diferencias en la estructura secundaria del sitio activo (o regiones cercana a este) (Leterrier *et al.*, 2008). Una diferencia entre estos grupos se encuentra en el residuo variable (X) del motivo KXGGL amino, altamente conservado en las SSs: en el grupo compuesto por GBSS, SSI y SSII es un residuo polar (Treonina en el caso de las proteínas de *Arabidopsis*) y en el grupo de SSIII y SSIV, no polar (Valina en el caso de *Arabidopsis*) (ver alineamiento SSs y GSs).

Recientemente, como se comentó en la página 46, se ha propuesto que SSIII y SSIV podrían haber evolucionado a partir de una ancestral SSIII/SSIV de origen en *Chlamydia*, sin embargo, a día de hoy no se han podido aportar más pruebas (Moustafa *et al.*, 2008).

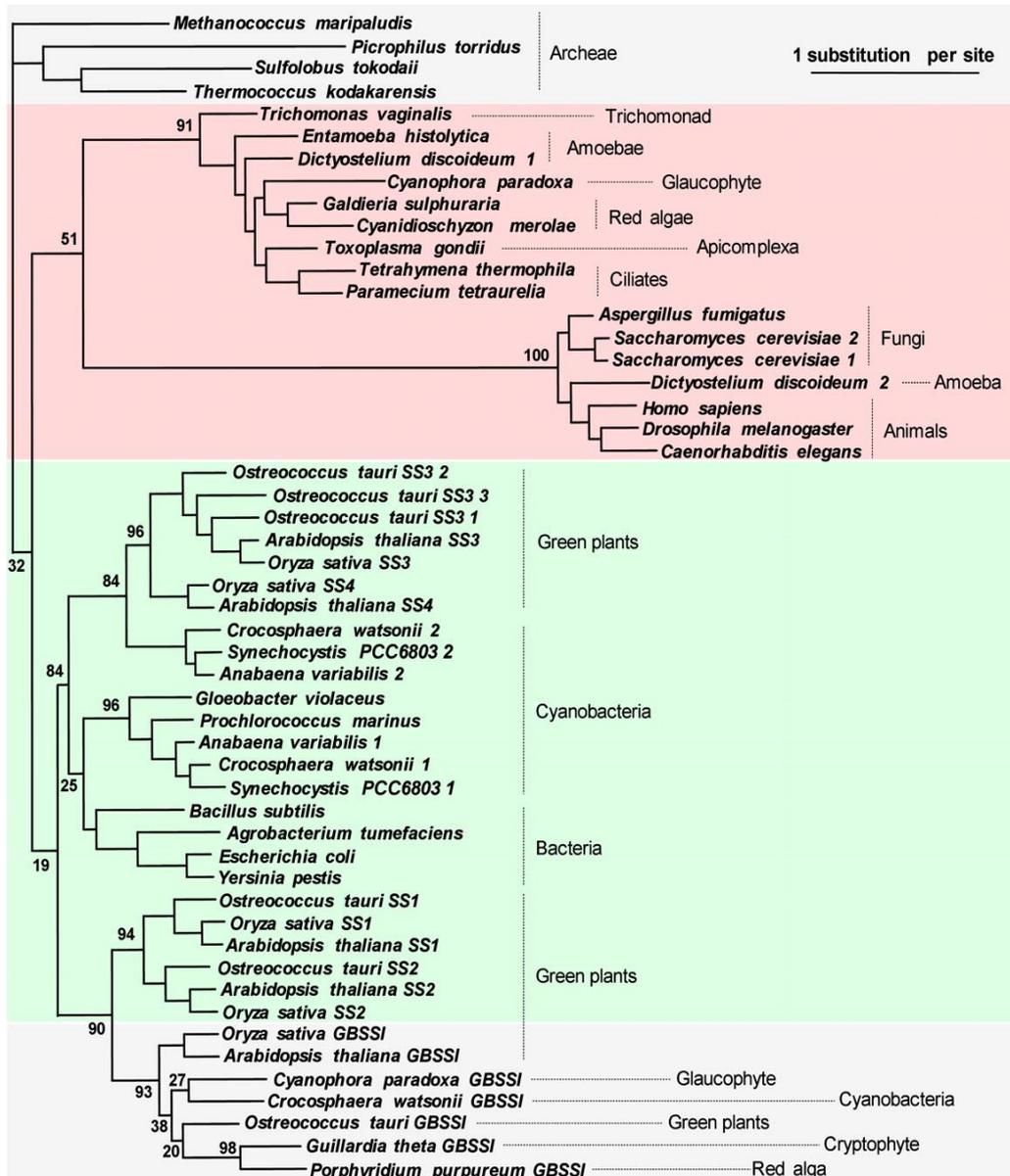


Figura 7. Árbol filogenético de máxima similitud de SSs y GSs (de Ball et al., 2011). Los colores definen la naturaleza del sustrato empleado por el enzima: rojo = UDP-Glc, azul = ADP-Glc y gris = mezcla del uso de ambos. Tres grupos pueden distinguirse claramente: las GSs específicas de UDP-Glc, típicas de opisthokons; la GS/SS específica de UDP-Glc encontrada en amebas (Amoeba) y algas rojas (Red algae); y las SS específicas de ADP-Glc de algas verdes y plantas terrestres (Green plants) que agrupan junto a las GSs y SSs específicas de ADP-Glc de bacterias y cianobacterias. Todas las GBSS se agrupan juntas independientemente de la preferencia de sustrato (ADP-Glc o UDP-Glc), lo cual indica su origen común.

EL INICIO DEL GRÁNULO DE ALMIDÓN.

Como se comentó en la página 22, almidón y glucógeno son homopolímeros de moléculas de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos α -(1,4) formando cadenas lineales, que se ramifican a través de enlaces α -(1,6). Aunque la estructura final es muy diferente (el glucógeno es soluble en agua, mientras que el almidón forma gránulos semi-cristalinos) y la adquisición de la compleja estructura de la amilopectina requiere de actividades adicionales (página 33), el modo en que las cadenas de glucosa de ambos polímeros son elongadas y ramificadas es bastante parecido (D'Hulst & Mérida, 2010): la elongación es llevada a cabo, en ambos casos, por glucosiltransferasas que usan ADP-Glucosa (SSs y GSs bacterianas) o UDP-Glucosa (GSs de animales y hongos) como donador glucosilo; y la ramificación de las cadenas, por enzimas ramificantes, que en ambos casos cortan un fragmento de una cadena existente y lo transfieren a otra cadena lineal (o a la misma). Tanto en el caso del glucógeno como en el del almidón, los procesos de elongación y ramificación son bastante conocidos. Sin embargo, mientras la iniciación de la síntesis del glucógeno ha sido bien caracterizada, los mecanismos que permiten la iniciación del gránulo de almidón son, a día de hoy, desconocidos. Existen fuertes evidencias de que el proceso de iniciación de la síntesis del gránulo está sometido a regulación. El número de gránulos de almidón por plasto es dependiente del tipo celular y la especie, por ejemplo, mientras que los amiloplastos del endospermo de maíz contienen un único gránulo, los de arroz y avena contienen varios. Otro claro ejemplo de regulación del proceso es la aparición de dos tipos diferentes de gránulos de almidón en las semillas de trigo, cebada y avena, cada uno de los cuales es sintetizado en un momento diferente del desarrollo de la semilla y posee un tamaño, forma y localización característicos (D'Hulst & Mérida, 2010).

Necesidad de un mecanismo de cebado. La glucogenina.

Tanto las glucógeno sintasas (GSs) como las almidón sintasas (SSs) requieren de un extremo no reductor libre al cual añadir moléculas de glucosa desde el donador glucosílico (UDP-glucosa o ADP-glucosa respectivamente) (Ball & Morell, 2003). Este requerimiento implica la existencia de un mecanismo de síntesis de un cebador glucosídico, el cual pueda ser a continuación elongado y ramificado (D'Hulst *et al.*, 2007). Dicho mecanismo es bien conocido en el caso de animales y hongos. En ambos casos, el cebador es sintetizado por una proteína con actividad autoglucosilante, denominada glucogenina (Lomako *et al.*, 1988; Pitcher *et al.*, 1988), que generalmente funciona como un dímero. La glucogenina cataliza la unión covalente de una glucosa al grupo hidroxilo de su tirosina¹⁹⁴, usando como donador glucosídico la UDP-Glucosa. A continuación, la glucogenina forma un complejo con la GS dentro del cual se forma un maltooligosacarido por adición de hasta otros siete residuos de glucosa (procedentes de la

UDP-glucosa) a la glucosa unida a la glucogenina (Alonso *et al.*, 1995). En este punto la GS comienza a elongar el maltooligosacárido (cebador) y se disocia de la glucogenina, la cual queda unida a un extremo (extremo reductor) del polímero (Figura 8).

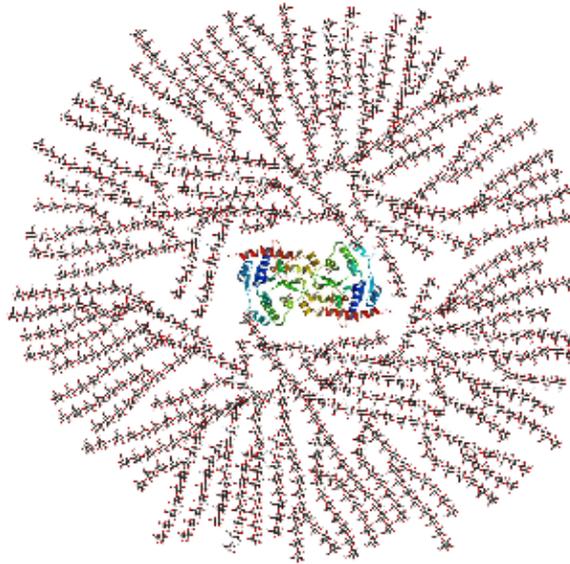


Figura 8. Molécula de glucógeno. Puede observarse la estructura esférica, con los puntos de ramificación distribuidos de modo homogéneo, diferente de la de la amilopectina (ver Figura 2, página 24). En el centro de la molécula queda el dímero de glucogenina.

En el genoma bacteriano no se ha encontrado ninguna secuencia que pudiese codificar para una proteína de tipo glucogenina. En el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, se ha descrito que el proceso de cebado es llevado a cabo por la propia glucógeno sintasa, la cual lleva a cabo ambas actividades: síntesis de un cebador oligosacárido gracias a una actividad autoglucosilante y elongación de las cadenas de glucanos (Ugalde *et al.*, 2003). Es posible que el mismo mecanismo funcione en otras bacterias, pero hasta la fecha no hay ninguna evidencia, por lo que no es posible descartar la existencia de otros mecanismos.

Proteínas tipo glucogenina en plantas.

La búsqueda en plantas de proteínas tipo glucogenina llevó inicialmente a la identificación de proteínas con actividad autoglucosilante dependiente de UDP-Glc en diferentes especies: patata (Lavintman & Cardini, 1973; Lavintman *et al.*, 1974; Ardila & Tandecarz, 1992), zanahoria (Quentmeier *et al.*, 1987), trigo (Langeveld *et al.*, 2002) y maíz (Rothschild & Tandecarz, 1994). Sin embargo, las evidencias sugieren que estas proteínas están más probablemente implicadas en la síntesis de componentes de la pared celular que en la síntesis de almidón. Singh y cols. (Singh *et al.*, 1995) denominaron amilogenina a una proteína identificada en endospermo de maíz, sin homología con la glucogenina de mamíferos, la cual presentaba actividad autoglucosilante *in vitro*. Más tarde se demostró que la amilogenina tiene una localización extraplasmática y que su función es la síntesis de polisacáridos de la pared celular (D'Hulst & Mérida, 2010). Los estudios más recientes de búsqueda de proteínas tipo glucogenina

en plantas se han basado en la búsqueda de secuencias homólogas a las secuencias de las glucogeninas de mamíferos y hongos. De este modo se han identificado varias secuencias en el genoma de *Arabidopsis* que codificarían para proteínas tipo glucogenina, entre ellas, hay una (PGSIIIP1, *plant glycogenin-like starch initiation protein 1*; Chatterjee *et al.*, 2005) cuya inhibición se relacionó en principio con una disminución de los niveles de almidón. Posteriormente, esta proteína fue identificada como una glucosiltransferasa implicada en la síntesis de la pared secundaria (Brown *et al.*, 2005). Estos estudios sugieren que las plantas carecen de una proteína tipo glucogenina que lleve a cabo el proceso de cebado de la síntesis de almidón de modo similar a lo descrito para animales y hongos.

Otras posibles enzimas implicadas en la síntesis de almidón.

Las enzimas desramificantes (DBEs, en particular ISA1; ver página 33) y las α -glucano fosforilasas (PHS1 en *Arabidopsis*, Pho1 en otras especies; ver páginas 30 y 35) han sido propuestas como enzimas implicadas en la iniciación del almidón. La ausencia de ISA1 tiene efectos diferentes en función de la especie y el tipo celular concreto, pero en general, lleva a un aumento de la síntesis de fitoglucógeno y a la disminución del contenido y el tamaño de los gránulos de almidón; lo cual, llevó a proponer que las isoamilasas podrían ser fundamentales en el control de la iniciación de la síntesis de almidón (Burton *et al.*, 2002; Bustos *et al.*, 2004). Recientes evidencias descartan, al menos en hojas de *Arabidopsis*, que las enzimas desramificantes jueguen un papel crucial en el inicio del gránulo (Streb *et al.*, 2008): mientras el mutante carente de las cuatro isoformas de DBEs no presenta síntesis de almidón, el mutante quintuple, carente también de una α -amilasa plastidial, restaura la síntesis del mismo. Es probable que el incremento del número de pequeños gránulos en los mutantes *isa1*, sea consecuencia de la acumulación de fitoglucógeno (D'Hulst & Mérida, 2010), producida como consecuencia de la incapacidad de sintetizar amilopectina correctamente por parte del mutante. La acumulación de fitoglucógeno en ausencia de ISA1 (debida al incremento del número de ramificaciones y el mal posicionamiento de estas, ver página 33), podría facilitar la nucleación y formación de pequeños gránulos de almidón.

Existen múltiples evidencias de la implicación de Pho1 en la síntesis del almidón de reserva (Dauvillée *et al.*, 2006; Satoh *et al.*, 2008; Fettke *et al.*, 2010). El trabajo de Satoh y cols. (Satoh *et al.*, 2008) muestra que la ausencia de Pho1 tiene dos efectos diferentes sobre la síntesis de almidón en el endospermo de semillas de arroz. Por un lado, la ausencia provoca pequeños cambios en la estructura de la amilopectina, por otro, provoca una drástica disminución de los niveles de almidón dependiente de la temperatura de crecimiento de la planta (a 20 °C el contenido de almidón del mutante *pho1* es inferior al del mutante *shr2*, carente de actividad AGPasa, mientras que a 30 °C el contenido es casi igual al de plantas silvestres). Ellos proponen que Pho1 estaría implicada en dos fases distintas: en la elongación de las cadenas (su ausencia provoca pequeños cambios en la estructura de la amilopectina) y en la iniciación (su ausencia provoca una menor acumulación). La función propuesta para Pho1 en el inicio de la síntesis de

almidón sería la elongación de pequeños MOS lineales (dada su alta afinidad por los mismos y su capacidad para producir cadenas lineales mayores que SSII a partir de MOS de 6 moléculas de glucosa) formando el sustrato necesario para el inicio de la síntesis del gránulo. Sin embargo, dado que el efecto de la mutación es dependiente de la temperatura, ellos postulan que otro factor (factor X) sería capaz de suplir la función de Pho1 en el inicio de la síntesis de almidón a altas temperaturas. Hasta la fecha no existen más evidencias del papel de Pho1 en el inicio del gránulo, por el contrario no parece que Pho1 pueda tener un papel importante en el inicio de la síntesis del almidón transitorio, ya que su ausencia en hojas de patata y *Arabidopsis* no parece tener ningún efecto en el metabolismo del almidón (Sonnewald *et al.*, 1995; Zeeman *et al.*, 2004b).

Por último, un trabajo previo de nuestro grupo (Roldán *et al.*, 2007b) mostró, por primera vez, la implicación de una SS, la almidón sintasa de clase IV (SSIV, At4g18240), en la iniciación del gránulo de almidón. La ausencia de SSIV impide la síntesis de un número normal de gránulos de almidón por cloroplasto (5-7 gránulos/cloroplasto) en hojas de *Arabidopsis thaliana*. El mutante *ssIV* de *A.thaliana* acumula un único gránulo (dos en algunos casos) por cloroplasto, de mayor tamaño que los gránulos de plantas silvestres. Este trabajo (Roldán *et al.*, 2007b) sugiere que SSIV podría estar implicada en el proceso de cebado de la síntesis de almidón y es el punto de partida de mi tesis. Las evidencias del papel de SSIV en el inicio de la síntesis de almidón previas a esta tesis se comentarán a continuación (ver página 62).

ALMIDÓN SINTASA IV.

La almidón sintasa de Clase IV (SSIV) ha sido la última en ser descrita y la menos estudiada de las cinco clases de SSs. Aunque su existencia ya había sido predicha (Li *et al.*, 2003; Ball & Morell, 2003), no fue hasta 2005, cuando Dian y cols. (Dian *et al.*, 2005) demostraron que los genes OsSS4-1 y OsSS4-2 (de *Oryza sativa*) codificaban para SSs activas. Previamente, Hirose y Terao (Hirose & Terao, 2004) habían incluido estos genes dentro de su estudio sobre la expresión espacio-temporal de las diferentes SSs en semilla de arroz.

En arroz (al igual que ocurre con otras SSs (ver página 47) existen dos isoformas de SSIV: SSIV-1 y SSIV-2 (codificadas por dos genes diferentes). Ambas han sido incluidas dentro del grupo de expresores estables en cuanto a su patrón temporal de expresión en semilla de arroz (ver página 47; Hirose & Terao, 2004). SSIV-1 y SSIV-2 se expresan tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintético, aunque la expresión de SSIV-1 es mayor en endospermo que en hojas y la de SSIV-2 es mayor en hojas que en endospermo (Dian *et al.*, 2005; Leterrier *et al.*, 2008), siendo los transcritos de SSIV-2 en ambos tejidos más abundantes que los de SSIV-1. Los análisis filogenéticos muestran que AtSSIV (de *A.thaliana*) habría divergido desde un ancestro común de las dos isoformas de arroz (SSIV-1 y SSIV-2) (Leterrier *et al.*, 2008). AtSS4 presenta aproximadamente los mismos niveles de expresión en todos los órganos de *Arabidopsis* (Roldán *et al.*, 2007b), con valores similares a los de AtSS3.

Todas las secuencias SS4 caracterizadas hasta la fecha poseen 16 exones, separados por 15 intrones. En todas ellas se ha predicho la presencia de una secuencia señal de transporte al cloroplasto. El tamaño del péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) codificado por ésta difiere entre especies e isoformas: 78/33 amino para las isoformas SSIV-1/-2 de arroz (OsSSIV-1/-2, *Oryza sativa*) (Dian *et al.*, 2005), 55 aminoácidos para SSIV-2 de trigo (TaSSIV-2, *Triticum aestivum*) (Leterrier *et al.*, 2008) y 42 aminoácidos para AtSSIV. El tamaño de la proteína madura (sin CTP) es similar para diferentes especies/isoformas: 108,1/104,2 KDa para OsSSIV-1/-2 (Hirose & Terao, 2004), 98,3 KDa para TaSSIV-2 (Leterrier *et al.*, 2008) y 113 KDa AtSSIV (Roldán *et al.*, 2007b). La secuencia de AtSSIV presenta una alta homología con las secuencias de SSIV de otras especies: 56,8 % de identidad con OsSSIV-1, 58,3 % con OsSSIV-2, 58,2 % con TaSSIV-2 y 71 % con VuSSIV (de *Vigna unguiculata*). La mayor homología entre estas secuencias aparece en el dominio carboxilo (71-89 %) (ver Figura 83, en página 205), que también presenta una alta homología con el dominio carboxilo del resto de clases de SSs (35-50 %) y con la GS bacteriana (28-35 %) (ver Figura 82, en página 203). Este dominio carboxilo es responsable de la actividad SS y posee los dominios GT-5 y GT-1, característicos de la superfamilia de glucosiltransferasa GT5 (ver página 49). Dentro de la secuencia del dominio carboxilo, se localizan también los dos motivos, altamente conservados, implicados en la unión de la ADP-Glc: motivo KXGGL amino (KVGGGL en el caso de AtSSIV) y motivo XXGGL carboxilo (KTGGL en el caso de AtSSIV) (ver Figura 81, en página 201; Leterrier *et al.*, 2008).

Al igual que ocurre con las demás SSs, el dominio amino de SSIV es exclusivo y, aunque más variable que el dominio carboxilo, presenta regiones altamente conservadas entre especies (ver Figura 83, en página 205). En 2008, Leterrier y cols. (Leterrier *et al.*, 2008) identificaron, dentro del dominio amino de TaSSIV-2, dos dominios *coiled-coil* y un sitio de reconocimiento por proteínas 14-3-3, pero no llevaron a cabo un análisis de los mismos. Uno de los objetivos de esta tesis ha sido la caracterización del dominio amino de AtSSIV.

Nuestro grupo llevó a cabo por primera vez la caracterización de un mutante carente de SSIV: el mutante *ssIV* de *Arabidopsis thaliana* (Roldán *et al.*, 2007b). Este trabajo demostró la implicación directa de SSIV en la síntesis del número correcto de gránulos de almidón por cloroplasto y permitió proponer que SSIV sería necesaria para establecer una estructura inicial que permita la nucleación de la cristalización y la síntesis de un nuevo gránulo. Las consecuencias de la mutación fueron: una menor tasa de crecimiento que el silvestre (WT) bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, un retraso en el tiempo de floración (aunque el número de hojas de la roseta en el momento de la floración es el mismo en el mutante y el WT) y una disminución del contenido de almidón en hoja al final del periodo de luz (entre un 35 y un 40 % respecto al WT). El tamaño del fruto, el número de semillas por silicua y la tasa de germinación no están alterados en las líneas mutantes. Tampoco lo están las actividades SS soluble total, AGPasa, ramificante y desramificante, la relación amilosa/amilopectina o la distribución bimodal de las longitudes de las cadenas de la amilopectina (salvo por una leve reducción del número de cadenas de entre 7 y 10 moléculas de glucosa), lo que indicaría que la función principal de SSIV no debe ser la elongación de las cadenas de glucano.

El menor contenido de almidón en ausencia de SSIV parece provocado por la síntesis de un único gránulo por cloroplasto (dos en algunos casos) a diferencia de los 5-7 del WT (Roldán *et al.*, 2007a). Este único gránulo de almidón alcanza un tamaño bastante mayor que los del WT, probablemente como consecuencia de que todo el pool de ADP-Glc está disponible para la elongación de uno o dos gránulos en el mutante, mientras que en el WT debe dividirse entre 5-7 gránulos. La obtención de las curvas de acumulación de almidón mostró que tanto la tasa de síntesis como la tasa de degradación eran inferiores a las del WT: la menor tasa de síntesis da lugar a una menor acumulación de almidón al final del día, la menor tasa de degradación provoca un mayor contenido que el WT al final de la noche. La disminución de las tasas de síntesis y degradación fue relacionada con la menor superficie de sustrato, disponible para la actuación de las enzimas implicadas en ambos procesos, en el mutante que en el WT (menor superficie de 1-2 gránulos vs. 5-7 respectivamente). Todo ello relaciona a SSIV con el inicio de la síntesis del gránulo de almidón, aunque la presencia de uno o dos gránulos en el mutante también indicaría la existencia de cierta redundancia en dicha función.

El único miembro de *Chloproplastida* carente de SSIV descrito hasta la fecha es el alga unicelular *Ostreococcus tauri*, una de las algas verdes más pequeñas que existe. *O.tauri* presenta un único gránulo de almidón (de igual modo que el mutante *ssIV*), situado en el centro del cloroplasto, y un sistema exclusivo de reparto del mismo durante la división del plasto (Ral *et al.*, 2004), consistente en la elongación del gránulo y la degradación localizada del mismo en el

sitio de constricción del plasto, dando lugar a dos gránulos de aproximadamente el mismo tamaño en el momento de división del mismo. La aparición de tal sistema de reparto del gránulo hace innecesario el mantenimiento de un sistema de cebado del gránulo, salvo para reiniciar la síntesis tras situaciones que llevasen a la degradación total del gránulo. Curiosamente, nunca se ha conseguido provocar la degradación completa del mismo en *O.tauris* (Ral *et al.*, 2004), la viabilidad se pierde antes de que el almidón haya sido consumido cuando se incuba en oscuridad continua. El hecho de que el único organismo dentro de *Chloproplastida*, carente de SSIV haya desarrollado un sistema como este, el cual hace innecesaria la síntesis *de novo* del gránulo, apoya la idea de que SSIV está implicada en el inicio del gránulo.

Materiales y Métodos.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Arabidopsis thaliana.

En este trabajo se ha utilizado la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, perteneciente a la familia de las *Brassicaceas*. Los ecotipos usados han sido Columbia (Col-0) y Wassilewskija (WS). Además de las plantas silvestres, se han usado mutantes simples, dobles y triples de las diferentes isoformas de almidón sintasa: *ssIII*, *ssIV*, *ssl ssIV*, *ssII ssIV*, *ssIII ssIV*, *ssl ssII ssIV* y *ssl ssII ssIII*; el mutante simple *apsI*, carente de la actividad ADP-Glucosa pirofosforilasa, y el triple mutante *apsI ssIII ssIV*. La Tabla 4 describe las características de estos mutantes.

Las líneas mutantes se obtuvieron de las colecciones de mutantes de inserción de T-DNA generadas en el INRA de Versailles (Bechtold *et al.*, 1993; Bouchez *et al.*, 1993), el Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto Salk (SIGnAL) y la colección de mutantes GABI-KAT (Rosso *et al.*, 2003).

Además, en este trabajo se han obtenido diferentes líneas transgénicas, las cuales serán descritas dentro de la sección de Resultados (página 207).

Mutante	Ecotipo	Deficiencia	Referencia
<i>ssl</i>	WS	Ausencia de la almidón sintasa soluble de Clase I (SSI).	Sessions <i>et al.</i> , 2002; Delvallé <i>et al.</i> , 2005a
<i>ssII</i>	WS	Ausencia de la almidón sintasa soluble de Clase II (SSII).	Zhang <i>et al.</i> , 2008a
<i>ssIII</i>	Col	Ausencia de la almidón sintasa soluble de Clase III (SSIII).	Zhang <i>et al.</i> , 2005b
	WS		Szydlowski <i>et al.</i> , 2009
<i>ssIV</i>	Col	Ausencia de la almidón sintasa soluble de Clase IV (SSIV).	Roldán <i>et al.</i> , 2007b
	WS		
<i>sslssIV</i>	WS	Ausencia de SSI y SSIV.	Szydlowski <i>et al.</i> , 2009
<i>ssIIssIV</i>	WS	Ausencia de SSII y SSIV.	Szydlowski <i>et al.</i> , 2009
<i>ssIIIssIV</i>	Col	Ausencia de SSIII y SSIV.	Szydlowski <i>et al.</i> , 2009
<i>sslssIIssIII</i>	WS	Ausencia de SSI, SSII y SSIII.	Szydlowski <i>et al.</i> , 2009
<i>sslssIIssIV</i>	WS	Ausencia de SSI, SSII y SSIV.	Szydlowski <i>et al.</i> , 2009
<i>apsI</i>	Col	Ausencia de la subunidad pequeña de la ADP-Glucosa Pirofosforilasa (AGPasq).	Ventriglia <i>et al.</i> , 2008

Tabla 4. Mutantes empleados en este trabajo.

Condiciones de cultivo de *A.thaliana*.

Cultivo en tierra.

Las semillas se vernalizaron durante 3 o 4 días mediante su incubación en agua y oscuridad a 4 °C, para después ser sembradas en semilleros con turba vegetal COMPO SANA® - Universal previamente humedecida. La turba utilizada recibía un tratamiento antifúngico con Terraclor SuperX (Etridiazol 6 % + Quintoceno 24 %, Cow Agrosience Ibérica, SA España) al 0,5 %. Este tratamiento era realizado por el Servicio de Cultivos del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja. Dependiendo del ensayo, las plantas se crecieron en invernadero, fitotrón (Radiber, S.A.) o cámaras de crecimiento de plantas (SANYO SGR193.S26A) bajo un fotoperiodo de 16h de luz/8h de oscuridad (condiciones de día largo, DL) o bien de 8 h de luz/16 h de oscuridad (condiciones de día corto, DC). La temperatura en el fitotrón la temperatura fue de 21 °C durante todo el fotoperiodo. En las cámaras, de 22 °C durante el día y 20 °C durante la noche, con una humedad relativa del 70 %. La intensidad lumínica al nivel de las plantas era entre 120 y 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas eran regadas con agua cada 3 días.

Cultivo en placa y esterilización de semillas.

El proceso de esterilización de las semillas consistía en poner las mismas en eppendorfs abiertos dentro de una campana de vacío, en la cual se ponía también un vaso de precipitado con una solución al 3 % de ácido clorhídrico en lejía (hipoclorito sódico al 50 %). Se aplicaba vacío y se dejaban las semillas en contacto con los gases durante toda la noche.

Una vez esterilizadas, las semillas se suspendían en 0,1 % de fitoagar (Duchefa Biochemie B.V.) estéril y se sembraban en placas de Petri estériles con medio MS 0,5x (Murashige & Skoog, 1962) solidificado con fitogel (Duchefa Biochemie B.V.) al 0,8 % y tamponado a pH 5,8 con MES 0,5 g/l. Una vez sembradas, la germinación de las semillas se coordinaba mediante incubación en agua y oscuridad a 4 °C durante 3 días.

***Escherichia coli*.**

Dos estirpes de *E.coli* se han empleado en este trabajo: DH5 α (Hanahan, 1983) y BL21 (DE3) ΔglgCAP (Alonso-Casajus *et al.*, 2006).

La estirpe BL21 (DE3) ΔglgCAP tiene deletado el operón CAP, el cual contiene los genes que codifican la ADP-glucosa pirofosforilasa (*glgC*), la glucógeno sintasa (*glgA*) y la glucógeno fosforilasa (*glgP*). Esta estirpe ha sido empleada para la expresión de las diferentes Clases de

almidón sintasas, ya que permite los ensayos de actividad sin la interferencia de estas tres actividades enzimáticas.

Cultivo de *E.coli* en medio líquido.

Las estirpes de *E.coli* se cultivaban en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición era: NaCl 10 g/l, Bactotripton 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l. Se emplearon tubos de ensayos o erlenmeyers dependiendo del volumen del cultivo, manteniendo una proporción volumen líquido / volumen vacío de 1:4 para una buena aireación del cultivo y un crecimiento óptimo. Las incubaciones se llevaron a cabo en un incubador (Innova®43) a 37 °C con agitación a 200 rpm, salvo en el caso de inducciones, que se probaron distintas temperaturas y tiempos, como se explica en la página 91.

El material empleado, medios y tubos o erlenmeyers, eran previamente esterilizados en autoclave. Los antibióticos u otros compuestos añadidos al medio eran esterilizados por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de diámetro de poro.

Para el cultivo y selección de bacterias portadoras de plásmidos, el medio LB se suplementaba con el correspondiente antibiótico (según la resistencia que confiriese el plásmido usado). Las concentraciones usadas fueron: ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, espectinomicina 100 µg/ml y/o cloranfenicol 30 µg/ml.

Cultivo de *E.coli* en medio sólido.

El cultivo en medio sólido se realizó en medio LB-agar, LB (ver página 69) suplementado con Bacto-agar (15 g/l). Las placas se incubaban en una estufa a 37 °C. Al igual que en los medios líquidos, para el cultivo y selección de bacterias portadoras de plásmidos los medios se suplementaban con ampicilina, kanamicina, espectinomicina o cloranfenicol a las concentraciones indicadas en el apartado anterior.

Agrobacterium tumefaciens.

Para la transformación genética de *Arabidopsis thaliana* (ver página 120), se utilizó la estirpe de *A. tumefaciens* C58 (Wood *et al.*, 2001).

Cultivo de *A.tumefaciens* en medio líquido.

A.tumefaciens se cultivaba a 30 °C en medio LB (ver página 69) y con una agitación de 150 rpm (en un incubador INFORS HT). Se emplearon tubos de ensayos o erlenmeyers dependiendo del volumen del cultivo, manteniendo una relación de volumen líquido/volumen vacío de 1:4 para una buena aireación del cultivo y un crecimiento óptimo.

El material empleado, medios y tubos o erlenmeyers, eran previamente esterilizados en autoclave. Los antibióticos añadidos al medio eran esterilizados por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de diámetro de poro. Se añadían al medio: rifampicina a 50 µg/ml, porque la estirpe C58 es resistente a este antibiótico (Hood *et al.*, 1993) y espectinomycinina a 100 µg/ml, en el caso de estirpes transformadas con el vector pCTAPi.

Cultivo de *A.tumefaciens* en medio sólido.

El cultivo en medio sólido se realizó en medio LB-agar (ver página 69) suplementado con rifampicina a 50 µg/ml. Las placas se incubaban a 30 °C. Al igual que en medio líquido, para la selección de colonias portadoras de plásmidos derivados del vector pCTAPi, el medio se suplementaba con espectinomycinina a 100 µg/ml.

Saccharomyces cerevisiae.

Dos cepas diferentes de *S.cerevisiae* fueron empleadas para el ensayo de doble híbrido (Clontech laboratories, 2010):

Cepa	Tipo sexual	Auxotrofías
Y2HGold	MAT α	Adenina, histidina, leucina y triptófano.
Y187	MAT α	Adenina, histidina, leucina y triptófano.

Tabla 5. Cepas de *S.cerevisiae* empleadas en el ensayo de doble híbrido.

Ambas carecen del activador transcripcional GAL4, lo cual permite el ensayo de doble híbrido (ver página 108). La cepa YH2Gold se transformó (ver página 119) con los plásmidos pGBKT7_SSIV, pGBKT7_SSIV \dagger N y pGBKT7_SSIV \dagger C y la cepa Y187, con los plásmidos pGADT7_SSIV, pGADT7_SSIV \dagger N y pGADT7_SSIV \dagger C, mediante clonación de los respectivos genes en los vectores pGBKT7 y pGADT7 (ver Tabla 9). Las 3 estirpes resultantes de Y2HGold y las 3 de Y187 fueron conjugadas durante el ensayo de doble híbrido.

Cultivo de *S.cerevisiae* en medio líquido.

Las levaduras se cultivaron en diferentes medios durante el desarrollo del ensayo de doble híbrido, teniendo en cuenta que las cepas Y2HGold e Y187 son protótrofas para Uracilo (Ura) y que los vectores pGBKT7 y pGADT7 confieren prototrofia para Triptófano (Trp) y Leucina (Leu) respectivamente.

Como medio rico para el cultivo de rutina de levaduras no transformadas se usó YPDA, cuya composición era 20 g/L Difco peptonas, 10 g/L extracto de levadura, 0,003 % (p/v) hemisulfato de adenina y 2 % (p/v) glucosa; como medio de conjugación se usó YPDA 2x; como medio mínimo se usó SD, cuya composición era 100 ml de DO 10x (10X Dropout Solution: L-

arginina 200 mg/l, L-isoleucina 300 mg/l, L-lisina HCl 300 mg/L, L-metionina 200 mg/L, L-fenilalanina 500 mg/L, L-treonina 2000 mg/l, L-tirosina 300 mg/l y L-valina 1500 mg/l), 1,7 g/l Bases Nitrogenadas de levaduras (sin aminoácidos ni sulfato de amonio), 5 g/l sulfato de amonio y 2 % (p/v) glucosa. El medio mínimo era suplementado con 200 mg/l Adenina (Ade), 1000 mg/l leucina (Leu), 200 mg/l histidina (His), 200 mg/l triptófano (Trp) y/o 200 mg/l Uracilo (Ura) según las auxotrofías de la estirpe que se fuese a crecer/seleccionar. Si la estirpe era protótrofa para Ura y Trp, pero auxótrofa para el resto (His, Ade, Leu) usábamos un medio SD-Trp-Ura (SD sin Trp ni Ura), es decir, un medio SD suplementado con His, Ade, Leu. En la siguiente tabla se muestra el crecimiento (+)/no crecimiento (-) de las diferentes estirpes en varios medios SD:

Estirpes	SD-Ade	SD-His	SD-Leu	SD-Trp	SD-Ura
Y2HGold	-	-	-	-	+
Y187	-	-	-	-	+
Y2HGold [pGBKT7]	-	-	-	+	+
Y187 [pGADT7]	-	-	+	-	+
Células diploides [pGBKT7 + pGADT7]	*	*	+	+	+

Tabla 6. Medios SD para testar fenotipos. * Las células diploides solo crecerán en ausencia de Ade e His si hay interacción entre las proteínas testadas.

Las estirpes se crecieron mediante incubación en un incubador INFORS HT con una temperatura de 30 °C y una agitación de 150 rpm.

Cultivo de *S.cerevisiae* en medio sólido.

Los medios sólidos se emplearon añadiendo a los medios líquidos agar al 2 % (p/v). Las placas se incubaron a 30 °C.

OBTENCIÓN DE MUTANTES DOBLES Y TRIPLES.

Cruce de plantas parentales.

Para la obtención de mutantes dobles y triples se seleccionaron plantas receptoras de ambos parentales, que serían fecundadas con polen del otro parental. A las plantas receptoras se les cortaron las flores que no iban a ser utilizadas, para facilitar el trabajo. *A.thaliana* es hermafrodita y sus flores se autofecundan antes de abrirse. Por ello, las flores que iban a ser utilizadas como receptoras debían estar en un estadio temprano de su desarrollo. Dichas flores eran desprovistas de sépalos, pétalos y estambres - comprobando que las anteras aún no estaban amarillas, lo cual aseguraba que la autofecundación no había tenido lugar - con ayuda de pinzas y lupa. Del parental que procediera en cada caso, se cortaba un estambre de una flor a punto de abrir y se empleaba para fecundar las flores "desnudas", para ello, bastaba con dar unos ligeros toques con la antera sobre el estigma.

Parte de los cruces desarrollaban silicuas, otros abortaban, probablemente por daño en algún tejido durante la manipulación. Las silicuas que maduraban se cortaban, una vez secas, para recoger las semillas.

Selección de la progenie.

Las semillas obtenidas de los cruces se sembraban en tierra y se dejaban florecer y secar. En teoría, todas ellas debían ser heterocigotas para las mutaciones de sus parentales. Sus semillas (resultantes de la autofecundación), se sembraban también en tierra. Esta generación de plantas presentaba una distribución mendeliana de las mutaciones parentales. Mediante extracción de ADN genómico (ver página 111) y PCR (ver página 112) se seleccionaron aquellas plantas homocigotas para las mutaciones que nos interesaban.

MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN VEGETAL.

Curvas de crecimiento.

Para las curvas de crecimiento, las plantas fueron crecidas en tierra, bien en el fitotrón o bien en la cámara de crecimiento de plantas. Cada 3 o 4 días, la parte aérea de la planta era cortada y pesada en una balanza de precisión. El primer punto se hacía aproximadamente 8 días después de la siembra y el último, cuando la inflorescencia tenía un par de centímetros aproximadamente (unos 30 días después de la siembra).

Para cada punto de la curva se pesaban unas 5 plantas, de modo que se pudiese obtener un valor medio \pm desviación estándar.

Tinción de hojas con lugol.

La tinción de hojas con lugol permite visualizar el contenido en almidón de la misma. El lugol es una solución yodada, compuesta por 0,5 % I₂/1,5 % KI, con afinidad por los polímeros de glucosa. El lugol tiñe el almidón debido a que las moléculas de yodo se alinean en el interior de las hélices formadas por las cadenas de glucosa.

Para la tinción se cortó 1 hoja de cada planta (varias plantas por línea) y se metieron en eppendorfs. Se eliminó la clorofila mediante incubación con etanol 100 % a 60 °C. Cuando las hojas quedaban blancas (aproximadamente 3-5 min de incubación), se eliminaba el etanol y se enjuagaban con agua. Se retiraba el agua y se añadía lugol. Se incubaba aproximadamente 2 minutos a temperatura ambiente y se enjuagaba un par de veces con agua. Para tomar la fotografía se extendían las hojas sobre una transparencia y se ponía esta sobre un transiluminador.

Aunque la tinción con lugol no es cuantitativa, permite la comparación entre plantas silvestres y mutantes y la identificación de líneas con un mayor o menor contenido de almidón (Caspar *et al.*, 1985; Caspar *et al.*, 1991).

Determinación del contenido de almidón en hojas.

La determinación del contenido de almidón en hojas, se realizaba siguiendo el protocolo descrito por Lin y cols. (Lin *et al.*, 1988b), con algunas modificaciones.

Para aislar los gránulos de almidón, se pesaban 1-5 g de hojas, las cuales eran trituradas en un mortero con nitrógeno líquido. Una vez trituradas y antes de que se descongelasen, se añadían 10-25 ml de tampón de extracción (Hepes 50 mM pH 7,6 y Tritón X-100 1 % (p/v)). El extracto crudo se filtraba a través de un filtro de Miracloth (Millipore, MA, USA) cuyo tamaño de poro era de 100 μm , y se centrifugaba en frío a 4000 rpm durante 15 min. El almidón (pellet) se resuspendía entonces en 1ml Percoll 90 % y se centrifugaba en frío durante 45 min a 14000 rpm. El sobrenadante se descartaba y el precipitado se lavaba dos veces con etanol absoluto y se dejaba secar. Una vez seco, el almidón se resuspendía en 1 ml de KOH 0,2 N.

En este punto se preparaba un patrón con cantidades conocidas de almidón de maíz en 1 ml de KOH 0,2 N: 0, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 mg almidón / ml.

El almidón se hervía entonces a 100 °C durante 30-45 min y se centrifugaba 10 min a velocidad máxima y 4 °C. El sobrenadante se pasaba a un tubo de microcentrifuga nuevo. Se tomaba una alícuota de 500 μl y se ajustaba el pH a 5,0 añadiendo 150 μl de ácido acético 1 N. A continuación, se procedía a la degradación del almidón en glucosa, cuya concentración se determinaba enzimáticamente. Se tomaban 200 μl de la preparación anterior y se añadían 7,4 U de α -amilasa (en 35 μl de acetato sódico 0,1 M pH 4,5). Se incubaba a 37 °C durante 30 min y se añadían 5 U de amiloglucosidasa (en 165 μl de acetato sódico 0,1 M pH 4,5). Se incubaba a 55 °C durante 1 h y se detenía la reacción hirviendo durante 2 min y centrifugando a velocidad máxima durante 10 min. La determinación de glucosa se realizaba mediante la determinación espectrofotométrica de la cantidad de NADH formado en la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), tras convertir la glucosa en Glc-6-P por acción de la enzima hexoquinasa (HK). La reacción acoplada de reducción del NAD^+ puede esquematizarse de la siguiente manera:

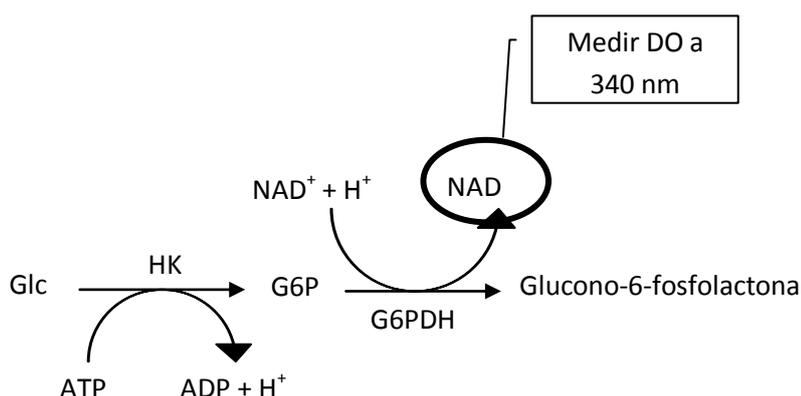


Figura 9. Esquema de la determinación de glucosa (Glc) acoplada a la reducción de NAD^+ .

En una cubeta de espectrofotetría se preparaba una mezcla de reacción que contenía Hepes 80 mM pH 7,7, NAD^+ 0,4 mM, ATP 1 mM, MgCl_2 5 mM, DTT 0,5 mM, BSA 0,02 %, 5 U de G6PDH y 100 μl de muestra (diluida si el contenido de almidón era mayor de 1 mg / gpf) en un volumen de reacción de 1 ml. Se determinaba la absorbancia a 340 nm (medida a tiempo cero) y posteriormente la reacción era iniciada añadiendo 5 U de HK. Tras incubar a 28 °C

durante 20 min, se volvía a medir la absorbancia a 340 nm. Restando al valor obtenido tras la incubación, el valor obtenido a tiempo cero, tenemos la absorbancia neta de NADH reducido y haciendo uso de la recta patrón podemos saber el contenido de almidón en la muestra. El contenido de almidón se presenta como mg de almidón por gramo de peso fresco (gpf).

Alternativamente, para confirmar la ausencia de un contenido de almidón cuantificable en el mutante *ssIIIssIV* se usó un protocolo descrito por Smith y Zeeman (Smith & Zeeman, 2006), que difiere del descrito anteriormente en el modo de extracción del almidón (eliminación previa de la clorofila, trituración sin nitrógeno líquido, en agua y ajuste del pH a 5,5 con acetato sódico 200 mM).

Determinación del contenido de azúcares.

El contenido en glucosa, fructosa y sacarosa fue determinado para plantas crecidas en condiciones de DL a las 16 h de luz. Para la extracción se partía de 100-300 mg de hojas de roseta, que con anterioridad habían sido machacadas en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C. Una vez pesado el material, se añadían 500 µl de etanol 100 % y se mezclaba en el vortex hasta obtener una suspensión homogénea. Se añadían 500 µl de etanol 80 % y se agitaba de nuevo. Se incubaba a 70 °C durante 90min (con inversiones frecuentes) y se centrifugaba a 13000 rpm durante 10min. El sobrenadante era recogido en un tubo nuevo y el etanol evaporado en un evaporador centrífugo tipo Speed-Vac®, para eliminar la clorofila. Se añadían 300-500 µl de agua mili-Q y se resuspendían las muestras, que acto seguido eran liofilizadas. Se conservaban así hasta el momento de ser inyectadas en el HPLC (DIONEX® DX-500), para lo cual eran resuspendidas en 600 µl de agua Milli-Q. Se inyectaban 10 µl mediante un inyector automático Waters® 717plus. La separación de los azúcares se llevaba a cabo mediante cromatografía iónica (columna analítica Carbopac® PA-10 de 4x250 mm con precolumna Carbopac® PA-10 de 4x50 mm) con el siguiente programa: isocrático de NaOH 52 mM (20 minutos), gradiente lineal de NaOH 52 a 200 mM (2 minutos), isocrático de NaOH 200 mM (10 minutos), gradiente lineal de NaOH 200 a 52 mM (2 minutos) e isocrático de NaOH 52 mM (11 minutos). La detección se llevaba a cabo por amperometría de pulso con electrodo de oro (DIONEX® ED40).

Extracción y cuantificación de pigmentos.

Clorofilas y carotenoides.

Para cada línea se cortaron 7 discos de hojas de roseta (5-10 mg) de plantas independientes. Cada disco se pesó y se metió en un eppendorf al que se añadía 1 ml de metanol. Los eppendorfs se cubrían con papel de aluminio y se incubaba con agitación a 4 °C durante toda la noche. Por último, se medía la absorbancia a 665nm, 652nm y 470nm y se

calculaban las concentraciones de pigmentos aplicando las fórmulas en Tabla 7. Las concentraciones se presentan referidas a los gramos de peso fresco.

	$\mu\text{g/ml metanol}$
Clorofila a	$\text{Chl a} = 16,29 \text{ Abs}_{665} - 8,54 \text{ Abs}_{652}$
Clorofila b	$\text{Chl b} = 30,66 \text{ Abs}_{652} - 13,58 \text{ Abs}_{665}$
Clorofilas totales	$\text{Chls a+b} = 22,12 \text{ Abs}_{652} + 2,71 \text{ Abs}_{665}$
Carotenoides	$\text{Carotenoides} = (1000 \text{ Abs}_{470} - 1,63 \text{ Chl a} - 104,96 \text{ Chl b}) / 221$

Tabla 7. Ecuaciones empleadas para el cálculo de la concentración de clorofilas y carotenoides (Porra *et al.*, 1989; Lichtenthaler & Buschmann, 2001) a partir de las absorbancias indicadas y en metanol.

Antocianinas.

El procedimiento de extracción y cuantificación de antocianinas se basó en el método de Rabino y Mancinelli (Rabino & Mancinelli, 1986). Para cada línea se cortaron 7 hojas de roseta de plantas independientes (15-30 mg). Cada hoja fue troceada e incorporada a un eppendorf, al que se añadió 1 ml de una dilución al 1 % de ácido clorhídrico en metanol. Los eppendorfs se incubaron en agitación y oscuridad a 4 °C durante 5 h, tras las cuales se midió la absorbancia a 530nm y 657nm. Los niveles de antocianina se calcularon como $(\text{Abs}_{530} - 0,2 \text{ Abs}_{657})/\text{gramos de peso fresco}$.

Técnicas de microscopía electrónica.

Análisis mediante microscopía óptica de cloroplastos aislados.

Para la observación al microscopio óptico de los gránulos de almidón y la disposición de éstos en el interior del cloroplastos, en primer lugar se procedía a aislar cloroplastos de plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Se recogían 10 gramos de hojas al final del ciclo luz (16 horas) y se procedía a la extracción de los cloroplastos (ver página 89).

Los cloroplastos así aislados se observaban al microscopio óptico tal cual o se añadía a la suspensión de cloroplastos una gota de lugol para teñir el gránulo de almidón, magnificándose así el contraste entre estos y el estroma del cloroplasto. El microscopio óptico utilizado fue el modelo Olympus BX60 (Olympus) acoplado a un sistema de captación de imágenes digital Leica DFC 300FX (Leica).

Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía óptica de secciones de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

Para los análisis de TEM se recogían hojas de plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana* a 12 horas de luz de plantas crecidas bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas

de oscuridad. Se cortaban pequeñas piezas de aproximadamente 2 mm² de hojas con una cuchilla e inmediatamente se procedía a fijarlas en 1 % de paraformaldehído y 0,5 % de glutaraldehído preparados en 0,05 M de tampón cacodilato sódico pH 7,4, que contenía 25 mg de sacarosa/ml durante 3,5 horas a 4 °C en vacío. Después de la fijación las muestras fueron lavadas con el mismo tampón 3 veces durante 30 minutos a 4 °C, y posteriormente fueron deshidratadas en una serie de soluciones con concentración creciente de etanol a 4 °C: 10 minutos al 30 %, 10 minutos al 50 %, 10 minutos al 70 %, 10 minutos al 90 %, 30 minutos al 96 %, 2 incubaciones de 1 hora al 100 % de etanol, tras lo cual se procedió a embeber progresivamente las muestras deshidratadas en la resina LR White (London Resin Co.). Para ello se hicieron diferentes incubaciones a 4 °C y con agitación, disminuyendo el etanol y aumentando la concentración de resina: 3 horas en 1 : 3 LR White : Etanol 100 %; toda la noche en 1 : 1 LR White : Etanol 100 %; 3 horas en 3 : 1 LR White : Etanol 100 %; y, finalmente, LR White pura. La resina fue polimerizada con luz UV a -20 °C (Fedorova *et al.*, 1999). Alternativamente, algunas muestras fueron fijadas en 3 % de glutaraldehído en 0,05 M de tampón cacodilato sódico, pH 7,4, que contenía 25 mg de sacarosa ml⁻¹ y embebidas en Araldita Durcupan ACM tal y como fue descrito por Lucas y cols. (Lucas *et al.*, 1998). Se obtuvieron secciones Semi-finas (1 μm) y ultrafinas (60 nm) cortando las muestras con un microtomo Leika Ultracut (Leika, Viena, Austria) provisto de una cuchilla de diamante. Las secciones semifinas para la microscopía óptica fueron teñidas con 1 % (p/v) de azul de toluidina (preparada en una solución acuosa al 1 % de borato sódico) (Roldán *et al.*, 2007b) o mediante la reacción PAS (incubación en una solución al 0,5 % de ácido peryódico en agua destilada, seguida de incubación con el reactivo de Schiff) (Shvaleva *et al.*, 2009); tras lo cual se procedió a su observación directa con microscopio Zeiss axiophot (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las secciones ultrafinas para la microscopía electrónica de transmisión fueron contrastadas con una solución acuosa al 2 % de acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963). Las muestras así tratadas fueron observadas con un microscopio electrónico STEM LEO 910 (Oberkochen, Alemania) a 80 kV, equipado con una cámara digital Gatan Bioscan 792 (Gatan, Pleasanton, CA, USA). Se analizaron diferentes secciones de al menos tres diferentes hojas.

Análisis mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión de gránulos de almidón aislados.

Se aislaron gránulos de almidón tal y como se describe en la página 89. Tras dejar secar los gránulos de almidón se procedía al recubrimiento con oro de los mismos mediante pulverización.

En el caso de la microscopía electrónica de barrido los gránulos de almidón así tratados fueron visualizados con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5400 (JEOL, Tokio, Japón).

En el caso de la microscopía electrónica de transmisión los gránulos de almidón fueron embebidos en una solución de agar al 3 % (peso/volumen) a una temperatura inferior a 40 °C.

Después de que la solución solidificase, se cortaron pequeños cubos de 1mm³, las cuales fueron tratadas con una solución de ácido peryódico al 1 % durante 20 minutos, lavadas con agua desionizada, incubadas en una solución saturada de tiosemicarbazida durante 24 horas, lavadas con agua desionizada nuevamente y finalmente incubadas con una solución al 1 % (peso/volumen) de nitrato de plata durante 24 horas (tratamiento PATAg) de acuerdo con Gallant et al (1973). Las muestras fueron entonces lavadas y embebidas en Nanoplast (Helbert et al., 1996). Después de 10 días de polimerización con Nanoplast las muestras fueron nuevamente embebidas en la resina LR White Hard Grade. Usando un microtomo MT-7000, Bal-Tec RMC; Tucson, AZ, USA) provisto de una cuchilla de diamante se obtuvieron secciones de 0,1 mm. Las muestras fueron entonces examinadas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100S (Croissy sur Seine, Francia) bajo un voltaje de 80 kV.

Determinación de parámetros fotosintéticos.

Análisis del intercambio de gases mediante IRGA.

Las tasas de fotosíntesis neta (A) y transpiración (E) en respuesta a intensidades crecientes de luz (Q) y a concentraciones crecientes de CO₂ en el interior de la hoja (C_i), se determinaron usando un analizador de gases por infra-rojo (IRGA): el modelo portátil LICOR-6400 (LI-COR Biosciences, Inc., Lincoln, NE, USA). Estas determinaciones se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. Mariam Sahrawy, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (CSIC).

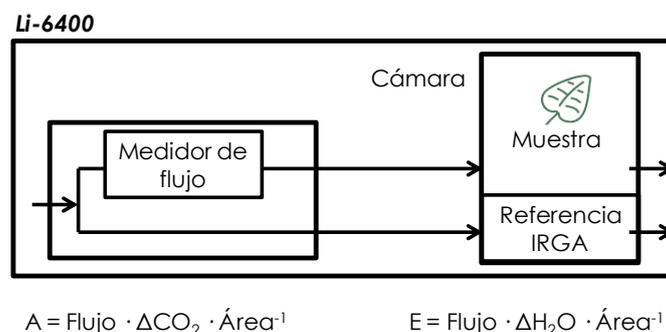


Figura 10. Esquema sobre el funcionamiento del IRGA y modo en que se determinan las tasas de fotosíntesis y transpiración (adaptado de LI-COR Biosciences, 2005).

Las tasas de fotosíntesis neta (A) y de transpiración (E), son calculadas como la diferencia entre el contenido de CO₂ o el de H₂O, respectivamente, de referencia y el que atraviesa la cámara donde se encuentra fijada la hoja. Tanto la conductancia estomática (g_s) como la concentración de CO₂ en el interior de la hoja (C_i) son medidas estimadas, calculadas mediante ecuaciones (LI-COR Biosciences, 2005), a partir de las variaciones de CO₂ y H₂O.

Antes de su uso, el IRGA fue calibrado y una serie de parámetros (como el área de la hoja, el flujo de la corriente y la temperatura) fueron fijados. La temperatura dentro de la cámara del IRGA se ajustó a la temperatura a la que crecieron las plantas (23 °C). Para las curvas de respuesta a luz se fijó una concentración de CO₂ de 400 μmol m⁻² s⁻¹ (próxima a la que se encuentra en el aire), con un flujo de 350 μmol s⁻¹. Tras la adaptación de las hojas a la oscuridad, se determinó la tasa fotosintética a distintas intensidades de luz: 0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 μmol m⁻² s⁻¹. Para las curvas A/Ci se fijó una intensidad lumínica de 1000 μmol m⁻² s⁻¹, siendo esta intensidad a la que se obtiene la tasa fotosintética máxima en las curvas de respuesta a luz. Las medidas empezaron a 400 μmol mol⁻¹ de CO₂ y ésta se fue disminuyendo progresivamente hasta 50 μmol mol⁻¹ de CO₂ para luego ir aumentándose: 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 y 1500 μmol mol⁻¹ de CO₂. La disminución inicial de la concentración de CO₂ permite la adaptación de las plantas a bajo C_i, de modo que las medidas iniciales (a baja concentración) sean fiables.

El programa de análisis de datos del LI-6400 de LI-COR calcula todos los parámetros obtenidos directamente (A y E) y estimados (g_s y C_i) a partir de las concentraciones de CO₂ y H₂O en la cámara. Las tasas de fotosíntesis (A) y transpiración (E), así como, la conductancia estomática (g_s) al vapor de agua fueron recalculados mediante un simulador del programa, para ajustarlos a las áreas foliares reales de cada caso. Las áreas foliares fueron determinadas mediante escaneo de las mismas y empleo del programa Adobe Photoshop CS4.

Análisis de las curvas AQ.

Las curvas de fotosíntesis neta (μmol m⁻² s⁻¹) en función de la variación del nivel de luz (PAR) se denominan curvas de respuesta a luz ("curvas AQ"). En todos los casos, a muy baja intensidad de luz aparecen valores de A negativos, que corresponden a una mayor liberación de CO₂ por los procesos respiratorios (incluyendo la fotorrespiración) que la fijación fotosintética bruta de CO₂ (resultando en un incremento del CO₂ en la cámara del IRGA). A mayores intensidades se alcanza un punto de compensación por luz (Γ_i, punto de corte de la curva con el eje x), este es la intensidad de luz a la cual la velocidad de fotosíntesis y la de respiración/fotorrespiración se igualan. Por encima de este punto de compensación, A incrementa linealmente con respecto a PAR y el factor limitante es la velocidad de las reacciones luminosas. A mayores intensidades lumínicas, A incrementa mucho más lentamente hasta alcanzar un valor saturante, la A_{sat}, que corresponde a la asimilación neta de CO₂ en condiciones de luz saturante (y a la concentración de CO₂ del ensayo). La A está limitada en esta fase por la concentración de CO₂ y la velocidad de las reacciones enzimáticas de la fijación del carbono. Se denomina punto de saturación por luz a la intensidad de luz a partir de la cual no hay incremento de la tasa de fotosíntesis neta.

La tasa de asimilación de CO₂ en oscuridad (punto de corte de las curvas con el eje y), nos indica la tasa de respiración mitocondrial aparente (R_{day}), puesto que en oscuridad la Rubisco es inactiva. Se denomina "aparente" dado que existe controversia acerca de cuál es la

tasa respiratoria cuando la hoja está iluminada: recientemente se ha demostrado que la tasa respiratoria en luz es menor que en oscuridad (Tcherkez *et al.*, 2008) y dependiente, por ejemplo, de las condiciones previas. Por esta razón, el dato de tasa respiratoria obtenido con esta metodología debe tomarse con cierta cautela.

Para intensidades lumínicas superiores al punto de compensación por luz, como se dijo anteriormente, el incremento de A es proporcional al incremento de PAR. La pendiente de esta recta nos indica la eficiencia cuántica aparente (AQE o ϕ) (Tcherkez *et al.*, 2008). Debe usarse también aquí el término 'aparente', ya que la estimación se hace en base a la luz incidente y no a la realmente absorbida por la hoja.

Los datos de fotosíntesis neta (A) frente a PAR fueron analizados mediante el programa Photosyn Assistant (Parsons & Ogston, Dundee Scientific), de la Universidad de Dundee (UK) (<http://www.ddsci.com/>), el cual nos permitió estimar la tasa de fotosíntesis máxima a luz saturante, en las condiciones de ensayo (A_{sat}), la respiración en oscuridad o respiración mitocondrial aparente (R_{day}) y los puntos de compensación y de saturación por luz. Las estimaciones se hacen mediante el ajuste de los valores obtenidos a una función modelo, expresada como la siguiente ecuación cuadrática (Prioul & Chartier, 1977):

$$A = \frac{\phi \cdot Q + A_{max} - \sqrt{(\phi \cdot Q + A_{max})^2 - 4 \cdot \phi \cdot Q \cdot k \cdot A_{max}}}{2k} - R_{day}$$

donde ϕ es la eficiencia cuántica aparente, A_{max} es la tasa de fotosíntesis máxima y R_{day} es la respiración en oscuridad. La convexidad (k) es un parámetro adicional necesario para describir la tasa progresiva de flexión entre la primera parte de la función (comportamiento lineal) y el valor máximo de la misma.

Photosyn Assistant determina el mejor ajuste de los datos experimentales a esta curva mediante la variación de los parámetros y la minimización de la suma de los cuadrados. Lo primero que hace el programa es estimar los cuatro parámetros iniciales: ϕ , k, A_{max} y R_{day} . Mediante una regresión lineal de los primeros datos, se estiman R_{day} y ϕ ; ϕ es la pendiente de la recta y R_{day} el punto de corte con el eje y (oscuridad). A_{max} es la asíntota superior de la curva y se estima tomando un valor ligeramente superior al valor máximo. El programa utiliza entonces una rutina simple de Nelder-Mead para estimar los cuatro parámetros por mínimos cuadrados. Las estimaciones obtenidas se utilizan para crear una función modelo.

Photosyn Assistant calcula el punto de compensación por luz como el punto de corte con el eje x ($A = 0$) de la función modelo.

Análisis de las curvas A/C_i

Las curvas de fotosíntesis neta ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en función de la variación de la concentración de CO₂ intercelular de la hoja (C_i) se denominan "curvas A/C_i". Aunque conceptualmente similares a las curvas de AQ, las curvas A/C_i tienen algunas peculiaridades a destacar. En primer lugar, los datos de la variable independiente (en abscisas) son expresados no como la concentración ambiental de CO₂ (la variable realmente controlada en el equipo) sino como la concentración intercelular de CO₂ (C_i). C_i es una variable calculada (no directamente medida) a partir de la relación: $A = g_s (C_a - C_i)$, donde A es la tasa fotosintética neta, g_s es la conductancia estomática y C_a y C_i son la concentración ambiental e intercelular de CO₂ respectivamente (McMurtrie & Wang, 1993).

Al igual que en las curvas AQ, en las curvas A/C_i aparece una primera fase de valores negativos de A, para valores muy bajos de C_i, seguida de una segunda fase de incremento lineal de A con respecto a C_i y una tercera, en la cual el incremento de A con respecto al C_i disminuye, hasta alcanzarse un valor de A máximo, A_{max}, a concentraciones de C_i saturantes. Los valores negativos de A se corresponden con aquellas concentraciones de C_i que no son suficientes para permitir que la fijación fotosintética de CO₂ supere la liberación por los procesos de respiración mitocondrial y fotorrespiración. En este caso, el punto de corte con el eje y (C_i = 0), nos indica la tasa de liberación de CO₂ cuando la tasa de fotosíntesis y la de fotorrespiración se igualan, de modo que corresponde a la tasa respiratoria mitocondrial (R_d).

La A_{max} alcanzada en las curvas A/C_i es el valor máximo de fotosíntesis neta que puede alcanzar la planta, puesto que estamos en condiciones de saturación por luz y por CO₂, su valor va a depender de la tasa de uso de las triosas fosfato (TPU) y la respiración mitocondrial (R_d) a esta intensidad de luz ($A_{\text{max}} = 3 \text{ TPU} - R_d$) (Sharkey *et al.*, 2007). La estimación de A_{max} se llevó a cabo con el programa Photosyn Assistant, de la Universidad de Dundee (UK).

Photosyn Assistant fija los datos obtenidos a una curva modelo descrita por la hipérbola rectangular: $A = (CE \cdot C_i \cdot A_{\text{max}}) / (CE \cdot C_i + A_{\text{max}}) - R_d$; donde A es la asimilación de CO₂ o fotosíntesis neta, CE la eficiencia de carboxilación, C_i la concentración interna de CO₂, A_{max} la asimilación a concentración saturante de CO₂ y R_d es la respiración mitocondrial. Los datos experimentales son fijados y lo primero que hace el programa, igual que en el caso de las curvas de respuesta a luz, es obtener estimaciones iniciales de los valores de CE, R_d y A_{max}. A medida que la fotosíntesis neta se aproxima a cero, el CO₂ se convierte en el factor limitante de la fotosíntesis, de modo que la relación entre A y C_i es lineal para los valores más bajos de C_i. Mediante una regresión lineal de los primeros datos obtenemos CE, como la pendiente de la recta, y R_d, como la intersección con el eje y. A_{max} es estimada a partir de los valores de A para concentración de C_i saturante. Posteriormente, el programa fija los valores de los tres parámetros mediante mínimos cuadrados (Olsson & Leverenz, 1994) y estima el punto de compensación por CO₂ (nivel de CO₂ subestomático necesario para que haya asimilación neta de CO₂), como el punto de intersección con el eje x.

Cómo se explica en Olsson & Leverenz, 1994, las curvas de respuesta a CO₂ pueden entenderse como el resultado de tres factores diferentes que limitan la respuesta de A al CO₂ (Figura 11): la tasa de carboxilación permitida por la Rubisco (V_c), la tasa de transporte de electrones (J) y el uso de las triosas fosfato (TPU), cada uno de los cuales puede ser estimado a partir de la parte de la curva dónde los otros dos factores no son limitantes.

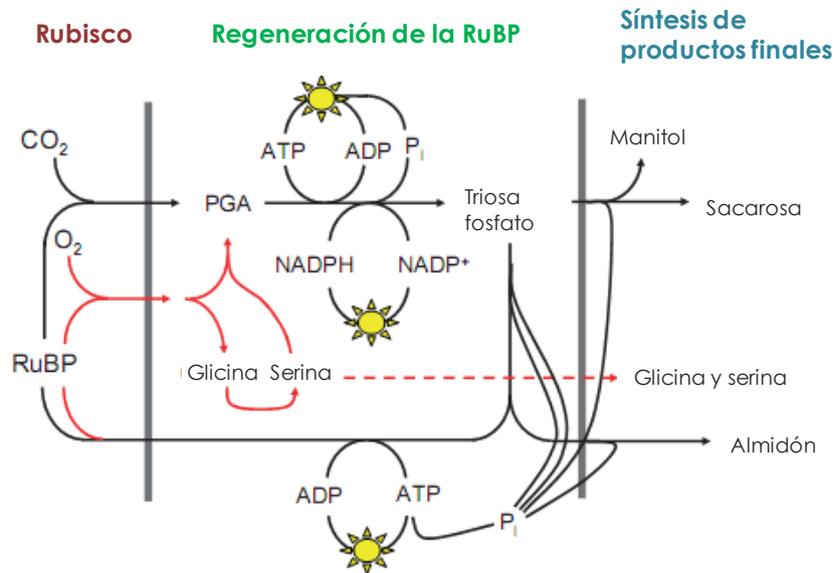


Figura 11. Esquema de los procesos que afectan a la tasa de fotosíntesis en respuesta CO₂ (adaptado de Sharkey *et al.*, 2007). RuBP = Ribulosa bifosfato; Rubisco = ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa.

A bajas concentraciones de CO₂, la tasa de fotosíntesis neta puede ser predicha por las propiedades de la Rubisco (ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) asumiendo un suministro saturante de ribulosa bifosfato (RuBP). La limitación por la Rubisco en esta fase de la curva está asociada a la baja concentración de CO₂ más que a la V_{max} del enzima. El incremento de A con la concentración de CO₂ en esta fase es debido a (1) que el CO₂ es el sustrato del enzima y (2) la disminución del CO₂ liberado por la fotorrespiración (se incrementa la carboxilación de la RuBP a expensas de la oxigenación) (Figura 11). La tasa de carboxilación máxima permitida por la Rubisco (V_{cmax}) puede ser estimada a partir de los valores de esta fase de la curva (Caemmerer & Farquhar, 1981; Sharkey *et al.*, 2007). A concentraciones más altas de CO₂, la tasa de fotosíntesis neta puede ser predicha asumiendo que la RuBP es limitante (Caemmerer & Farquhar, 1981). En esta fase, el incremento de A con la concentración de CO₂ es debido a que el incremento de la concentración de CO₂ provoca (1) la disminución del CO₂ liberado por la fotorrespiración y (2) el incremento de la eficiencia del uso de luz (Figura 11). La tasa de transporte de electrones (J) puede ser estimada a partir de los valores de la curva limitados por la regeneración de la RuBP. Por último, una tercera fase aparece cuando los cloroplastos tienen una capacidad de síntesis de triosas fosfato más alta que la capacidad de la hoja para usarlas. En esta fase no se observa incremento de A al incrementar la concentración de CO₂. La limitación de la fotosíntesis por la tasa de uso de las triosas fosfato (TPU) frecuentemente determina la A_{max}. La estimación de los parámetros V_{cmax}, J y TPU, requiere del

conocimiento de la tasa de respiración mitocondrial (R_d) y la conductancia del mesófilo (g_m), parámetros que pueden ser estimados a partir de las ecuaciones que definen la fase de la curva limitada por la Rubisco y la fase limitada por la regeneración de la RuBP (Farquhar & Sharkey, 1982).

La respuesta fotosintética a la concentración de CO_2 nos ha permitido estimar tres parámetros relacionados con la fisiología de la hoja: la tasa de carboxilación máxima permitida por la Rubisco (V_{cmax}), el uso de las triosas fosfato (TPU) y la tasa de respiración mitocondrial (R_d). Estos parámetros fueron estimados gracias al software diseñado para Excel por Sharkey y col., el cual se basa en los principios recogidos y documentados en Sharkey *et al.*, 2007.

Análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila mediante PAM.

La energía de la luz que es absorbida por los complejos recolectores de luz pigmento-proteína (LHC) es rápidamente transferida a la clorofila *a*, la cual puede relajarse de tres maneras diferentes: mediante los procesos fotoquímicos (reducción de quinonas, QA), los procesos no fotoquímicos (NPQ, principalmente la emisión de calor) y/o la emisión de fluorescencia (Brooks & Niyogi, 2011; Butler, 1978). Kautsky y cols. (Kautsky *et al.*, 1960) demostraron que la fluorescencia de la clorofila podía ser empleada para el estudio de las reacciones lumínicas de la fotosíntesis y caracterizó las curvas de inducción. Actualmente, la fluorescencia de la clorofila se ha convertido en uno de los métodos principales de análisis de la fotosíntesis *in vivo* (Baker, 2008; Maxwell & Johnson, 2000; Govindjee, 2004), junto con las medidas de intercambio de gases.

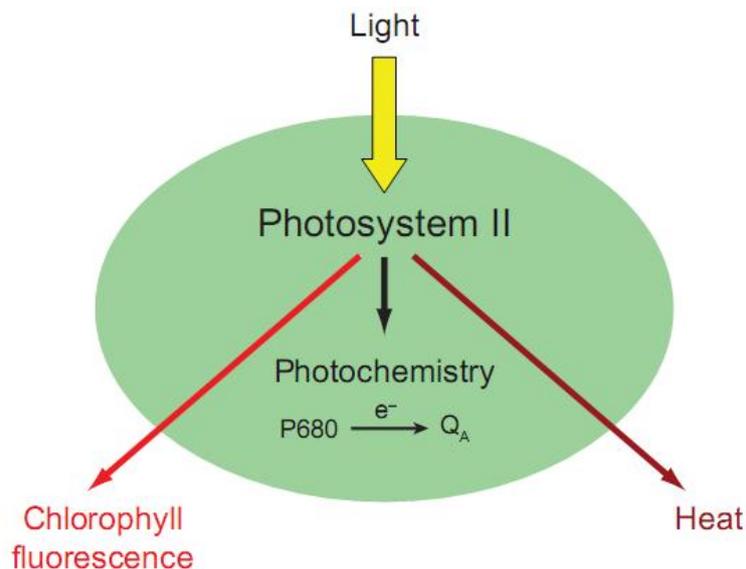


Figura 12. Modelo sencillo sobre los posibles destinos de la energía lumínica absorbida por el PSII (de Govindjee, 2004). La energía lumínica absorbida por las clorofilas asociadas al PSII (Photosystem II) puede ser empleada en las reacciones fotoquímicas (*Photochemistry*), por las cuales un electrón (e^-) es transferido desde la molécula de clorofila del centro de reacción (P680) al aceptor primario del PSII (quinona A, Q_A). Alternativamente, la energía lumínica absorbida puede ser perdida por el PSII como emisión de fluorescencia de la clorofila (*Chlorophyll fluorescence*) o como calor (*Heat*).

En nuestro caso las medidas de fluorescencia de la clorofila se han llevado a cabo usando un fluorímetro de pulso de amplitud modulada (Dual-PAM-100, *Chlorophyll Fluorescence & P700 Photosynthesis Analyzer*), el cual permite determinar la señal de fluorescencia de una manera precisa, rápida y no invasiva (Schreiber *et al.*, 1986; Schreiber, 2004). Los fluorímetros tipo PAM usan tres tipos distintos de luz: una luz débil no actínica ($<0.1 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), una luz actínica (que es absorbida por el aparato fotosintético y permite el transporte de electrones) de intensidad moderada y variable ($0\text{--}3000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y una luz saturante de alta intensidad ($10000 \mu\text{E}$). El sistema PAM permite medir la emisión de fluorescencia sin interferencia de la luz actínica y saturante.

Dos tipos de medidas han sido realizadas usando el sistema PAM. La primera de las medidas (curva de inducción-relajación del "quenching" no fotoquímico) consistió en cuantificar la fluorescencia emitida tras aplicar pulsos de luz saturante a la hoja adaptada a la oscuridad, adaptada a la luz y en oscuridad después de la adaptación a la luz. Antes de comenzar la medida las plantas eran adaptadas a oscuridad, para ello fueron mantenidas en oscuridad durante un mínimo de 1 h. Las plantas adaptadas en oscuridad permiten la obtención de los parámetros F_0 (fluorescencia basal) y F_m (fluorescencia máxima), para ello la hoja seleccionada era colocada en el PAM e iluminada con una luz no actínica de muy baja irradiancia (de modo que no se produce disipación de la energía lumínica a través de vías fotoquímicas). En estas condiciones, el pool de Q_A (aceptor primario de electrones del PSII) está completamente oxidado (se dice que los centros de reacción están abiertos) y la hoja emite una señal baja de fluorescencia denominada fluorescencia basal en condiciones de aclimatación a la oscuridad (F_0). A continuación se aplicó un pulso breve de luz saturante de alta intensidad, lo cual provoca que el pool de Q_A se reduzca completamente (se dice que los centros de reacción están cerrados) y la emisión de fluorescencia alcance su valor máximo (F_m) resultante de la saturación fotoquímica de la hoja. Posteriormente la hoja era iluminada con luz actínica ($75 \mu\text{E}$) y la fluorescencia emitida en estas condiciones era determinada (F_s). La iluminación era mantenida durante aproximadamente 7 minutos, durante los cuales eran aplicados 8 pulsos de luz saturante y registrada la fluorescencia emitida: fluorescencia máxima de la hoja adaptada a la luz (F'_m). Esta señal F'_m es siempre menor que F_m (hoja en oscuridad) debido a la existencia de procesos de disipación térmica (no fotoquímicos, NPQ) inducidos por la luz actínica y que normalmente están relajados en la oscuridad. Por último, la luz actínica era retirada la luz y se iluminaba de nuevo con luz débil, obteniéndose una nueva señal basal llamada F'_0 , la cual suele ser menor que F_0 (tomada en oscuridad). La aplicación de pulsos de luz saturante, en estas condiciones, permite observar la recuperación de la fluorescencia máxima, con objeto de comprobar que el procesos de inducción y relajación de los procesos de NPQ. Nótese que todos los parámetros de fluorescencia previamente citados son adimensionales, ya que se basan en cocientes entre coeficientes, los cuales se miden en unidades arbitrarias de fluorescencia.

El otro tipo de medida realizado con el sistema PAM se denomina curva de luz. La curva era realizada a continuación de la curva de inducción-relajación de NPQ. Para esta curva, se

aplicaron a la hoja intensidades crecientes de luz actínica (0, 11, 18, 27, 58, 100, 131, 221, 344, 536, 830, 1292 y 1957 μE) y para cada una de ellas, se obtuvieron los valores de F_s y F'_m (esta última mediante aplicación de un pulso de luz saturante una vez medida F_s).

Sin entrar en los fundamentos teóricos y matemáticas detrás de ello (Baker, 2008), una serie de parámetros pueden ser calculados a partir de los datos obtenidos a partir de las distintas emisiones de fluorescencia que permiten profundizar en los procesos asociados a la fase lumínica durante la fijación de carbono (Maxwell & Johnson, 2000):

- Rendimiento cuántico máximo del PSII. Calculado como: F_v/F_m , donde F_v es la fluorescencia variable = $F_m - F_0$. Su medición se realiza en oscuridad en hojas aclimatadas un mínimo de 1 h. F_v/F_m no debe ser considerado como un valor rigurosamente cuantitativo del rendimiento cuántico máximo del PSII (Blankenship, 2002), sin embargo, resulta una medida relativa del mismo muy útil. El valor de F_v/F_m para plantas de diferentes especies no sometidas a estrés suele ser consistentemente de 0,83 (Björkman & Demmig, 1987) y su disminución es considerada un indicador de pérdida de función (daño) a nivel del aparato fotosintético (Bilger *et al.*, 1995). Sin embargo, también se ha descrito una disminución de este parámetro asociada a procesos de fotoprotección (Osmond *et al.*, 1999).

- Rendimiento cuántico efectivo del PSII (ϕPSII). Se calcula como: F'_q/F'_m , donde $F'_q = F'_m - F_s$. F'_q es el resultado de la atenuación de F'_m por los procesos fotoquímicos. F'_q/F'_m es teóricamente proporcional al rendimiento cuántico del PSII antes de aplicar el pulso de luz saturante. Cuando los mecanismos de disipación térmica son iguales a 0 (oscuridad), el rendimiento cuántico efectivo del PSII (F'_q/F'_m) es igual al rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m). Las tasas de consumo de NADPH y ATP son los principales factores que determinan ϕPSII . Cambios en la eficiencia de carboxilación, la tasa de regeneración de la ribulosa 1,5-bifosfato, la conductancia estomática, la fotorrespiración o la tasa de exportación de azúcares influyen en la tasa de uso de NADPH y ATP y, por tanto, en el rendimiento cuántico efectivo del PSII (Baker, 2008).

- Atenuación no fotoquímica ('Quenching' no fotoquímico (NPQ)). Calculado como: $(F_m/F'_m) - 1$ o, lo que es lo mismo, $(F_m - F'_m)/F'_m$. Como puede observarse, su cálculo requiere tanto parámetros obtenidos en oscuridad (F_m) como a la luz (F'_m). Esto hace que sea muy importante la medida de ambos parámetros justo en la misma zona de la hoja. La NPQ es un mecanismo de defensa que evita o reduce la formación de moléculas de clorofila en estado triplete y, con ello, protege de la formación de especies reactivas del oxígeno. Los procesos de NPQ están relajados en oscuridad. NPQ tiene tres componentes (Müller *et al.*, 2001), de los cuales el más importante es la emisión de calor.

La emisión de calor por parte de la planta tiene dos componentes: uno inducible por luz (incrementa al incrementar la intensidad de la luz actínica) y otro no inducible por luz (permanece prácticamente constante a cualquier intensidad). El incremento de la disipación no fotoquímica de energía con el incremento de la intensidad lumínica es un proceso regulado y

dependiente de la acidificación del lumen y la activación de la violaxantina de-epoxidasa (Müller *et al.*, 2001). La disipación de calor no regulada (no inducible por luz) es consecuencia del bloqueo del transporte de electrones provocado por daños debidos a reacciones secundarias como la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS).

El parámetro NPQ solo puede ser comparado entre plantas con una misma relación F_v/F_m . Sin embargo, los rendimientos cuánticos del PSII (ϕ_{PSII}), de la atenuación no fotoquímica inducible por luz (ϕ_{NPQ}) y de la atenuación no fotoquímica no regulada (ϕ_{NO}) son referidos a un valor total de 1, lo cual nos permite comparar la contribución de cada uno de estos tres componentes del apantallamiento de la fluorescencia entre las distintas líneas estudiadas.

Para hojas expuestas a luz actínica, ϕ_{PSII} es equivalente (relación lineal) al rendimiento cuántico del flujo de electrones (LEF) a través del PSII, lo cual, permite estimar la tasa de transporte no cíclico de electrones (ETR). Los parámetros obtenidos en la curva de luz permiten representar la ETR a diferentes intensidades de luz. Sin embargo, la estimación de ETR por el software del PAM asume valores para ciertos parámetros que en el caso del mutante *ssl/sslV* no podemos asumir (por poseer un alto contenido de antocianinas, pigmentos no fotosintéticos) (Müller *et al.*, 2001), por ello, aunque las curvas de luz representadas en las páginas 163 y 176 no incluyen ETR, podemos comparar el rendimiento cuántico del flujo de electrones de las diferentes líneas a partir de los valores de ϕ_{PSII} .

Medidas de estrés oxidativo.

Las medidas de estrés oxidativo fueron realizadas en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) en el grupo de la Dra. Luisa Sandalio.

Inmunodetección de carbonilos.

Este ensayo se basa en la capacidad de la dinitrofenilhidracina (DNP) para unirse a los grupos carbonilo de cetonas y aldehídos y se llevó a cabo según el método de Romero-Puertas y col. (Romero-Puertas *et al.*, 2002).

Se partió de 0,2-0,5 mg de hojas de rosetas que fueron machacados en un mortero con 200-500 μ l de tampón de extracción, cuya composición era: 10mM de tampón fosfato sódico pH 7,4, 1mM de EDTA, 0,2 % de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas (1-5 μ l/ml). Las muestras machacadas se centrifugaron 30 min a 4 °C y 13000 rpm y la concentración de proteínas del sobrenadante fue determinada mediante el método descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Se preparaban 200 μ g de proteína en 200 μ l de tampón de extracción y se añadían 50 μ l de DNP 10 mM preparada en HCl 2N. Se incubaban las muestras 1 h a temperatura ambiente con agitación y, a continuación, se añadían 300 μ l de TCA al 20 % y se incubaban 10 min en hielo para precipitar las proteínas y eliminar la DNP.

Se centrifugaba 10 min a 4 °C y 2500 g. El precipitado era lavado tres veces - hasta que el color amarillo del precipitado desaparecía - con acetato de etilo:etanol (1:1): se resuspendía el precipitado, se dejaba 5 min en agitación y se centrifugaba (10 min a 4 °C y 2500 g).

Finalmente, se resuspendía en 125 µl de 10 mM de tampón fosfato sódico pH 7,4, se añadía tampón de carga 2x y se separaban las proteínas mediante electroforesis en geles de acrilamida (ver página 100). A continuación, eran transferidas a membranas de nitrocelulosa, que eran teñidas con rojo Ponceau y, posteriormente, bloqueadas con bloqueante comercial e incubadas con anti-DNP (1:50000), como anticuerpo primario, y anti-IgG de conejo, como anticuerpo secundario (ver protocolo estándar de Inmunoblot en página 103).

La señal obtenida para cada muestra en el western se relativizaba a la cantidad de proteína (Ponceau), para lo cual se hacía uso de Adobe Photoshop, y se refería cada mutante al silvestre.

Determinación del contenido en peróxido de hidrógeno.

Para la medida peróxido de hidrógeno en extractos crudos de hojas se usó un método fluorimétrico descrito por Creissen y col. (Creissen *et al.*, 1999).

La extracción del peróxido de hidrógeno se realizó con ácido sulfúrico 25 mM (2 µl/mg de material vegetal) y con mortero. Se centrifugaba luego 25 min a 4 °C y 14000 rpm para eliminar los restos de hoja. Se añadió carbón activo a los extractos para eliminar pigmentos que pudieran interferir en la reacción. El carbón activo y los pigmentos se eliminaron por centrifugación a 5000 g durante 5 min. El sobrenadante resultante se neutralizaba con NaOH 1 N. Se preparaba además una solución madre de peróxido de hidrógeno 1 M en ácido sulfúrico 25 mM neutralizado con NaOH 5 N, para realizar la recta patrón.

La mezcla de reacción, en un volumen final de 3 ml, contenía tampón Hepes 50 mM pH 7,6, 30 µl de ácido homovanilínico (HVA) 50 mM preparado en Hepes 50 mM pH 7,6 y 100 µl de muestra o dilución de la solución madre. La reacción comenzaba con la adición de 30 µl peroxidasa de rábano 4 µM y transcurría durante 2 min en oscuridad. La concentración de H₂O₂ se determinó midiendo la fluorescencia, en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540, con excitación a 315 nm y emisión a 425 nm, frente a una curva patrón de peróxido de hidrógeno (1-20 µM). El HVA se oxida en presencia de H₂O₂ en una reacción catalizada por la peroxidada y da un compuesto altamente fluorescente que es lo que se mide con el fluorímetro.

Determinación de los niveles de peroxidación lipídica.

La tasa de peroxidación lipídica se determinó midiendo la concentración de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico según el método de Buege y Aust (Buege & Aust, 1978).

Se partió de 0,2 mg de hojas de rosetas que fueron machacados en un mortero con 200 μ l de tampón de extracción, cuya composición era: 10mM de tampón fosfato sódico pH 7,4, 1mM de EDTA, 0,2 % de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas (1–5 μ l/ml). Las muestras machacadas se centrifugaron 30 min a 4 °C y 13000 rpm y el sobrenadante fue tomado como extracto crudo. 100 μ l de extracto se mezclaban con 1 ml de la siguiente solución madre, preparada justo antes de realizar el ensayo: ácido Tricloroacético (TCA) al 15 % (p/v), ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,375 % (p/v), ácido Clorhídrico 0,25 N e Hidroxitolueno butilado (BHT) al 0,01 % (p/v) en agua Milli-Q. El TCA se usa para precipitar las proteínas (y evitar así posible interferencias) y el BHT (antioxidante), para evitar daños a las membranas durante el proceso. Se mezclaban vigorosamente la solución anterior con muestra (extracto) y se calentaba a 95 °C durante 15 min. Se deja enfriar y se daba un pulso. Finalmente se medía la absorbancia del sobrenadante a 535 nm. Los lípidos peroxidados reaccionan con el TBA y forman malondialdehído (MDA), que se mide a 535 nm. La peroxidación se da como concentración de MDA, la cuál se calculó a partir de una recta patrón con distintas concentraciones de MDA (0,1-10 μ M) que recibieron el mismo tratamiento que las muestras.

FRACCIONAMIENTO CELULAR.

Aislamiento de cloroplastos.

Para el aislamiento de cloroplastos se partía de 20-50 g de hojas de roseta, que eran trituradas con una batidora (BRAUN) en 100-150 ml de tampón CIB 1x, cuya composición era: sorbitol 300 mM, tricina 20 mM pH 8,4, EDTA 10 mM, NaHCO₃ 10 mM y ácido ascórbico 40 mM. La trituración con la batidora se realizaba de forma intermitente y a mínima potencia, evitando el calentamiento de la muestra, hasta que no se observaban trozos de hojas. Una vez triturado, se filtraba a través de un filtro Miracloth (Millipore, MA, USA), cuyo tamaño de poro era de 100 µm, y se centrifugaba en frío en tubos tipo Falcons de 50 ml a 1000 g durante 10 minutos. El sobrenadante era descartado y cada pellet resuspendido suavemente - con un pincel - en 1 ml de tampón CIB 1x.

Cada muestra de cloroplastos se ponía - usando puntas azules cortadas, para evitar la rotura de los cloroplastos - sobre un gradiente de Percoll 40-85 % (en CIB 1x) y se centrifugaban en frío a 2500 g durante 15 minutos y sin freno.

Después de la centrifugación, se veían dos bandas: una superior, en la interfase entre el tampón CIB 1x y el Percoll 40 %, correspondiente a cloroplastos rotos; y otra inferior, en la interfase entre el Percoll 40 % y el Percoll 85 %, correspondiente a los cloroplastos intactos. Se retiraba el tampón y el Percoll y los cloroplastos se lavaban en abundante tampón CIB 1x (30-40 ml), para eliminar restos de Percoll, centrifugando cada vez a 700 g, 5 min, en frío y sin freno.

En ocasiones, los cloroplastos eran guardados resuspendidos en 0,5-1 ml de tampón CIB 1x a 4 °C y en oscuridad, para su uso al día siguiente.

Fraccionamiento cloroplastídico.

Este protocolo está basado en el descrito por Block y cols. (Block *et al.*, 1983). Para la rotura de los cloroplastos, éstos eran resuspendidos en 3 ml de tampón de rotura (Tris 62,5 mM pH 7,5 y MgCl₂ 2mM), suplementado con inhibidor de proteasas (1-5 µl / ml), y rotos mediante la Prensa de French a 20000 Psi. Tras la rotura se centrifugaban en eppendorfs a 10000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. El pellet era descartado (almidón y cloroplastos intactos) y nos quedábamos con el sobrenadante (SN, verde), del cual se tomaba una alícuota de 200 µl que se conservaba en frío y el resto se cargaba sobre un gradiente discontinuo de sacarosa 0,4-1 M. El gradiente de sacarosa era preparado en tubos apropiados para el rotor SW 41 Ti (Beckman), en el cual las

muestras (en el gradiente) eran ultracentrifugadas (Beckman XL-80) durante 90 min a 4 °C y 90000 g, sin freno.

Después de la ultracentrifugación, tres fracciones podían ser separadas: una fracción superior, correspondiente al tampón de rotura, donde se encontraban las proteínas solubles del estroma; una fracción amarilla, entre ambas concentraciones de sacarosa, correspondiente a las envolturas (externa e interna) del cloroplasto; y un fracción inferior, pellet, correspondiente a las membranas tilacoidales. El pellet era resuspendido en 250–500 µl de tampón de rotura (suplementado con inhibidor de proteasas).

La concentración de proteínas en cada fracción se determinaba mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y se cargaban 30 µg de cada una en cuatro geles de acrilamidas. Se separaban las proteínas de cada fracción mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (ver página 100) y uno de los geles se teñía con Coomassie (ver página 101) para comprobar la carga proteica en cada calle. Los otros tres geles eran transferidos a membranas de nitrocelulosa (ver página 103) y cada una de ellas era incubada con un anticuerpo primario diferente (ver Tabla 8): anti-SSIV, anti-PRK (marcador estromático) y anti-PsbA (marcador tilacoidal).

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS.

Inducción de BL21 (DE3) Δ glgCAP. Preparación de extractos crudos bacterianos.

Las cuatro clases de almidón sintasas – completas y/o fragmentadas - sin péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) - fueron expresadas en la estirpe de *E.coli* BL21 (DE3) Δ glgCAP, que carece de las actividades ADP-glucosa pirofosforilasa, glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa (Alonso-Casajus *et al.*, 2006), permitiendo los ensayos de actividad almidón sintasa sin interferencia de estas tres actividades bacterianas. La expresión fue posible mediante la clonación de los correspondientes genes (o parte de ellos) en el vector de expresión pET45b, inducible por isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) (ver Tabla 9).

Para la inducción, la estirpe que correspondiese se crecía en LB suplementado con ampicilina (resistencia del vector) y kanamicina (resistencia de la estirpe) (ver concentraciones en página 69) hasta una DO_{600nm} de 0,5 (cultivo en fase exponencial), momento en que se añadía al cultivo el inductor, IPTG, a una concentración de 1 mM. Diferentes tiempos, temperaturas y velocidades de agitación fueron probadas (ver página 186) y las mejores condiciones fueron empleadas para el resto de inducciones de este trabajo. Estas condiciones fueron 90 min a 25 °C y con agitación a 100 rpm. Tras la inducción, el cultivo era centrifugado a 7000 rpm en una centrífuga Avanti de Beckman Coulter y el pellet congelado hasta su uso.

Para la preparación del extracto crudo (EC), el pellet era descongelado en hielo y resuspendido en tampón de rotura suplementado con 1 mM de PMSF y 1-5 μ l/ml de cocktail inhibidor de proteasas. La composición y el volumen empleado del tampón de rotura dependían en cada caso del ensayo para el que se requería el EC. Una vez resuspendidas, las células inducidas eran rotas mediante la Prensa de French a 20000 Psi, salvo en el caso de las determinaciones de Kms, cuando se usó la rotura por sonicación (3 pulsos de 30 segundos a una intensidad del 10 % y con descansos de 1 min en hielo entre pulso y pulso). El lisado obtenido era pasado a tubos eppendorfs y centrifugado a velocidad máxima durante 30 min a 4°C. La fracción soluble obtenida constituía el EC.

Preparación de extractos crudos vegetales.

Para la preparación de extractos crudos vegetales, se emplearon hojas de roseta, las cuales fueron cortadas en el momento del fotoperiodo que se indica en cada caso. En general, las determinaciones enzimáticas (incluidos los zimogramas) se hicieron con extractos vegetales de plantas crecidas en el invernadero (condiciones de día largo) y, en este caso, las hojas

fueron cortadas a las 8 h de luz y trituradas con una trituradora Tissue Tearor™ (Biospec products, INC) a 4 °C. Para las medidas de estrés oxidativo, los extractos crudos vegetales fueron realizados con mortero en frío, sin congelación en nitrógeno líquido. Para los ensayos de actividad almidón sintasa soluble y los inmunoblots anti-SS4 de los mutantes, el material se trituró en mortero con nitrógeno líquido.

La cantidad de material, así como, el tampón de rotura y el volumen del mismo empleados dependió de cada ensayo en concreto. Pero en todos los casos, el tampón fue suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas de SIGMA (1–5 µl/ml).

Los restos de hojas fueron eliminados mediante centrifugación a 14000 rpm y 4 °C durante 15-30 min, tras lo cual, los extractos solubles fueron recuperados y conservados a 4 °C.

DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.

Determinación de la actividad Almidón Sintasa Soluble (SS).

Dos tipos de ensayo de actividad almidón sintasa soluble se han realizado durante el desarrollo de este trabajo, ambos basados en la capacidad de las SS de utilizar ADP-glucosa como sustrato para añadir unidades de glucosa a los extremos no reductores de un polímero de glucógeno o amilopectina, liberando una molécula de ADP por cada molécula de glucosa incorporada.

El primer tipo de ensayo (Denyer *et al.*, 1995) es un "ensayo radiactivo" y supone el uso de ADP-Glc radiactiva. La actividad SS se determina a partir de la detección de glucosa marcada con C^{14} incorporada a un polímero de glucógeno o amilopectina. El segundo tipo de ensayo (Viola *et al.*, 1999), "ensayo no radiactivo", consiste en cuantificar la incorporación de glucosa al polímero de modo indirecto: mediante la cuantificación del ADP liberado desde la ADP-Glc.

Ensayo radiactivo.

Este ensayo se empleó para la medida de actividad en los mutantes SS. Para la preparación del extracto crudo vegetal, se partió de aproximadamente 200 mg de hojas de roseta, que se trituraban en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual se resuspendía en 1 ml de tampón Hepes 50 mM pH 7,6 suplementado con cóctel de Inhibidores de Proteasas (SIGMA). Los restos de hojas fueron eliminados mediante centrifugación a 14000 rpm y 4 °C durante 15 min, quedándonos con el extracto soluble. La concentración de proteínas de dicho extracto se determinaba mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 200 μ l y se ensayaban aproximadamente 250 μ g de proteínas. La composición de la mezcla de reacción era: Tricina 100 mM pH 8,0; acetato potásico 25 mM; EDTA 5 mM; DTT 5mM; BSA 0,5 mg/ml; citrato sódico 0,5 M; glucógeno o amilopectina 10 mg/ml; y ADP [$U-^{14}C$] glucosa 5 mM (actividad específica 2,8 GBq/mol).

Se tomaba una alícuota de 100 μ l de dicha mezcla y se hervía durante 5 minutos, representando el tiempo 0 (t_0) del ensayo. La reacción se desarrollaba durante 15 (t_{15}) o 30 (t_{30}) minutos a 30 °C y era detenida mediante incubación a 100 °C durante 5 minutos. El glucógeno o la amilopectina, ya elongados por la acción de las almidón sintasas solubles, era precipitado por adición de 1 ml de solución 75 % metanol, 1 % KCl, seguida de centrifugación durante 2 min a 13000 rpm. Se lavaba 3 veces con la misma solución, y finalmente se resuspendía en 200 μ l de agua destilada. La radiactividad incorporada al glucógeno o a la amilopectina se determinaba

mediante la adición de 5 ml de líquido de centelleo Ready Protein⁺ MR (Beckman) y posterior lectura en un contador de centelleo modelo LS 6000 IC (Beckman), restando las descomposiciones por minuto (dpm) de la muestra a tiempo cero (t_0) a las dpm de la muestra tras la reacción (t_{30}).

Ensayo no radiactivo.

Este ensayo se empleó para la determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m) de SSIV completa y de sus versiones truncadas. La K_m de un enzima con respecto a un sustrato nos indica la afinidad de dicho enzima por este sustrato. Dada la imposibilidad de obtener el enzima puro, el cálculo de este parámetro (independiente de la concentración de enzima) es el único modo de comparar la actividad de cada versión del enzima con respecto a cada sustrato. Las almidón sintasas tienen dos sustratos: la ADP-Glc (donador de grupos glucosilos) y la amilopectina (aceptor de grupos glucosilos). Para ambos sustratos se calculó la K_m de cada versión de SSIV.

La inducción de cada versión del enzima y la preparación de los extractos crudos (EC) se llevó a cabo como se indica en la página 91. Las inducciones fueron de 1 h 30 min a 25 °C y se realizaron en 50 ml de cultivo. Los pellets se resuspendieron en 1 ml de Tricina 100 mM pH 8, suplementado con inhibidor de proteasas (1-5 μ l/ml) y PMSF (1 mM). La rotura de las células fue por sonicación (3 pulsos de 30 segundos a una intensidad del 10 % y con descansos de 1 min en hielo entre pulso y pulso). El lisado obtenido era pasado a tubos eppendorf y centrifugado a velocidad máxima durante 30 min a 4 °C, de modo que la fracción soluble obtenida constituía el EC.

La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 200 μ l, de los cuales 10 μ l eran de EC. La composición de la mezcla de reacción dependía de para que sustrato estemos calculando la K_m , para cada caso el otro sustrato se pone a una concentración saturante. En el cálculo de la K_m para la amilopectina, la mezcla de reacción se componía de: Tricina 100 mM pH 8,0, acetato potásico 25 mM, EDTA 5 mM, DTT 5mM, BSA 0,5 mg/ml, citrato sódico 0,5 M, ADP-Glc 5 mM (no radiactiva) y concentraciones crecientes de amilopectina: 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/ml de amilopectina. En el cálculo de la K_m para la ADP-Glc, la mezcla de reacción se componía de: Tricina 100 mM pH 8,0, acetato potásico 25 mM, EDTA 5 mM, DTT 5mM, BSA 0,5 mg/ml, citrato sódico 0,5 M, amilopectina 10 mg/ml y concentraciones crecientes de ADP-Glc: 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7,5 y 10 mg/ml.

De cada mezcla de reacción de 200 μ l, se tomaba una alícuota de 100 μ l que se hervían directamente durante 10 min - constituían el t_0 - y los otros 100 μ l se incubaban durante 7 minutos a 30 °C - constituían el t_r -, tras los cuales, la reacción se detenía hirviendo 10 minutos. Se centrifugaban después todos los tubos a 14000 rpm 5 minutos y el sobrenadante era inyectado en un HPLC Alliance de Waters 996 con detector de fotodiodo (*Photodiode Array Detector*). La separación del ADP de las muestras se realizó empleando una columna Partisil 10 SAX (Whatman).

Determinación de la actividad Almidón Sintasa Unida a Gránulo (GBSSI).

Los ensayos de actividad GBSSI se realizaban de acuerdo con el método descrito por Denyer y cols. (Denyer *et al.*, 1995) y basado en la capacidad de la enzima GBSS de utilizar ADP-Glc como sustrato para añadir unidades de glucosa a los extremos no reductores de un polímero de almidón en crecimiento.

Para el ensayo se utilizaban gránulos de almidón de hojas aislados según el método descrito previamente (ver página 73). Para ello, aproximadamente 1 g de hojas de roseta se trituraban en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El material triturado se resuspendía en 2 ml de tampón de extracción, cuya composición era: tampón Hepes 50mM pH 7,6 y Tritón X-100 al 1 % suplementado con cóctel Inhibidor de Proteasas (SIGMA). El extracto crudo se filtraba a través de un filtro de 100 μ m de Miracloth (Millipore, MA, USA) para eliminar los restos de hojas. El mortero se lavaba con el volumen de tampón necesario para enrasar a 10 ml, de los cuales, 5 ml eran empleados para la cuantificación de almidón y los otros 5 ml, para ensayar la GBSSI. Ambos se centrifugaron a 4000rpm y 4 °C durante 15 min, los sobrenadantes se descartaron y los pellets se resuspendieron en 1ml de Percoll 90 %. Se centrifugaron a máxima velocidad durante 45min.

La réplica para cuantificar almidón se lavaba con etanol 100 % y el contenido de almidón era determinado como se describe en la página 73.

Para el ensayo de la GBSSI, los gránulos de almidón así purificados eran lavados 3 veces con Hepes 50 mM pH 7,5 y finalmente resuspendidos en 184 μ l de mezcla de reacción, conteniendo Tricina 100 mM pH 8,5; acetato potásico 25 mM, DTT 10 mM; EDTA 5 mM; y maltotriosa 1 mM. Después de la completa resuspensión de los gránulos, se tomaba una alícuota de 92 μ l a la cual se añadían 8 μ l de ADP[U-¹⁴C] glucosa 125 mM (concentración final 10 mM; actividad específica 2,8 GBq/mol) y se hervía durante 5 minutos, representando el tiempo 0 de ensayo (t_0). A los restantes 92 μ l se les añadía también 8 μ l de ADP[U-¹⁴C] glucosa 125 mM (actividad específica 2,8 GBq/mol) y se incubaban durante 1 hora a 30 °C (t_{1h}). La reacción se detenía hirviendo durante 5 minutos.

Los gránulos de almidón eran precipitados por adición de 1 ml de solución 75 % Metanol, 1 % KCl, seguida de centrifugación durante 2 min a 13000 rpm. Se lavaban 3 veces con la misma solución, y finalmente se resuspendían en 100 μ l de agua destilada. La radiactividad incorporada al gránulo de almidón se determinaba mediante la adición de 5 ml de líquido de centelleo Ready Protein⁺ MR (Beckman) en un contador de centelleo modelo LS 6000 IC (Beckman), restando las cuentas por millón (cpm) de la muestra a tiempo cero (t_0) a las cpm de la muestra tras la reacción (t_{1h}).

Determinación de la actividad almidón ramificante (SBE).

Los ensayos de actividad SBE se realizaron de acuerdo con el método descrito por Hawker y cols. (Hawker *et al.*, 1974). Este ensayo está basado en la estimulación por SBE de la síntesis de α -D-glucano a partir de α -D-glucosa-1-P catalizada por la fosforilasa de conejo.

Para ello 200 mg de hojas de roseta se trituraban con una trituradora Tissue Tearor™ en 0,8 ml del siguiente tampón: 50 mM NaOH₂PO₄ pH 8, 0,5M NaCl y 1-5 μ l/ml de inhibidor de proteasa. Se centrifugaban los extractos a 4 °C durante 15-30 min, tras lo cual se recuperaba el extracto soluble y se mantenía a 4 °C. Se procedía entonces a la determinación de la concentración de proteínas para cada muestra, con el fin de ensayar siempre una cantidad fija de proteína. Dicha determinación se basaba en el método descrito por Lowry y cols. (Lowry *et al.*, 1951).

La cantidad de proteína ensayada era de 50 μ g para cada tiempo de reacción. Se tomaron 200 μ g de proteína de cada extracto, se completó con agua hasta 50 μ l y se añadieron 100 μ l de la siguiente mezcla de reacción: Hepes 50 mM pH7, ATP 1mM, glicerol 10 % y 3,2 U de fosforilasa α .

Por último, se añadían a cada muestra 50 μ l de una solución 200 mM [¹⁴C] glucosa-1-P con una actividad específica de 0,833 GBq/mol y se incubaba a 30 °C. Se tomaron alícuotas de 50 μ l para cada tiempo de reacción: t_0 , t_{30} , t_{45} y t_{60} min. La reacción se detuvo mediante incubación a 100 °C durante 5 min. Después de hervir, se añadían 100 μ l de una solución de glucógeno (10mg/ml), que facilita la precipitación de los glucanos, la cual se llevaba a cabo por adición de 1 ml de solución 75 % metanol y 1 % KCl y centrifugación a 13000rpm durante 5 min. Se realizaban 2 lavados con 800 μ l de la misma solución, y finalmente se resuspendían en 100 μ l de agua destilada.

La radiactividad incorporada al α -D-glucano se determinaba mediante la adición de 5ml de líquido de centelleo Ready Protein+ MR (Beckman) en un contador de centelleo modelo LS 6000 IC (Beckman).

Determinación de la actividad ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPasa).

Para la determinación de la actividad AGPasa, se prepararon los extractos a partir de 3-5 hojas de roseta que fueron trituradas con una trituradora Tissue Tearor™ (Biospec products, INC), en 100-150 μ l de tampón de extracción (tampón fosfato sódico 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M e 1-5 μ l/ml inhibidor de proteasas). Se centrifugaban a 4 °C durante 15-30 min, tras lo cual se recuperaba el extracto soluble y se mantenía a 4 °C. La concentración de proteínas era determinada según el método de Bradford (Bradford, 1976) o Lowry (Lowry *et al.*, 1951), para poder referir la actividad a mg de proteínas.

El ensayo se basa en en las siguientes reacciones:

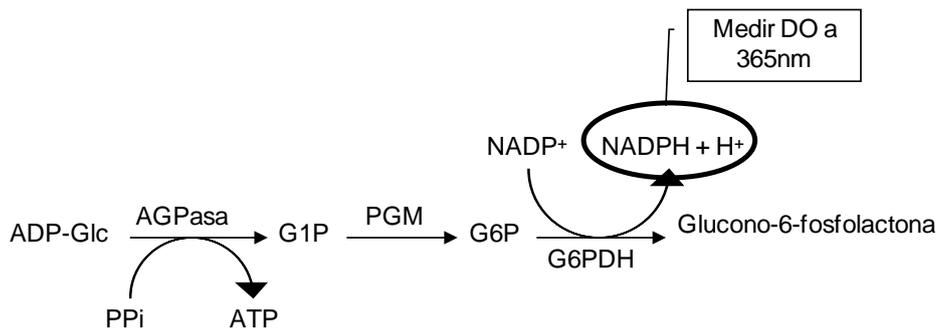


Figura 13. Esquema de la determinación de glucosa-1-P (G1P) acoplada a la reducción de NADP+. ADP-Glc = ADP-glucosa; PPI = pirofosfato inorgánico; AGPasa = ADP-glucosa pirofosforilasa; G6PDH = glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

Se mezclaban 50 μ l de muestra con 950 μ l de mezcla de reacción y se incubaba 30 min a 30 $^{\circ}$ C. La composición de la mezcla de reacción era: GlyGly/NaOH 80 mM pH 7,5, PPI 1 mM, MgCl₂ 60 mM, G1,6DP 0,05 mM, NADP 0,25 mM, NaF 10 mM y ADP-Glc 1 mM. La reacción se detenía hirviendo 10 min y centrifugando a velocidad máxima 10 min. El sobrenadante era pasado a un eppendorf nuevo para la determinación de glucosa-1-fosfato (G1P) formada.

Como control de la cantidad de G1P inicial, se tomaban otros 50 μ l de cada muestra y se hervían 10 min antes de añadirles los 950 μ l de mezcla e incubar. Se centrifugaba 10 min a máxima velocidad y se tomaba el sobrenadante. Se preparaban también una recta patrón con concentraciones conocidas de G1P en tampón de extracción (0, 25, 50, 75, 100 y 125 nmoles/tubo). De cada concentración se tomaban 50 μ l y se mezclaban con 950 μ l de mezcla de reacción.

Tanto las muestras ensayadas, como los controles y las distintas concentraciones de la recta patrón seguían, a continuación, el mismo tratamiento para la determinación del contenido de G1P. En primer lugar, se añadía 1 U de fosfoglucomutasa (PGM), se incubaba 10 minutos a temperatura ambiente y se medía la absorbancia a 365 nm (t_0). En segundo lugar, se añadían 2 U de G6PDH y se medía la DO a 365nm cada 15 min, hasta que ésta se estabilizaba (t_f). Se calculaba la diferencia entre la absorbancia a t_f y a t_0 , tanto de los controles como de las muestras ensayadas, y luego se restaba a cada muestra su control correspondiente. Se calculaba también la diferencia entre la absorbancia a t_f y a t_0 de las diferentes concentraciones de la recta patrón. Se representaba la recta patrón y se calculaba, a partir de su ecuación, la cantidad de G1P (nmoles) formada en el tiempo de reacción (min). Por último, se calculaba la actividad AGPasa como nmol de G1P liberados/min/ mg proteínas.

Determinación de la actividad α -amilasa.

Para la determinación de la actividad α -amilasa se utilizó el kit de Megazyme llamado CERALPHA METHOD y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Los extractos se prepararon triturando, con una trituradora Tissue Tearor™, 0,4–1 g de hojas de roseta en 0,8-1 ml del siguiente tampón: 50mM de ácido málico pH 5,4, 87,5 mM de NaOH, 50 mM de NaCl₂ y 2 mM de CaCl₂. Se centrifugaron a 4 °C durante 15-30 min, tras lo cual se recuperaba el extracto soluble y se mantenía a 4 °C.

Las diluciones de las muestras empleadas fueron optimizadas de modo que la absorbancia a 400 nm, medida tras el ensayo, estuviese dentro de un rango de 0,2-0,8. La actividad fue referida cómo U/mg de proteínas.

Determinación de la actividad β -amilasa.

Para la determinación de la actividad β -amilasa se utilizó el kit de Megazyme llamado BETAMYL METHOD y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Los extractos se prepararon triturando, con una trituradora Tissue Tearor™, 0,25-0,5 mg de hojas de roseta en 0,8-1,5 ml del siguiente tampón: 0,05 M de Tris-HCl pH 8, 1mM de EDTA y 1-5 μ l/ml de inhibidor de proteasa. Se centrifugaron a 4 °C durante 15-30 min, tras lo cual se recuperaba el extracto soluble y se mantenía a 4 °C.

Las diluciones de las muestras empleadas fueron optimizadas de modo que la absorbancia a 400 nm, medida tras el ensayo, estuviese dentro de un rango de 0,3-0,8. La actividad fue referida cómo U/mg de proteínas.

Determinación de la actividad almidón fosforilasa.

La actividad almidón fosforilasa se determinó en su sentido degradativo, de formación de glucosa-1-fosfato (G1P). Los extractos se prepararon a partir de 3-5 hojas de roseta que fueron trituradas con una trituradora Tissue Tearor™, en 150 μ l de tampón de extracción (Hepes 40 mM pH 7,5, EDTA 1mM y 1-5 μ l/ml inhibidor de proteasas). Se centrifugaban a 4 °C durante 15-30 min, tras lo cual se recuperaba el extracto soluble y se mantenía a 4 °C. La concentración de proteínas era determinada mediante Bradford (Bradford, 1976) o Lowry (Lowry *et al.*, 1951), para poder referir la actividad a mg de proteínas.

Se mezclaban 50 μ l de muestra con 950 μ l de mezcla de reacción y se incubaba 1 h a 30 °C. La composición de la mezcla de reacción era: 20 mM de MOPS pH7, 20 mM de tampón fosfato, 10 mM de MgCl₂, 2,7 mM de NADP, 4 μ M glucosa 1, 6-difosfato (G1,6DP) y 2,5 mg/ml de amilopectina. La reacción se detenía hirviendo 10 min y centrifugando a velocidad máxima 10 min. El sobrenadante era pasado a un tubo eppendorf nuevo para la determinación de la G1P formada. Como control de la cantidad de G1P inicial, se tomaban otros 50 μ l de cada muestra y se hervían 10 min antes de añadirles los 950 μ l de mezcla de reacción e incubar. Se centrifugaban 10 min a máxima velocidad y se tomaban los sobrenadantes. Se preparaba

también una recta patrón con concentraciones conocidas de G1P en tampón de extracción (0, 25, 50, 75, 100 y 125 nmoles/tubo), que recibían el mismo tratamiento que las muestras.

Tanto las muestras ensayadas como los controles y las distintas concentraciones de la recta patrón seguían a continuación el mismo tratamiento para la determinación del contenido de G1P. En primer lugar, se añadía 1 U de fosfoglucomutasa (PGM), se incubaba 10 minutos a temperatura ambiente y se medía la absorbancia a 365 nm (t_0). En segundo lugar, se añadían 2 U de G6PDH y se medía la DO a 365nm cada 15 min, hasta que ésta se estabilizaba (t_f). Se calculaba la diferencia entre la absorbancia a t_f y a t_0 , tanto de los controles como de las muestras ensayadas, y luego se restaba a cada muestra su control correspondiente. Se calculaba también la diferencia entre la absorbancia a t_f y a t_0 de las diferentes concentraciones de la recta patrón. Se representaba la recta patrón y se calculaba, a partir de su ecuación, la cantidad de G1P (nmoles) formada en el tiempo de reacción (min). Por último, se calculaba la actividad almidón fosforilasa como nmol de G1P liberados/min/mg proteínas.

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

Cuantificación de la concentración de proteínas.

La cuantificación del contenido proteico se realizó mediante técnicas espectrofotométricas: métodos de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y de Bradford (Bradford, 1976).

Concentración de fracciones proteicas.

Cuando la concentración proteica de una muestra o fracción era demasiado baja como para poder visualizarlas en un gel teñido con Coomassie o en un Inmunoblot, se usó la resina StrataClean™ (Stratagene®) para poder cargar en el gel de acrilamida un nivel óptimo de proteínas.

Separación de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes.

La separación analítica de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). El gel de separación se preparaba al 10 % de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) con SDS al 0,1 % (p/v) en tampón Tris-HCl 0,375 M pH 8,8. El gel de empaquetamiento se preparaba al 4 % de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) con SDS al 0,1 % (p/v) en Tris-HCl 0,307 M pH 6,8. Los geles se polimerizaban mediante la adición de persulfato amónico (APS) al 0,1 % (p/v) usando TEMED 6,6 mM como agente catalizador.

Antes de aplicar las muestras, estas se suplementaban con tampón de carga 2x SDS-SB (sample buffer), cuya composición era: Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4 % (p/v), 2-mercaptoetanol 2 % (v/v), Glicerol 20 % (v/v), Azul de bromofenol 0,005 % (p/v); y se hervían durante 5 min antes de ser cargadas. Como patrón de tamaño molecular se utilizaban una mezcla comercial de proteínas, PageRuler® Prestained Protein Ladder (Fermentas), con un rango de pesos moleculares entre 10-170 kDa).

El grosor de los geles era de 0,75 mm, 1 mm o 1,5 mm según el caso. Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta Mini Protean® Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 150 V durante 1-1,5 h a temperatura ambiente. La composición del tampón de corrida era: Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 0,19 M y SDS 0,1 % (p/v).

Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida con azul Coomassie.

La visualización de las proteínas separadas mediante electroforesis se llevó a cabo mediante tinción con Coomassie Blue (0,25 % (p/v) Coomassie Brilliant Blue, 45 % (v/v) metanol y 10 % (v/v) ácido acético): incubación con el reactivo en agitación y a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 min, seguida de 4-5 lavados con solución desteñidora (40 % (v/v) metanol y 10 % (v/v) ácido acético).

Tinción de proteínas con plata.

En aquellos casos en los que la cantidad de proteína a analizar no fuese suficiente para poder ser teñida con azul Coomassie o cuando las bandas iban a ser identificadas por MALDI-TOF (ver página 107), se procedía a teñir los geles de poliacrilamida con nitrato de plata, cuya sensibilidad es muy superior al azul Coomassie. Para ello se usaba el juego de reactivos comercial Silver Staining Kit Protein (Amersham), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

Zimogramas.

Los zimogramas son un tipo de electroforesis en condiciones nativas, en los cuales la separación de las proteínas se hace, no solo en función de la carga, forma y tamaño, sino también en función de la afinidad por un sustrato, y la visualización de las mismas es posible gracias a la modificación que hacen de dicho sustrato. El gel de separación se preparaba al 7,5 % de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) en tampón Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, incluyendo además uno de los siguientes sustratos: glucógeno al 0,3 % (p/v), pululano al 0,9 % (p/v), almidón al 0,3 % (p/v) o dextrina β -limite al 0,45 % (p/v). El gel de empaquetamiento se preparaba al 4 % de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) en Tris-HCl 0,307 M pH 6,8. Los geles se polimerizaban mediante la adición de persulfato amónico (APS) al 0,1 % (p/v) usando 1 μ l/ml de TEMED (BioRad) como agente catalizador.

En función del sustrato empleado en el gel de separación, la mezcla de reacción con la que incubemos y el tipo de revelado se pueden diferenciar varios tipos de zimogramas que se explican a continuación.

Para la preparación de los extractos crudos vegetales se partía de 200-300 mg de hojas de roseta que eran triturados con el Tissue-Teator™ en 200 μ l de tampón fosfato 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M y 1-5 μ l/ml de cóctel de inhibidores de proteasas (SIGMA) y, posteriormente, centrifugados a 14000 rpm y 4 °C durante 15 min. El sobrenadante era recuperado y se determinaba la concentración de proteínas. De cada muestra se cargaron 150 μ g de proteínas, que se suplementaban con tampón de carga 2x, cuya composición era: Tris 62,5 mM, Glicina 480 mM, Glicerol 25 % y Bromofenol blue 0,001 %. En los casos en los que se usó extractos crudos

bacterianos, el tampón de rotura empleado fue Tris 50mM pH 8 suplementado con 1-5 μ l de inhibidor de proteasas y 1 mM de PMSF y el volumen cargado se optimizó en función de la señal obtenida.

El gel se corre a 100 V durante 3 h y a 4 °C. La composición del tampón de corrida era Tris 25 mM, Glicina 192 mM y DTT 1 mM.

Zimograma de la actividad almidón sintasa.

Como sustrato en el gel se puede poner glucógeno o almidón. El gel se deja toda la noche a temperatura ambiente en Tricina 50mM pH 8,5; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 100mM; β -mercaptoetanol 5mM; MgCl_2 5 mM; BSA 0,25 g/l; y ADP-glucosa 1 mM. El revelado se hace con lugol (0,5 % I y 1,5 % KI) y la presencia de actividad SS se detecta por bandas oscuras. En el caso del WT solo se detectan 2 bandas. La banda superior corresponde a la SSIII y la banda inferior a la SSI.

Zimograma de la actividad fosforilasa.

Como sustrato en el gel se puede poner glucógeno o almidón. El gel se deja toda la noche a temperatura ambiente en citrato de sodio 100 mM pH 7 y glucosa 1-fosfato (G1P) 20 mM. El revelado se hace con lugol (0,5 % I y 1,5 % KI) y la presencia de fosforilasas se detecta por bandas oscuras.

Zimograma de las actividades modificantes del almidón y de la β -limite dextrina.

Como sustrato en el gel se puede poner almidón o β -limite dextrina (zimograma de las actividades modificantes de la β -limite dextrina). El gel se deja toda la noche a temperatura ambiente en Tris-HCl 100 mM pH7; MgCl_2 1 mM; CaCl_2 1 mM; y DTT 1 mM. El revelado se hace con lugol (0,5 % I y 1,5 % KI) y las distintas actividades se detectan en distintos colores en función de la modificación:

- elongación del polímero \rightarrow banda oscura.
- degradación del polímero \rightarrow banda clara.
- amilosa \rightarrow azul intenso.
- amilopectina \rightarrow rojo.

Zimograma de la actividad pululanasa.

Como sustrato en el gel se pone pululano. El gel se deja toda la noche a temperatura ambiente en Tris-HCl 100 mM pH7; MgCl_2 1 mM; CaCl_2 1 mM; y DTT 1 mM. El gel es rojo y la actividad pululanasa es detectable en blanco. También se puede revelar con lugol (0,5 % I y 1,5 % KI).

Inmunodetección de proteínas (Inmunoblots).

En primer lugar, se realizaba la transferencia de las proteínas de un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Millipore), lo cual se llevaba a cabo utilizando un sistema de transferencia semihúmeda Amersham ECL Semidry Blotters.

Una vez desarrollada la electroforesis de proteínas (ver página 100), se incubaban los geles aproximadamente 5 minutos en tampón de transferencia Towbin buffer, cuya composición es: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1 % SDS y 10 % metanol. Se preparaban para cada gel 6 piezas de papel de filtro Whatman 3MM y un filtro de nitrocelulosa de las mismas dimensiones que el gel a transferir, los cuales se humedecían también en towbin buffer y se colocaban, a modo de sándwich, en el siguiente orden (de abajo a arriba): 3 piezas de papel Whatman – el filtro de nitrocelulosa – el gel de acrilamida – 3 piezas de papel Whatman. La transferencia se realizaba con una intensidad de corriente de entre 0,8-1,2 mA/cm² durante 1–1,5 h.

Una vez finalizada la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se incubaban durante 1 h en solución de bloqueo: 2 % ECL Advance[®] Blocking agent de Amersham y 0,05 % de Tween-20 en TBS (15mM Tris-HCl pH 7,5 y 200 mM NaCl). Con ello se consigue la saturación de la membrana. A continuación, se llevaba a cabo la incubación durante 1-2 h con una dilución adecuada del anticuerpo primario en solución de bloqueo. En la Tabla 8, pueden verse los anticuerpos utilizados durante la realización de esta tesis y sus respectivas diluciones.

Nombre	Dilución	Referencia	Característica
Anti-SSIII	1:5000	Nuestro grupo.	Reconoce la SSIII.
Anti-SSIV	1:5000	Laemmli, 1970	Reconoce 178 aminoácidos del dominio amino de SSIV.
Anti-PRK	1:1000	Agrisera	Reconoce la fosforribulokinasa y se usa como marcador del estroma cloroplastídico.
Anti-PsbA	1:10000	Agrisera	Reconoce la proteína D1 del PSII y se usa como marcador de las membranas tilacoidales.
Anti-pentaHis	1:10000	QIAGEN	No requiere anticuerpo secundario.
Anti-DNP	1:50000	Cedido por el grupo de la Dra. Luisa Sandalio.	Reconoce la dinitrofenilhidrazina (DNP) y se emplea en la inmunodetección de carbonilos.

Tabla 8. Anticuerpos primarios empleados en esta tesis.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavaba varias veces con solución de lavado (Tween-20 al 0,05 % en TBS) para eliminar los anticuerpos unidos de forma inespecífica a la membrana. En general, se daba: un lavado rápido con abundante solución de lavado seguido de un lavado de 15 min y tres lavados de 5 min.

A continuación, se llevaba a cabo la incubación durante 1 h con el anticuerpo secundario (suero de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo marcado con peroxidasa). La dilución empleada de anticuerpo secundario era 1:100000 en solución de bloqueo. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se lavaba del mismo modo que después de la incubación con el anticuerpo primario.

Tanto las incubaciones con los anticuerpos primario y secundario como los lavados, se realizaban a temperatura ambiente y con agitación.

En último lugar se llevaba a cabo la detección de la unión antígeno-anticuerpo gracias a la actividad peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, la cual actúa sobre el sustrato ECL Advanced® (Amersham) dando lugar a un producto quimioluminiscente. El filtro de nitrocelulosa se incubaba durante 5 min y en oscuridad con una solución 1:1 de los reactivos Lumigen TMA-6_Solución A y Lumigen TMA-6_Solución B (siguiendo las instrucciones del fabricante). La señal quimioluminiscente se detectaba haciendo uso del sistema de captación de imágenes digital Chemidoc (BIO-RAD).

El anticuerpo anti-pentaHis está conjugado con la actividad peroxidasa directamente, de modo que no requiere de incubación con anticuerpo secundario.

Tinción de proteínas en membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau.

La visualización de las proteínas transferidas mediante electroforesis se llevó a cabo mediante tinción con rojo Ponceau: incubación con el reactivo (0.1% (p/v) Ponceau S en 5% ácido acético) en agitación y a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min, seguida de un par de lavados con agua destilada.

Técnicas de cromatografía.

En este trabajo se han empleado técnicas de cromatografía de afinidad por Níquel, de intercambio iónico y de exclusión molecular, tanto de modo independiente como de forma secuencial.

Cromatografía de afinidad: His-Trap.

La cromatografía de afinidad permite la elución diferencial de las proteínas contenidas en una muestra en función de su afinidad por la molécula contenida en la fase inmóvil de la columna. En nuestro caso, para la purificación se utilizó una columna de afinidad HisTrap HP (GE Healthcare), las cuales se basan en la afinidad de la histidina (His) por el níquel. Una vez inyectado el extracto crudo en la columna, sólo las proteínas con afinidad por níquel son retenidas. En nuestro caso, se fusionó una cola de His a las cuatro clases de SSs mediante clonación en el vector de expresión pET45b (ver página 186). Los extractos crudos (EC) se

preparaban como se explica en la página 91, usando para la resuspensión del pellet bacteriano tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) de glicerol, 10 mM de imidazol), suplementado con 1–5 µl/ml de cóctel inhibidor de proteasas y PMSF 1mM, y como método de rotura la Prensa de French.

El proceso de purificación era llevado a cabo en un cromatógrafo FPLC tipo ÄKTA (Amersham Pharmacia), lo que nos permitía controlar de forma precisa el flujo de solvente y la presión a través de la columna, así como la cantidad de proteína recogida en las fracciones.

Antes de inyectar el EC, la columna era lavada con tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) de glicerol y 0,5 M de imidazol) para eliminar posibles restos de otras proteínas unidas a la columna en usos anteriores. El imidazol es un intermediario de la biosíntesis de la histidina y desplaza las proteínas unidas a la columna. A continuación, la columna se equilibraba en tampón A y se procedía a la inyección de la muestra. Una vez inyectada la muestra se lavaba la columna con tampón A para eliminar las proteínas no unidas a la columna o que hubiesen establecido interacciones inespecíficas con la misma. La elución de las proteínas unidas específicamente se conseguía mediante un gradiente lineal de imidazol (de 10 mM a 500 mM). El gradiente era realizado de forma automática por el cromatógrafo haciendo uso de los tampones A y B. Las fracciones recogidas fueron de diferentes volúmenes y analizadas de diferentes maneras (medida de actividad, inmunoblot,...).

Cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico fue realizada como paso previo a la cromatografía de afinidad (ver página 104) y, al igual que en este caso, el proceso de purificación era llevado a cabo en un cromatógrafo FPLC tipo ÄKTA (Amersham Pharmacia).

La columna empleada era una HiPrep 16/10 Q FF (GE Healthcare), que contiene una matriz de intercambio aniónico (Q Sepharose Fast Flow).

Los extractos crudos (EC) se preparaban como se explica en la página 91, usando para la resuspensión del pellet bacteriano tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 7,5), suplementado con 1–5 µl/ml de inhibidor de proteasas y PMSF 1mM, y como método de rotura la Prensa de French. El pH 7,5 del buffer A permite que la SSIV (pI = 5,8) se encuentre cargada negativamente y sea retenida por la columna.

Antes de inyectar el EC, la columna era equilibraba en tampón A. Una vez inyectada la muestra se lavaba la columna con tampón A para eliminar las proteínas no unidas a la columna o que hubiesen establecido interacciones inespecíficas con la misma. La elución de las proteínas unidas específicamente se llevaba a cabo con tampón de elución (tampón A con 0,25 M de KCl). Las fracciones recogidas fueron analizadas mediante ensayo de actividad (ver página 93) y aquellas con actividad fueron unidas y sometidas a una cromatografía de afinidad (ver página 104).

Cromatografía de exclusión molecular.

La cromatografía de exclusión molecular permite la separación de proteínas en función de su peso molecular (PM) y el cálculo del mismo gracias al uso de proteínas de peso molecular conocido (en nuestro caso: tiroglobulina bovina, γ -globulina bovina, ovoalbúmina, mioglobina de caballo, ribonucleasa A y vitamina B12). Para la purificación se utilizó una columna Superdex 200 (S200) Tricorn (GE Healthcare), la cual tiene un rango de separación de 10000 - 600000 Da.

Los extractos crudos (EC) se preparaban como se explica en la página 91, usando para la resuspensión del pellet bacteriano tampón S200 (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM y glicerol 10 %), suplementado con 1–5 μ l / ml de inhibidor de proteasas y PMSF 1mM, y como método de rotura la Prensa de French.

El proceso de purificación era llevado a cabo en un cromatógrafo FPLC tipo ÄKTA (Amersham Pharmacia), lo que nos permitía controlar de forma precisa el flujo de solvente y la presión a través de la columna, así como la cantidad de proteína recogida en las fracciones.

En primer lugar, la columna era lavada con agua Milli-Q y equilibrada en tampón S200. Una vez inyectada la muestra, un volumen de 50 ml del mismo tampón se hacía pasar por la columna y las fracciones eluidas eran recogidas. El volumen vacío (V_0 , volumen de elución del azul dextrano) fue de 8,28 ml, por lo que la primera fracción fue recogida entre los 6 y 7,5 ml después de la inyección de la muestra (según cada caso). A partir de 16 ml, las proteínas que eluyen son mucho más pequeñas que SSIV, por tanto no se recogieron las fracciones más allá de los 16 ml de V_e . El volumen de las fracciones recogidas fue de 0,5 ml en las primeras purificaciones y de 200 μ l en las últimas. En las primeras fracciones se encontraban las proteínas de mayor PM y en las últimas las de menor PM. Las fracciones recogidas eran posteriormente analizadas de diferentes maneras (medida de actividad, inmunoblot,...).

Antes de inyectar el EC, se inyectaba el azul dextrano, para comprobar que el V_0 de la columna no hubiese variado, y, una vez eluido, se inyectaba una mezcla de proteínas de PM conocido, para obtener una recta patrón de pesos moleculares. Las proteínas empleadas fueron: tiroglobulina bovina (670 kDa), γ -globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina de caballo (17 kDa), ribonucleasa A (13,5 kDa) y vitamina B12 (1,35 kDa). Para obtener una relación lineal entre PM y volumen de elución (V_e), que nos permita calcular el PM de una proteína o de un fragmento o de un complejo conociendo su V_e , se usa el coeficiente de distribución, K_{av} , que se define como: $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$, donde V_t es el volumen total de la columna (24 ml). Representando K_{av} de las proteínas de PM conocido frente al log PM, obteníamos una recta, cuya ecuación nos permitía conocer el PM al que correspondía cada V_e . Dado el PM predicho de SSIV (113,84 kDa) y la recta patrón obtenida en esta columna (Figura 75) esperaríamos que SSIV tuviese una $K_{av} = 0,29$, que correspondería a un $V_e = 12,82$ ml (poco después a la γ -globulina).

Identificación de proteínas.

La identificación de las proteínas presentes en las fracciones se llevó a cabo mediante separación de las mismas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (ver página 100), tinción de los geles con plata (ver página 101) y análisis de las bandas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. La identificación de las bandas era realizada por el servicio de proteómica del IBVF.

Ensayo de autoglicosilación.

El ensayo de autoglicosilación que se describe a continuación está basado en el ensayo usado por de Paula y cols. (de Paula *et al.*, 2005) para la caracterización de la proteína glicogenina (GNN) de *Neurospora crassa*.

Los EC empleados se preparaban como se indica en la página 91. Los cultivos se injeraron durante 3 h a 30 °C y la rotura de las células (resuspendidas en tampón Hepes 100 mM pH 7,5) se llevó a cabo mediante la prensa de French.

La reacción se realizaba en un volumen de 50 μ l, de los cuales 25 μ l eran de extracto crudo, 5 μ l eran de mezcla de reacción 10x y 20 μ l eran de 125 μ M ADP-[U-¹⁴C]-glucosa (actividad específica de 200 mCi/mmol). La composición de la mezcla de reacción 10x era: 0,5 M Hepes pH 7,5, 50 mM MnSO₄ y 20 mM DTT. La reacción transcurría durante 20 min a 30 °C, tras los cuales las proteínas eran separadas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (ver página 100). Las muestras eran cargadas en dos geles: uno se teñía con Coomassie (ver página 101) y el otro era secado sobre un papel Whatman 3 MM con el uso de una secadora de vacío y calor (80 °C) (modelo 583 de Bio-Rad). La detección y el análisis de las áreas radiactivas se realizaba mediante autorradiografía electrónica con el sistema *Cyclone® Storage Phosphor System* (Packard) y el programa de análisis de imágenes *OptiQuant™* (PerkinElmer).

Tratamiento con tripsina.

Para asegurarnos que la señal radiactiva fuese verdaderamente autoglicosilación, se realizó el mismo ensayo, pero se incorporó un tratamiento de las muestras con tripsina antes de cargarlas en el gel de acrílamida. Para que la tripsina pudiese actuar, los EC se prepararon sin inhibidores de proteasas. El tratamiento consistió en incorporar 1 μ l de tripsina 1 mg/ml (en 1 mM HCl pH 3) e incubar durante 2 h a 37 °C. La tripsina degrada las proteínas de modo que si realmente se diera autoglicosilación, al degradarse las proteínas se perderían la señal radiactiva.

Ensayo de doble híbrido en levadura.

En este trabajo, se empleó el sistema "Matchmaker™ Gold Yeast Two-Híbrido System" (Clontech) y se siguieron las instrucciones de su manual de usuario (Clontech laboratories, 2010). Este sistema se basa en la reconstrucción del activador transcripcional GAL4 cuando dos proteínas de fusión: una proteína cebo (X) unida al dominio de unión al DNA de GAL4 (BD) y una proteína presa (Y) unida al dominio de activación (AD), interaccionan. Ninguna de estas proteínas de fusión es capaz, por sí sola, de activar la transcripción de los genes testigos dependientes de GAL4. Cuando la proteína X se expresa en levadura, el BD de GAL4 se une a la región reguladora del gen testigo, pero esto no es suficiente para activar la transcripción. Cuando la proteína Y se expresa en levadura, el AD de GAL4 puede unirse a otros componentes de la maquinaria de transcripción, pero como no se localiza en la región reguladora tampoco puede activar la transcripción del gen testigo. En cambio, cuando se hacen conjugar una levadura que expresa la proteína X y otra que expresa la proteína Y, si hay una interacción específica entre X e Y, tanto el BD como el AD de GAL4 se localizan en la región reguladora, permitiendo la transcripción de los genes testigos en la célula diploide originada. En el sistema "Matchmaker™ Gold Yeast Two-Híbrido", los genes testigos son *AUR1-C*, *HIS3*, *ADE2* y *MEL1*. La expresión de *AUR1-C* en *S.cerevisiae* confiere resistencia a Aureobasidina A. La expresión de *HIS3* y *ADE2* permite a la levadura sintetizar His y Ade y, por tanto, crecer en un medio carente de este aminoácido esencial y de esta base nitrogenada. La expresión de *MEL-1* permite a la célula secretar α -galactosidasa, un enzima que vuelve a la levadura azul en presencia del sustrato X- α -Gal.

En nuestro caso, tanto la proteína SSIV completa, como sus dominios carboxilo (SSIVtC) y amino (SSIVtN) por separado fueron fusionados al BD y al AD. En la cepa YH2Gold (ver Tabla 5), se expresaron las proteínas de fusión SSIV-BD, SSIVtN-BD y SSIVtC-BD, mediante clonación de los respectivos genes en el vector pGBKT7 (ver Tabla 9), y en la cepa Y187 (ver Tabla 5), se expresaron las proteínas de fusión SSIV-AD, SSIVtN-AD y SSIVtC-AD, mediante clonación de los respectivos genes en el vector pGADT7 (ver Tabla 9). Las estirpes de YH2Gold transformadas con pGBKT7_SS4/SS4tN/SS4tC se crecían a 30 °C en medio SD-Trp-Ura y las estirpes de Y187 transformadas con pGADT7_SS4/SS4tN/SS4tC se crecían también a 30 °C, pero en medio SD-Leu-Ura. Para la conjugación, las estirpes se inocularon por parejas de YH2Gold-Y187 en medio YPDA 2x (40 g/L Difco peptonas, 20 g/L extracto de levadura, 0,006 % (p/v) adenina hemisulfatada y 4 % (p/v) dextrosa) y se incubaron 24h a 30 °C y 50 rpm, tras lo cual las células diploides se sembraban en dos medios diferentes:

- SD-Leu-Trp, donde crecían los diploides independientemente de que hubiese o no interacción entre la proteína presa y la proteína cebo. Es un control de que la conjugación funciona.

- SD-Leu-Trp-His-Ade, donde los diploides solo crecían si había interacción entre la proteína presa y la proteína cebo.

Además, se hicieron dos ensayos controles: test de autoactivación y test de toxicidad, siguiendo las instrucciones del manual de usuario.

Análisis informático de secuencias proteicas.

Las secuencias de aminoácidos de las diferentes SSs de *Arabidopsis thaliana* fueron obtenidas de la base de datos de la TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; <http://www.arabidopsis.org/>). Dichas secuencias fueron analizadas con los programas ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>; Emanuelsson *et al.*, 1999), para determinar la existencia de péptidos de tránsito al cloroplasto (CTPs), y Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>; Delorenzi & Speed, 2002) y Parcoil (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html; Lupas *et al.*, 1991), para determinar la existencia de dominios *coiled-coil* (CC).

Para los alineamientos de secuencias se empleó el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; Larkin *et al.*, 2007) y BioEdit (*Sequence Alignment Editor*; Hall, 1999). La secuencia de aminoácidos de la SSIV de las diferentes especies empleadas fueron obtenidas de NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE DNA.

Vectores utilizados.

Los vectores utilizados para la realización de las diferentes construcciones utilizadas durante este trabajo han sido:

Vector	Resistencia que confiere en <i>E.coli</i>	Uso y características
pCTAPI (Rohila <i>et al.</i> , 2004)	Espectinomicina	Expresión de genes en <i>A.thaliana</i> . Confiere resistencia a Glufosinato en plantas. Presentan sitios de recombinación attR (GATEWAY SYSTEM).
pDONR221® (Invitrogen)	Kanamicina	Clonación mediante recombinación (GATEWAY SYSTEM) de fragmentos de DNA generados mediante PCR. Presentan sitios de recombinación attP (GATEWAY SYSTEM). Expresión y purificación de proteínas.
pET45b® (Novagen)	Ampicilina	Contiene un promotor para la polimerasa T7 y dos regiones de poli-His.
pJET1.2 (Fermentas)	Ampicilina	Clonación de fragmentos de extremos romos de DNA generados mediante PCR (mediante restricción y ligación).
pMBL®-T (Dominion MBL)	Ampicilina	Clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR (mediante restricción y ligación). Expresión de proteínas en levaduras.
pGADT7 (Clontech)	Ampicilina	Confiere prototrofia para Leu y los genes testigos de GAL4. Clonación de fragmentos de DNA mediante restricción y ligación. Expresión de proteínas en levaduras.
pGBKT7 (Clontech)	Kanamicina	Confiere prototrofia para Trp y los genes testigos de GAL4. Clonación de fragmentos de DNA mediante restricción y ligación.

Tabla 9. Vectores empleados en esta tesis.

Aislamiento de plásmidos de *E.coli*.

Aislamiento de plásmidos a pequeña escala.

Para la purificación de plásmidos de *E. coli* se ha utilizado el kit comercial "Genelute™ Plasmid Miniprep kit" de SIGMA. La purificación se realizó siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante y partiendo de un volumen de cultivo de 3 ml.

Aislamiento de plásmidos a mediana escala.

Para obtener preparaciones de DNA plasmídico a mayor escala, se partía de 50 ml de cultivo. Las extracciones se realizaban usando el sistema "Genelute™ HP Plasmid Midiprep kit" de SIGMA.

Aislamiento de DNA total de tejidos vegetales.

El aislamiento de DNA vegetal se llevó a cabo mediante uso del kit "GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit" de SIGMA, o bien mediante el método de Murray y Thompson (Murray & Thompson, 1980) descrito a continuación: un par de hojas de roseta congeladas en nitrógeno líquido se trituraban en un tubo eppendorf con ayuda de una punta azul sellada. Inmediatamente después se añadían 500 µl de tampón de extracción – cuya composición era: Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, NaCl 1,4 M, CTAB 2 % (p/v) y β-mercaptoetanol 0,2 % (v/v) – precalentado a 65 °C y suplementado con 1-2 µl de RNAsa A 10 mg/ml. Se incubaba a 65 °C durante 30 min con agitación suave. Tras dejar enfriar el homogenizado a temperatura ambiente, se realizaba una extracción con 500 µl cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). Posteriormente se centrifugaba a 14000 rpm y 4 °C durante 10 min. La fase acuosa se pasaba a tubos limpios y se añadían 400 µl de isopropanol (para precipitar el DNA), se mezclaba bien y se centrifugaba 20 minutos a 4 °C y 14000 rpm. Se descartaba el sobrenadante y se secaba el DNA (pellet). Por último, se añadían 30-50 µl de agua Milli-Q estéril y se dejaba resuspender en hielo.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA por tamaño se realizaba mediante electroforesis de DNA en geles de agarosa. El porcentaje de agarosa (p/v) de los geles variaba en función del tamaño de los fragmentos de DNA que se quisieran separar. La electroforesis se realizaba en cubetas horizontales Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad), dónde los geles de agarosa eran sumergidos en tampón TBE 0,5x (5,39 g Tris, 2,75 g ácido bórico y 0,37 g EDTA). Las muestras se suplementaban con un 10 % del volumen de tampón de carga 10x, compuesto por glicerol 50 % (v/v), xilenocianol 0,1 % (p/v), 0,1 M EDTA y azul de bromofenol 0,1 % (p/v).

Para la detección del DNA se añadía bromuro de etidio a los geles a una concentración final de 0,5 µg/ml y se visualizaba iluminando el gel con un transiluminador de luz ultravioleta. Como patrones de tamaño se utilizaban "HyperLadder II" e "HyperLadder III" de Biorline.

Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.

Para la purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa se empleó el kit comercial "*Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification*" de GE Healthcare y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Restricción del DNA.

La digestión de DNA con endonucleasas de restricción se llevaban a cabo incubando el DNA (0,5-2 µg) con 3-10 U de la enzima correspondiente a 37 °C durante 2-4 h. El volumen final era variable, pero siempre se cumplió que el volumen de la enzima fuera inferior a la décima parte del volumen de reacción. El tampón de incubación y su concentración se elegía en cada caso según las recomendaciones de la compañía comercial (Takara o New England BioLabs). Cuando se realizaban restricciones dobles se intentaba utilizar un único tampón adecuado para ambas enzimas, pero cuando esto no era posible, se realizaba primero una de las restricciones, con el tampón correspondiente, y luego la otra, inactivando previamente el primer enzima y desalando el DNA. La inactivación del enzima se lleva a cabo mediante incubación a 65 °C durante 10 min. El DNA se desalaba filtrando a través de una columna de Sephadex G-50 equilibrada en tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM) pH 8,0.

Ligación de DNA.

La ligación de fragmentos de DNA se llevó a cabo utilizando la enzima T4 DNA ligasa suministrada por Dominion MBL. En los casos en que se introducía un inserto en un vector, se empleaba una relación inserto:vector de 5:1. La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 10 µl, inserto y vector, 1 U de la enzima T4 DNA ligasa y 1 µl de tampón de ligación (Tris-HCl 0,3 M pH 7,8, MgCl₂ 0,1 M, DTT 0,1 M y ATP 10 mM). La reacción de ligación se desarrollaba a temperatura ambiente durante 2 h o a 15 °C durante toda la noche.

Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se realizaba en un termociclador (T-personal de Biometra®). Los cebadores eran sintetizados por la empresa SIGMA.

En función del fragmento a amplificar y la aplicación que se le fuese a dar, se empleaba una DNA polimerasa u otra. Para el análisis de plantas mutantes (ver Tabla 10) y transgénicas de *A.thaliana*, así como para la selección de colonias portadoras de un plásmido se usaron las enzimas EcoTaq® polimerasa (Ecogen) y BioTaq polimerasa (Bioline). Para la clonación de

fragmentos de DNA en vectores se usó la enzima iProof® High-Fidelity DNA Polymerase (BioRad), dada su alta fidelidad y estabilidad. En cada caso, se siguieron las instrucciones del fabricante.

Gen Código AGI	Identificador de la línea/ mutación	Oligonucleótidos usados en este trabajo (5'-3')	Ecotipo	Referencia
SS1 At5g24300	Genoplante_203C08/ inserción en intrón 1	Fwd: TTTCGGTCCGATCGCCAGTCTC Rev : TACGCCAAAGTCAGCCATTACAA Tag5 (T-DNA) : CTACAAATTGCCTTTTCTATCGAC	WS	Delvallé <i>et al.</i> , 2005a
SS2 At3g01180	Genoplante_549A11/ inserción en exón 8	Fwd: GGGGACCGGTAGATGATTC Rev : CGGTCGCCCTGTGCCTAAC Tag5 (T-DNA): CTACAAATTGCCTTTTCTATCGAC	WS	Zhang <i>et al.</i> , 2008a
SS3 At1g11720	SALK_065732/ inserción en exón 13	Fwd: AAAGGGCACAAGCTCAAGTTC Rev: TCTTGCTCCATCACCGTCTT LBa1 (T-DNA): TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	Col	Zhang <i>et al.</i> , 2005b
	Genoplante_117H05/ inserción en exón 12	Fwd: ATACGGCGCTGTTCCTGTGTTA Rev: ATTCATCTTAGAGCTTCCATTITA Tag5 (T-DNA): CTACAAATTGCCTTTTCTATCGAC	WS	Szydlowski <i>et al.</i> , 2009
SS4 At4g18240	GABI_290D11/ inserción en exón 11	Fwd: CATTGTAACAACCGTGTCCCC Rev: GTTGTTCAATACCTCAAATCC GABI-1 (T-DNA): CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC	Col	Roldán <i>et al.</i> , 2007b
	Genoplante_559H08/ inserción en intrón 1	Fwd: AACCCATGGATTAGCAGGAA Rev : CAAATGGGAAATGAAAGGAAC Tag5 (T-DNA): CTACAAATTGCCTTTTCTATCGAC	WS	
APS1 At5g48300	SALK_040155/ inserción en exón 8	Fwd: TGGTTGGACTCCGTTCTGTCAT Rev: TTCAGATGACAGTGCCGGTTGG LBb1 (T-DNA): GCGTGACCGCTTGCTGCAAC	Col	Ventriglia <i>et al.</i> , 2008

Tabla 10. Oligonucleótidos usados para la selección de alelos mutantes. Para la identificación de los genes silvestres se usaron las parejas Fwd y Rev correspondientes a cada gen. Para la identificación de la inserción de T-DNA (versión mutada de los genes) se emplearon las parejas Rev/Tag5 para SS1, SS2 y SS3 de ecotipo WS; Fwd/Tag5 para SS4 de ecotipo WS; Rev/LBa1 para SS3 de ecotipo Col; Rev/GABI-1 para SS4 de ecotipo Col; y Fwd/LBb1 para APS1 de ecotipo Col.

Sistema Gateway.

El sistema Gateway (Invitrogen) es una metodología pensada para facilitar la clonación de productos de PCR, ya que sustituye el método tradicional de clonación mediante digestión con enzimas de restricción y ligación, por una recombinación específica de sitio. Este sistema proporciona un modo versátil para transferir segmentos de DNA entre vectores. Una vez en el sistema, los fragmentos pueden transferirse desde un "vector de entrada" a numerosos "vectores de salida". Este sistema se basa en dos reacciones enzimáticas: la reacción BP y la reacción LR.

La reacción BP consiste en la introducción del gen o el fragmento de gen (flanqueado por sitios *attB*) en el "vector de entrada", conocido como pDONOR, el cual contiene sitios *attP*. Los sitios *attB* son incorporados al gen que queremos clonar mediante PCR. Mediante una reacción de recombinación entre los sitios *attB* y *attP* el gen queda introducido dentro del pDONOR, que a partir de ese momento se denomina pENTRY. La reacción LR es la recombinación por la cual el gen que se encuentra clonado en un pENTRY se transfiere al "vector de salida" (conocido como pDEST) que corresponda. Se trata de una reacción de recombinación entre los sitios *attL* del pENTRY y los sitios *attR* del pDEST que permite la transferencia del gen desde el primero al segundo, dónde queda de nuevo flanqueado por las secuencias *attB*. La orientación correcta del gen es mantenida en todo momento. Tanto el pDONOR como el pDEST poseen entre las regiones *attR* el gen *ccdB*, que codifica para una toxina letal para DH5 α y permite la selección negativa de las colonias transformantes que no hayan recibido el pENTRY con el gen de interés.

En el caso concreto de este trabajo, se emplearon los vectores pDONR221 ("vector de entrada") y pCTAPi ("vector de salida") para la clonación de SS4 completa y los fragmentos amino y carboxilo de SS4 (ver Tabla 9, en página 110). Para la realización de cada reacción se siguieron las indicaciones de Invitrogen.

Secuenciación automática de DNA.

El trabajo de secuenciación del DNA clonado en el transcurso de este trabajo fue realizado por el Servicio de Secuenciación Automática de DNA del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid).

MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE RNA.

Trabajando con RNA.

Cuando se trabajó con RNA se tomaron las siguientes precauciones con el fin de evitar la degradación del RNA por acción de RNAsas:

- todo el material de vidrio utilizado se esterilizó a 200 °C durante 2 h en un horno,
- todas las soluciones utilizadas, fueron preparadas con agua Milli-Q suplementada con DEPC al 0,1 % (v/v) y autoclavada.
- tanto el sitio cómo el equipo de trabajo fueron limpiados con NaOH 0,4 N para eliminar las RNAsas.

Aislamiento de RNA total de tejidos vegetales.

Para el aislamiento de RNA, se trituraban entre 10-100 mg de material congelado en nitrógeno líquido en un tubo eppendorf y empleando un pistilo para tubos eppendorfs estéril. Se añadía entonces 0,8-1 ml de Trizol (TRIsure, Biotline) y se centrifugaba a 12000 g y 4 °C durante 5 minutos. El Trizol lleva fenol y su uso tenía lugar en una campana de extracción. Tras la centrifugación, el sobrenadante (SN) era transferido a un tubo eppendorf nuevo e incubado 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadían 200 µl de cloroformo y se agitaba fuertemente por inversión durante 15 segundos, tras lo cual, se incubaba a temperatura ambiente 2 minutos y se centrifuga a 12000 g y 4 °C durante 15 minutos. A continuación, la fase acuosa (superior) se transfería a un tubo eppendorf nuevo y se añadían 500µl de isopropanol. Se incubaba 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaba durante 10 minutos a 4 °C y 13000 rpm. Se descartaba el SN y se resuspendía el pellet en 750 µl de cloruro de litio 3M. Se incubaba 10 minutos a temperatura ambiente y se volvía a centrifugar. Se volvía a descartar el SN y se lavaba el pellet con etanol 85 %. Se centrifugaba por última vez, se volvía a descartar el SN y se dejaba secar el pellet, para finalmente, resuspenderlo en agua tratada con DEPC (50µl).

Reacción de retrotranscripción (RT).

Para probar la expresión de los transgenes en las plantas transgénicas, así como para las reacciones de Q-PCR (ver página 116), el RNA total aislado (ver página 115) fue retrotranscrito usando el kit "QuantiTect Reverse Transcription" de QIAGEN.

En primer lugar, el RNA era tratado con DNasa I, siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar el DNA genómico contaminante. Una vez eliminado el DNA genómico, se procedía a la reacción de RT, para lo cual se seguían también las instrucciones del fabricante, obteniéndose finalmente una preparación de cDNA de la muestra.

Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

Los niveles absolutos o relativos de mRNA se pueden determinar mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR) de los transcritos presentes en una preparación de cDNA. La cuantificación mediante Q-PCR es una potente técnica experimental que combina una alta sensibilidad y especificidad (Czechowski *et al.*, 2004). La técnica se basa en la determinación del ciclo umbral (*Threshold Cycle*; Ct) para cada muestra en cada experimento de Q-PCR. El Ct para una muestra se define como el número de ciclos de PCR a partir del cual la señal de fluorescencia es mayor que el nivel mínimo de detección del aparato (Ginzinger, 2002). Así, los valores de Ct de diferentes muestras son usados para calcular la abundancia del mRNA de interés – para el cuál estemos usando oligos específicos – en cada una de ellas, ya que los valores de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de cDNA inicial y ésta, proporcional a los niveles de mRNA (la relación va a depender de la eficiencia de retrotranscripción).

En éste trabajo se han cuantificado los niveles relativos de mRNA de las isoformas citosólica y cloroplastídica de la almidón fosforilasa de *Arabidopsis thaliana* (genes PHS2 y PHS1 respectivamente) usando el kit "SensiMezclaPlus SYBR & Fluorescein" de Quantace, que se basa en el fluoróforo SYBR® Green I. Las mezclas de reacción de PCR se prepararon según las instrucciones del fabricante. Para cada isoforma se usó una pareja de cebadores específicos (ver Tabla 11) y, como gen control (*house-keeping gene*), se usó el gen de la actina (ACT2, Charrier *et al.*, 2002) por tener una expresión constitutiva. La cuantificación relativa de los genes de estudio respecto al gen control, permitió comparar la expresión de los primeros en diferentes líneas de *A.thaliana* aún sin conocer en términos absolutos sus niveles de expresión: expresión en el mutante (mut) respecto al silvestre (WT) = $2^{-\Delta Ct \text{ mut} - \Delta Ct \text{ wt}}$ (Livak & Schmittgen, 2001), donde ΔCt es el Ct del gen de interés en una muestra menos el Ct del gen control en la misma muestra.

Gen	Cebadores (5'-3')	Tamaño del fragmento
PHS1 At3g29320	SA546: TGGAAGGAAA CGAAGGCTTTG	194 pb
	SA547: TGCTTTGGCGTATTCGTGGA	
PHS2 At3g46970	SA548: ACAGGTTTGGACGTGGTGATT	208 pb
	SA549: ACAGGACAAGCCTCAATGTCCA	
ACT2 At3g18780	ACT2-8L: GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	110 pb
	ACT2-8R: AACGACCTAATCTTCATGCTGC	

Tabla 11. Cebadores específicos usados para la Q-PCR de la almidón fosforilasa. PHS1 es la isoforma cloroplastídica; PHS2 es la isoforma citosólica; y ACT2 es el gen de la actina, usado como control (*house-keeping gene*).

MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.

Escherichia coli.

Transformación de *E. coli* por choque térmico.

Las células competentes de *E.coli* DH5 α eran preparadas siguiendo el procedimiento descrito por Hannahan y cols. (Hannahan, 1983) por el Servicio de Cultivos Biológicos perteneciente al Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (Sevilla).

Para la transformación, 100 μ l de suspensión de células competentes, previamente descongeladas en hielo, eran mezcladas con 5-10 μ l de la preparación de DNA transformante (no más de un 10 % del volumen). La mezcla se incubaba en hielo 20-30 min y, a continuación, a 42 °C durante 90 segundos (choque térmico), tras lo cual se añadía rápidamente 1 ml de LB y se incubaba en agitación a 37 °C durante 1 h. Por último, las células se sembraban en placas de Petri que contenían medio LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados (en función de la resistencia incluida en el DNA transformante).

Transformación de *E. coli* BL21 Δ gIqCAP mediante electroporación.

Las células electroporables fueron preparadas según el método descrito por Dower y cols. (Dower *et al.*, 1988).

Se realizaba un precultivo en 10 ml de LB suplementado con kanamicina (ver página 69), el cual se crecía durante toda la noche a 37 °C y con una agitación de 200 rpm. A la mañana siguiente se inoculaban, con 4 ml del precultivo, 200 ml de LB suplementado con kanamicina precalentado a 37 °C. Se dejaba crecer el cultivo hasta que este alcanzaba una DO_{600nm} de 0,6. En ese momento, se colocaba rápidamente el cultivo en hielo. A continuación, se fraccionaba en tubos falcon de 50 ml y se centrifugaba a 5000 rpm durante 15 minutos, tras lo cual, se descartaba el sobrenadante y los pellets eran resuspendidos y lavados en 25 ml de agua Milli-Q a 4 °C. Se repetía el lavado con agua Milli-Q dos veces más y se resuspendían los pellets de células en 400 μ l de glicerol al 10 %. Finalmente, se fraccionaban (100 μ l) en tubos eppendorfs que eran congelados en nitrógeno líquido y posteriormente conservados a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación por electroporación, una de las alícuotas de células electroporables era descongelada en hielo y mezclada con 1-5 μ l del DNA. Se incubaba la mezcla durante 1 minuto en hielo y se procedía a dar un pulso de 2,5 kV y 15 μ F, para lo cual, la mezcla era puesta en una cubeta de electroporación *Cell projects*, BioRad) y se hacía uso de un electroporador (*EasyJet Optima* de Equibio). Inmediatamente después del pulso, se

adicionaba 1 ml de LB y se transfería el cultivo a un eppendorf. Se incubaba durante 1 h a 37 °C con agitación suave y, por último, se sembraban las células electroporadas en cajas de Petri que contenían LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados (en función de la resistencia incluida en el DNA transformante).

Agrobacterium tumefaciens.

La preparación de células transformables de *A.tumefaciens* y su consiguiente transformación por electroporación fueron realizadas de acuerdo con Mattanovich y cols. (Mattanovich *et al.*, 1989). 300 ml de LB se inoculaban con 3 ml de un cultivo saturado de la estirpe C58 de *A. tumefaciens* y se incubaban a 28 °C con agitación durante 3-4 h hasta que el cultivo alcanzaba una DO_{600nm} de 0,5. En ese momento, el cultivo era enfriado en hielo (10 minutos) para detener su crecimiento. Las células se recogían mediante centrifugación a 4000 g y 4 °C durante 5 minutos y se lavaban tres veces con 10 ml de tampón Hepes 1mM pH 7,0 y una vez con glicerol 10 % (v/v). Finalmente, las células eran resuspendidas en 3 ml de glicerol 10 % (v/v), distribuidas en alícuotas de 100 μ l y conservadas a -80 °C hasta su uso.

La transformación se llevaba a cabo por electroporación. Para ello, una de las alícuotas de células electroporables era descongelada en hielo y mezclada con 200 ng del DNA. La mezcla se pasaba a una cubeta de electroporación (*Cell projects*, BioRad) y se procedía a dar un pulso de 2,5 kV y 15 μ F en un electroporador (*EasyJet Optima* de Equibio). Inmediatamente después del pulso, se adicionaba 1 ml de LB y se transfería el cultivo a un eppendorf. Se incubaba durante 1 h a 30 °C con agitación suave y, por último, se sembraban las células electroporadas en cajas de Petri que contenían LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados (en función de la resistencia incluida en el DNA transformante) y se crecían a 28 °C durante 48 h.

Saccharomyces cerevisiae.

El método empleado para la transformación de las levaduras del ensayo de doble híbrido fue el descrito por Gietz y Woods (Gietz & Woods, 2002): "*Quick and Easy Transformation Protocol*".

En primer lugar se crecía toda la noche a 30 °C y en agitación un cultivo de la estirpe de levadura en medio YPAD 2x (ver página 70). Las células eran recogidas mediante centrifugación en tubos eppendorfs a 14000 rpm durante 1 minuto y resuspendidas en la siguiente mezcla de transformación (los diferentes componentes eran añadidos en el orden en que se listan): 240 μ l PEG 3500 50 % (p/v), 36 μ l acetato de litio 1 M, 50 μ l de DNA "carrier" 2 mg/ml hervido durante 5 minutos y 34 μ l del plásmido transformante (0,1-1 μ g) en agua. La mezcla de transformación (ya con las células resuspendidas) se incubaba a 42 °C durante 40-60 minutos, tras lo cual, las células

volvían a recogerse por centrifugación. Por último, las células eran resuspendidas en 1 ml de agua estéril y sembradas (10 y 100 μ l) en el correspondiente medio selectivo (SD-Leu en el caso de Y187 transformada con pGADT7 y SD-Trp en el caso de Y2HGold transformada con pGBKT7, ver Tabla 6). Las placas se incubaban a 30 °C durante 3-4 días. Las células transformadas eran conservadas en placas a 4 °C hasta su uso.

***Arabidopsis thaliana*.**

Durante esta Tesis se han obtenido plantas transgénicas de *A.thaliana*, ecotipo Columbia mutantes para el gen AtSS4, transformadas con la secuencia codificante completa (incluyendo el péptido tránsito hacia el cloroplasto) del gen AtSS4 (ssIV::SS4) y de los dominios amino (SS4tN) y carboxilo (SS4tC) por separados (ssIV::SS4tN y ssIV::SS4tC respectivamente) de *A.thaliana*.

Transformación por inmersión floral.

La transformación se llevó a cabo siguiendo el método de inmersión floral (*floral dip*) descrito por Clough y Bent (Clough & Bent, 1998), mediado por *A. tumefaciens*.

Lo primero que se hacía era cultivar plantas de *A.thaliana* en condiciones de día largo (16 h de luz/8 h de oscuridad) hasta que las inflorescencias primarias tenía unos 5 cm de longitud, momento en el cual eran cortadas para favorecer la aparición de un gran número de inflorescencias secundarias. A los 2-4 días se procedía a la transformación de la planta.

Dos días antes de la transformación se inoculaba con una colonia de *A.tumefaciens* portadora del plásmido que se deseaba transferir, un matraz con 20 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente, en nuestro caso espectinomicina (ver Tabla 9). Se incubaba a 30 °C con agitación durante 24 h, y con 10 ml de este precultivo se inoculaban 300 ml de LB, también suplementado con espectinomicina. Este cultivo se dejaba crecer a 30 °C en agitación hasta que la DO_{600nm} alcanzaba valores entre 0,8 y 2 (aproximadamente 24 h), momento en el que las células de *A.tumefaciens* eran precipitaban por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos y resuspendidas en medio de infiltración a una DO₆₀₀ de 0,8. El medio de infiltración consistía en una solución de sacarosa 5 % (p/v) y Silwet L-77 (Lehle Seeds, EE.UU.) 0,05 % en agua. Las inflorescencias de las plantas eran entonces sumergidas en esta suspensión bacteriana durante aproximadamente 10 segundos con agitación suave y, a continuación, las plantas eran cubiertas con film transparente para mantener alta la humedad y evitar la desecación. Las plantas envueltas eran mantenidas con baja intensidad lumínica durante 24 h, tras las cuales, el film era retirado y las plantas eran cultivadas hasta que las semillas podían ser recogidas.

Selección de transformantes. Fumigación.

La selección de las semillas transformadas se realizó por tolerancia al herbicida Finale[®] (cuyo principio activo es el glufosinato de amonio), debido a que sólo las transformadas habrían incorporado el gen de resistencia a dicho herbicida. Para ello, las semillas se sembraban en tierra (ver página 68) y se cultivaban en el invernadero. Aproximadamente 10 días después de la siembra, las plántulas eran fumigadas con una solución al 1,6 % (v/v) del herbicida Finale[®] (Bayer) - compuesta por glufosinato amónico al 15 % (p/v) - y 0,005 % (p/v) Silwet-L77 (surfactante). Tres días después se volvía a repetir el tratamiento con el herbicida para minimizar los falsos positivos. Los transformantes, que eran resistentes al herbicida, continuaban creciendo, mientras que las plantas que procedían de semillas no transformadas, dejaban de crecer, presentaban clorosis y, finalmente, morían. Las plántulas transformadas (generación F₀) se, dejaban crecer para volver a obtener la siguiente generación de semillas (F₁).

Selección de líneas genéticas.

Las semillas de la F₁ eran sembradas y fumigadas como se describe en el punto anterior y las plantas resistentes al herbicida eran analizadas. Para ello, se realizaba en primer lugar la extracción de DNA genómico (ver página 111) y, usando éste como molde se realizaban las PCRs (ver página 112) oportunas. En la siguiente tabla (Tabla 12) pueden encontrarse todas las parejas de cebadores empleadas en el análisis.

Una vez seleccionadas las plantas F₁, con inserto, se dejaban crecer y se recogían semillas (F₂) de forma individualizada. Las semillas de la F₂ eran sembradas en tierra y fumigadas, igual que las de la F₁, pero ésta vez se hacía un conteo del número de plántulas antes de fumigar y del número de supervivientes unos días después de la segunda fumigación. El análisis del número de supervivientes nos permite saber que plantas son homocigotas y cuales heterocigotas. A las plantas homocigotas (100 % resistencia al herbicida) se les extrajo RNA (ver página 115) y se probó la expresión del transgén mediante retrotranscripción (ver página 115) seguida de PCR con los oligos adecuados para cada transgen en concreto.

Parejas de cebadores	Tamaños de bandas (pb) esperadas en las diferentes línea de <i>Arabidopsis</i>				
	WT	ssIV	ssIV::SS4tN	ssIV::SS4tC	ssIV::SS4
Fwd: CATTGTAACAACCGTGTCCCC Rev: GTTGTCAATACCTTCAAATTC	650	-	-	398	398
Fwd: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCGAAG GAGATAGAACCATGGCGACGAAGCTATCGAGCTTC Rev: GGGGACCCATTTGTACAAGAAAGCTGGGTACAATCC TGAACTT GTTGGAGA	-	-	1720	-	1720
Fwd: GGATCCGTCGTTACATTGCAGCTGAG Rev: GGGGACCACITTTGTACAAGAAAGCTGGGTACGTGC GATTAGG AACAGCTCT	-	-	-	1526	1526

Tabla 12. Cebadores empleados para la selección de plantas transgénicas. La primera pareja de cebadores amplifica un fragmento de SS4 dentro de su dominio carboxilo. La diferencia de tamaño observada entre la banda del WT y la banda de las transgénicas es debida a la presencia de intrones en la secuencia genómica, ausentes en la secuencia del transgen. La ausencia de la banda en el mutante ssIV es debida a la inserción del T-DNA en la región flanqueada por los cebadores. La segunda pareja de cebadores amplifica un fragmento dentro del dominio amino de SS4, el cual es demasiado grande en la secuencia genómica (debido a la presencia de intrones) como para ser amplificado (ausencia de banda en el WT, el mutante ssIV y la transgénica ssIV::SS4tC). La tercera pareja amplifica un fragmento dentro del dominio carboxilo, el cual, al igual que en el caso anterior, es demasiado grande en la secuencia genómica como para ser amplificado.

Resultados.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES ALMIDÓN SINTASA (SS).

Obtención y caracterización de los mutantes dobles de almidón sintasas (SS).

Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio (Roldán *et al.*, 2007b) mostraron, mediante la caracterización del mutante simple *sslV* de *A.thaliana*, carente de la actividad almidón sintasa de Clase IV (SSIV), que la ausencia de dicha actividad provoca la acumulación de un único gránulo de almidón por cloroplastos (Figura 14), salvo excepciones en las que se observan dos. Este único gránulo de almidón, aunque de un tamaño mucho mayor que los gránulos de almidón de plantas silvestres (Figura 15), no presentaba modificaciones a nivel de estructura molecular (contenido de amilosa, distribución de longitudes de cadena,...). Los resultados indicaban que SSIV era necesaria para la síntesis del número correcto de gránulos de almidón por cloroplastos observados en plantas silvestres y sugerían que dicha enzima estaría implicada en el proceso de iniciación del gránulo de almidón. La pérdida de SSIV, sin embargo, no impide por completo la síntesis de almidón en el cloroplasto, lo cual sugería la existencia de cierto grado de redundancia en la función de esta proteína y nos llevó a la obtención y caracterización de los mutantes dobles carentes de la SSIV y de cada una de las otras Clases de SS (Szydlowski *et al.*, 2009): *sslsslV*, *sslsslV* y *sslsslV* (ver Tabla 4), en busca de qué otra SS era responsable de la síntesis de almidón en el mutante *sslV*.

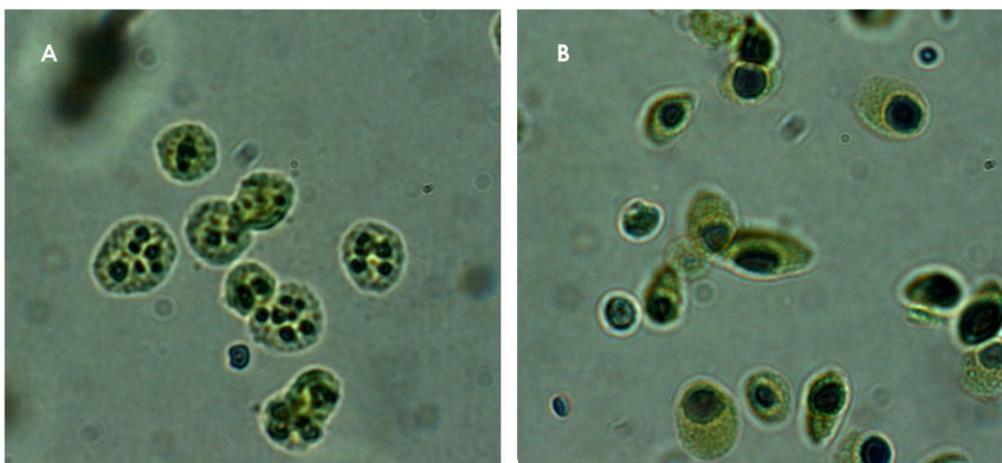


Figura 14. Imágenes de microscopía óptica de cloroplastos aislados de plantas silvestres de ecotipo Col-0 (A) y el mutante simple *sslV* (B) teñidos con lugol. Col-0 muestra aproximadamente 5-7 gránulos de almidón por cloroplasto, mientras que *sslV* presenta un único gránulo de gran tamaño.

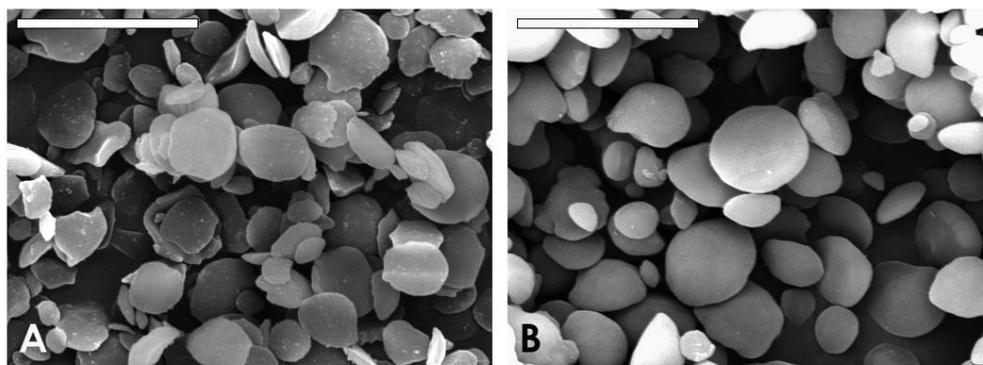


Figura 15. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de gránulos de almidón aislados de plantas silvestres de ecotipo Col-0 (A) y del mutante simple *ssIV* (B). La barra blanca corresponde a 10 μm . Se puede observar el mayor tamaño de los gránulos del mutante respecto al WT.

Los mutantes dobles *sslssIV*, *ssIIssIV* y *ssIIIssIV* fueron obtenidos mediante el cruce de los respectivos mutantes simples parentales: el mutante *sslssIV* como resultado del cruce de los mutantes *ssl* y *ssIV* de ecotipo Wassilewskija (WS), el mutante *ssIIssIV* como resultado del cruce de los mutantes *ssII* y *ssIV* de ecotipo WS y el mutante *ssIIIssIV* como resultado del cruce de los mutantes *ssIII* y *ssIV* de ecotipo Columbia (Col-0). Los mutantes simples empleados pertenecen a las siguientes colecciones de mutantes de inserción de T-DNA: los mutantes *ssl*, *ssII* y *ssIV*, de ecotipo WS, pertenecen la colección de mutantes generados por el INRA en Versailles (Francia) (Bechtold *et al.*, 1993; Bouchez *et al.*, 1993); el mutante *ssIII*, de ecotipo Col-0, fue generado en el Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto Salk (SIGnAL); y el mutante *ssIV*, de ecotipo Col-0, pertenece a la colección de mutantes GABI-KAT (Rosso *et al.*, 2003). Para referencias sobre estos mutantes ver Tabla 4 (página 68).

La selección de los mutantes dobles homocigotos se hizo mediante PCR de DNA genómico usando los cebadores descritos en la Tabla 10 (página 113). La ausencia de SS4 en los dobles mutantes se comprobó mediante Inmunoblot con anti-SSIV (Figura 58).

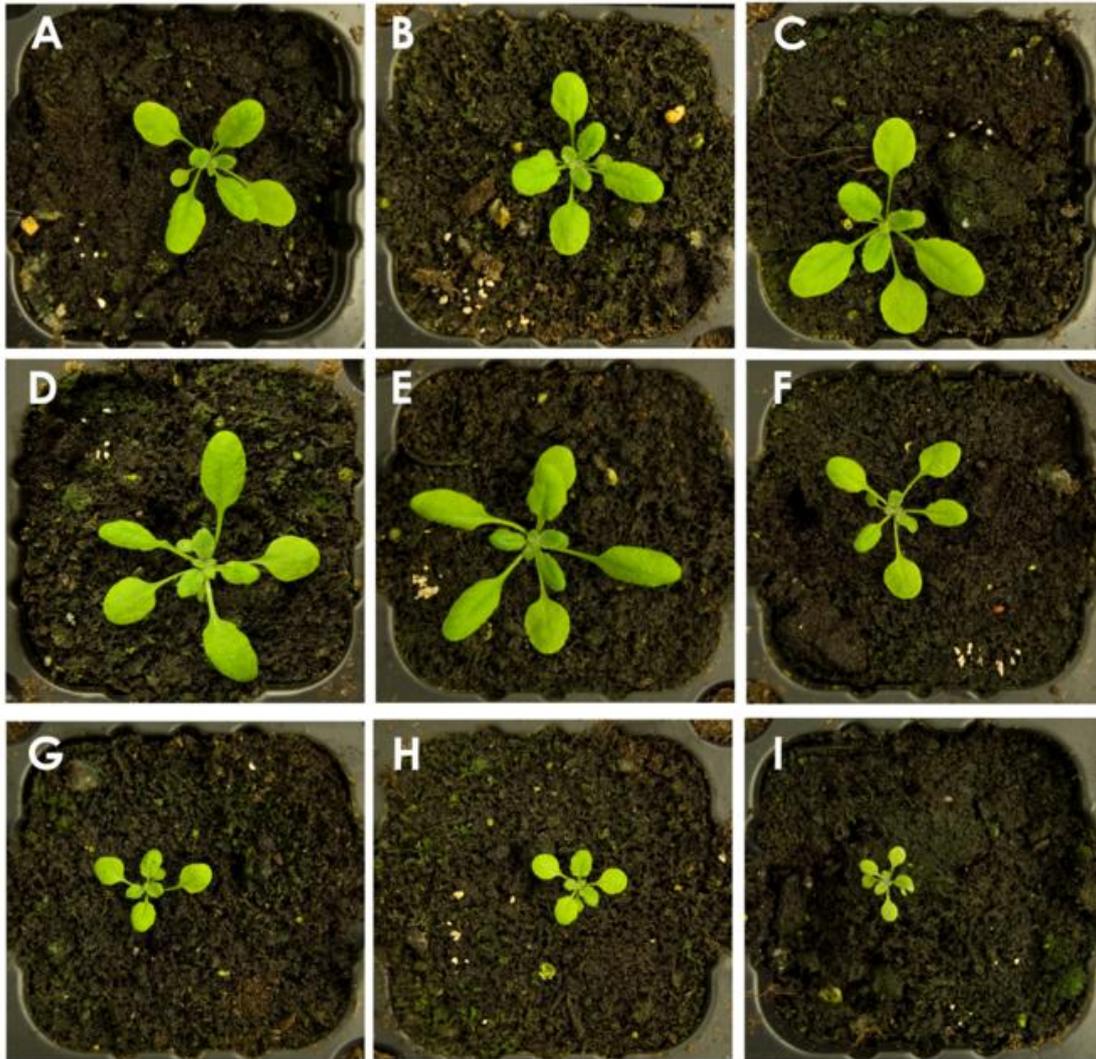


Figura 16. Fotos de plantas silvestre de ecotipo WS (A); mutantes simples de ecotipo WS: *ssl* (B) y *ssl* (C); silvestre de ecotipo Col-0 (D); mutantes simples de ecotipo Col-0: *ssl* (E) y *ssl* (F); mutantes dobles de ecotipo WS: *ssl/ssl* (G) y *ssl/ssl* (H); y mutante doble de ecotipo Col-0: *ssl/ssl* (I). Las plantas se crecieron bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad (DL) en una cámara de crecimiento de plantas. Las fotos fueron tomadas 18 días después de la siembra.

Curvas de crecimiento en condiciones de día largo (DL).

Las curvas de crecimiento de los mutantes dobles (Figura 17) muestran la menor tasa de crecimiento de todos ellos respecto a su respectivo WT (Col-0 o WS). El efecto deletéreo de las mutaciones sobre el crecimiento se puede observar también en la Figura 16.

A los 25 días de crecimiento, los mutantes *ssl/ssl* y *ssl/ssl* tienen un peso fresco/planta aproximadamente 6 veces menor que su silvestre (WS), mientras que el efecto de las mutaciones sobre el crecimiento es más drástico en el mutante *ssl/ssl*, con un peso fresco/planta aproximadamente 27 veces menor que su silvestre (Col-0).

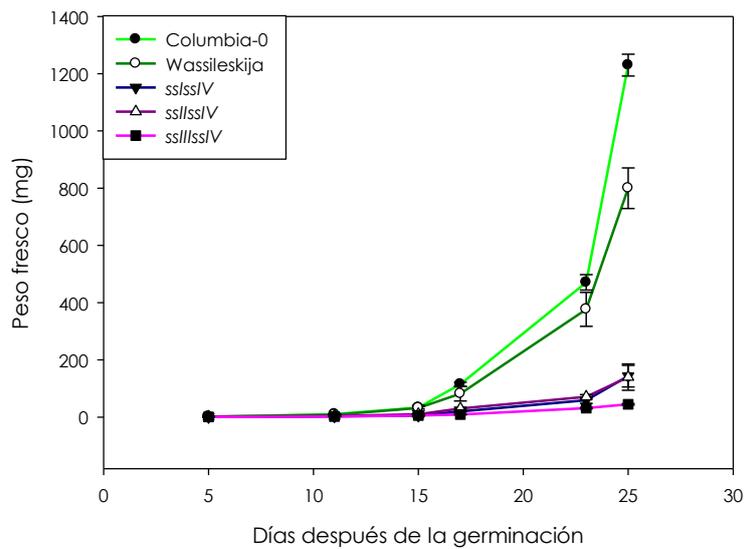


Figura 17. Curva de crecimiento de los mutantes dobles frente a sus silvestres. Las plantas fueron crecidas bajo un fotoperíodo de DL (en cámara de crecimiento de plantas) y el peso de la roseta fue determinado en diferentes días a lo largo del ciclo de vida. Cada punto es la media (\pm desviación estándar) del peso de 5-7 plantas.

Curvas de acumulación de almidón.

Las curvas de acumulación de almidón fueron obtenidas para cada mutante doble junto con los correspondientes mutantes simples parentales y silvestres (Figura 18). Se puede observar que la acumulación de almidón durante el día y su degradación durante la noche en los mutantes *ss/sslV* y *ssl/sslV* siguen una cinética aproximadamente igual a la esperada de la suma de las cinéticas de sus respectivos parentales (mutantes simples). Así, el doble mutante *ss/sslV* acumula un 29 % de almidón respecto al encontrado en el WT al final del periodo de luz, mientras que sus parentales acumulan un 67 % en el caso de *ssl* y un 61,7 % en el caso de *ssIV*. El doble mutante *ssl/sslV* acumula un 40 % de almidón respecto al WT, mientras que sus parentales acumulan un 77,6 %, el mutante simple *sslI*, y un 61,7 %, el mutante simple *ssIV*. Sin embargo, en el doble mutante *ssl/sslV* la situación es muy diferente: mientras que las líneas parentales acumulan (al final del periodo de luz) un 122 % respecto al WT, en el caso del mutante *sslIII* (Zhang *et al.*, 2005b), y un 61,7 %, en el del mutante *ssIV* (Roldán *et al.*, 2007b), el doble mutante *ssl/sslV* carece de almidón, o al menos de un contenido de almidón que sea cuantificable a lo largo de todo el ciclo luz/oscuridad. La ausencia de almidón cuantificable en este mutante se probó además mediante el método descrito por Smith y Zeeman (Roldán *et al.*, 2007b). Estos datos sugieren que la presencia de *SSIII* o *SSIV* es necesaria para la síntesis de almidón en las hojas de *Arabidopsis thaliana* (Szydłowski *et al.*, 2009).

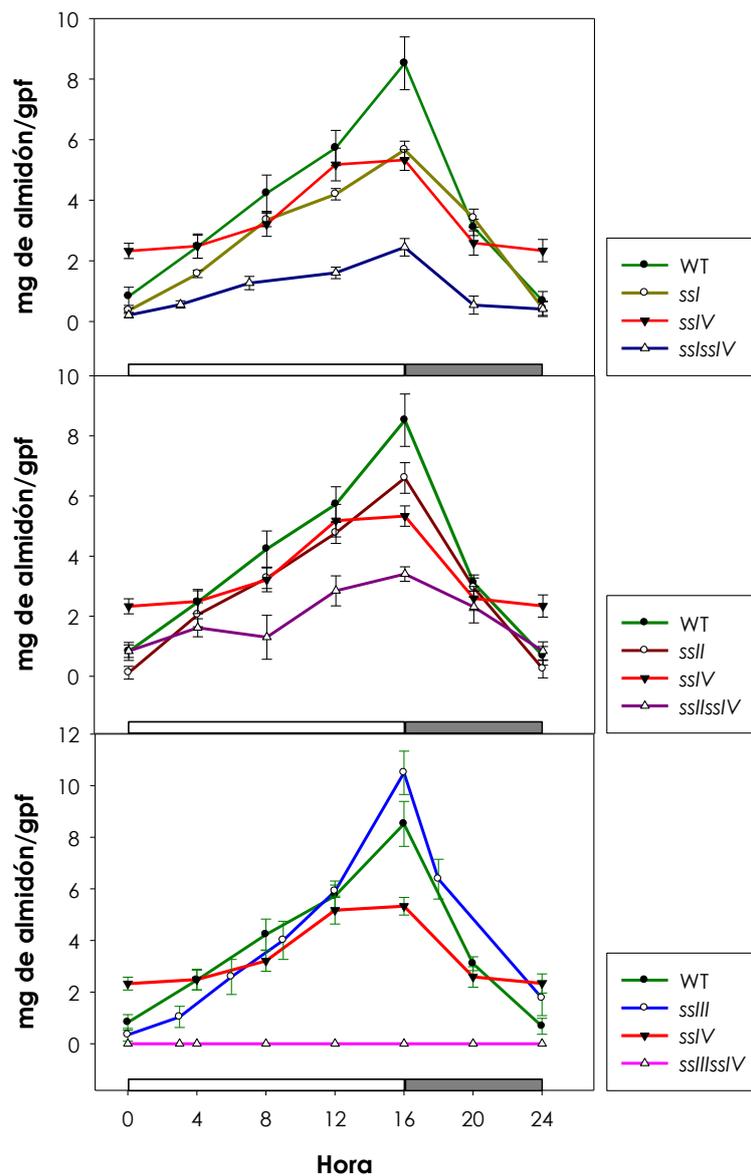


Figura 18. Curvas de acumulación de almidón de los dobles mutantes *ssI/ssIV* (gráfica izquierda), *ssII/ssIV* (gráfica central) y *ssIII/ssIV* (gráfica derecha) con las líneas parentales respectivas y el WT a lo largo del día. Las plantas fueron crecidas bajo un fotoperíodo de DL y el contenido en almidón fue determinado cada 4 h. Cada punto es la media (\pm desviación estándar) del contenido de almidón/gpf de 5 plantas.

Análisis mediante técnicas de microscopía.

Los análisis de secciones de hojas mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión (TEM) de los mutantes dobles *ssI/ssIV* (Figura 19, imágenes D, E y F) y *ssII/ssIV* (Figura 19, imágenes G, H e I) muestran la presencia de un único gránulo de almidón por cloroplasto frente a los 5-7 que se observan en el WT (Figura 19, imágenes A, B y C), de manera similar a lo descrito previamente para el mutante simple *ssIV* (Szydlowski *et al.*, 2009). Además, el análisis mediante TEM de dichos mutantes muestra que los gránulos tienen un mayor tamaño que los del WT (Figura 19). Los análisis mediante microscopía óptica de cortes seriados de hojas de los mutantes dobles *ssI/ssIV* y *ssII/ssIV* recogidas al final del día y teñidas con azul de toluidina o reactivo PAS,

muestran la existencia de cloroplastos vacíos en ambos mutantes (imágenes no mostradas), hecho que no se observa en el mutante simple *ssIV* (Roldán *et al.*, 2007b).

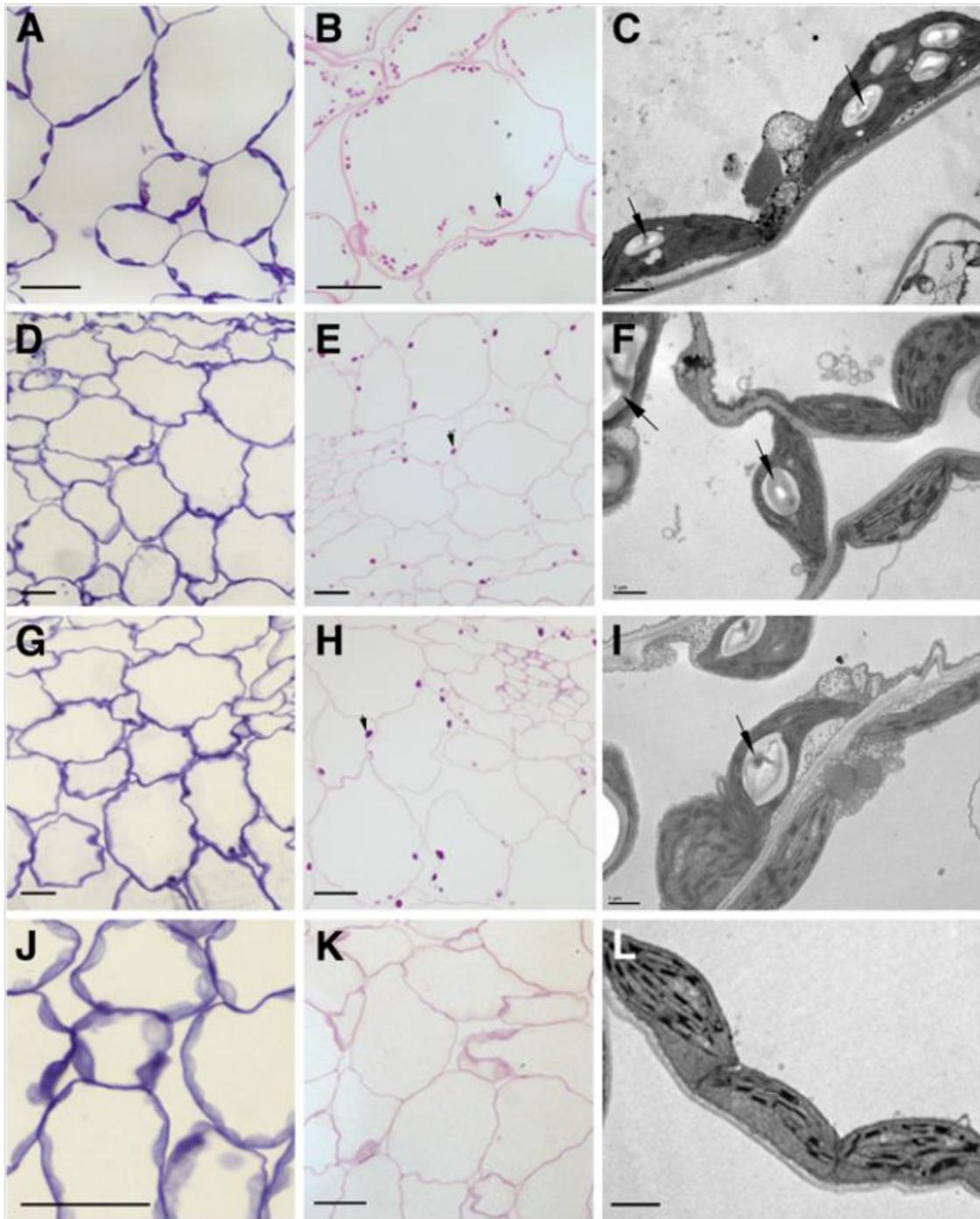


Figura 19. Imágenes de microscopía óptica y electrónica de secciones de hojas de (A-C) WT y los mutantes (D-F) *ssI/ssIV*, (G-I) *ssII/ssIV* y (J-L) *ssIII/ssIV*. Las imágenes de microscopía óptica A, D, G y J corresponden a tinciones con azul de toluidina; la pared celular y el estroma de los cloroplastos aparecen en color azul, mientras que los gránulos de almidón no se tiñen, salvo cuando son muy grandes, como en el caso de los mutantes carentes de *SSIV*. Las imágenes de microscopía óptica B, E, H y K corresponden a secciones de tejido teñidas con PAS; los carbohidratos de la pared celular y los gránulos de almidón se observan en rojo. En las imágenes de microscopía electrónica C, F, G e I pueden diferenciarse los cloroplastos y, en el interior de ellos, se pueden observar los gránulos de almidón como estructuras blancas menos electrodensas que el estroma. Las barras corresponden a 20 μm en las imágenes A, B, D, E, G, H, J y K, y a 1 μm en C, F, L e I.

Los análisis de secciones de hojas mediante microscopía corroboran la ausencia de almidón en el doble mutante *ssIIIssIV* (Figura 19, imágenes J, K y L). Sin embargo, los análisis de áreas mayores mediante tinción con azul de toluidina o reactivo PAS, mostraron la existencia de cloroplastos (muy pocos) con un único gránulo de almidón, al igual que el resto de mutantes *ssIV*, indicando que en ausencia de *SSIII* y *SSIV*, la síntesis de almidón puede ocurrir pero con una probabilidad muy baja (Figura 20).

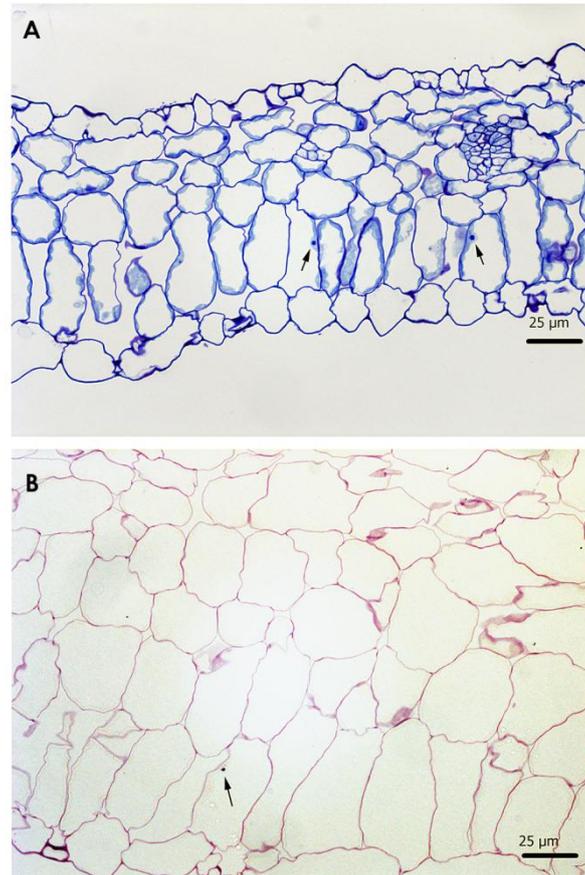


Figura 20. Imágenes de microscopía óptica de secciones de hojas del mutante *ssIIIssIV*. La imagen A corresponde a una tinción con azul de toluidina; la pared celular y el estroma de los cloroplastos aparecen en color azul, mientras que los gránulos de almidón no se tiñen, salvo cuando son muy grandes. La imagen B corresponde a una tinción con PAS; los carbohidratos de la pared celular y los gránulos de almidón se observan en rojo. En ambas imágenes se observa como la mayor parte de los cloroplastos del mutante *ssIIIssIV* carecen de almidón, pero es posible encontrar algún cloroplasto con un único gránulo de gran tamaño. Las barras corresponden a 25 µm en ambas imágenes.

Obtención de los mutantes triples *ssIsslssIII* y *ssIsslssIV*.

Dado que los datos indicaban que las enzimas *SSIII* y *SSIV* juegan un papel importante en el inicio de la síntesis del gránulo de almidón, nos planteamos si éstas permitirían la síntesis en ausencia del resto de almidón sintetasas. Por ello, se obtuvieron los mutantes triples *ssIsslssIII* y *ssIsslssIV* que poseen exclusivamente las almidón sintetasas de Clase IV y III respectivamente.

Los mutantes triples *sslsslssl* y *sslsslsslV* fueron obtenidos mediante el cruce (ver página 72) del mutante doble *sslssl* y los mutantes dobles *sslssl* y *sslsslV* respectivamente. Los mutantes *sslssl* y *sslssl* fueron generados por el grupo del Dr. Christophe d'Hulst (Szydlowski *et al.*, 2009).

La selección de los triples mutantes homocigotos se hizo mediante PCR de DNA genómico usando los cebadores descritos en la Tabla 10 (página 113). La presencia/ausencia de SS4 se comprobó mediante Inmunoblot con anti-SSIV (Figura 58).



Figura 21. Fotos del WT ecotipo WS (A) y los mutantes triples del mismo ecotipo, *sslsslssl* (B) y *sslsslsslV* (C). Las plantas se crecieron en condiciones de DL en una cámara de crecimiento de plantas. Las fotos fueron tomadas 18 días después de la siembra.

Curvas de crecimiento en condiciones de día largo (DL).

Las curvas de crecimiento de los mutantes triples (Figura 22) muestra el menor crecimiento de ambos respecto al WT (WS). El efecto de las mutaciones sobre el crecimiento se puede observar también en la Figura 21.

A los 25 días de crecimiento, los mutantes *sslsslssl* y *sslsslsslV* tienen un peso fresco/planta de aproximadamente una tercera parte y 15 veces inferior al del WT respectivamente.

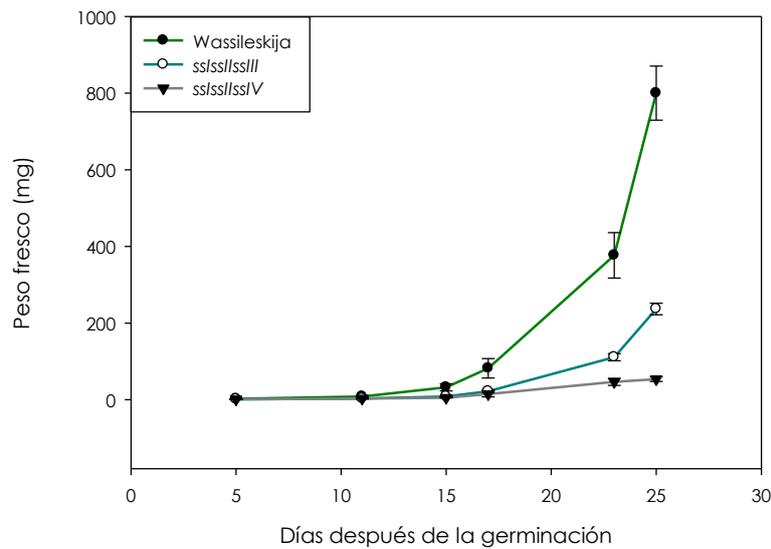


Figura 22. Curva de crecimiento de los mutantes triples frente a su silvestre. Las plantas fueron crecidas bajo un fotoperiodo de DL (en cámara de crecimiento de plantas) y el peso de la roseta fue determinado en diferentes días a lo largo del ciclo de vida. Cada punto es la media (\pm desviación estándar) del peso de 5-7 plantas.

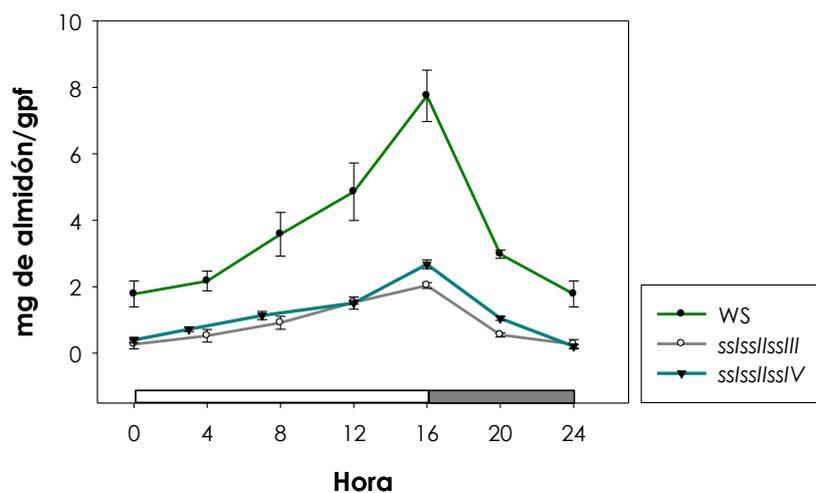


Figura 23. Curvas de acumulación de almidón de los mutantes triples *sslssl/sslIII* y *sslssl/sslIV* con su silvestre (WS) a lo largo del día. Las plantas fueron crecidas bajo un fotoperiodo de DL y el contenido en almidón fue determinado cada 4 h. Cada punto es la media (\pm desviación estándar) del contenido de almidón/gpf de 5 plantas.

Curvas de acumulación de almidón.

Los dos mutantes triples acumulan almidón durante el día y lo movilizan durante la noche, aunque el contenido de almidón está fuertemente reducido al final del periodo de luz en comparación con el WT. En el mutante *sslssl/sslIII*, encontramos un 26,8 % y en el *sslssl/sslIV*, un 34,6 % respecto al silvestre (Figura 23).

Ambos mutantes presentan una tasa de crecimiento menor que la del WT, pero superior a la del doble mutante *sslsslV*.

Análisis mediante técnicas de microscopía.

El análisis de secciones de hojas del mutante *sslsslV* mediante microscopía (Figura 24, imágenes D y E) muestra la presencia de un único gránulo de almidón por cloroplasto, de tamaño superior a los gránulos del WT, de manera similar a lo observado en los mutantes dobles *sslsslV* y *sslsslV*. Al igual que ellos, el triple mutante presenta cloroplastos vacíos (carentes de gránulos de almidón visibles), lo cual ha sido confirmado mediante el análisis de cortes seriados, teñidos con PAS y azul de toulidina, por microscopía óptica.

El mutante *sslsslIII* en contra, presenta un número de gránulos de almidón por cloroplasto igual al observado en el WT y un tamaño de gránulo considerablemente menor (Figura 24, imágenes A-C).

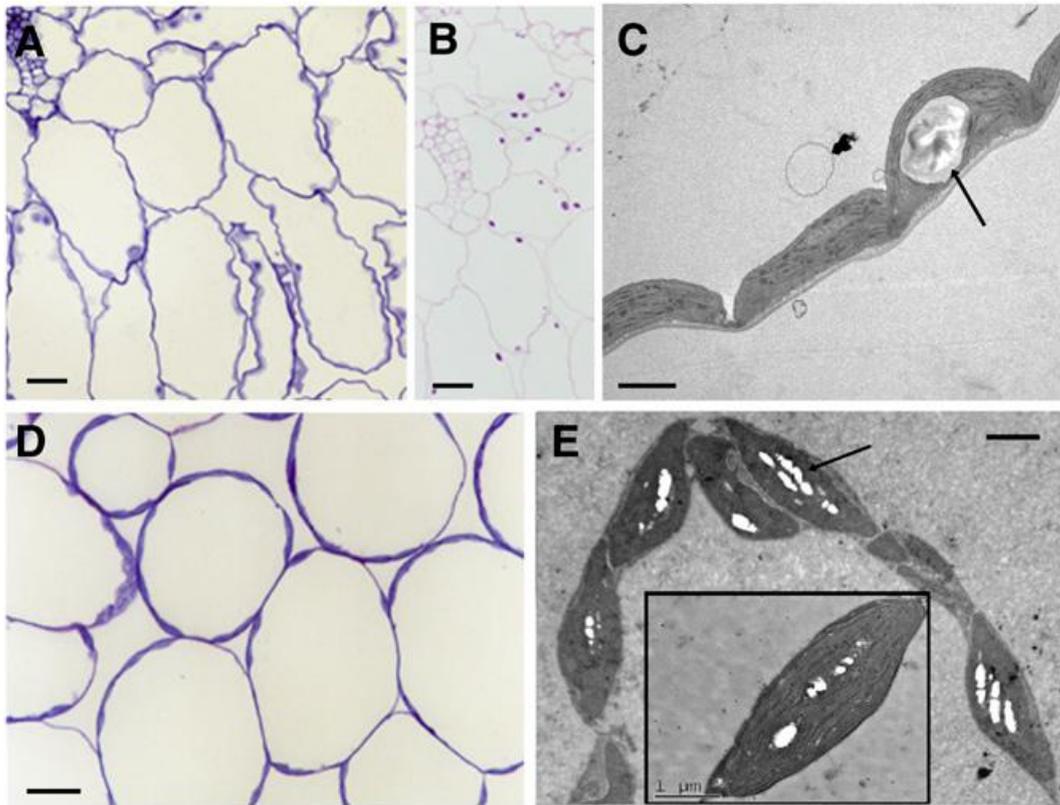


Figura 24. Imágenes de microscopía óptica y electrónica de secciones de hojas de los mutantes triples (A-C) *sslsslIII* y (D y E) *sslsslV*. Las imágenes de microscopía óptica A y D corresponden a tinciones con azul de toluidina; la pared celular y el estroma de los cloroplastos aparecen en color azul, mientras que los gránulos de almidón no se tiñen. La imagen de microscopía óptica B corresponde a una tinción con PAS; los carbohidratos de la pared celular y los gránulos de almidón se observan en rojo. En las imágenes de microscopía electrónica C y E pueden diferenciarse los cloroplastos y, en el interior de ellos, se pueden observar los gránulos de almidón como estructuras blancas menos electrodensas que el estroma. Las barras corresponden a 20 μm en las imágenes A, B y D, y a 2 μm en C y E (1 μm en la ampliación).

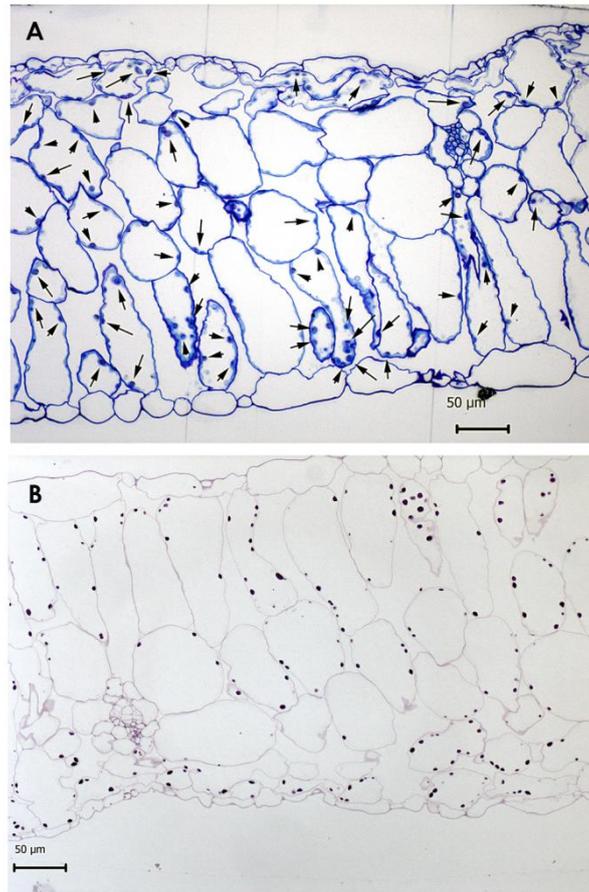


Figura 25. Imágenes de microscopía óptica de secciones de hojas del mutante *ss/ssllss/IV*. La imagen A corresponde a una tinción con azul de toluidina; la pared celular y el estroma de los cloroplastos aparecen en color azul, mientras que los gránulos de almidón no se tiñen, salvo cuando son muy grandes, como en este caso. La imagen B corresponde a una tinción con PAS; los carbohidratos de la pared celular y los gránulos de almidón se observan en rojo. En ambas imágenes se observa como la mayor parte de los cloroplastos del mutante *ss/ssllss/IV* presentan un único gránulo de almidón, pero además se observa la existencia de cloroplastos vacíos. Las barras corresponden a 50 µm en ambas imágenes.

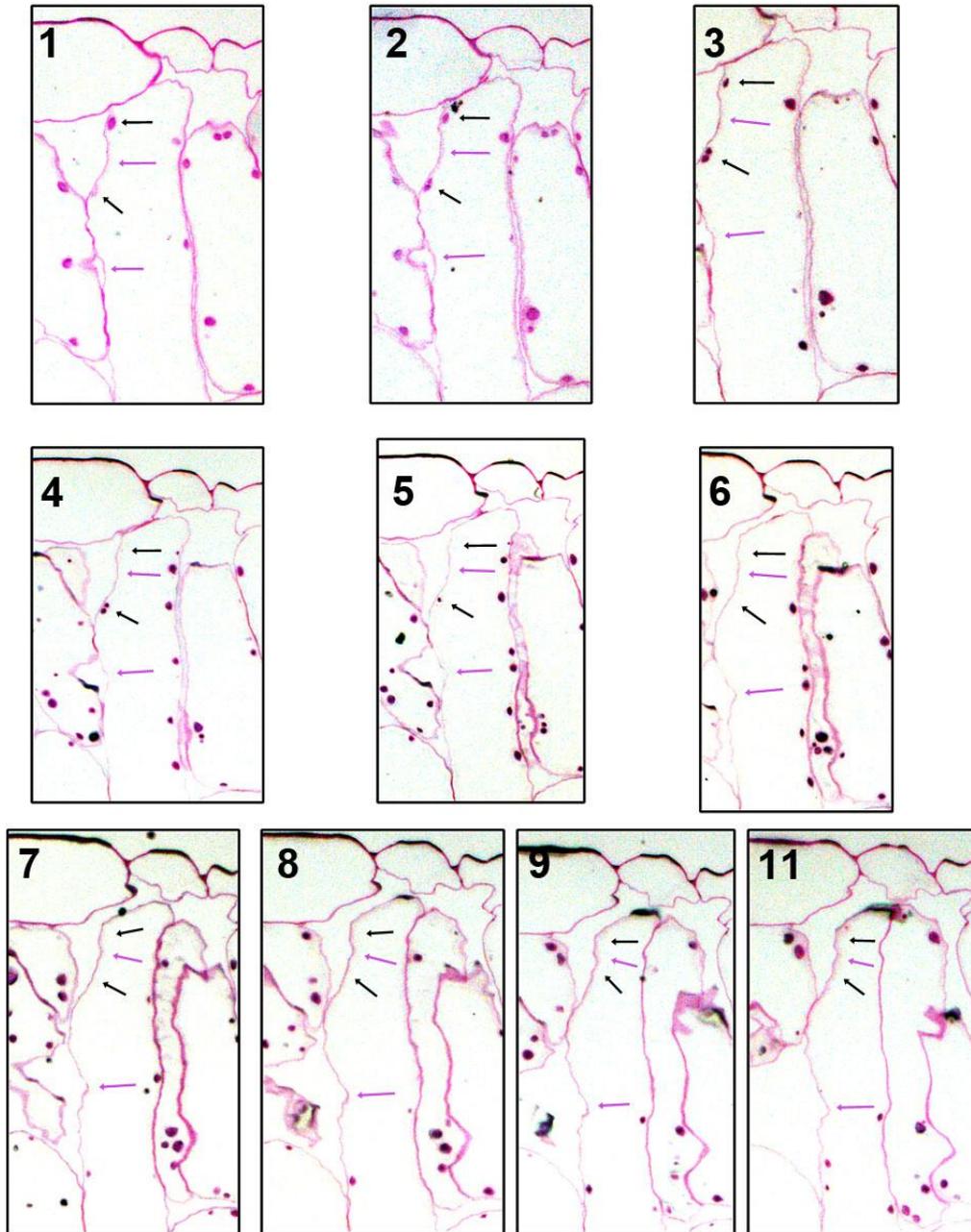


Figura 26. Imágenes de microscopía óptica de cortes seriados de hojas del mutante triple *ss/ss/ll/IV* teñidos con PAS. Las flechas negras indican cloroplastos con un gránulo de almidón. Las flechas rojas indican cloroplastos vacíos.

Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del almidón de los mutantes SS.

Para determinar si los fenotipos observados en los mutantes SS (especialmente la ausencia de almidón en el mutante *ssl/sslV*) eran debidos exclusivamente a la ausencia de las SS y no al efecto pleiotrópico de las mutaciones, la actividad de diferentes enzimas relacionadas con el metabolismo del almidón fueron ensayadas bioquímicamente y/o detectadas mediante zimograma.

Actividad almidón sintasa soluble de los mutantes SS.

La actividad almidón sintasa soluble (SS) fue ensayada para los mutantes simples, dobles y triples. En la Figura 27 se muestra la actividad presente en cada uno de ellos respecto a su silvestre.

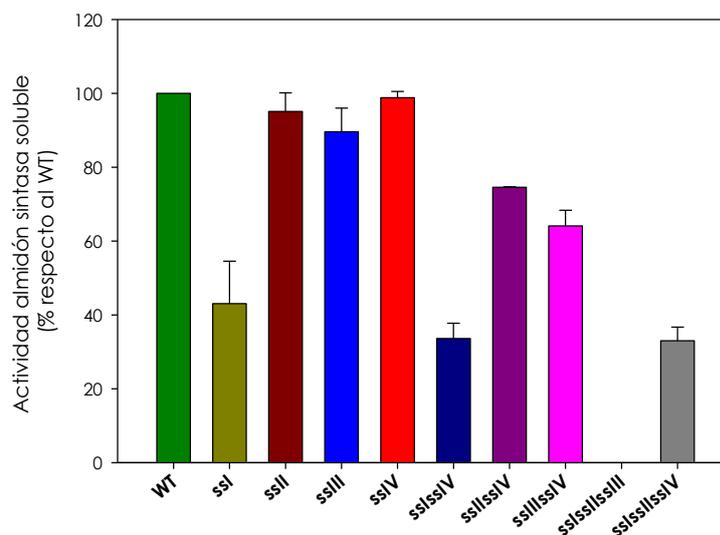


Figura 27. Actividad almidón sintasa soluble de los mutantes simples, dobles y triples. La actividad de cada línea fue ensayada en 3-5 experimentos independientes y, para cada experimento, los valores de los mutantes fueron referidos al WT.

Si comparamos los niveles de actividad SS de los mutantes simples respecto al silvestre, observamos que la mutación simple *ssl* es la que tiene un efecto más drástico en la actividad SS de la planta, mientras que la mutación simple *sslV* no tiene un efecto aparente sobre la actividad total. Si observamos los niveles de actividad de los mutantes dobles, vemos que la pérdida de actividad almidón sintasa soluble en los mutantes simples *ssl*, *sslI* y *sslII* es ligeramente potenciada por la mutación del gen *AtSS4* (dobles mutantes *sslsslV*, *sslsslV* y *sslsslV*). En el caso del doble mutante *sslsslV*, la actividad almidón sintasa soluble se reduce a un 65 % respecto al silvestre, lo cual quiere decir que las enzimas SSI y SSII están presentes y son activas en este mutante. La ausencia de actividad SSIII y la presencia de actividad SSI en el doble mutante *sslsslV* se puede visualizar mediante zimograma (ver Figura 28).

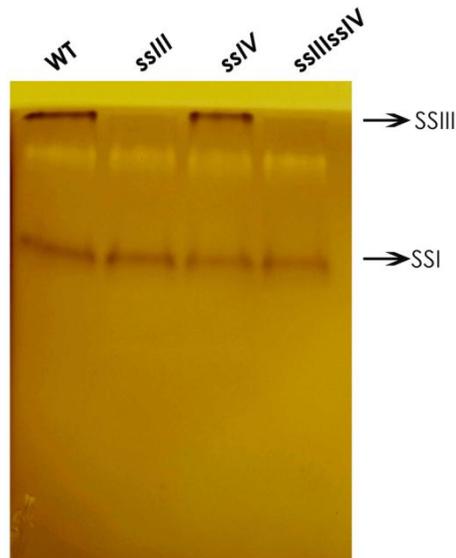


Figura 28. Zimograma de la actividad almidón sintasa. Se cargaron extractos crudos vegetales (150 μ g de proteínas) del WT y los mutantes *ssIII*, *ssIV* y *ssIIIssIV*. Mediante zimograma de extractos vegetales sólo es posible detectar la actividad almidón sintasa de Clase I y III.

En el caso de los mutantes triples vemos dos situaciones muy diferentes. Mientras que el mutante triple *ssIIIssIV* presenta unos niveles de actividad SS de aproximadamente el 32 % respecto al WT, en el mutante triple *ssIIIssIII* no se detecta actividad SS, lo cual concuerda con el hecho de que la actividad medida en el mutante simple *ssIV* sea prácticamente la misma que en el WT. Diferentes condiciones de ensayo han sido probadas: cebadores diferentes (amilopectina y glucógeno), presencia o ausencia de citrato - activador de algunas almidón sintasas (Szydłowski *et al.*, 2011b) - o agentes reductores como DTT; en ninguno de los casos se detectó actividad almidón sintasa soluble. La presencia del enzima SSIV se comprobó mediante inmunoblot con anticuerpos específicos anti-SSIV y su expresión en el mutante triple *ssIIIssIII* es similar a la del WT (Figura 58).

Actividad Almidón Sintasa Unida a Gránulo.

La actividad almidón sintasa unida a gránulo (GBSSI) fue ensayada para los mutantes simples *ssIII* y *ssIV*, los mutantes dobles *ssIIIssIV* y *ssIIIssV* y los mutantes triples *ssIIIssIII* y *ssIIIssIV* (Figura 29). No es posible determinar la actividad GBSSI en el mutante *ssIIIssIV* puesto que no hay almidón.

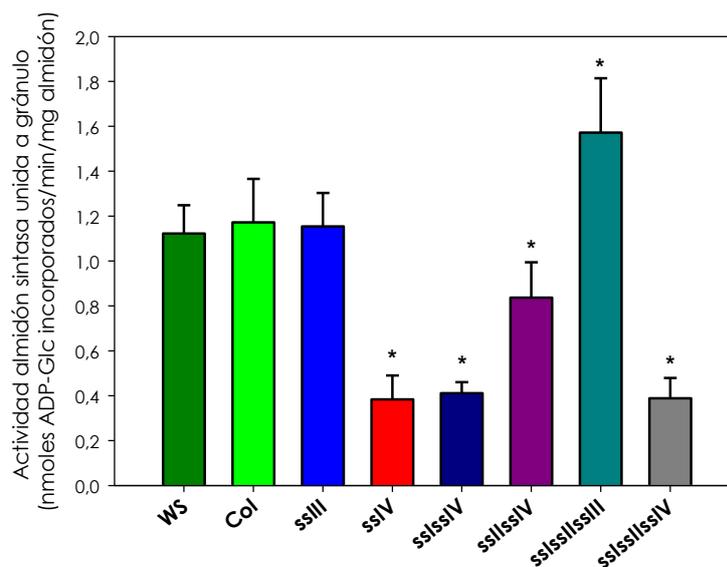


Figura 29. Actividad almidón sintasa unida a gránulo de los mutantes simples, dobles y triples referida al contenido de almidón. Los valores corresponden a la media (\pm error estándar de la media) de la actividad obtenida en 3 experimentos independientes.

Se observa que los niveles de actividad GBSSI por mg de almidón del mutante *sslII* son aproximadamente los mismos que en el WT, mientras que en todos los mutantes carentes de actividad *SSIV*, hay una disminución de la actividad respecto al WT y, en el caso del mutante triple *sslsslsslII*, un incremento de la misma. La disminución de la actividad GBSSI en los mutantes carentes de *SSIV* podría deberse al gran tamaño de los gránulos observados en los mismos. La entrada de la ADP-Glc en grandes gránulos sería más complicada que en gránulos pequeños, de modo que para un mismo contenido de almidón, la diferente difusión de la ADP-Glc entre un único gránulo grande o múltiples gránulos pequeños podría explicar la relación observada entre la actividad GBSSI y la mutación *sslV*, así como el incremento observado en el mutante *sslsslsslII*.

Otras actividades relacionadas con el metabolismo del almidón.

Las actividades más importantes relacionadas con el metabolismo del almidón fueron determinadas en extractos de hojas de los mutantes dobles y triples. Los valores obtenidos están recogidos en la Tabla 13. Como puede verse en la misma, los mutantes dobles *sslsslV* y *sslsslV* no tienen alteradas de manera estadísticamente significativamente ninguna de las actividades ensayadas, aunque parece existir un incremento de la actividad α -glucano fosforilasa. El mutante doble *sslsslV*, sin embargo, presenta niveles de actividad β -amilasa y α -glucano fosforilasa muy superiores a los del WT (aproximadamente 3,5 y 8 veces más respectivamente). En cuanto a los triples mutantes, se observa un incremento de la actividad β -amilasa en el mutante *sslsslsslV* y una disminución de la actividad α -glucano fosforilasa en el mutante *sslsslsslII*. El resto de actividades ensayadas no parecen afectadas de forma estadísticamente significativa en ninguno de los dos mutantes triples, sin embargo la actividad α -glucano fosforilasa parece incrementar en *sslsslsslV*, al igual que ocurre con los mutantes *sslsslV* y *sslsslV*.

Teniendo en cuenta que el mutante simple *sslV* presenta un mayor nivel de actividad de las fosforilasas citosólica (PHS1) y cloroplastídica (PHS2) (Boyer & Preiss, 1979), se debe considerar la existencia de un incremento de la actividad α -glucano fosforilasa asociado a la ausencia de *SSIV* y que, probablemente, un mayor número de repeticiones del ensayo hubiese confirmado un nivel de actividad estadísticamente superior al del WT en estos mutantes.

Actividad (% respecto al WT)	WT	<i>sslsslV</i>	<i>sslsslV</i>	<i>sslsslV</i>	<i>sslsslsslIII</i>	<i>sslsslsslIV</i>
SBE	100,0 ± 6,1	105,0 ± 5,3	107,9 ± 1,8	101,1 ± 4,5	108,8 ± 7,7	91,7 ± 3,6
AGPasa	100,0 ± 17,2	107,3 ± 13,3	161,0 ± 16,9	125,6 ± 19,6	64,1 ± 5,9	218,5 ± 34,6
α-amilasa	100,0 ± 10,0	83,0 ± 8,1	89,7 ± 9,0	113,4 ± 10,0	103,8 ± 6,2	97,0 ± 6,6
β-amilasa	100,0 ± 3,4	125,1 ± 17,8	86,5 ± 7,2	356,2* ± 2,7	183,3 ± 50,3	209,6* ± 8,2
α-glucano fosforilasa	100,0 ± 8,1	131,5 ± 11,7	161,3 ± 24,6	799,2* ± 7,7	49,7* ± 0,9	154,8 ± 47,8

Tabla 13. Actividades enzimáticas relacionadas con el almidón de los mutantes dobles y triples respecto a sus correspondientes WT. SBE = actividad almidón ramificante, AGPasa = actividad ADP-Glc pirofosforilasa. Los valores son porcentajes respecto a los obtenidos en el WT. Cada valor es la media \pm error estándar de la media de tres ensayos independientes. * indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$).

Además de las determinaciones bioquímicas mostradas en la Tabla 13, se llevó a cabo el análisis mediante zimogramas de los mutantes *sslsslV* (Figura 30), *sslsslsslIII* (Figura 31 izquierda) y *sslsslsslIV* (Figura 31 derecha), junto a sus respectivos parentales (*sslIII* y *sslIV* para *sslsslV*; *ssl*, *sslII*, *sslIII*, *sslsslIII* y *sslsslIII* para *sslsslsslIII*; y *ssl*, *sslII*, *sslIV*, *sslsslIV* y *sslsslIV* para *sslsslsslIV*), y el WT (Col-0 para *sslsslV* y WS para los mutantes triples). En la Figura 30 podemos observar un incremento respecto al WT de las actividades ISA1 e ISA3 (isoamilasas) en los mutantes *sslIII* y *sslsslV*, así como, un incremento de la actividad RAM1 (β -amilasa citosólica) en el mutante *sslIII*, y PGM3 (fosfoglucomutasa citosólica) en los mutantes *sslIII*, *sslIV* y *sslsslV*, siendo el incremento en el doble mutante lo esperado en función del incremento observado en sus parentales respecto al WT. En el zimograma de la actividad fosforilasa (abajo derecha) de la Figura 30, se puede observar que el incremento de la actividad α -glucano fosforilasa del mutante *sslsslV* es debido a un incremento de la actividad de ambas isoformas, PHS1 y PHS2. Los cambios en los niveles de actividad respecto al WT observados en el mutante *sslIII* de ecotipo Col-0 (Figura 30), no se observan en el caso del mutante *sslIII* de ecotipo WS (Figura 31), probablemente por las diferentes condiciones de crecimiento de las plantas empleadas para los zimogramas en la Figura 30, crecidas en el invernadero del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC-Sevilla, España), y en la Figura 31, crecidas en el invernadero de la Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (Université des Sciences et Technologies-Lille, Francia). En cuanto a los triples mutantes, la única variación respecto al WT que se observa en los zimogramas de las actividades modificantes de la β -dextrina límite (Figura 31 arriba) y del almidón (Figura 31 abajo) es un incremento de la actividad β -amilasa tanto en *sslsslsslIII* como en *sslsslsslIV*.

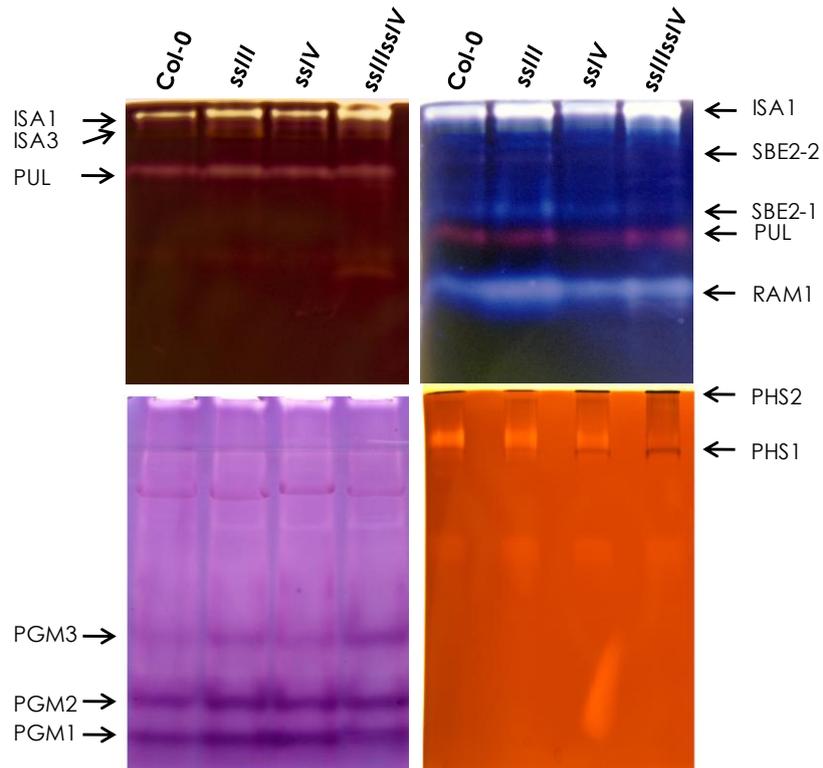


Figura 30. Zimogramas de las actividades modificantes de la β -dextrina límite (arriba izquierda) y del almidón (arriba derecha), de la fosfoglucomutasa (abajo izquierda) – las flechas indican diferentes isoformas – y de la fosforilasa (abajo derecha) de los mutantes *sslII*, *sslV* y *sslIIsslIV* y del silvestre Col-0. ISA1 e ISA3 son las isoamilasas 1 y 3, SBE2-1 y SBE2-2 son enzimas desramificantes del almidón, PUL es la actividad pululanasa, RAM1 es la β -amilasa citosólica y PHS1 y PHS2 son las almidón fosforilasas.

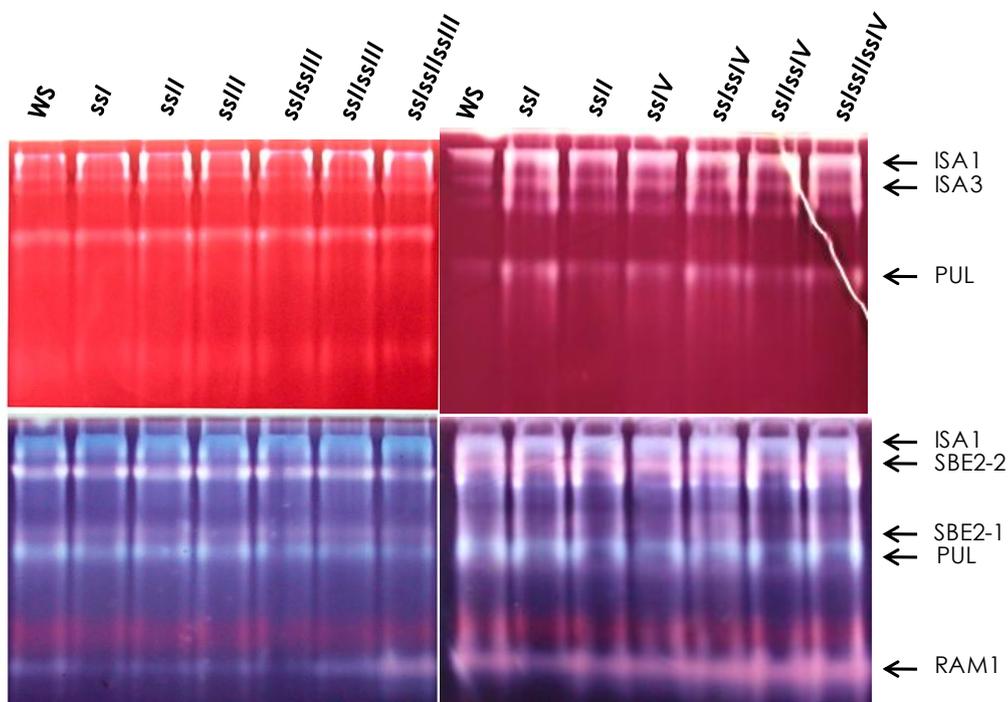


Figura 31. Zimogramas de las actividades modificantes de la β -dextrina límite (arriba) y del almidón (abajo) de los triples mutantes *ssl/ssl/ssl/II* (izquierda) y *ssl/ssl/ssl/IV* (derecha) junto a sus respectivos parentales y WT (WS). ISA1 e ISA3 son las isoamilasas 1 y 3, SBE2-1 y SBE2-2 son enzimas desramificantes del almidón, PUL es la actividad pululanasa, RAM1 es la β -amilasa citosólica y PHS1 y PHS2 son las almidón fosforilasas.

Tanto en el ensayo cuantitativo como en el zimograma, se observa un claro incremento de la actividad almidón fosforilasa en el mutante *ssl/sslV*. La expresión de los genes PHS1 (fosforilasa cloroplastídica) y PHS2 (fosforilasa citosólica) fue analizada mediante Q-PCR. Como se observa en la Tabla 14 el incremento de actividad en el mutante *ssl/sslV* se corresponde con un incremento de la expresión de los genes PHS1 y PHS2.

	PHS1	PHS2
Col-0	1,00	1,00
<i>ssl/III</i>	1,05 ^a ± 0,13	0,99 ^a ± 0,20
<i>ssl/V</i>	1,04 ^a ± 0,11	1,68 ^b ± 0,07
<i>ssl/sslV</i>	2,69 ^b ± 0,30	5,10 ^b ± 0,36

Tabla 14. Expresión respecto al WT de los genes PHS1 y PHS2 en el mutante *ssl/sslV* y sus parentales los mutantes simples *ssl/III* y *ssl/V*. Los valores están normalizados respecto a los obtenidos en el WT que se consideran como 1,00. Cada valor corresponde a la media ± error estándar de la media de 5 ensayos independientes. ^a indica que no hay diferencia significativa con respecto al WT ($p \geq 0,05$). ^b indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$).

Determinación de los niveles de pigmentos.

Todos los mutantes afectados en el gen *SS4* presentan un color verde pálido, lo cual sugiere que los niveles de clorofila podrían estar afectados en dichos mutantes. Por ello, los niveles de clorofilas a (*Chla*) y b (*Chlb*), carotenoides y antocianinas fueron determinados en los mutantes simples *ssl/III* y *ssl/V*, los mutantes dobles *ssl/sslV*, *ssl/sslV* y *ssl/sslV* y los mutantes triples *ssl/ssl/ssl/III* y *ssl/ssl/ssl/V* (Figura 32 y Figura 33).

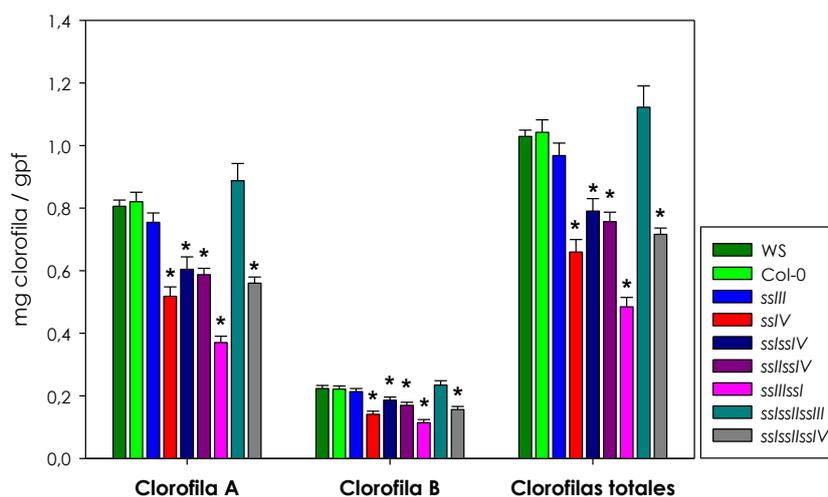


Figura 32. Niveles de clorofilas a (izquierda), b (centro) y totales (derecha) de los mutantes *ssl/III*, *ssl/V*, *ssl/sslV*, *ssl/sslV*, *ssl/ssl/III*, *ssl/ssl/III* y *ssl/ssl/ssl/V*. La barra de error corresponde al error estándar de la media. * indica que hay diferencia significativa con respecto al correspondiente WT ($p < 0,05$).

	Ratio Chl a/b
WS	3,61 ± 0,02
Col-0	3,71 ± 0,05
ssIII	3,53 ± 0,04
ssIV	3,68 ± 0,05
sslssIV	3,26 ± 0,09
sslssIV	3,49 ± 0,11
ssllssIV	3,26 ± 0,08
ssllssIII	3,82 ± 0,02
ssllssIV	3,32 ± 0,04

Tabla 15. Ratio clorofila a/clorofila b (Chl a/b) de los mutantes *ssIII*, *ssIV*, *sslssIV*, *ssllssIV*, *ssllssIII* y *ssllssIV* y sus silvestres Col-0 y WS.

Como puede verse en la Figura 32, todos los mutantes carentes de actividad SSIV poseen niveles de clorofilas totales inferiores a su correspondiente WT (1,03 mg/gpf para WS y 1,04 mg/gpf para Col-0), lo cual explica el color pálido que presentan. Tanto los niveles de clorofila a como los de clorofila b están disminuidos en dichos mutantes sin que la razón clorofila a/clorofila b se vea alterada significativamente en ninguno de ellos (Tabla 15). La disminución más drástica de los niveles de clorofilas se observa en el mutante *ssllssIV* (con un contenido de clorofilas totales de 0,48 mg/gpf). El mutante simple *ssIII* y el triple mutante *ssllssIII*, en cambio, poseen niveles normales (aproximadamente iguales a los del WT) de clorofilas (0,97 y 1,22 mg de clorofilas totales/gpf respectivamente). El mismo efecto se observa en los niveles de carotenoides (Figura 33): todos los mutantes carentes de actividad SSIV poseen un contenido en carotenoides inferior al WT (0,22 µg/gpf para ambos ecotipos), observándose la disminución más drástica en el mutante *ssllssIV* (0,09 µg/gpf).

En cuanto a los niveles de antocianinas (Figura 33), al contrario que lo observado para los niveles de clorofilas y carotenoides, todos los mutantes carentes de actividad SSIV poseen un mayor contenido que el correspondiente WT. El incremento es especialmente grande en el caso del mutante *ssllssIV*, que posee entre 5 y 7 veces más que Col-0, lo cual explica el color rojo que adquieren los extractos ácidos de este mutante. Los mutantes *ssIII* y *ssllssIII* poseen niveles normales de antocianinas.

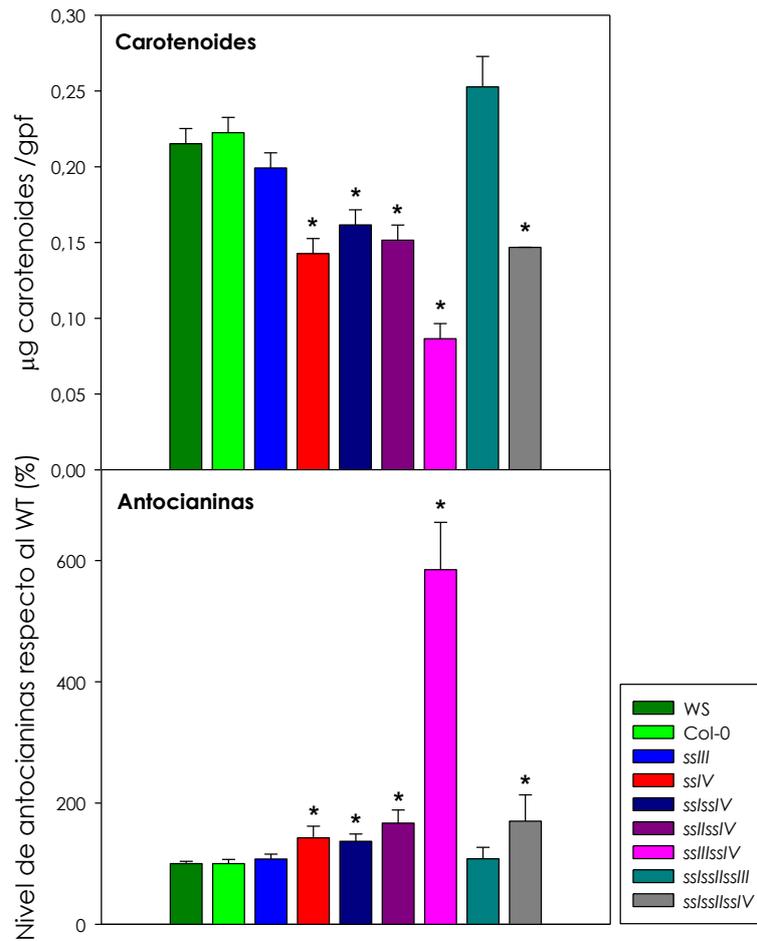


Figura 33. Niveles de carotenoides (arriba) y antocianinas (abajo) de los mutantes *ssIII*, *ssIV*, *ssIII/IV*, *ssIII/IV*, *ssIII/IV*, *ssIII/IV* y *ssIII/IV* y los WT de ecotipo WS y Col-0. * indica que hay diferencia significativa con respecto al correspondiente WT ($p < 0,05$).

Análisis de la síntesis de novo de gránulos de almidón en los diferentes mutantes.

Dado que SSIV parecía tener un papel importante en el inicio del gránulo de almidón, nos planteamos estudiar el reinicio de la síntesis de almidón en plantas mantenidas durante 4 días en oscuridad (104 h en realidad) con objeto de eliminar por completo el almidón acumulado. El ensayo consistió en comparar el contenido de almidón de los diferentes mutantes al final del primer y segundo día (16 h de luz) después de la incubación en oscuridad (Figura 34).

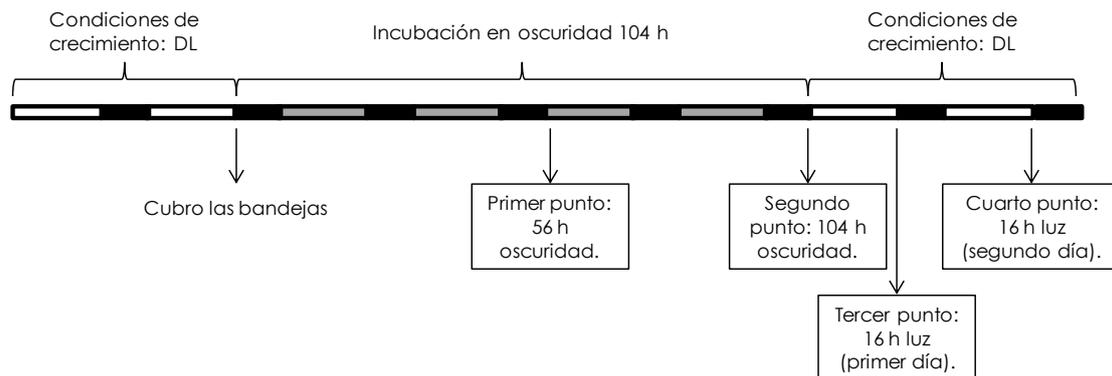


Figura 34. Esquema del ensayo para el análisis de la síntesis de novo de gránulos de almidón en los diferentes mutantes. Los rectángulos en blanco y negro corresponden con las 16 h de luz y 8 h de oscuridad (respectivamente) del ciclo de DL. Los rectángulos en gris son los días (16 h cada uno) que las bandejas estuvieron cubiertas para la completa eliminación del almidón acumulado.

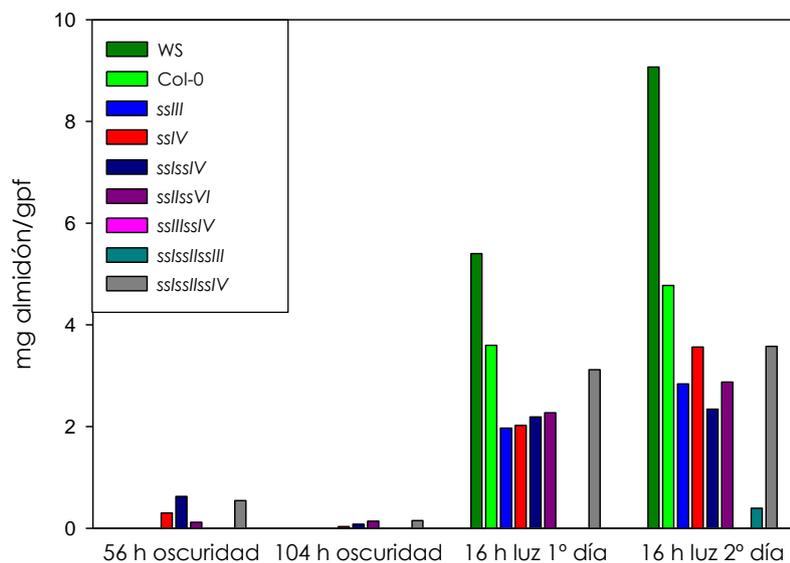


Figura 35. Contenido de almidón de los silvestres de ecotipo Col-0 y WS y los mutantes *ssIII*, *ssIV*, *sslsslV*, *sslsslV*, *sslsslV*, *sslsslIII* y *sslsslV* tras 56 y 104 h de oscuridad, a las 16 h de luz después de la incubación en oscuridad (104 h) y a las 16 h de luz del segundo día después de la incubación en oscuridad.

El primer dato a resaltar es que mientras las plantas WT, el mutante simple *sslIII* y el mutante triple *sslsslsslIII* no presentan almidón cuantificable tras 56 h de oscuridad, los mutantes carentes de SSIV - sin tener en cuenta el mutante *sslsslIV*, que no posee almidón cuantificable - poseen cierta cantidad de almidón aún después de 104 h de oscuridad (Figura 35). El siguiente dato observado es que el mutante *sslsslsslIII* - a diferencia del resto - aún carecía de almidón tras las primeras 16 h de luz (Figura 35 y Figura 36) y sólo al final del segundo día su contenido de almidón es cuantificable. Del mismo modo, Col-0 y *sslIII* parecen necesitar más de dos días para alcanzar sus niveles normales de almidón (Figura 35). La cinética de recuperación de los niveles normales de almidón es similar para Col-0, *sslIII* y *sslsslsslIII*, y sólo la de WS parece ser más rápida. Los datos indican, por tanto, que la recuperación de los niveles normales de almidón de los mutantes carentes de SSIV es más rápida que la de los mutantes carentes de otras SS o del WT, presumiblemente porque la degradación de almidón no es total tras los 4 días de oscuridad. Cómo se discutirá en la página **¡Error! Marcador no definido.**, este hecho podría relacionarse con la presencia de un "centro de nucleación" diferente al habitual en los mutantes carentes de SSIV. Por su parte en el WT y los mutantes *sslIII* y *sslsslsslIII*, el inicio del gránulo debe hacerse desde cero, lo cual implicaría la formación de un "complejo de iniciación" de la síntesis de almidón. SSIV sería de algún fundamental para la formación de dicho complejo.

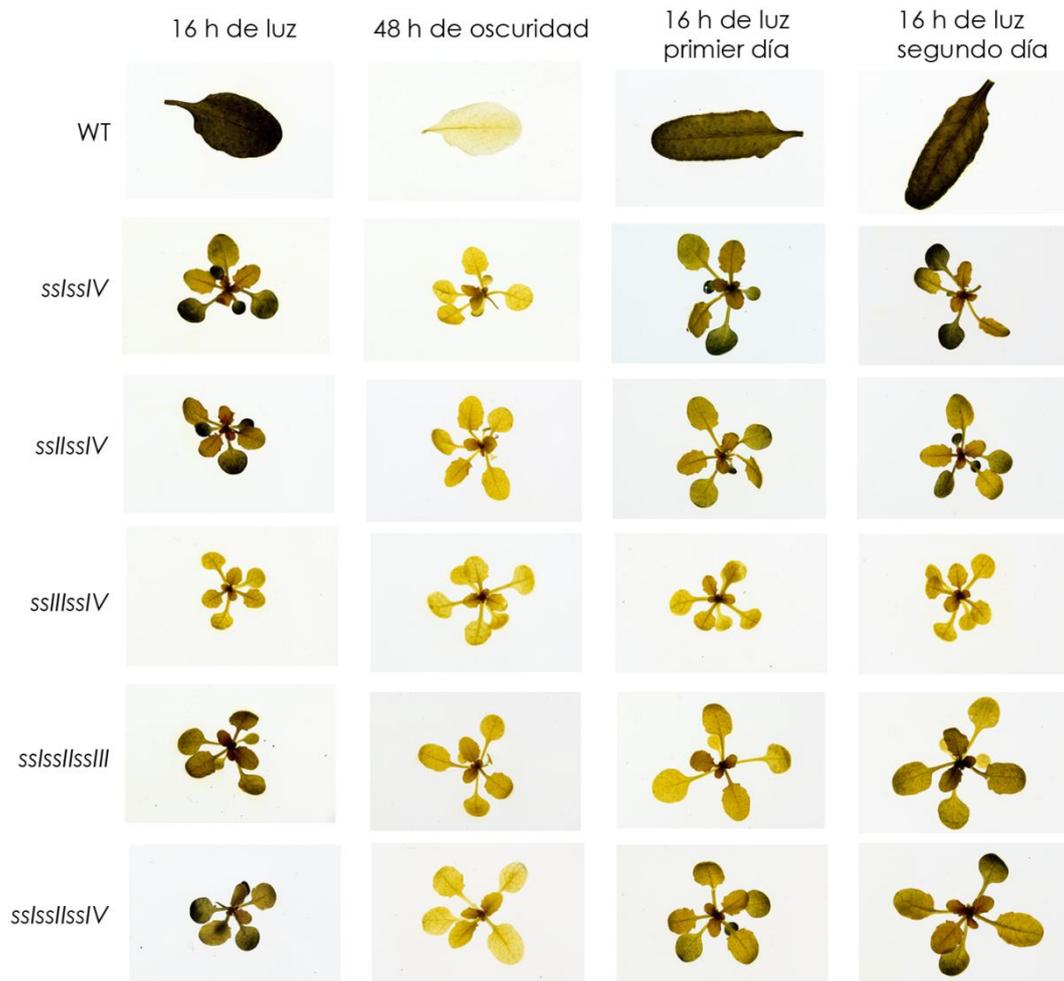


Figura 36. Tinción con lugol de hojas y plantas antes (columna 1) y después (columna 2) de la incubación en oscuridad durante 48 h, tras las primeras 16 h de luz (columna 3) y a las 16 h de luz del segundo día (columna 4).

Caracterización del doble mutante *ssIIIssIV*.

Parte de mi trabajo se ha centrado en la caracterización del mutante doble *ssIIIssIV*, el cual, cómo se puede ver en la Figura 18 y la Figura 20, es incapaz de acumular niveles cuantificables de almidón. En la Figura 37, puede verse que el doble mutante *ssIIIssIV* posee una tasa de crecimiento mucho menor que la del WT. Cuando uno compara este mutante con otros mutantes con niveles muy bajos (no detectables) de almidón, como *aps1* (Roldán *et al.*, 2007b) o *pgm1* (Ventriglia *et al.*, 2008), encuentra que ninguno tiene un fenotipo tan drástico como *ssIIIssIV*, de modo que la ausencia de un contenido de almidón cuantificable no es la responsable directa del fenotipo de *ssIIIssIV*, lo que nos llevó a preguntarnos por qué *ssIIIssIV* presentaba un fenotipo más drástico que estos otros mutantes (*aps1* y *pgm1*).

Comparación del crecimiento en día largo (DL), día corto (DC) y luz continua (LC).

El mutante doble *ssIIIssIV* fue crecido, junto a sus parentales, el WT y el mutante *aps1* (carente de la subunidad pequeña de la ADP-glucosa pirofosforilasa), bajo diferentes fotoperiodos (Figura 37): 16 h luz/8 h oscuridad (DL, día largo), 8 h luz/16 h oscuridad (DC, día corto) y 24 h luz/0 h oscuridad (LC, luz continua), con el objetivo de comparar el comportamiento del mutante *ssIIIssIV* con otro mutante con niveles no detectables de almidón. La ausencia de niveles detectables de almidón en los mutantes *ssIIIssIV* y *aps1* en los tres tipos de fotoperiodos se comprobó mediante tinción de hojas con lugol (Figura 39).

En la Figura 37 y la Figura 38 puede observarse el menor crecimiento de los mutantes *ssIV* y *ssIIIssIV* respecto al WT bajo cualquiera de los fotoperiodos – siendo el crecimiento de *ssIIIssIV* siempre menor que el de *ssIV* –, mientras que la mutación del gen *SS3* no parece tener un efecto deletéreo sobre el crecimiento – en nuestras condiciones experimentales de DL, las plantas mutantes *ssIII* crecieron mejor que las plantas WT. El mutante *aps1* presenta una menor tasa de crecimiento que el WT en condiciones de DC, pero el aumento del período de luz, potencia su crecimiento, de modo que su tasa de crecimiento en condiciones de DL o LC es prácticamente la misma que la observada en las plantas WT. El crecimiento de *ssIIIssIV*, en estas condiciones (DL y LC), se mantuvo severamente afectado, y el de *ssIV* se mantuvo intermedio entre el de *ssIIIssIV* y el de plantas WT. Estos resultados indican que el efecto nocivo observado en el crecimiento de *ssIIIssIV*, y en menor grado en *ssIV*, no es provocado por la deficiencia en la acumulación de almidón y podría ser consecuencia de otra alteración metabólica.

El mutante *aps1* presenta una menor tasa de crecimiento que el WT en condiciones de DC, pero en condiciones de DL y LC no se observan diferencias entre uno y otro (Figura 38).



Figura 37. Comparación del crecimiento en día largo (DL), día corto (DC) y luz continua (LC) del mutante *ssIIIssIV*, sus parentales *ssIII* y *ssIV*, el mutante *aps1* y el control WT Col-0. Las plantas fueron crecidas en fitotrones bajo fotoperiodos de 16 h luz / 8 h oscuridad (DL, primera columna), 8 h luz / 16 h oscuridad (DC, segunda columna) y 24 h luz / 0 h oscuridad (LC, tercera columna) y las fotos fueron tomadas a los 22 (DL), 28 (DC) y 18 (LC) días después de la siembra.

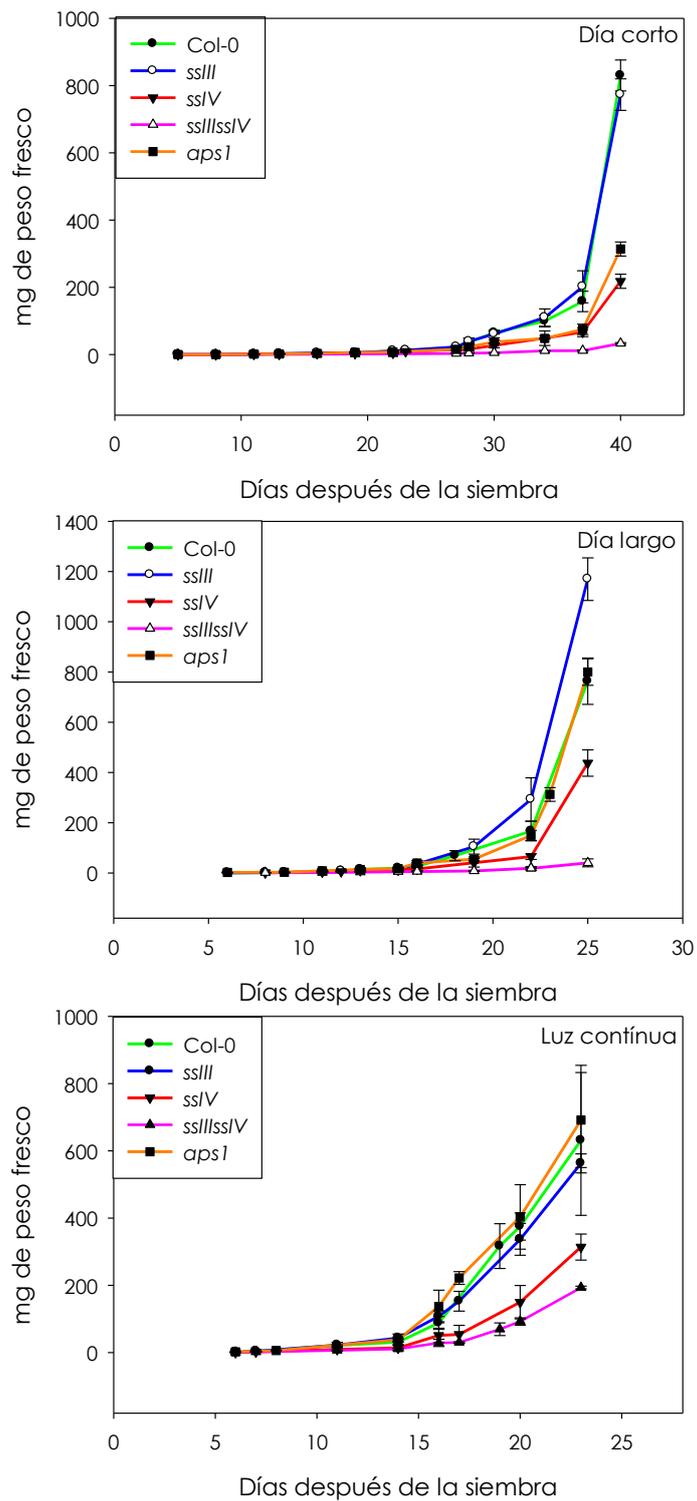


Figura 38. Curvas de crecimiento de Col-0, *sslIII*, *sslIV*, *sslIIIsslIV* y *apsI* crecidas bajo fotoperiodos de 16 h luz/8 h oscuridad (arriba, DL), 8 h luz/16 h oscuridad (centro, DC) y 24 h luz/0 h oscuridad (abajo, LC). El peso de la roseta fue determinado en diferentes días a lo largo del ciclo de vida. Cada punto es la media (\pm desviación estándar) del peso de 5-7 plantas.

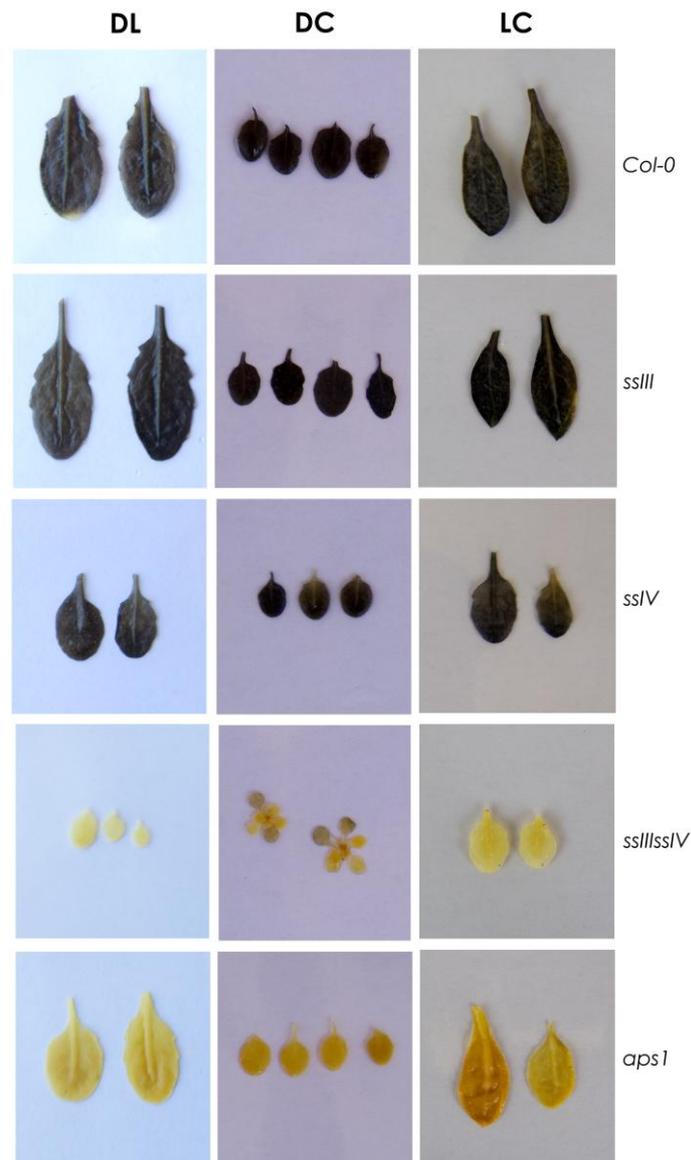


Figura 39. Comparación del contenido de almidón, mediante tinción con lugol, de Col-0, *sslIII*, *sslIV*, *sslIIIsslIV* y *aps1* cultivadas en fotoperiodos de 16 h luz/8 h oscuridad (DL, primera columna), 8 h luz/16 h oscuridad (DC, segunda columna) y 24 h luz/0 h oscuridad (LC, tercera columna). En los casos de DL y DC, las muestras se recogieron al final de los respectivos periodos de luz.

Análisis del contenido de almidón en cotiledones y raíces.

La tinción con lugol de plantas enteras del mutante *sslIIIsslIV* (Figura 39, columna central), reveló cierta acumulación de almidón en los cotiledones de dicho mutante, indicando que la síntesis de almidón en los cotiledones podría estar ocurriendo de modo diferente a como ocurre en los tejidos fotosintéticos. En la Figura 41 se puede ver claramente la diferencia en cuanto a contenido de almidón entre una hoja y un cotiledón del mutante *sslIIIsslIV*. Quisimos conocer la situación en el mutante *aps1* y, para ello, plantas jóvenes (9 días desde la siembra) silvestres (Col-0) y mutantes *sslIIIsslIV* y *aps1* fueron teñidas con lugol. Como vemos en la Figura 40, a diferencia de lo comentado para el doble mutante *sslIIIsslIV*, las plantas mutantes *aps1* no parecen

acumular almidón en los cotiledones (al menos no una cantidad detectable con este método). Por tanto, SSIII y SSIV no juegan un papel tan claro en la síntesis de almidón en los cotiledones.



Figura 40. Tinción con lugol de cotiledones de Col-0, *ssIIIssIV* y *aps1*. Las muestras fueron recogidas a los 9 días después de la siembra.

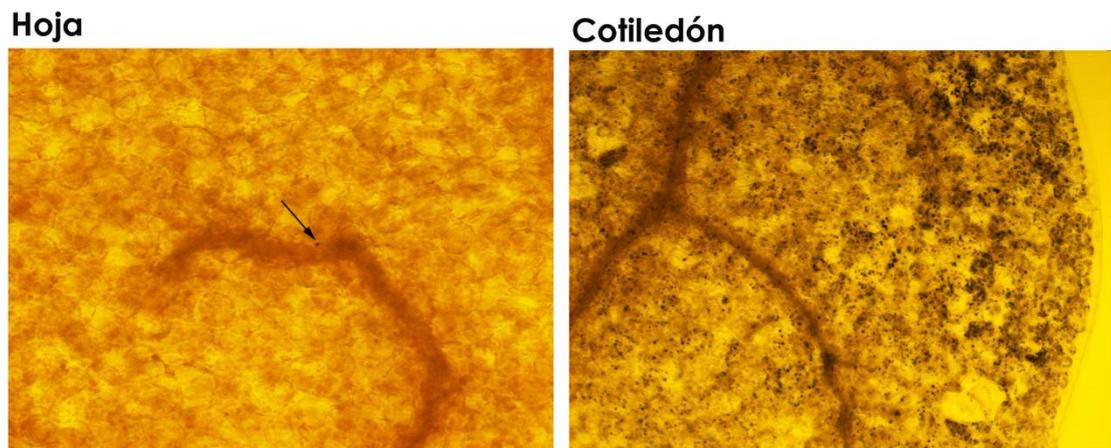


Figura 41. Imágenes de microscopía óptica de hoja y cotiledón del mutante doble *ssIIIssIV* teñidos con lugol. La flecha señala el único gránulo visible en este segmento de hoja.

Mediante tinción con lugol de raíces (Figura 42), se comprobó que *ssIIIssIV* carece de acumulación de almidón en las células de la columela, del mismo modo que lo descrito para el mutante *aps1* (Caspar *et al.*, 1985). De este modo, se confirma que la presencia de SSIII o SSIV es necesaria para la síntesis de almidón, no solo en los cloroplastos de los tejidos fotosintéticos, sino también en los plastos de tejidos no fotosintéticos.



Figura 42. Tinción de raíces del WT (Col-0) y el mutante doble *slllssIV* con lugol. Las plantas fueron crecidas en placas con medio MS y bajo un fotoperíodo de DC.

La ausencia de almidón en el ápice de la raíz podría estar afectando al gravitropismo del mutante. Para comprobarlo, se comparó el crecimiento de las raíces de éste con las del WT (Col-0) en plantas sembradas en placas de Petri estériles con medio MS o MS-sac (suplementado con sacarosa al 2 %) dispuesta verticalmente en el fitotrón. En la Figura 43 puede verse cómo el desarrollo de las raíces está muy afectado en el doble mutante creciendo en MS, mientras que en MS-sac se observa un buen desarrollo de las raíces y se hace evidente la incompleta respuesta a la gravedad del mismo. Como era de esperar, la ausencia de almidón afecta al gravitropismo de la planta.

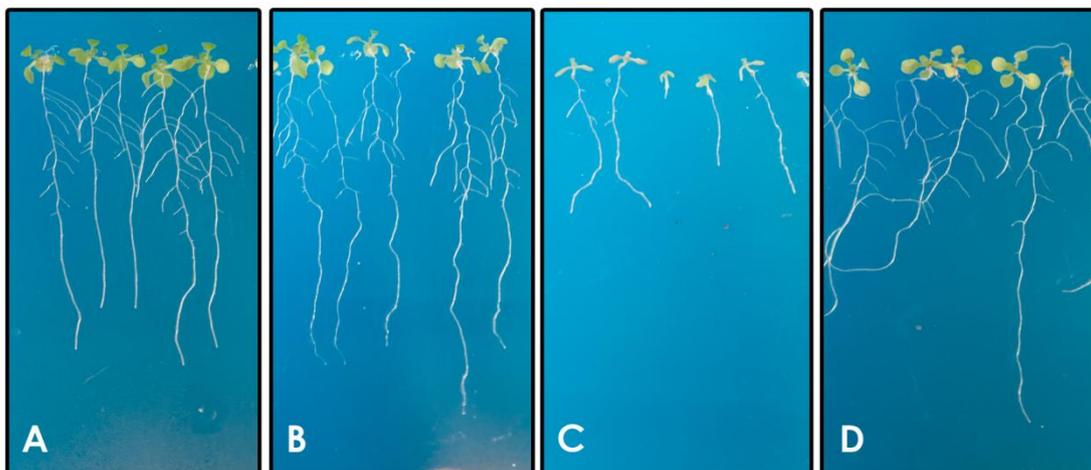


Figura 43. Crecimiento de raíces de Col-0 (A y B) y *slllssIV* (C y D) en placas de MS (A y C) y MS-sac (B y D) dispuestas verticalmente en fitotrón.

Contenido en azúcares.

Los niveles de glucosa, fructosa y sacarosa del mutante *ssIIIsslV* se muestran en la Figura 44, junto con los niveles de sus parentales y del mutante *aps1*. No encontramos diferencia significativa entre el mutante *ssIII* y el WT respecto a los niveles de glucosa, pero sí un incremento de los niveles en los mutantes *ssIV*, *ssIIIsslV* y, sobre todo, *aps1*. En cuanto a los niveles de fructosa no podemos decir que ninguno de los mutantes ensayados presente una alteración significativa de los mismos. Y, por último, en cuanto a los niveles de sacarosa, los mutantes *ssIII* y *aps1* presentan un incremento respecto al WT, mientras que en los mutantes *ssIV* y *ssIIIsslV* no observamos un cambio estadísticamente significativo.

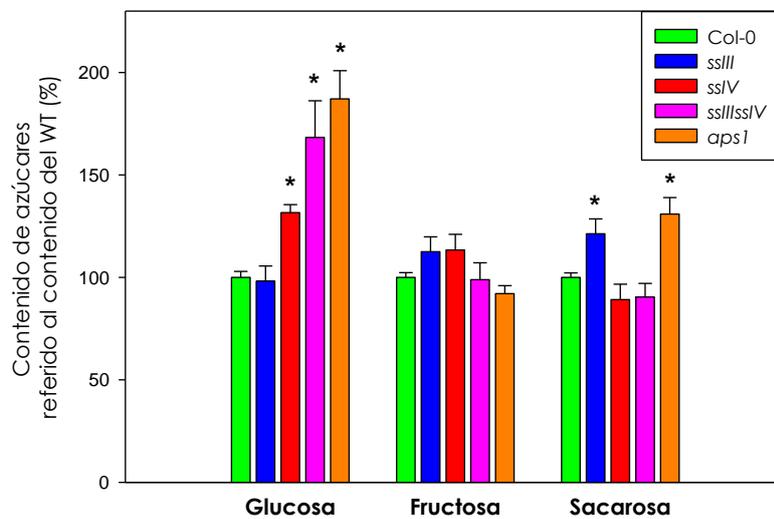


Figura 44. Niveles de azúcares de los mutantes *ssIII*, *ssIV*, *ssIIIsslV* y *aps1* respecto al WT. El contenido de azúcares fue determinado en extractos de plantas crecidas bajo un fotoperiodo de DL. Las hojas fueron cortadas a las 16 h de luz. Cada valor es la media (\pm error estándar de la media) de 4-6 extracciones diferentes.

Análisis del intercambio de gases mediante IRGA.

Continuando con la caracterización del mutante *ssllssIV*, se obtuvieron las curvas de fotosíntesis neta (A), transpiración (E) y conductancia estomática (g_s) en respuesta a intensidades crecientes de luz y a concentraciones crecientes de CO_2 en el interior de la hoja (C_i), para plantas crecidas bajo un fotoperíodo de DL, usando un analizador de intercambio de gases por infra-rojo (IRGA) portátil (LI-COR 6400).

Curvas de respuesta a luz del doble mutante *ssllssIV*.

En la Figura 45, se representan los datos de fotosíntesis neta (A), transpiración (E), concentración de CO_2 en el interior de la hoja (C_i) y conductancia estomática (g_s) obtenidos con el IRGA directa o indirectamente (ver materiales y métodos, página 78) para intensidades crecientes de luz (PAR) de Col-0, *sslll*, *ssIV* y *ssllssIV*.

La Figura 45A muestra la variación de la tasa de asimilación de CO_2 o de fotosíntesis neta (A) del WT y los mutantes en respuesta a las diferentes intensidades lumínicas, son las denominadas "curvas AQ". Se observa que, mientras la curva AQ del mutante *sslll* es idéntica a la del WT, los mutantes *ssIV* y *ssllssIV* presentan tasas de fijación de CO_2 inferiores a prácticamente cualquier intensidad lumínica; aproximadamente un 30 y un 75 % menor que la del WT, respectivamente, a partir de $1000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las curvas AQ de los mutantes *sslll*, *ssIV* y *ssllssIV* y del WT (Figura 45A) desvela el por qué los mutantes carentes de SSIV, sobre todo *ssllssIV*, poseen una menor tasa de crecimiento que el WT (o mutantes como *aps1*, ver Figura 54A en página 170): los mutantes *ssIV* poseen una menor tasa de fotosíntesis neta que el WT en las condiciones de cultivo (concentración de CO_2 atmosférica y una intensidad lumínica de 120-150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Como se mostrará más adelante (Figura 54A en página 170), el mutante *aps1*, en estas condiciones, posee aproximadamente la misma tasa de fotosíntesis neta que el WT.

La Figura 45C muestra el C_i estimado frente a PAR de los mutantes *sslll*, *ssIV* y *ssllssIV* y del WT (Col-0). Estas curvas son el reflejo de las curvas de A frente a PAR (Figura 45A): a medida que se incrementa la A, disminuye el C_i : el CO_2 intercelular está siendo fijado. El WT y el mutante *sslll*, que presentan las mayores tasas de fotosíntesis neta en condiciones de saturación lumínica (A_{sat}), presentan la mayor disminución de los niveles de C_i ; el mutante *ssIV* presenta una disminución de los niveles de C_i intermedia entre el WT y el mutante doble *ssllssIV*, así como su A_{sat} es intermedia entre los mismos; y el mutante *ssllssIV* presenta la menor disminución de los niveles de C_i respecto a PAR, lo cual se corresponde con su inferior A_{sat} . Los altos niveles de C_i del doble mutante nos indican que la baja tasa fotosintética de *ssllssIV* no es debida a la falta de CO_2 dentro de la hoja, sino a algún otro factor. La Figura 45 B y D muestran la transpiración (E) y la conductancia estomática (g_s) respecto a PAR. Aunque los valores de ambos parámetros no difieren mucho entre las cuatro líneas, se observa que a baja intensidad de luz (y sobre todo en oscuridad), los valores de E y g_s de los mutantes *ssIV* y *ssllssIV* son mayores que los del WT y el mutante *sslll*. El incremento de la intensidad de luz provoca el incremento de ambos parámetros en los casos del WT y el mutante *sslll*, mientras que en el caso del mutante *ssIV*, E y g_s se

mantiene aproximadamente constantes, y en el caso del mutante *ssIIIssIV*, se observa una caída de los mismos con el incremento de la intensidad lumínica. Este diferente comportamiento con respecto al WT (o, como se mostrará más adelante, el mutante *aps1*; Figura 54B y Figura 54C en página 170), en cuanto a la variación de la tasa de transpiración y la conductancia estomática con el incremento de PAR, podría estar reflejando una respuesta diferente a la luz a nivel estomático de los mutantes carentes de SSIV.

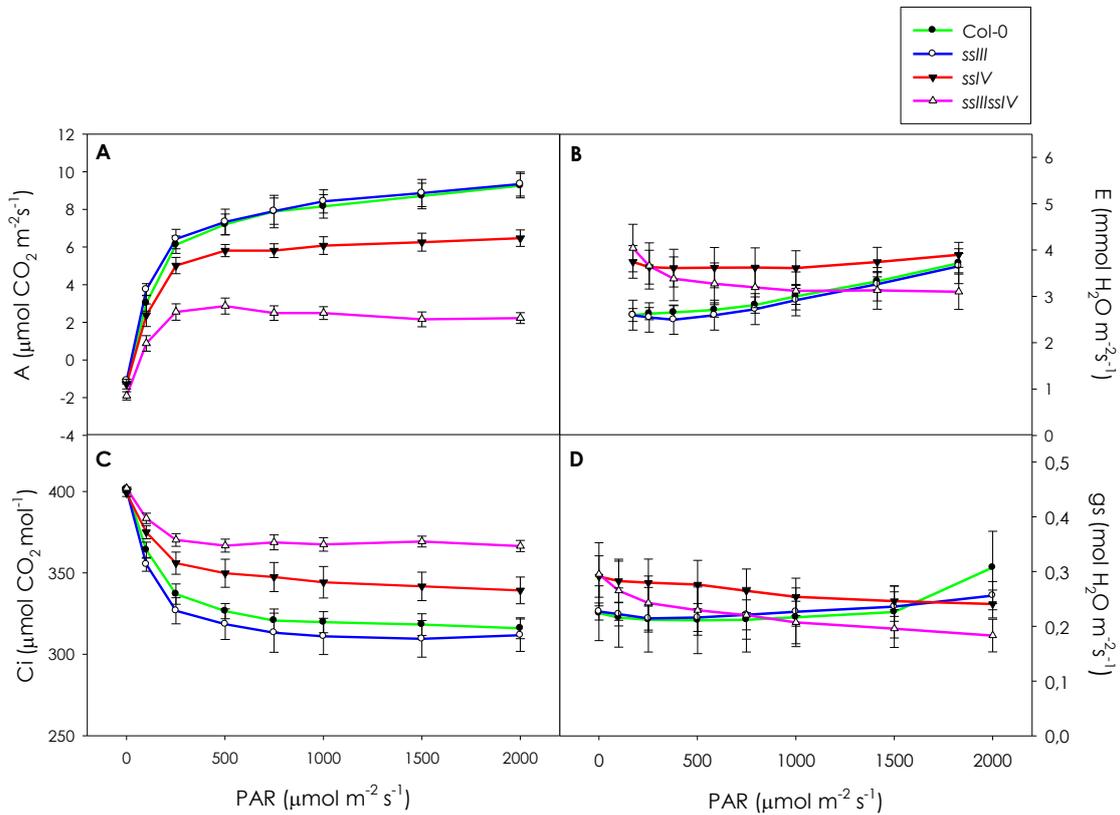


Figura 45. Curvas de respuesta a luz del mutante *ssIIIssIV* en comparación con sus parentales, los mutantes simples *ssIII* y *ssIV*, y el WT: (A) tasa de fijación de CO_2 o fotosíntesis neta, A; (B) tasa de transpiración, E; (C) concentración de CO_2 subestomática, C_i ; y (D) conductancia estomática, g_s . Cada curva consta de 8 puntos y cada punto es la media de 4 medidas (4 plantas independientes) para cada genotipo. La barra de error corresponde al error estándar de la media.

El análisis de las curvas AQ con el programa de análisis complementario Photosyn Assistant nos permitió estimar los parámetros recogidos en la Tabla 16. Los valores de respiración mitocondrial aparente, R_{day} , estimados para los mutantes simples *ssIII* ($-0,93 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y *ssIV* ($-1,13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) son similares a los del WT ($-1,00 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sin embargo, en el caso del mutante *ssIIIssIV* ($-1,96 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), el valor de R_{day} es casi el doble que en el WT, probablemente como consecuencia de una carencia de energía, dada la ausencia de síntesis de almidón. Los valores de R_{day} estimados para el mutante *aps1* son también superiores a los del WT (1,4 veces; ver Tabla 21 en página 170). Esta diferencia entre el mutante *ssIV* y los mutantes *ssIIIssIV* y *aps1* podría deberse a que, en el momento de la medida en oscuridad, el mutante *ssIV* al poseer almidón, dependen de la degradación de éste para el aporte de azúcares que degradar (al igual que el WT), mientras que los mutantes *ssIIIssIV* y *aps1* poseen un mayor contenido de azúcares solubles que son consumidos a mayor velocidad.

Si comparamos el punto de compensación por luz (Γ_i , la intensidad de luz a la cual la velocidad de fotosíntesis y la de respiración/fotorrespiración se igualan), estimado mediante Photosyn Assistant (Tabla 16), de los mutantes respecto al WT, vemos que para el mutante simple *ssIII* ($14,80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) es prácticamente igual al WT ($15,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mientras que para los mutantes simple *ssIV* ($32,87 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y doble *ssIIIssIV* ($69,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) es aproximadamente 2 y 4,5 veces superior (respectivamente) al del WT, lo cual puede ser debido a una menor eficiencia de las reacciones lumínicas y/o una mayor tasa de respiración/fotorrespiración de estos mutantes.

Para intensidades lumínicas superiores al punto de compensación por luz, como se explicó en materiales y métodos (página 79), el incremento de A es proporcional al incremento de PAR. La pendiente de esta recta nos indica la eficiencia cuántica aparente (AQE o ϕ) (Ventriglia *et al.*, 2008). Al igual que ocurre con el punto de compensación, la AQE del WT y del mutante *ssIII* son similares ($0,065 \mu\text{mol CO}_2/\mu\text{mol fotones}$ y $0,062 \mu\text{mol CO}_2/\mu\text{mol fotones}$ respectivamente), mientras que la del mutante *ssIV* ($0,034 \mu\text{mol CO}_2/\mu\text{mol fotones}$) es la mitad que la del WT y la del mutante *ssIIIssIV* ($0,025 \mu\text{mol CO}_2/\mu\text{mol fotones}$) es aproximadamente 2,5 veces inferior. Una AQE inferior a la del WT, indica que factores como la cadena de transporte de electrones, la actividad de la Rubisco o el metabolismo de las triosas-P pudieran ser limitantes en estos mutante (Habermann *et al.*, 2003b). Para intensidades lumínicas mayores, la A se satura y alcanza un valor máximo, A_{sat} . Aunque el punto de saturación por luz (intensidad lumínica a partir de la cual no hay incremento de A con el incremento de PAR) no ha sido estimado, en la Figura 45A se puede observar que el doble mutante *ssIIIssIV* se satura a una menor intensidad lumínica que el WT y los mutantes *ssIII* y *ssIV*. Como se recoge en la Tabla 16, no hay diferencias significativas entre el WT y el mutante *ssIII* en cuanto a A_{sat} ($10,57$ y $10,63 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente). En el caso de los mutantes *ssIV* y *ssIIIssIV*, sin embargo, la A_{sat} es, respectivamente, un 35 ($6,87 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y un 76 % ($2,51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inferiores a la del WT ($10,57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), lo cual indica una menor velocidad de las reacciones de fijación de carbono (ciclo de Calvin) a la concentración de CO_2 ensayada.

Como se mostrará más adelante (Tabla 21 en página 170) el mutante *aps1* también posee una A_{sat} inferior a la del WT (un 34,5 % inferior), indicando que, para altas intensidades lumínicas la velocidad del ciclo de Calvin limita la velocidad de fotosíntesis neta. Si comparamos las A_{sat} de *ssIIIssIV* y *aps1*, vemos que pese a que ambos poseen un contenido prácticamente nulo de almidón, la velocidad de fijación de CO_2 (a intensidad lumínica saturante) está más limitada en el mutante *ssIIIssIV* que en el mutante *aps1*, indicando que la disminución de la velocidad del ciclo de Calvin tiene motivos diferentes en estos mutantes.

	A_{sat} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	AQE ($\mu\text{mol CO}_2/\mu\text{mol}$ fotones)	R_{day} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Γ_i ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Col-0	10,57 ± 0,64	0,065 ± 0,003	-1,00 ± 0,07	15,15 ± 1,08
ssIII	10,63 ^a ± 0,32	0,062 ^a ± 0,002	-0,93 ^a ± 0,07	14,80 ^a ± 1,48
ssIV	6,87 ^b ± 0,39	0,034 ^b ± 0,002	-1,13 ^a ± 0,07	32,87 ^b ± 0,17
ssIIIssIV	2,51 ^b ± 0,52	0,025 ^b ± 0,001	-1,96 ^b ± 0,04	69,75 ^b ± 8,96

Tabla 16. Parámetros estimados con Photosyn Assistant a partir de los valores de las curvas AQ. Los parámetros se calculan para 4 curvas (4 plantas independientes) para cada genotipo y se presentan las medias ± error estándar de la media. ^a indica que no hay diferencia significativa con respecto al WT ($p \geq 0,05$). ^b indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$).

Curvas de respuesta a C_i del doble mutante *ssIIIssIV*.

En la Figura 46 se representan los datos de fotosíntesis neta (A), transpiración (E) y conductancia estomática (g_s) obtenidos con el IRGA directa o indirectamente (ver materiales y métodos, página 78) para concentraciones crecientes de CO_2 en el interior de la hoja (C_i) de Col-0, *ssIII*, *ssIV* y *ssIIIssIV*.

La Figura 46A muestra la variación de la tasa de asimilación de CO_2 en respuesta al incremento del C_i del WT y los mutantes, son las denominadas "curvas A/ C_i ". A primera vista, se puede observar que los mutantes *ssIV* y, especialmente, *ssIIIssIV* poseen menor tasa fotosintética que el WT a cualquier C_i , mientras que el mutante *ssIII* presenta valores idénticos a los del WT a bajas concentraciones de C_i y ligeramente inferiores a altas. La Figura 46 B y C muestran la transpiración (E) y la conductancia (g_s) respecto al C_i . Se observa que el mutante *ssIII* no presenta un comportamiento diferente al del WT, ambos presentan un ligero incremento de E y g_s con la concentración de C_i . La misma tendencia se observa en el mutante *ssIV*, aunque los valores de ambos parámetros son más bajos para este mutante que para el WT o el mutante *ssIII* a cualquier C_i . Sin embargo, la E y la g_s de *ssIIIssIV* presentan una tendencia totalmente diferente: ambos parámetros caen drásticamente con el incremento de C_i . La disminución de E y g_s probablemente se deba al cierre de estomas en respuesta al incremento de C_i en el mutante *ssIIIssIV*. Este comportamiento no se observa tampoco en el mutante *aps1* (Figura 55 B y C) y podría indicar, como será discutido más adelante (ver página 239), que la "ausencia" de síntesis de almidón es detectada de manera diferentes en los mutantes *aps1* y *ssIIIssIV*.

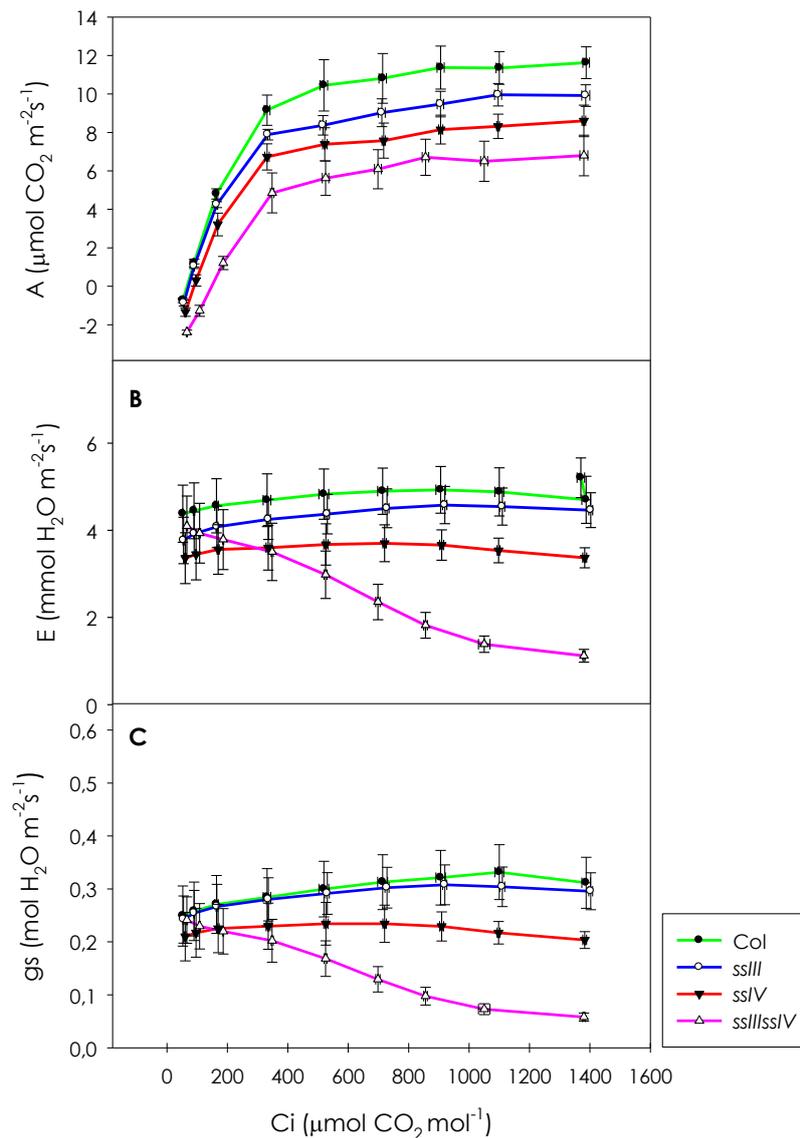


Figura 46. Curvas de respuesta a C_i del mutante *ssl/IIIssl/V* en comparación con sus parentales, los mutantes simples *ssl/III* y *ssl/V*, y el WT: (A) tasa de fotosíntesis, A ; (B) tasa de transpiración, E ; y (C) conductancia estomática, g_s . Cada curva consta de 8 puntos y cada punto es la media de 4 medidas (4 plantas independientes) para cada genotipo. La barra de error corresponde al error estándar de la media.

Si comparamos los valores de A_{max} , estimados con el programa de análisis complementario Photosyn Assistant (Tabla 17), para el WT ($11,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y el mutante *ssl/III* ($10,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no encontramos diferencias significativas, sin embargo, se estiman valores inferiores a los del WT en el caso del mutante *ssl/V* ($8,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y del mutante *ssl/IIIssl/V* ($6,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), aproximadamente un 30 y un 40 % inferiores respectivamente. En cuanto al punto de compensación por CO_2 (Tabla 17) de los mutantes respecto al WT ($69,24 \mu\text{mol mol}^{-1}$), vemos que para el mutante simple *ssl/III* ($78,90 \mu\text{mol mol}^{-1}$) no se obtiene un valor significativamente diferente, mientras que para los mutantes *ssl/V* ($92,69 \mu\text{mol mol}^{-1}$) y *ssl/IIIssl/V* ($148,90 \mu\text{mol mol}^{-1}$) se estiman valores superiores al del WT (aproximadamente 1,34 y 2,15 veces superiores respectivamente), lo cual indica la necesidad de una mayor concentración de CO_2 intercelular para que la tasa de

fijación de CO₂ supere a las tasas de respiración/fotorrespiración. Los cambios en el punto de compensación pueden ser debidos a modificaciones en la emisión de CO₂ (respiratoria y/o fotorrespiratoria) y/o a cambios en la asimilación (Habermann *et al.*, 2003a).

	A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Punto de compensación por CO₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
Col-0	11,2 ± 0,82	69,24 ± 8,88
sslIII	10,0 ^a ± 0,80	78,90 ^a ± 5,61
sslV	8,0 ^b ± 0,61	92,69 ^b ± 2,41
sslIIIsslV	6,8 ^b ± 0,96	148,90 ^b ± 7,02

Tabla 17. Parámetros estimados con Photosyn Assistant a partir de los valores de las curvas A/Ci. Los parámetros se calculan para 3-4 curvas (3-4 plantas independientes) para cada genotipo y se presentan las medias ± error estándar de la media. ^a indica que no hay diferencia significativa con respecto al WT ($p \geq 0,05$). ^b indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$).

	V_{cmax} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	TPU ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	R_d ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	g_m ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)
Col-0	35,37 ± 1,74	4,14 ± 0,08	1,58 ± 0,11	30 ± 0,00
sslIII	36,03 ^a ± 1,38	3,69 ^a ± 0,20	1,79 ^a ± 0,25	30 ^a ± 0,00
sslV	32,14 ^a ± 1,76	3,66 ^a ± 0,09	2,48 ^b ± 0,13	30 ^a ± 0,00
sslIIIsslV	24,01 ^b ± 2,50	3,65 ^a ± 0,30	3,54 ^b ± 0,29	30 ^a ± 0,00

Tabla 18. Parámetros V_{cmax}, TPU, R_d y g_m estimados para Col-0, sslIII, sslV y sslIIIsslV. Los parámetros se calculan para 3-4 curvas (3-4 plantas independientes) para cada genotipo y se presentan las medias ± error estándar de la media. ^a indica que no hay diferencia significativa con respecto al WT ($p \geq 0,05$). ^b indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$).

La tasa de carboxilación máxima permitida por la Rubisco (V_{cmax}), el uso de las triosas fosfato (TPU), la tasa de respiración mitocondrial (R_d) y la conductancia del mesófilo (g_m) fueron estimadas para el mutante doble sslIIIsslV y sus parentales (Tabla 18), gracias al software diseñado para Excel por Sharkey y col. (Lawlor & Cornic, 2002). Como muestra la Tabla 18, no hay diferencias significativas en cuanto a V_{cmax} entre el WT y los mutantes simples, pero es menor a la del WT en el mutante doble sslIIIsslV. Esta inferior V_{cmax} es indicativa de una menor actividad de la enzima Rubisco (por ejemplo, ocurre ante un factor de estrés o senescencia), lo cual puede ocurrir como consecuencia de procesos de fotoinhibición. No hay diferencias entre los valores estimados de TPU y g_m de los mutantes con respecto al WT, indicando que estos factores no son limitantes y no afectarían a la fijación de CO₂. El mutante sslIII (1,79 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) presenta la misma R_d que el WT (1,58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), pero los mutantes sslV (2,48 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y sslIIIsslV (3,54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) presentan una R_d 1,5 y 2,2 veces superiores respectivamente, lo cual explicaría la menor A_{max} de estos mutantes ($A_{\text{max}} = 3 \text{ TPU} - R_d$).

Análisis de la emisión de fluorescencia mediante PAM.

Con objeto de completar el estudio de los procesos fotosintéticos, se llevó a cabo el análisis de la emisión de fluorescencia mediante el sistema PAM, lo cual nos permitió calcular el rendimiento cuántico máximo del PSII, el rendimiento cuántico efectivo del PSII a diferentes intensidades lumínicas y la contribución relativa al apantallamiento de los procesos de atenuación no fotoquímica (regulados y no regulados), así como analizar las cinéticas de inducción-relajación de los procesos de NPQ.

Rendimiento cuántico máximo del PSII.

El análisis de la emisión de fluorescencia de plantas adaptadas a oscuridad permitió la obtención del parámetro F_v/F_m , que aunque no debe ser considerado como un valor rigurosamente cuantitativo, resulta una medida relativa del rendimiento cuántico máximo del PSII. La Tabla 19 muestra los valores obtenidos para los mutantes *ssIII*, *ssIV* y *ssIIIssIV* junto a su WT (Col-0). Como vemos, todos los mutantes poseen un valor de F_v/F_m inferior al WT de manera estadísticamente significativa, sin embargo, solo los mutantes *ssIV* y *ssIIIssIV* poseen un valor fuera del rango que se considera normal para este parámetro (Sharkey *et al.*, 2007; Maxwell & Johnson, 2000). El menor rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m) de estos mutantes indica la existencia de daño en el aparato fotosintético (Brooks & Niyogi, 2011) y/o de mecanismos de fotoprotección (Bilger *et al.*, 1995). La caída de los niveles de clorofilas y carotenos, junto con el incremento de antocianinas, provocarían la **caída de F_v/F_m en el caso de los mutantes *ssIV* y *ssIIIssIV*.**

	F_v/F_m (\pm se)	
Col-0	0,817	\pm 0,002
<i>ssIII</i>	0,801 ^b	\pm 0,001
<i>ssIV</i>	0,754 ^b	\pm 0,009
<i>ssIIIssIV</i>	0,632 ^b	\pm 0,040

Tabla 19. Valores de F_v/F_m obtenidos para Col-0, *ssIII*, *ssIV* y *ssIIIssIV*. Las plantas fueron adaptadas a oscuridad y la emisión de fluorescencia basal (F_0) y máxima (F_m) fueron obtenidas mediante el sistema PAM. F_v es calculada como $F_m - F_0$. Se presenta el valor medio \pm error estándar de la media de tres medidas independientes. ^b indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$).

Como se mostrará más adelante (Tabla 24, página 174), el mutante *aps1* posee un F_v/F_m estadísticamente inferior al del WT, pero dentro de lo que podemos considerar normal, lo cual se reflejaría también en las modificaciones a nivel de pigmentos de éste mutante (ver página 167). *aps1* posee un menor contenido de clorofilas que el WT y un mayor contenido de antocianinas, pero la variación con respecto al WT es mucho menor que la del mutante *ssIIIssIV*.

Curvas de inducción-relajación de NPQ ('Quenching' no fotoquímico).

Las curvas de inducción-relajación de NPQ obtenidas mediante el sistema PAM nos permiten comparar cambios en la contribución relativa de las reacciones fotoquímicas del PSII y la atenuación no fotoquímica al apantallamiento total de la fluorescencia. La Figura 47 representa el rendimiento cuántico efectivo del PSII (ϕ_{PSII} ; Panel superior), el rendimiento de la atenuación no fotoquímica inducible por luz (ϕ_{NPQ} ; Panel medio) y el rendimiento de la atenuación no fotoquímica no regulada (ϕ_{NO} ; Panel inferior) de los mutantes *sslIII*, *sslIV* y *sslIIIsslIV*, junto al WT (*Col-0*), en condiciones de inducción de NPQ con luz actínica o sin luz actínica. Podemos ver que, aunque la respuesta a luz actínica/no actínica de los mutantes sigue la misma cinética que la del WT en todos los casos, la contribución relativa al apantallamiento total es diferente en el caso del mutante *sslIIIsslIV*, que presenta un menor ϕ_{PSII} (tanto en luz actínica como no actínica) y una mayor contribución relativa de los procesos de NPQ (mayor ϕ_{NPQ} y, sobre todo, mayor ϕ_{NO}).

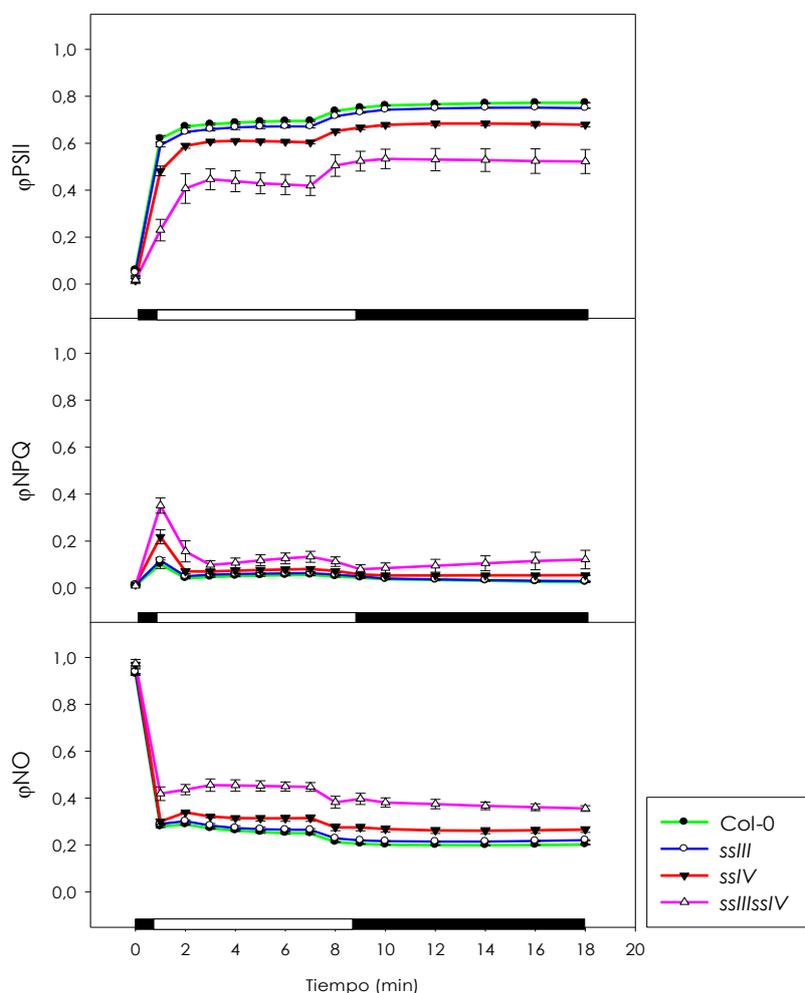


Figura 47. Curvas de inducción-relajación de NPQ de *Col-0*, *sslIII*, *sslIV* y *sslIIIsslIV*. Se representan el rendimiento cuántico efectivo del PSII (ϕ_{PSII} ; Panel superior), el rendimiento de la atenuación no fotoquímica inducible por luz (ϕ_{NPQ} ; Panel medio) y el rendimiento de la atenuación no fotoquímica no regulada (ϕ_{NO} ; Panel inferior). La barra blanca indica cuando la luz actínica (75 μE) está encendida y la barra negra, cuando está apagada. Cada punto corresponde con la media de tres medidas independientes y la barra de error corresponde al error estándar de la media.

Curvas de luz.

La Figura 57 muestra los cambios en la contribución relativa de las reacciones fotoquímicas del PSII y los procesos de NPQ (regulados y no regulados) al apantallamiento total de la fluorescencia a diferentes intensidades de luz actínica. Aunque las tendencias de los tres mutantes son similares, observamos un menor ϕ_{PSII} del mutante *ssIIIssIV* que el resto de líneas principalmente a intensidades de luz entre 0 y 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El menor ϕ_{PSII} se corresponde con un mayor ϕ_{NO} , pero no con un mayor ϕ_{NPQ} respecto al WT o los mutantes *aps1* y *aps1ssIIIssIV*.

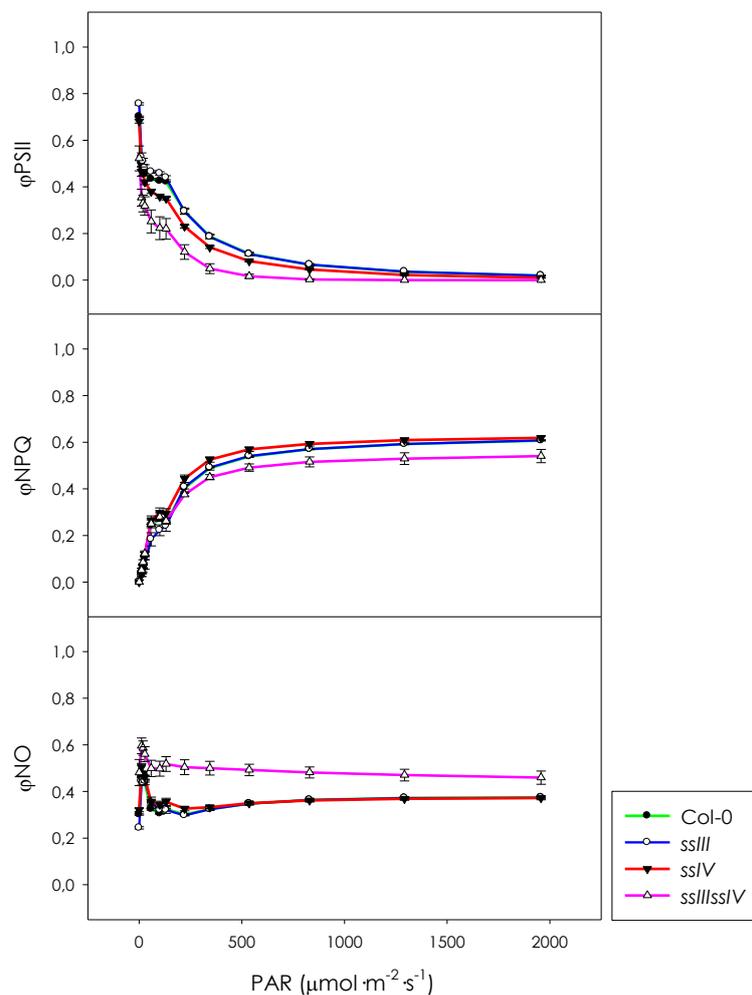


Figura 48. Curvas de luz de Col-0, *aps1*, *ssIIIssIV* y *aps1ssIIIssIV*. Se representan el rendimiento cuántico efectivo del PSII (ϕ_{PSII} ; Panel superior), el rendimiento de la atenuación no fotoquímica inducida por luz (ϕ_{NPQ} ; Panel medio) y el rendimiento de la atenuación no fotoquímica no regulada (ϕ_{NO} ; Panel inferior) a diferentes intensidades de luz actínica. Cada punto corresponde con la media de tres medidas independientes y la barra de error corresponde al error estándar de la media.

Como se explicó en materiales y métodos (página 86), ϕ_{PSII} es equivalente al rendimiento cuántico del flujo de electrones (LEF) a través del PSII, lo cual, permite estimar la tasa de transporte no cíclico de electrones (ETR). Sin embargo, la estimación de ETR por el software del PAM no es válida para el mutante *ssIIIssIV* por poseer un alto contenido de antocianinas

(pigmentos no fotosintéticos) (Osmond *et al.*, 1999) y, por ello, no se ha incluido en la Figura 57 la curva de ETR frente a PAR. No obstante, podemos comparar el rendimiento cuántico del flujo de electrones de las diferentes líneas a partir de los valores de ϕ PSII y concluir un menor rendimiento del mismo en el mutante *ssIIIssIV* que en el WT, es decir, el flujo de electrones a través del PSII se ve limitado en el mutante *ssIIIssIV* a intensidades de luz inferiores al resto (Figura 45).

Niveles de estrés oxidativo.

Con el objetivo de saber si los niveles de estrés oxidativo podían explicar las características descritas del mutante *ssIIIssIV*, tres medidas fueron realizadas: nivel de carbonilación de proteínas, nivel de peroxidación lipídica y contenido en peróxido de hidrógeno. Estas tres medidas nos indican el nivel de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el daño producido por las mismas.

	Nivel de carbonilación proteica (intensidad relativa)	Nivel de peroxidación lipídica (% respecto al WT)	Contenido en peróxido de hidrógeno (nmoles H ₂ O ₂ /gpf)
Col-0	3,06 ± 0,38	100,00 ± 3,09	13,49 ± 0,69
<i>ssIII</i>	3,03 ^a ± 0,30	78,42 ^b ± 3,94	12,89 ^a ± 0,86
<i>ssIV</i>	3,23 ^a ± 0,56	140,28 ^b ± 8,94	13,56 ^a ± 1,25
<i>ssIIIssIV</i>	3,23 ^a ± 0,44	210,51 ^b ± 32,95	16,49 ^b ± 0,52
<i>aps1</i>	4,19 ^a ± 0,67	199,17 ^b ± 13,46	19,56 ^b ± 0,47

Tabla 20. Valores de los tres parámetros de estrés oxidativo ensayados para el WT, los mutantes simples *ssIII*, *ssIV* y *aps1* y el mutante doble *ssIIIssIV*. Cada valor es la media (\pm error estándar de la media) del valor obtenido para 3-6 ensayos.

Como se resume en la Tabla 20, no hay diferencia significativa entre el WT y ninguno de los mutantes con respecto al nivel de carbonilación proteica. Sin embargo, el mutante *ssIII* presenta un menor nivel de peroxidación lipídica (78,42 %) que el WT y los mutantes *ssIV*, *ssIIIssIV* y *aps1* presentan un nivel mayor (140,28 %, 210,51 % y 199,17 % respectivamente) que el mismo. En cuanto al contenido en peróxido de hidrógeno, no se observan diferencias entre los mutantes *ssIII* (12,89 nmoles H₂O₂/gpf) y *ssIV* (13,56 nmoles H₂O₂/gpf) y el WT (13,49 nmoles H₂O₂/gpf), mientras que los mutantes *ssIIIssIV* y *aps1* presentan un mayor contenido que el mismo (16,49 y 19,56 nmoles H₂O₂/gpf respectivamente). Aunque el mutante *ssIIIssIV* si presenta un mayor nivel de estrés oxidativo que el WT, éste no difiere prácticamente del nivel observado en el mutante *aps1* y, por tanto, el fenotipo del mutante *ssIIIssIV* no puede ser explicado como consecuencia del mayor nivel de estrés oxidativo.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL TRIPLE MUTANTE *APS1SSIIISSIV*.

Los datos de las curvas de fotosíntesis neta en respuesta a luz del mutante *ssIIIssIV*, nos permiten explicar la menor tasa de crecimiento encontrada en el mismo como resultado de una menor capacidad de fijación de CO₂ en las condiciones de crecimiento. Dado que la ausencia de almidón no parecía ser la responsable directa de esta menor tasa de fotosíntesis neta (por comparación con el mutante *aps1*), nos planteamos dos posibilidades: (1) que la ausencia de SSIV y SSIII estuviese impidiendo el funcionamiento de algún otro proceso, el cual afectase a la actividad fotosintética o (2) que la incapacidad de sintetizar gránulos de almidón estuviese provocando la acumulación de ADP-Glc (sustrato), lo cual provocaría, directa o indirectamente, una inhibición de la fotosíntesis y un menor crecimiento. Para testar esta hipótesis decidimos obtener el triple mutante *aps1ssIIIssIV*, de modo que, si el triple mutante presentaba un fenotipo *ssIIIssIV*, la opción (2) no sería cierta, mientras que, si el triple mutante tenía fenotipo *aps1*, la opción (2) sería correcta: la mutación *aps1* revertiría el efecto de la acumulación de ADP-Glc.

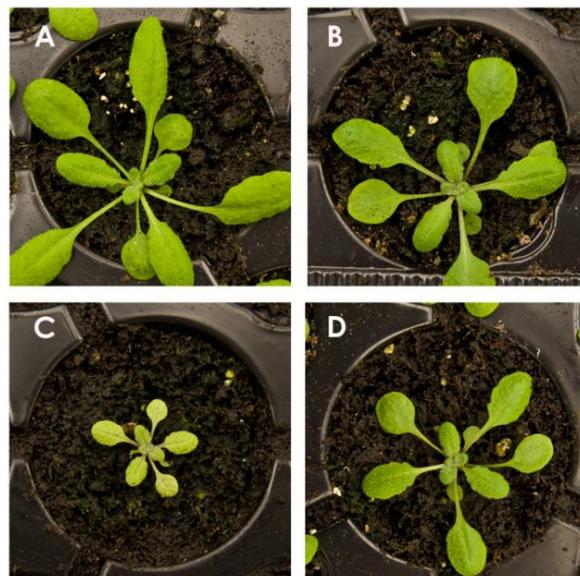


Figura 49. Fotos del WT ecotipo Col (A), el mutante simple *aps1* (B), el mutante doble *ssIIIssIV* (C) y el triple mutante *aps1ssIIIssIV* (D). Las plantas se crecieron en condiciones de DL en una cámara de crecimiento de plantas. Las fotos fueron tomadas aproximadamente 23 días después de la siembra.

Obtención del triple mutante.

El mutante triple *aps1sslsslV* fue obtenido mediante el cruce del mutante simple *aps1* (Baker, 2008) y el mutante doble *sslsslV* (Ventriglia *et al.*, 2008), ambos de ecotipo Col-0. La selección de los dobles mutantes homocigotos se hizo mediante PCR de DNA genómico usando los cebadores descritos en la Tabla 10.

Curva de crecimiento en condiciones de día largo (DL).

El crecimiento del triple mutante *aps1sslsslV* fue comparado con el de sus parentales (*aps1* y *sslsslV*) y su WT (Col-0).

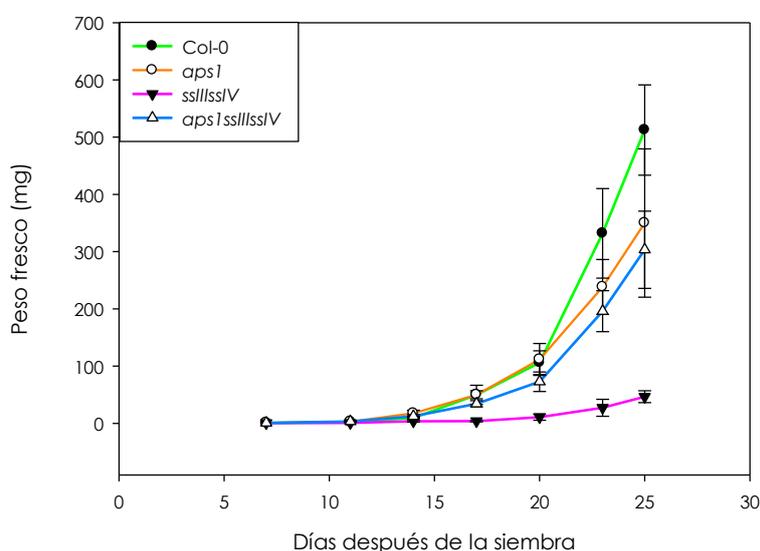


Figura 50. Curva de crecimiento del mutante *aps1sslsslV*, sus parentales y el WT (Col-0). Las plantas fueron crecidas bajo un fotoperiodo de DL (en cámara de crecimiento de plantas) y el peso de la roseta fue determinado en diferentes días a lo largo del ciclo de vida. Cada punto es la media (\pm desviación estándar) del peso de 5-7 plantas.

Como puede verse en las Figura 49 y Figura 50, en estas condiciones de fotoperiodo el mutante *aps1sslsslV* presenta una tasa de crecimiento prácticamente idéntica a la del mutante *aps1*. Ambos crecen mejor que el mutante *sslsslV* y ligeramente peor que el WT.

Ausencia de almidón en el triple mutante *aps1sslsslV*.

La ausencia de almidón en el triple mutante *aps1sslsslV* se comprobó mediante tinción con lugol. Como se observa en la Figura 51, el triple mutante, al igual que sus parentales (*aps1* y *sslsslV*), carece de niveles detectables de almidón.

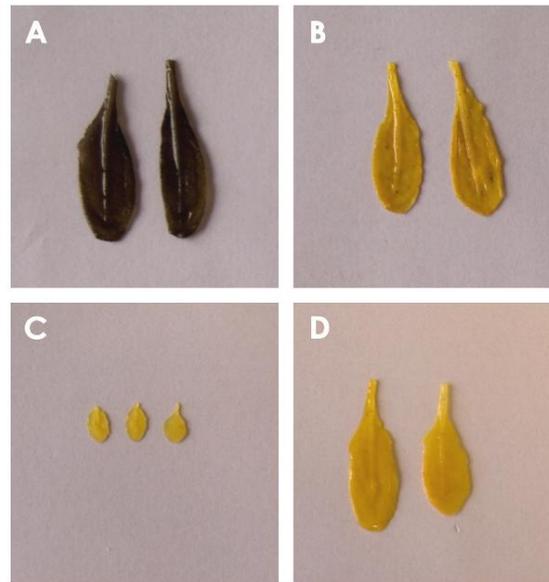


Figura 51. Tinción con lugol de hojas de Col-0 (A), *aps1* (B), *ssl/sslIV* (C) y *aps1ssl/sslIV*. Las plantas fueron crecidas bajo fotoperíodo de DL y las hojas cortadas a las 16 h de luz.

Pese a carecer los tres mutantes de niveles detectables de almidón, el mutante *aps1ssl/sslIV*, al igual que el mutante *aps1*, presenta un fenotipo menos drástico que el del mutante *ssl/sslIV*.

Determinación de los niveles de pigmentos.

Los niveles de clorofilas a (Chla) y b (Chlb), carotenoides y antocianinas fueron determinados en el mutante triple *aps1ssl/sslIV*, junto con sus parentales y el WT. Como puede verse en la Figura 52, el mutante triple *aps1ssl/sslIV* posee los mismos niveles de clorofilas a y b que el mutante simple *aps1*, es decir, aproximadamente un 90 % de la clorofila total del WT. Lo cual indica que la ausencia de APS1 revierte la disminución de clorofilas observada en todos los mutantes carentes de actividad SSIV. Este hecho se evidencia en el color de la planta (Figura 49): el color pálido de *ssl/sslIV* no se observa ni en *aps1* ni en *aps1ssl/sslIV*. El mismo efecto se observa en los niveles de carotenoides y antocianinas (Figura 53): el triple mutante presenta los mismos niveles que el mutante *aps1*, es decir, no difiere del WT en cuanto al contenido en carotenoides y posee aproximadamente un 60 % más de antocianinas que éste, mientras que el mutante *ssl/sslIV* presenta aproximadamente un 40 % menos de carotenoides y unas seis veces más antocianinas que el WT.

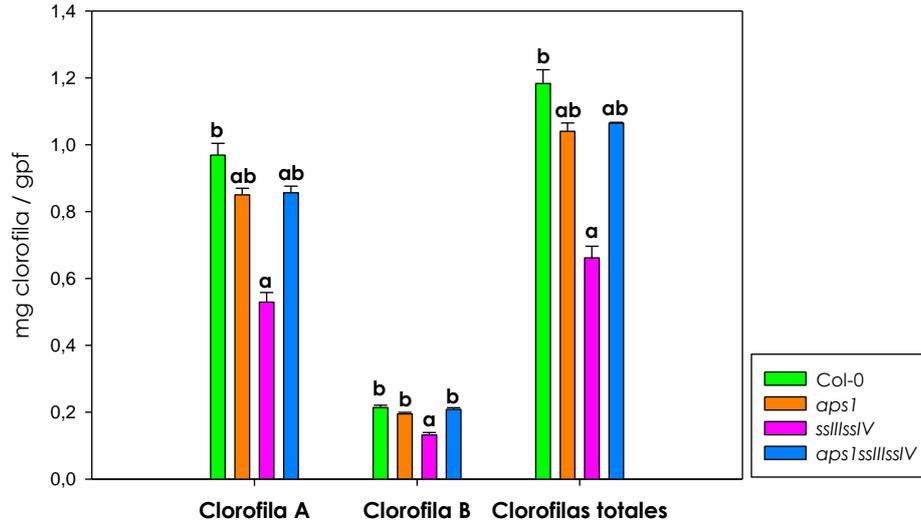


Figura 52. Niveles de clorofilas a (izquierda), b (centro) y totales (derecha) de los mutantes *aps1*, *ssl1ssl1V* y *aps1ssl1ssl1V*, junto con su WT (Col-0). a indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$). b indica que hay diferencia significativa con respecto al mutante *ssl1ssl1V* ($p < 0,05$).

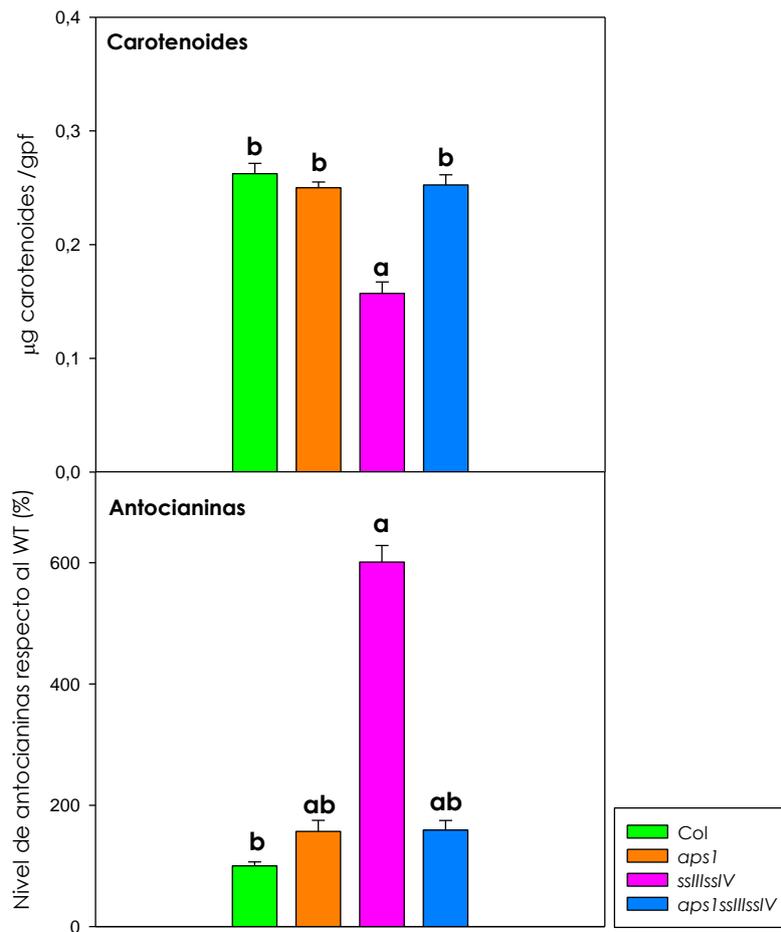


Figura 53. Niveles de carotenoides (arriba) y antocianinas (abajo) de los mutantes *aps1*, *ssl1ssl1V* y *aps1ssl1ssl1V*, *ssl1ssl1V* junto a su WT (Col-0). Las barras de error corresponden con el error estándar de la media. a indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$). b indica que hay diferencia significativa con respecto al mutante *ssl1ssl1V* ($p < 0,05$).

Análisis del intercambio de gases mediante IRGA.

Continuando con la caracterización del mutante *aps1sslsslV* se obtuvieron las curvas de fotosíntesis neta (A), transpiración (E) y conductancia estomática (g_s) en respuesta a intensidades crecientes de luz y a concentraciones crecientes de CO_2 en el interior de la hoja (C_i), para plantas crecidas bajo un fotoperiodo de DL, usando un analizador de intercambio de gases por infra-rojo (IRGA) portátil (LI-COR 6400).

Curvas de respuesta a luz del triple mutante *aps1sslsslV*.

En la Figura 54, se representan los datos de fotosíntesis neta (A), transpiración (E), concentración de CO_2 en el interior de la hoja (C_i) y conductancia estomática (g_s) obtenidos con el IRGA directa o indirectamente (ver materiales y métodos, página 78) para intensidades crecientes de luz (PAR) de Col-0, *aps1* y *aps1sslsslV*.

La Figura 54A muestra las denominadas "curvas AQ" (variación de la tasa de asimilación de CO_2 respecto a PAR) del WT y los mutantes en respuesta a las diferentes intensidades lumínicas. Lo primero que se comprueba es que la respuesta del mutante *aps1sslsslV* es prácticamente idéntica a la del mutante simple *aps1*, ambos presentan una A idéntica a la del WT para bajas intensidades lumínicas y entorno a un 30 % inferior a la de éste a partir de 1000 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que la disminución observada en el mutante *sslsslV* era de aproximadamente un 75 % (Figura 45A). La Figura 54C muestra el C_i estimado frente a PAR. Como se dijo anteriormente, estas curvas son el reflejo de las curvas de A frente a PAR (Figura 54A): a medida que se incrementa la A, disminuye el C_i , dado que el CO_2 intercelular está siendo fijado. El WT, que tiene la mayor A_{sat} , presenta la mayor disminución de los niveles de C_i . Los mutantes *aps1* y *aps1sslsslV* presenta una disminución de los niveles de C_i intermedia entre el WT y el mutante doble *sslsslV* (Figura 45C), así como su A_{sat} es intermedia entre los mismos. En cuanto a la transpiración (E, Figura 45B) y la conductancia estomática (g_s , Figura 45D) no se observa ningún cambio significativo entre los mutantes y el WT.

El análisis de las curvas con Photosyn Assistant nos permitió estimar los parámetros recogidos en la Tabla 21. Ninguno de los parámetros estimados para el mutante *aps1sslsslV* difiere significativamente de los valores estimados para el mutante *aps1*. Ambos mutantes poseen una eficiencia cuántica aparente (AQE) igual a la del WT (0,07 $\mu\text{mol } CO_2/\mu\text{mol fotones}$ para el WT y *aps1sslsslV*, 0,06 $\mu\text{mol } CO_2/\mu\text{mol fotones}$ para *aps1*) y, por tanto, superior a la del mutante *sslsslV* (0,03 $\mu\text{mol } CO_2/\mu\text{mol fotones}$; Tabla 16). Tanto *aps1* (-1,03 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) como *aps1sslsslV* (-1,16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) poseen una R_{day} superior a la del WT (-0,74 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e inferior a la del mutante *sslsslV* (-1,96 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tabla 16). El mismo hecho se observa para los valores estimados para el punto de compensación por luz (Γ_i): el valor estimado para *aps1sslsslV* (18,32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no difiere del estimado para *aps1* (14,71 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), siendo en ambos casos superior al del WT (10,73 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e inferior al del mutante *sslsslV* (69,75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tabla 16). El mayor punto de compensación obtenido para los mutantes debe ser consecuencia de la

mayor tasa de respiración aparente. En ambos casos (R_{day} y Γ_i), los valores estimados para *aps1* y *aps1sslsslssIV* son más próximos al WT que al mutante doble *sslsslssIV*. En cuanto a la A_{sat} de los mutantes *aps1* ($6,08 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y *aps1sslsslssIV* ($6,69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se estiman (y puede observarse en la Figura 54A) valores inferiores al estimado para el WT ($9,29 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y superiores al del mutante *sslsslssIV* ($2,51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tabla 16), indicando (como se dijo anteriormente, página 157) una menor velocidad del ciclo de Calvin (una mayor limitación de la fotosíntesis por las reacciones bioquímicas) en el mutante *sslsslssIV* que el mutante *aps1*.

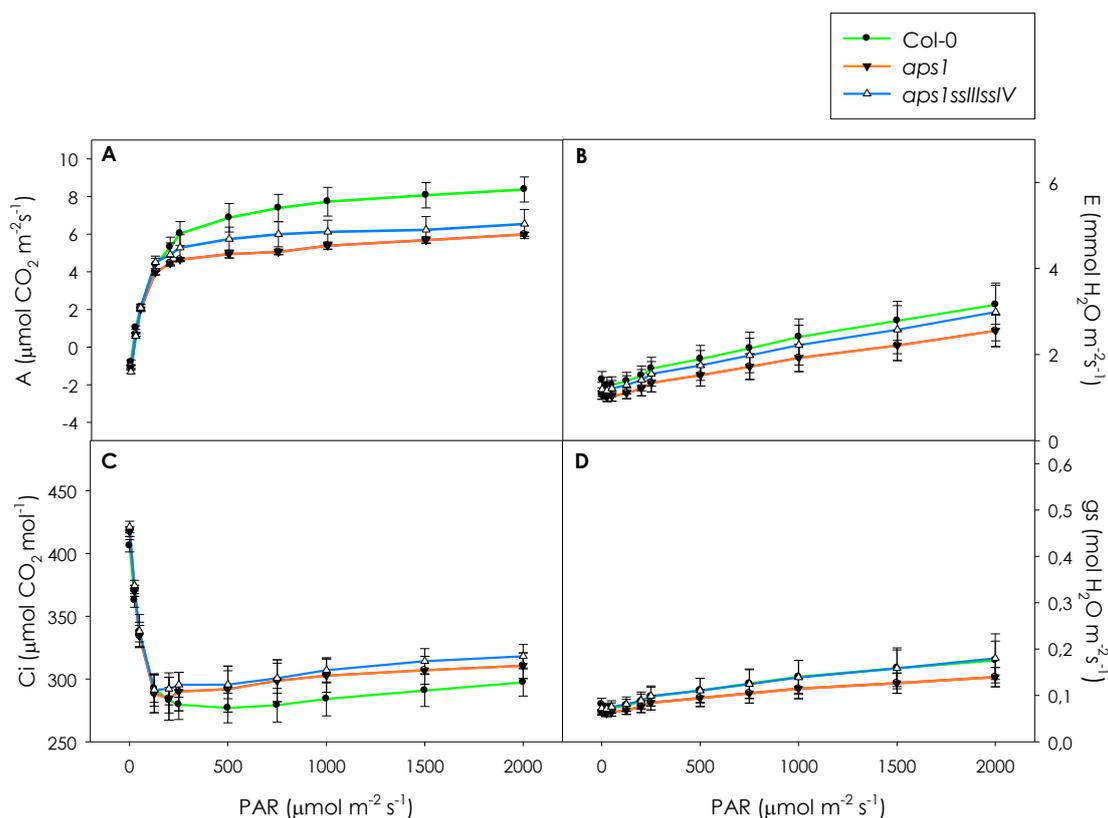


Figura 54. Curvas de respuesta a luz de los mutantes *aps1* y *aps1sslsslssIV* en comparación con su WT (Col-0): (A) tasa de fijación de CO_2 o fotosíntesis neta, A; (B) tasa de transpiración, E; (C) concentración de CO_2 subestomática, C_i ; y (D) conductancia estomática, g_s . Cada curva consta de 8 puntos y cada punto es la media de 4-6 medidas (4-6 plantas independientes) para cada genotipo. La barra de error corresponde al error estándar de la media.

	A_{sat} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	AQE ($\mu\text{mol CO}_2/\mu\text{mol}$ fotones)	R_{day} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Γ_i ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Col-0	$9,29^c \pm 1,01$	$0,07^c \pm 0,01$	$-0,74^c \pm 0,05$	$10,73^c \pm 0,78$
<i>aps1</i>	$6,08^{b,c} \pm 0,23$	$0,06^{a,c} \pm 0,00$	$-1,03^{b,c} \pm 0,06$	$14,71^{b,c} \pm 1,44$
<i>aps1sslsslssIV</i>	$6,69^{b,c} \pm 0,77$	$0,07^{a,c} \pm 0,00$	$-1,16^{b,c} \pm 0,03$	$18,32^{b,c} \pm 0,71$

Tabla 21. Parámetros estimados con Photosyn Assistant a partir de los valores de las curvas AQ. Los parámetros se calculan para 4-6 curvas (4-6 plantas independientes) para cada genotipo y se presentan las medias \pm error estándar de la media. ^a indica que no hay diferencia significativa con respecto al WT ($p \geq 0,05$). ^b indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$). ^c indica que hay diferencia significativa con respecto al mutante *sslsslssIV* ($p < 0,05$), datos en Tabla 16 (página 158).

Curvas de respuesta a C_i del triple mutante $aps1sslsslV$.

En la Figura 55 se representan los datos de fotosíntesis neta (A), transpiración (E) y conductancia estomática (g_s) obtenidos con el IRGA (ver materiales y métodos, página 78) para concentraciones crecientes de CO_2 en el interior de la hoja (C_i) de Col-0, $aps1$ y $aps1sslsslV$.

La Figura 46A corresponde a las curvas A/ C_i del triple mutante $aps1sslsslV$ frente a su parental el mutante simple $aps1$ y el WT. Lo primero que podemos comprobar es la idéntica respuesta del triple mutante con su parental $aps1$, claramente diferente de la respuesta del WT. Los mutantes presentan una A idéntica a la del WT para C_i hasta $300 \mu\text{mol } CO_2 \text{ mol}^{-1}$, pero se saturan a un C_i inferior al de éste, alcanzando una A_{max} inferior.

En cuanto a la transpiración (E, Figura 55B) y la conductancia (g_s , Figura 55C), no parece haber diferencias entre los mutantes $aps1$ y $aps1sslsslV$ y el WT, observándose en los tres un ligero incremento de E y g_s con la concentración de C_i , a diferencia de lo observado en el mutante $sslsslV$ (Figura 45, paneles B y D, en página 156).

Si comparamos los valores estimados (Photosyn Assistant) de A_{max} y de punto de compensación por CO_2 (Tabla 22), vemos que los mutantes $aps1$ ($7,77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y $aps1sslsslV$ ($7,00 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) presentan una menor A_{max} que el WT ($12,33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) - similar a la estimada para $sslsslV$ ($6,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Tabla 17) - y un punto de compensación por CO_2 similar al del WT ($73,93 \mu\text{mol mol}^{-1}$ para Col-0, $75,97 \mu\text{mol mol}^{-1}$ para $aps1$ y $86,54 \mu\text{mol mol}^{-1}$ para $aps1sslsslV$) - inferior, por tanto, al del mutante $sslsslV$ ($148,90 \mu\text{mol mol}^{-1}$; Tabla 17).

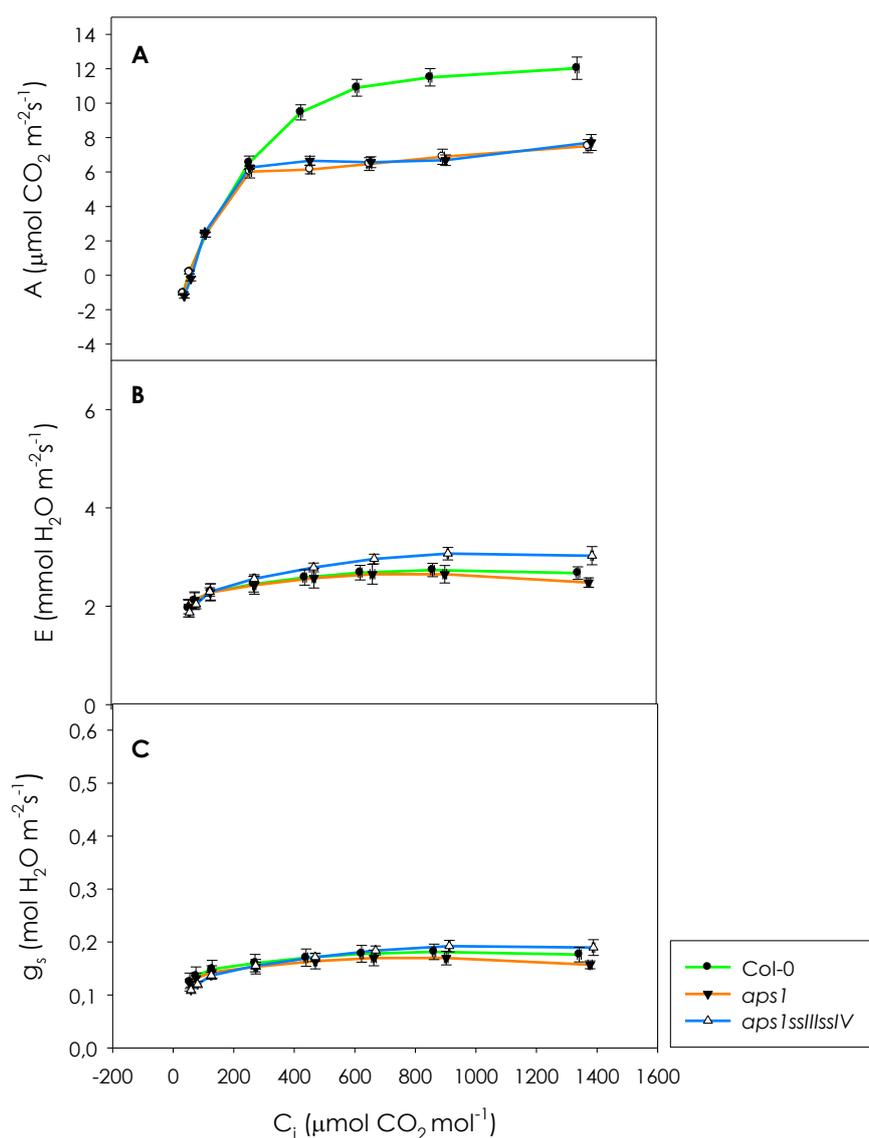


Figura 55. Curvas de respuesta a C_i del mutante *aps1sslsslV* en comparación con sus parentales, los mutantes *sslsslV* y *aps1*, y el WT: (A) tasa de fotosíntesis, A ; (B) tasa de transpiración, E ; y (C) conductancia estomática, g_s . Cada curva consta de 8 puntos y cada punto es la media de 4-5 medidas (4-5 plantas independientes) para cada genotipo. La barra de error corresponde al error estándar de la media.

	A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Punto de compensación por CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
Col-0	12,33 ^c \pm 0,88	73,93 ^c \pm 4,90
<i>aps1</i>	7,77 ^b \pm 0,33	75,97 ^{a,c} \pm 2,03
<i>aps1sslsslV</i>	7,00 ^b \pm 0,41	86,54 ^{a,c} \pm 5,37

Tabla 22. Parámetros estimados con Photosyn Assistant a partir de los valores de las curvas A/C_i de Col-0, *aps1* y *aps1sslsslV*. Los parámetros se calculan para 4-5 curvas (4-5 plantas independientes) para cada genotipo y se presentan las medias \pm error estándar de la media. ^a indica que no hay diferencia significativa con respecto al WT ($p \geq 0,05$). ^b indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$). ^c indica que hay diferencia significativa con respecto al mutante *sslsslV* ($p < 0,05$); datos en Tabla 17 (página 160).

	V_{cmax} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	TPU ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	R_d ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	g_m ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)
Col-0	45,53 \pm 2,94	5,06 \pm 0,18	2,33 ^c \pm 0,39	30 \pm 0,00
aps1	37,55 ^a \pm 4,52	3,34 ^{b,c} \pm 0,30	2,05 ^{a,c} \pm 0,30	30 ^a \pm 0,00
aps1ssllssIV	42,67 ^a \pm 1,43	3,74 ^{b,c} \pm 0,20	2,98 ^{a,c} \pm 0,39	30 ^a \pm 0,00

Tabla 23. Parámetros V_{cmax} , TPU, R_d y g_m estimados para Col-0, *aps1* y *aps1ssllssIV*. Los parámetros se calculan para 4-5 curvas (4-5 plantas independientes) para cada genotipo y se presentan las medias \pm error estándar de la media. ^a indica que no hay diferencia significativa con respecto al WT ($p \geq 0,05$). ^b indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$). ^c indica que hay diferencia significativa con respecto al mutante *ssllssIV* ($p < 0,05$); datos en Tabla 18 (página 160).

La tasa de carboxilación máxima permitida por la Rubisco (V_{cmax}), el uso de las triosas fosfato (TPU), la tasa de respiración mitocondrial (R_d) y la conductancia del mesófilo (g_m) fueron estimadas para los mutantes *aps1* y *aps1ssllssIV* y su WT (Tabla 23), gracias al software diseñado para Excel por Sharkey y col. (Szydlowski *et al.*, 2009). Como muestra la Tabla 23, no hay diferencias significativas en cuanto a ninguno de los parámetros estimados (V_{cmax} , TPU y g_m) para el triple mutante y para su parental *aps1*. Tan solo la TPU difiere entre estos mutantes y su WT: los valores de TPU estimados para *aps1* ($3,34 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y *aps1ssllssIV* ($3,74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) son inferiores al estimado para Col-0 ($5,06 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y, por tanto, inferiores también al valor estimado para *ssllssIV* (Tabla 18, no hay diferencia significativa entre la TPU de Col-0 y *ssllssIV*). La ausencia de la AGPasa en los mutantes *aps1* y *aps1ssllssIV* estaría provocando una acumulación de TP mayor a la que el cloroplasto puede dar uso. La R_d de *aps1* ($2,05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y *aps1ssllssIV* ($2,98 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no difieren significativamente de la del WT ($2,33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y es, por tanto, inferior a la de *ssllssIV* (Tabla 18, la R_d de *ssllssIV* es 2,4 veces superior a la del WT). Como se explicó anteriormente, la A_{max} depende del TPU y la R_d ($A_{max} = 3 \text{ TPU} - R_d$). Los mutantes *ssIV* y *ssllssIV* presentan una A_{max} un 28,5 y un 39 % inferiores a la del WT (Tabla 17 en página 160) y el mutante *aps1*, un 37 % inferior a la de este (Tabla 22 en página 172). Aunque la disminución de la A_{max} de los mutantes *ssllssIV* y *aps1* es similar, los motivos parecen ser diferentes: en el mutante *aps1*, la menor A_{max} respecto al WT parece ser debida a una inferior tasa de uso de las triosas-P (TPU, ver Tabla 23), mientras que en el mutante *ssllssIV* (y también en el *ssIV*), la TPU no difiere significativamente de la del WT (Tabla 18 en página 160) y la disminución de la A_{max} sería consecuencia de la mayor R_d .

Análisis de la emisión de fluorescencia mediante PAM.

Para completar el estudio de los procesos fotosintéticos, se llevó a cabo el análisis de la emisión de fluorescencia mediante el sistema PAM, lo cual nos permitió calcular el rendimiento cuántico máximo del PSII, el rendimiento cuántico efectivo del PSII a diferentes intensidades lumínicas y la contribución relativa al apantallamiento de los procesos de atenuación no fotoquímica (regulados y no regulados), así como analizar las cinéticas de inducción-relajación de los procesos de NPQ.

Rendimiento cuántico máximo del PSII.

El análisis de la emisión de fluorescencia de plantas adaptadas a oscuridad permitió la obtención del parámetro F_v/F_m , medida relativa del rendimiento cuántico máximo del PSII. La Tabla 24 muestra los valores obtenidos para los mutantes *aps1*, *ssllssIV* y *aps1ssllssIV* junto a su WT (Col-0). Como vemos, todos los mutantes poseen un valor de F_v/F_m inferior al WT de manera estadísticamente significativa, sin embargo, solo el mutante *ssllssIV* posee un valor fuera del rango que se considera normal para este parámetro. Podemos decir que, solo el mutante *ssllssIV* posee un menor rendimiento cuántico máximo del PSII, lo cual indica la existencia de daño en el aparato fotosintético (Sharkey *et al.*, 2007) o de mecanismos de fotoprotección (Bilger *et al.*, 1995).

	F_v/F_m (\pm se)
Col-0	0,817 \pm 0,002
<i>aps1</i>	0,804 ^b \pm 0,003
<i>ssllssIV</i>	0,632 ^b \pm 0,040
<i>aps1ssllssIV</i>	0,803 ^b \pm 0,003

Tabla 24. Valores de F_v/F_m obtenidos para Col-0, *aps1*, *ssllssIV* y *aps1ssllssIV*. Las plantas fueron adaptadas a oscuridad y la emisión de fluorescencia basal (F_0) y máxima (F_m) fueron obtenidas mediante el sistema PAM. F_v es calculada como $F_m - F_0$. Se presenta el valor medio \pm error estándar de la media de tres medidas independientes. ^b indica que hay diferencia significativa con respecto al WT ($p < 0,05$).

Curvas de inducción-relajación de NPQ ('Quenching' no fotoquímico).

Las curvas de inducción-relajación de NPQ obtenidas mediante el sistema PAM nos permiten comparar cambios en la contribución relativa de las reacciones fotoquímicas del PSII y la atenuación no fotoquímica al apantallamiento total de la fluorescencia. La Figura 56 representa el rendimiento cuántico efectivo del PSII (ϕ PSII; Panel superior), el rendimiento de la atenuación no fotoquímica inducible por luz (ϕ NPQ; Panel medio) y el rendimiento de la atenuación no fotoquímica no regulada (ϕ NO; Panel inferior) de los mutantes *aps1*, *ssllssIV* y *aps1ssllssIV*, junto al WT (Col-0), en condiciones de inducción de NPQ con luz actínica o sin luz actínica. Podemos ver que aunque la respuesta a luz actínica/no actínica de los mutantes sigue la misma cinética que la del WT en todos los casos, la contribución relativa al apantallamiento total es diferente en el caso del mutante *ssllssIV*, que presenta un menor ϕ PSII (tanto en luz

actínica como no actínica) y una mayor contribución relativa de los procesos de NPQ (mayor ϕ_{NPQ} y, sobre todo, mayor ϕ_{NO}).

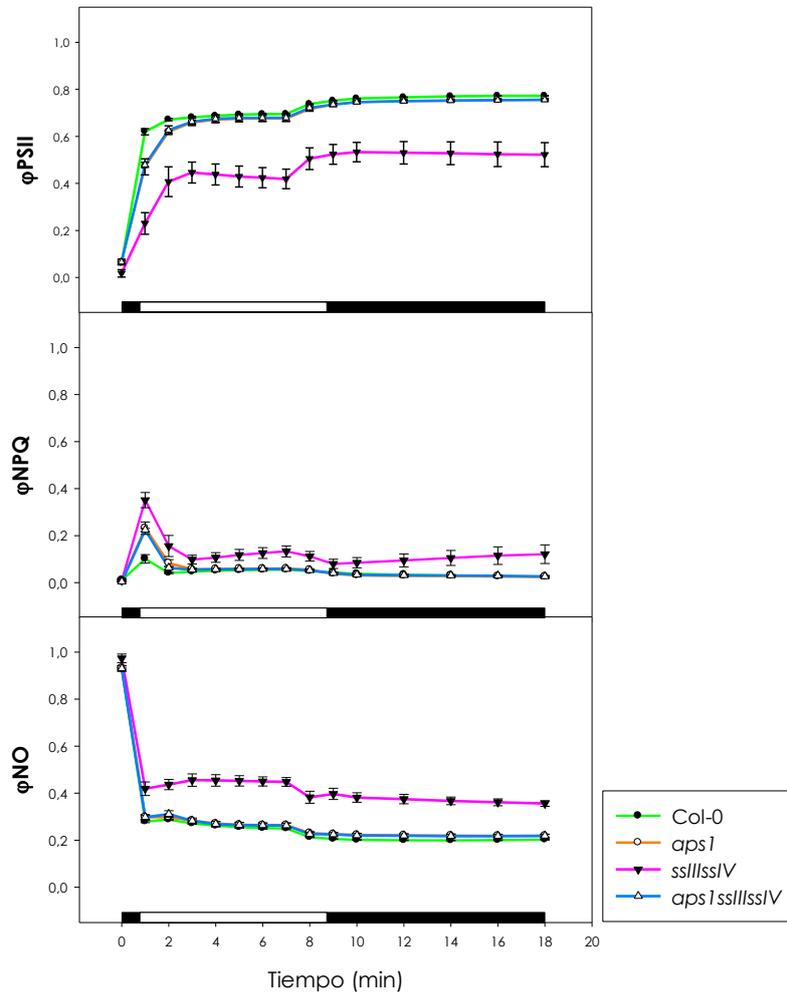


Figura 56. Curvas de inducción-relajación de NPQ de Col-0, *aps1*, *ssl1ssl4* y *aps1ssl1ssl4*. Se representan el rendimiento cuántico efectivo del PSII (ϕ_{PSII} ; Panel superior), el rendimiento de la atenuación no fotoquímica inducible por luz (ϕ_{NPQ} ; Panel medio) y el rendimiento de la atenuación no fotoquímica no regulada (ϕ_{NO} ; Panel inferior). La barra blanca indica cuando la luz actínica (75 μE) está encendida y la barra negra, cuando está apagada. Cada punto corresponde con la media de tres medidas independientes y la barra de error corresponde al error estándar de la media.

Curvas de luz.

La Figura 57 muestra los cambios en la contribución relativa de las reacciones fotoquímicas del PSII y los procesos de NPQ (regulados y no regulados) al apantallamiento total de la fluorescencia a diferentes intensidades de luz actínica. Aunque las tendencias de los tres mutantes son similares, observamos un menor ϕ_{PSII} del mutante *ssl1ssl4* que el resto de líneas principalmente a intensidades de luz entre 0 y 1000 $\mu moles$ de fotones $m^{-2} s^{-1}$. El menor ϕ_{PSII} se corresponde con un mayor ϕ_{NO} , pero no hay incremento del ϕ_{NPQ} respecto al WT o los mutantes *aps1* y *aps1ssl1ssl4*.

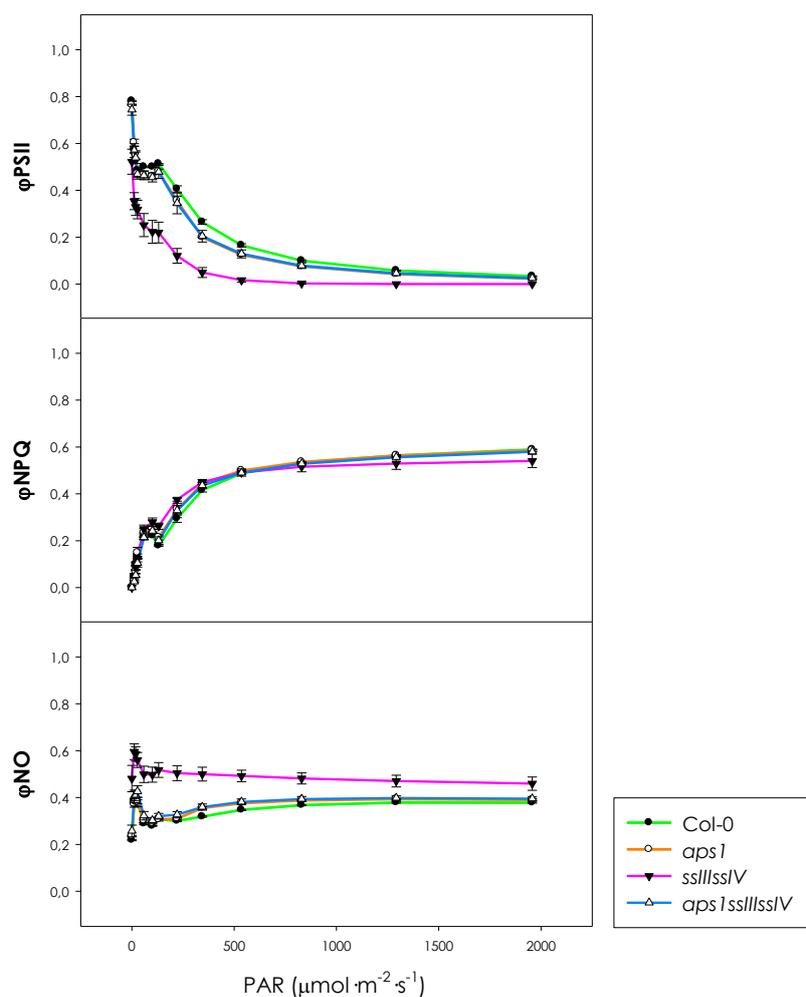


Figura 57. Curvas de luz de Col-0, *aps1*, *ssl1ssl4* y *aps1ssl1ssl4*. Se representan el rendimiento cuántico efectivo del PSII (ϕ_{PSII} ; Panel superior), el rendimiento de la atenuación no fotoquímica inducible por luz (ϕ_{NPQ} ; Panel medio) y el rendimiento de la atenuación no fotoquímica no regulada (ϕ_{NO} ; Panel inferior) a diferentes intensidades de luz actínica. Cada punto corresponde con la media de tres medidas independientes y la barra de error corresponde al error estándar de la media.

Como se explicó en materiales y métodos (página 86), ϕ_{PSII} es equivalente al rendimiento cuántico del flujo de electrones (LEF) a través del PSII, lo cual, permite estimar la tasa de transporte no cíclico de electrones (ETR). Sin embargo, la estimación de ETR por el software del PAM no es válida para el mutante *ssl1ssl4*, por poseer un alto contenido de antocianinas (pigmentos no fotosintéticos) (Osmond *et al.*, 1999) y, por ello, no se ha incluido en la Figura 57 la curva de ETR frente a PAR. No obstante, podemos comparar el rendimiento cuántico del flujo de electrones de las diferentes líneas a partir de los valores de ϕ_{PSII} y concluir un menor rendimiento del mismo en el mutante *ssl1ssl4* que en el WT y los mutantes *aps1* y *aps1ssl1ssl4*, es decir, el flujo de electrones a través del PSII se ve limitado en el mutante *ssl1ssl4* a intensidades de luz inferiores al resto (Figura 45).

ALMIDÓN SINTASA DE CLASE IV (SSIV) *IN VIVO*.

Detección de SSIV *in vivo*.

La detección de SSIV en Col-0 y WS y su ausencia en el mutante *ssIV* de ambos ecotipos fue probada por Roldán y cols. (Baker, 2008) mediante inmunoblot con anticuerpos específicos anti-SSIV: dos bandas de tamaño aproximado al predicho para la proteína se observaban en los WT y estaban ausentes en el mutante.

Cuando se analizó la presencia/ausencia de SSIV en la batería de mutantes SS, se observó que la mayor parte de la proteína SSIV aparecía en una banda de alto peso molecular. Como podemos observar en la Figura 58 esta banda de alto peso molecular está presente en Col-0, WS y los mutantes *ssIII* y *ssIIIssIII*, pero ausente en los mutantes *ssIV*, *ssIVssIV*, *ssIIIssVI*, *ssIIIssIV* y *ssIIIssIV*, confirmando la ausencia de SSIV en los mismos. La presencia de esta banda de alto peso molecular nos llevó a estudiar la posibilidad de que SSIV formase parte de algún tipo de complejo macromolecular.

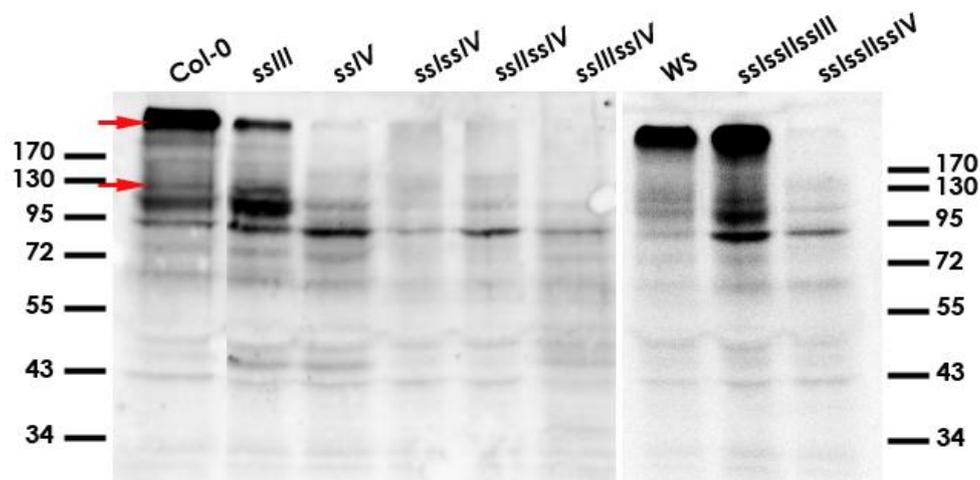


Figura 58. Análisis mediante inmunoblot de extractos crudos vegetales de todos los mutantes SS y sus silvestres (Col-0 y WS). Las proteínas (aproximadamente 30 μ g) fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo primario anti-SSIV. Las dos flechas rojas indican las bandas presentes en los WT y ausentes en los mutantes carentes de SSIV (la aparición de las dos bandas de tamaño aproximado al predicho para la proteína se observa mejor en la Figura 65).

Aproximación al estudio del “complejo SSIV”.

La aparición de la mayor parte de SSIV como una banda de alto peso molecular nos llevó a estudiar la posibilidad de que SSIV formase parte de un complejo macromolecular (“complejo SSIV”), lo cual podría ocurrir mediante interacción de SSIV con ella misma, con otras proteínas o con componentes celulares, presumiblemente a través de las regiones long coiled-coil del dominio amino de SSIV. Aunque, la identificación y caracterización de interactores de SSIV está siendo realizada por uno de mis compañeros de grupo, inicialmente se llevaron a cabo una serie de aproximaciones cuyos resultados muestro a continuación.

Confirmación de la existencia del complejo SSIV.

Lo primero que nos planteamos fue si este complejo era real o producto de la manipulación de las muestras. Por ello, realizamos un inmunoblot frente a SSIV con extractos vegetales de Col-0 tratados y sin tratar con TCA al 5% (30 min en hielo y eliminado con acetona). Como tampón de carga se empleó un tampón sin β -mercaptoetanol, cuya composición era 125 mM de Tris-HCl pH 6,8, 20 % de glicerol, 4 % de SDS, 0,001 % de bromofenol blue y 20 mM de iodoacetamida. La iodoacetamida alquila las cisteínas reducidas “bloqueandolas” y evita así que se formen puentes disulfuro durante la manipulación de las muestras.

El resultado (Figura 59) muestra que el tratamiento con TCA evita la aparición de SSIV en su forma monomérica, de modo que, podemos suponer que *in vivo* casi la totalidad de SSIV estaría formando parte de este complejo macromolecular.

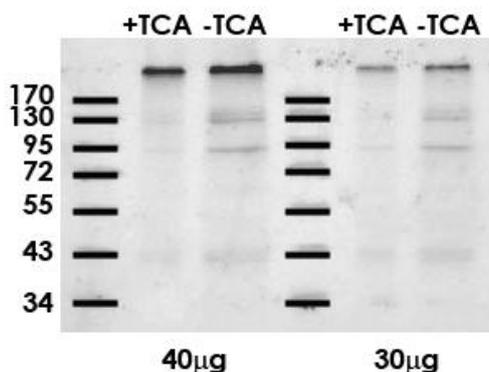


Figura 59. Análisis mediante inmunoblot de extractos crudos de Col-0 tratados (+) o sin tratar (-) con TCA 5%. Las proteínas (aproximadamente 40 o 30 µg) fueron resuspendidas en tampón de carga sin β -mercaptoetanol (composición en el texto), separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el AC primario anti-SSIV.

Posible regulación redox del complejo.

A continuación, puesto que la regulación redox juega un papel importante en la síntesis y degradación de almidón, nos planteamos si sería posible romper el complejo mediante incubación con DTT. Se repitió el procedimiento anterior incorporando una incubación de 90 min a temperatura ambiente con concentraciones crecientes de DTT. El inmunoblot resultante se muestra en la Figura 60 (Panel superior), como control se realizó un inmunoblot paralelo con anti-SSIII (Figura 60, Panel inferior). Observamos que el incremento de la concentración de DTT provoca la disminución de la intensidad de la banda correspondiente al "complejo SSIV" e incrementa la de la banda correspondiente a SSIV, mientras que la intensidad de la banda correspondiente a SSIII permanece constante a cualquier concentración de DTT. Los datos indicarían que el anclaje de SSIV a este complejo implica puentes disulfuro.

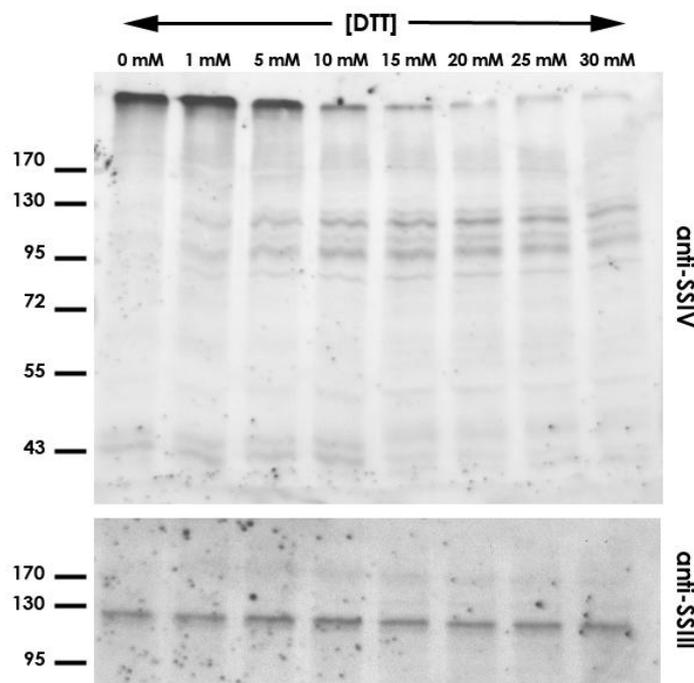


Figura 60. Análisis mediante inmunoblot de extractos crudos de Col-0 incubados con concentraciones crecientes de DTT. Las proteínas (aproximadamente 30 μ g) fueron resuspendidas en tampón de carga sin β -mercaptoetanol (composición en página 178), separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo primario anti-SSIV (Panel superior) o anti-SSIII (Panel inferior).

Dado que los resultados podrían explicarse como la existencia de una regulación redox de la formación/ruptura del complejo, quisimos saber si la reducción podría llevarse a cabo enzimáticamente y si el complejo estaba presente durante todo el ciclo día/noche. Para probar lo primero, incubamos durante 1 h a temperatura ambiente extracto crudo de Col-0 con diferentes concentraciones de DTT y 2 μ M de NtrC o 4 μ M de TrxA (Roldán *et al.*, 2007b). NtrC es una NADPH-tiorredoxina reductasa, que contiene además un dominio tiorredoxina, implicada entre otros procesos en la regulación redox de la AGPasa (Lindahl & Florencio, 2003). TrxA es una tiorredoxina esencial para la supervivencia de *Synechocystis* (Michalska *et al.*, 2009). El resultado

(Figura 61) fue prácticamente el mismo sin enzimas que con ellas, no hubo ningún cambio en la cinética de separación de SSIV del complejo por concentraciones crecientes de DTT.

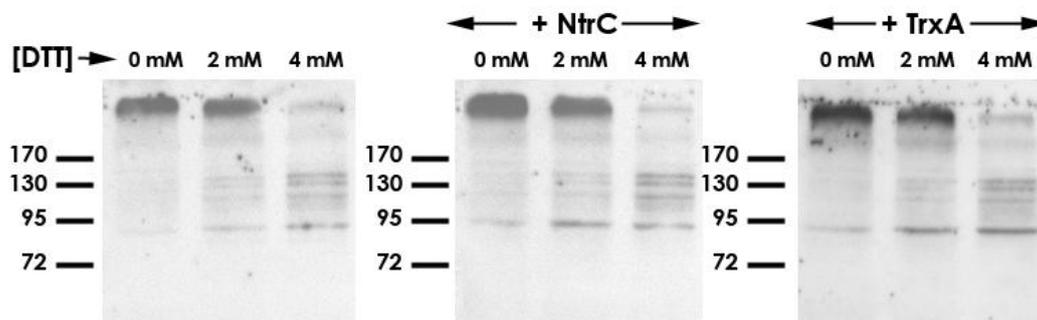


Figura 61. Análisis mediante inmunoblot de extractos crudos de Col-0 incubados con concentraciones crecientes de DTT (izquierda) y 2 μ M de NtrC (centro) o 4 μ M de TrxA (derecha). Las proteínas (aproximadamente 30 μ g) fueron resuspendidas en tampón de carga sin β -mercaptoetanol (composición en página 178), separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo primario anti-SSIV.

El análisis de la secuencia de aminoácidos nos muestra que las posibles Cys formadoras de puentes disulfuro ocupan posiciones que no son accesibles por otras proteínas y que, más bien, participarían en puentes disulfuro intracatenarios, no en la unión a otras proteínas. Además, las concentraciones de DTT que eliminan el complejo son muy superiores a las esperadas en un proceso de regulación redox. Por tanto, creemos que la separación de SSIV del complejo al incrementar la concentración de DTT sería debida a la pérdida de la estructura de la proteína, lo cual causaría la pérdida de interacción de SSIV con su/sus interacto(es).

Existencia del complejo a lo largo del ciclo día-noche.

La expresión de SS4 parece seguir un patrón de expresión diurna: los niveles de RNAm aumentan durante el día y disminuyen durante la noche, co-expresando, además, con un gran número de genes relacionados con el metabolismo del almidón (Lindahl & Florencio, 2003). Quisimos por ello comprobar si la cantidad de SSIV variaba también a lo largo del ciclo día-noche. Para ello, se prepararon extractos de Col-0 a partir de material vegetal recogido a diferentes horas del ciclo y se realizó un inmunoblot frente a SSIV. Como puede verse en la Figura 62, el complejo SSIV está presente durante todo el ciclo día-noche y aproximadamente en la misma cantidad. Por tanto, SSIV está presente en niveles constantes a lo largo del día a pesar de las fluctuaciones de los niveles de RNAm, hecho que se ha descrito para otras muchas proteínas implicadas en la síntesis de almidón. Además, este resultado junto con el anterior, nos permiten descartar la idea de una regulación redox del complejo.

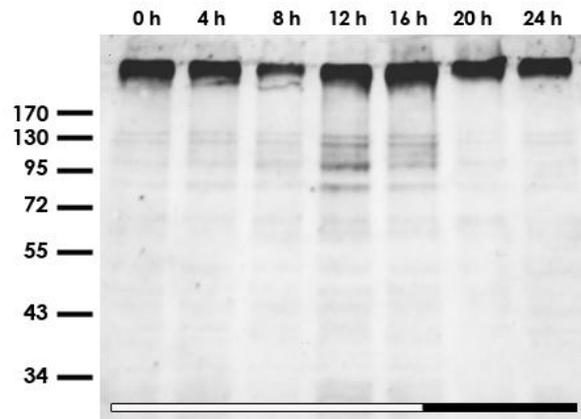


Figura 62. Análisis mediante inmunoblot de extractos crudos de Col-0 correspondientes a diferentes momentos del ciclo día-noche. Las proteínas fueron resuspendidas en tampón de carga 2x SDS-SB (composición en página 100), separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo primario anti-SSIV.

Posible anclaje al gránulo de almidón del complejo SSIV.

Las imágenes de microscopía confocal obtenidas por el grupo del Dr. Javier Romero-Pozueta (Figura 64), nos desvelaron la disposición *in vivo* de SSIV en cloroplastos de *A.thaliana*: a diferencia de lo esperado de una proteína soluble (Figura 64F), SSIV no aparece dispersa por todo el estroma, sino formando partículas definidas asociadas a la superficie de uno de los polos del gránulo de almidón (Figura 64B y C). Quisimos, por tanto, probar si el "complejo SSIV" estaba anclado al gránulo de almidón. Para ello, se preparó un extracto vegetal a partir de hojas de Col-0 (y otro a partir de hojas del mutante *ssIV*, como control) en tampón Hepes 50 mM pH 7,5, suplementado con inhibidores de proteasas, y el pellet obtenido tras la centrifugación fue empleado para la extracción de almidón. El almidón fue lavado 5 veces con Tris-HCl 50 mM pH8, resuspendido en SDS-SB 1x (página 100) y hervido durante 10 min para extraer las proteínas asociadas a los gránulos (Lohmeier-Vogel *et al.*, 2008a). Antes de cargarse en el gel, las muestras de almidón eran centrifugadas (13000 g 15 min), para eliminar el almidón gelatinizado, y el extracto soluble era concentrado con StrataClean™ (Stratagene®). Las proteínas de las muestras fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo primario anti-SSIV. El inmunoblot resultante (Figura 63) muestra que de existir algún tipo de asociación SSIV-almidón, no se trataría de una interacción fuerte, pues como puede observarse toda la proteína se localiza en la fracción soluble y no en el almidón.

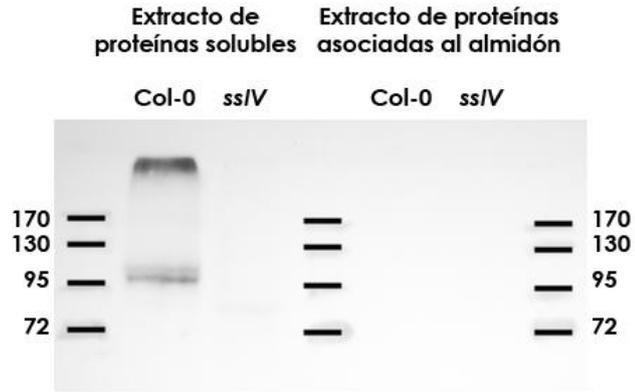


Figura 63. Análisis mediante inmunoblot de extractos de proteínas solubles y extractos de proteínas asociadas al gránulo de almidón de Col-0 y el mutante simple *ssIV*. Los extractos de proteínas solubles fueron concentrados con StrataClean™ (Stratagene®) y las proteínas asociadas al almidón fueron extraídas hirviendo las muestras (10 min) y eliminando luego el almidón gelatinizado por centrifugadas (13000 g 15 min). Las proteínas fueron resuspendidas en tampón de carga 2x SDS-SB (composición en página 100), separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo primario anti-SSIV.

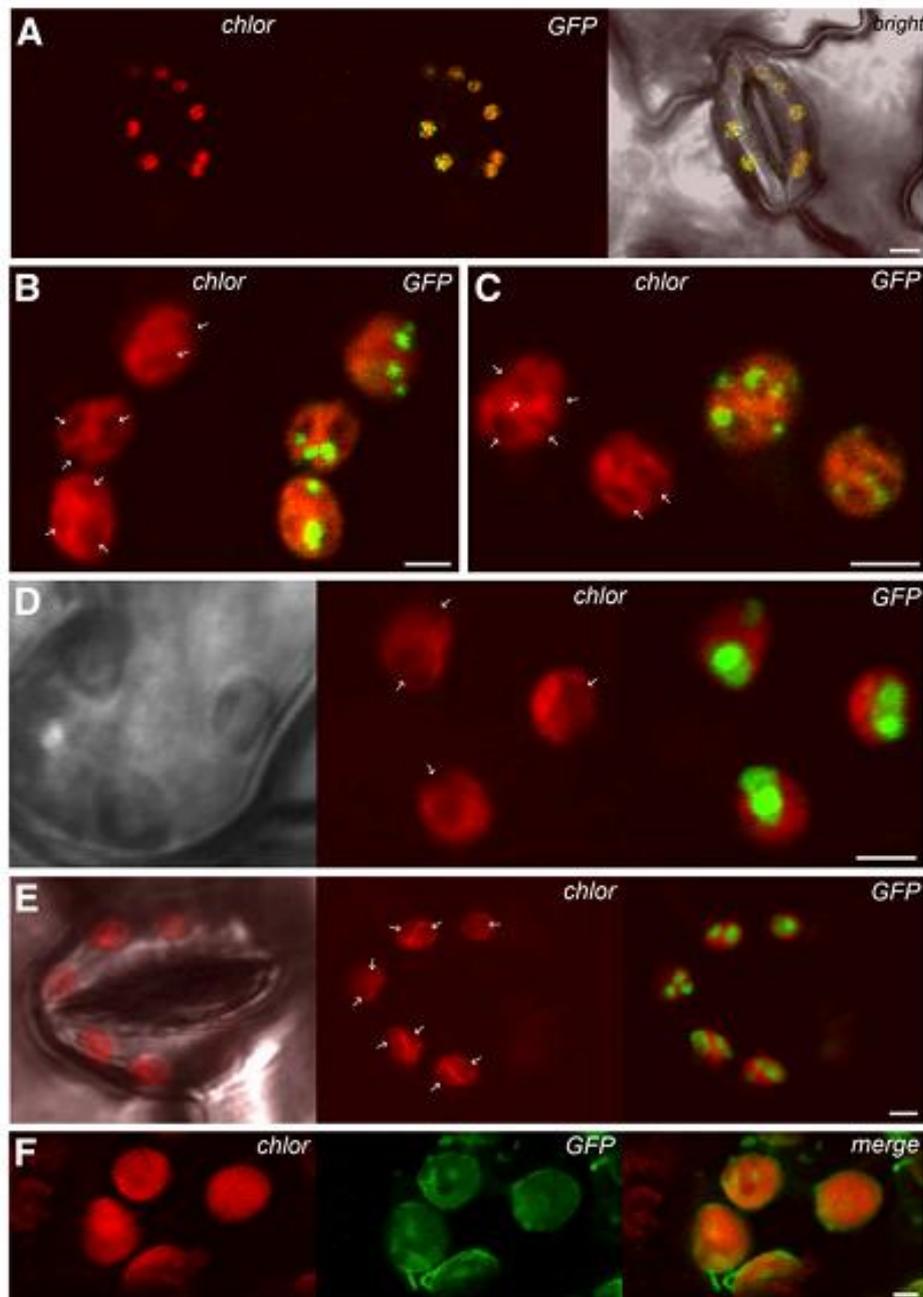


Figura 64. Localización de SSIV-GFP en cloroplastos de *A.thaliana* (Szydlowski *et al.*, 2009). (A) Localización de SSIV-GFP en células guarda de los estomas de la hoja. La microscopía confocal revela su aparición como partículas definidas en el interior de los cloroplastos. Los cloroplastos son visualizados gracias a la autofluorescencia de la clorofila. (B y C) las partículas definidas de SSIV-GFP aparecen asociadas a uno de los polos de estructuras ovoides (indicadas con flechas) detectadas en las imágenes de autofluorescencia del cloroplasto, las cuales fueron identificadas como gránulos de almidón usando plantas expresoras de GBSSI-GFP (D yE). (F) Localización estromática de la construcción ASPP-GFP, control de localización de una proteína cloroplástica soluble. Barras = 5 mm en (A) y 2 mm en (B-E).

Localización subcloroplastídica de SSIV.

La localización subcelular de SSIV se llevó a cabo mediante separación en gradiente de sacarosa de las fracciones estromática (ES), tilacoidal (TI) y la correspondiente a las envolturas cloroplastídicas (membranas externa e interna, EC) de cloroplastos aislados de Col-0. La Figura 65 muestra el inmunoblot resultante de la incubación de las diferentes fracciones con anti-SSIV, anti-PRK y anti-PsbA. PRK es la fosforibuloquinasa, una proteína estromática. PsbA es la proteína D1 del fotosistema II. Los anticuerpos anti-PRK y anti-PsbA son empleados como marcadores estromático y tilacoidal respectivamente. Observamos que las fracciones TI y ES presentan señal de sus respectivos marcadores y están libres de señal del marcador contrario. La fracción EC presenta contaminación de ambas fracciones, sobre todo de la fracción tilacoidal. La proteína SSIV, tanto en su forma de complejo como en su forma monomérica, está ausente en la fracción ES y presente en la fracción TI. SSIV se encuentra, por tanto, asociada de alguna manera (presumiblemente mediante interacción con otras proteínas a través de su dominio long coiled-coil) a las membranas tilacoidales.

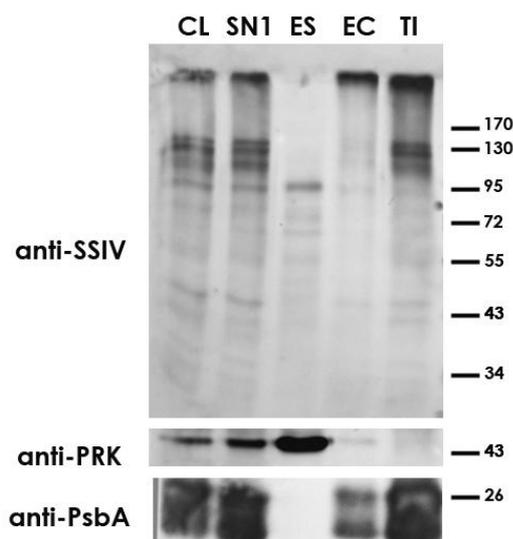


Figura 65. Análisis mediante inmunoblot de la presencia/ausencia de SSIV en extractos de cloroplastos aislados (CL), el sobrenadante obtenido tras la rotura de los cloroplastos y la centrifugaban a 10000 rpm (SN1) y las fracciones estromática (ES), de las membranas externa e interna (EC) y tilacoidal (TI) obtenidas mediante ultracentrifugación del SN1 en gradiente de sacarosa. Las proteínas (aproximadamente 40 µg) fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el AC primario anti-SSIV, anti-PRK y anti-PsbA.

Para descartar que la localización de SSIV en la fracción tilacoidal fuese debida a su unión a algún polímero de glucosa y no a su asociación a la membrana, la fracción tilacoidal fue tratada con amiloglucosidasa de *Rhizopus sp.* (Megazyme). Para ello, la fracción tilacoidal fue resuspendida en acetato sódico 100 mM pH 4,5 y dividida en 2 eppendorfs: a uno se le añadieron 30 U de amiloglucosidasa y el otro, se llevó como control. La reacción ocurría a 55 °C durante 1 h y se detenía hirviendo 2 minutos. A continuación, se centrifugaron en una microcentrífuga durante 15 minutos a velocidad máxima y sobrenadantes y pellets fueron separados. Como vemos en la Figura 66, el tratamiento con amiloglucosa no evita la

precipitación de SSIV junto con las membranas tilacoidales: observamos la misma señal en el pellet sin tratamiento (p-) que en el pellet con tratamiento (+) – salvo por la presencia de la amiloglucosidasa - y no observamos señal en el sobrenadante con tratamiento (SN+).

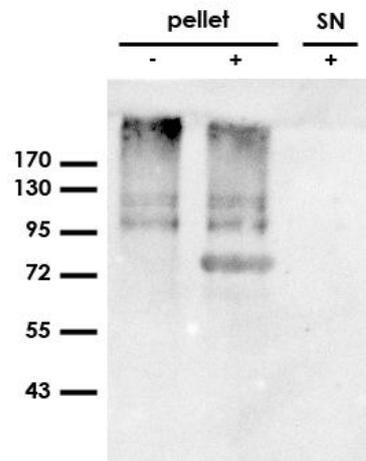


Figura 66. Análisis mediante inmunoblot del efecto sobre SSV del tratamiento con amiloglucosidasa de la fracción tilacoidal. La fracción tilacoidal fue resuspendida en acetato sódico 100 mM pH 4,5 y dividida en 2 eppendorfs: a uno se le añadió amiloglucosidasa (+) y el otro, se llevó como control (-). Transcurrida la reacción, se centrifugaron a 14000 rpm y sobrenadantes (SN) y pellets (p) fueron separados. Las proteínas (aproximadamente 30 µg) fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo primario anti-SSIV. La banda inferior que aparece en la calle de la muestra tratada (p+) correspondería a la amiloglucosida, que va en exceso en la muestra y parece asociarse al pellet.

ALMIDÓN SINTASA DE CLASE IV (SSIV) IN VITRO.

Clonación de SS1, SS2, SS3 y SS4.

Las secuencias codificantes de AtSS1, AtSS3 y AtSS4 fueron clonadas en el vector de expresión en *E.coli* pET45b (Tabla 9), bajo el control de un promotor reconocido por la DNA polimerasa del fago T7. Las clonaciones se realizaron mediante PCRs con oligos específicos para cada gen (excluyendo la secuencia de nucleótidos correspondiente a la señal de tránsito al cloroplasto) (Tabla 25) y usando como molde una preparación de cDNA de hojas de Col-0. Los productos de PCR fueron purificados desde los correspondientes geles de agarosa y clonados en el pET45b mediante corte con enzimas de restricción y ligación, pasando primero por el vector pJET1.2 o el pMBL[®]-T (Tabla 9). El vector pET45b permite la expresión de las proteínas recombinantes SSI, SSIII y SSIV con una cola de His fusionada en la parte amino. Como se explica en materiales y métodos (página 91), las tres proteínas recombinantes fueron expresadas en la estirpe de *E.coli* BL21 (DE3) Δ glgCAP, por carecer de las actividades ADP-glucosa pirofosforilasa, glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa (Szydłowski *et al.*, 2009). La estirpe de BL21 (DE3) Δ glgCAP expresora de SSII (pDEST15_ AtSS2) fue cedida por el grupo del Dr. Christophe d'Hulst.

Gen Código AGI	Oligonucleótidos usados en este trabajo (5'-3')	Tamaño de banda esperado (incluyendo dianas)
SS1 At5g24300	Fwd: ggatccTCTTCTCCTCTCCGGTG (BamHI) Rev : ctcgagCTAGCTGACATAGGGAGG (XhoI)	1824 pb
SS3 At1g11720	Fwd: ctgcagGGAAGTGCTCAGAAAAGAACTCAGA (PstI) Rev: ctcgagTACTTGCGTGCAGAGTGATA (XhoI)	3031 pb
SS4 At4g18240	Fwd: ggatccGTGTAAGATGCGACAACAACGT (BamHI) Rev: ctcgagTCACGTGCGATTAGGAACAGC (XhoI)	3010 pb

Tabla 25. Oligonucleótidos específicos para cada gen (excluyendo la secuencia del CTP) empleados para la clonación de los genes AtSS1, AtSS2, AtSS3 y AtSSIV y tamaño de la banda esperada en cada caso, usando como molde una preparación de cDNA de hojas de Col-0. Los nucleótidos en minúscula corresponden a la incorporación de la secuencia diana para el enzima de restricción indicado entre paréntesis.

Inducción de las proteínas recombinantes SSI, SSII, SSIII y SSIV.

La inducción mediante IPTG fue probada con varias colonias resultantes de cada transformación y aquella con una mayor inducción fue seleccionada. Para comparar la inducción de las diferentes colonias de una misma transformación, 1ml de cultivo de cada una de ellas, inducido a 30 °C y 150 rpm, fue tomado a las 0 (t_0), 1 (t_1) y 3 (t_3) h después de la adición de IPTG. Las tres muestras de cada colonia fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 5 min y los sobrenadantes (LB) fueron eliminados. Los pellets fueron resuspendidos en 500 μ l de tampón Tris-HCl 100mM pH 7,5 suplementado con PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas, y rotas por sonicación (ver página 91). Los cultivos rotos fueron centrifugados (20 min a 4 °C y 14000 rpm) y los sobrenadantes (aproximadamente 30 μ g de proteínas) fueron cargados en geles de poliacrilamida para la separación de las proteínas de las muestras. Como control, se indujo también la estirpe BL21 (DE3) Δ glgCAP transformada con el pET45b_vacio (sin ningún gen clonado). La Figura 67 muestra la tinción con Coomassie de las proteínas, separadas en geles de poliacrilamida, de la colonia elegida de cada transformación a los diferentes tiempos de inducción. El primer gel (A) muestra a la estirpe transformada con el vector vacío. Se comprueba que ninguna de las bandas incrementa su intensidad con la inducción. Los otros tres geles corresponden a las estirpes transformadas con los plásmidos (B) pET45b_SSI, (C) pET45b_SS3 y (D) pET45b_SS4. En los tres casos se puede observar el incremento en la intensidad de una banda con el tiempo de inducción. Estas bandas presentan aproximadamente el tamaño esperado en cada caso (considerando que el CTP ha sido eliminado y una cola de His añadida): 67,17 kDa para SSI, 115,25 kDa para SSIII y 113,84 kDa para SSIV.

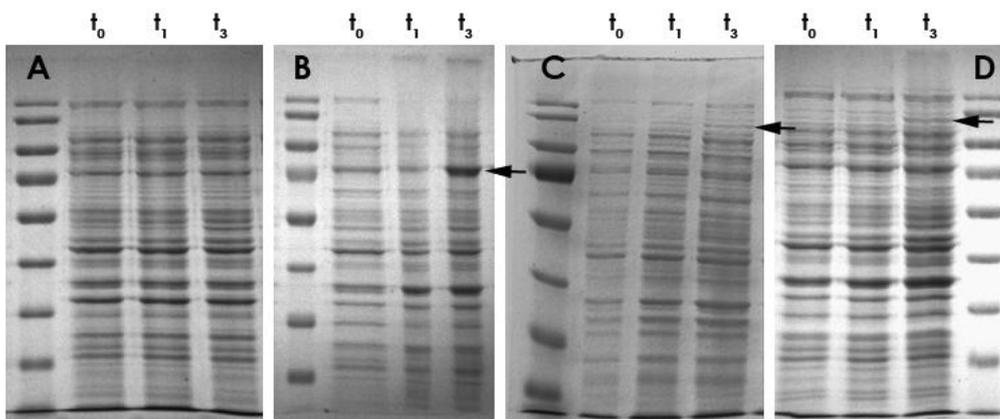


Figura 67. Análisis mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con Coomassie de la inducción por IPTG de las estirpes de BL21 (DE3) Δ glgCAP transformadas con (A) pET45b_vacio, (B) pET45b_SSI, (C) pET45b_SS3 y (D) pET45b_SS4. Las estirpes fueron inducidas con IPTG durante 0 (t_0), 1 (t_1) y 3 (t_3) h a 30 °C y 150 rpm. La inducción se realizó mediante adición de 1mM de IPTG al cultivo de la estirpe crecido hasta una DO_{600nm} de 0,5. Muestras de 1 ml de los cultivos fueron tomadas a los diferentes tiempos de inducción. Las muestras eran centrifugadas a 13000 rpm durante 5 min y el sobrenadante (LB) era eliminado. Los pellets fueron resuspendidos en 500 μ l de tampón Tris-HCl 100mM pH 7,5 suplementado con PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas y rotas por sonicación (ver página 91). Los cultivos rotos se centrifugaban (20 min a 4 °C y 14000 rpm) y los sobrenadantes (aproximadamente 30 μ g de proteínas) fueron cargados en geles de poliacrilamida que, tras la separación de las proteínas de las muestras, fueron teñidos con Coomassie blue. Las flechas indican la banda inducida. Las bandas del marcador de peso molecular corresponden (de arriba a abajo) a los siguientes tamaños: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26 y 10 kDa.

Actividad almidón sintasa de las proteínas recombinantes SSI, SSII, SSIII y SSIV.

Para comprobar que las proteínas expresadas en *E.coli* eran funcionales se realizó un zimograma de la actividad almidón sintasa de los cultivos inducidos 3 h a 30 °C y 150 rpm. La cantidad de proteína cargada de cada inducción se intentó ajustar para tener una señal parecida, sin embargo, dado que la inducción de una misma estirpe no siempre resulta en la producción de una misma cantidad de proteína y que cada proteína tiene una diferente actividad en las condiciones ensayadas, resulta complicado hacer un buen ajuste de las cantidades. La Figura 68 muestra un zimograma de la actividad SS usando glucógeno como sustrato, en el cual se cargaron 100 µg de proteínas de la estirpe vacía (pET45b_vacío), 35 µg de proteínas de la estirpe expresora de SSI, 225 µg de proteínas de las estirpes expresoras de SSII (pET45b_SSII) y SSIV (pET45b_SSIV) y 100 µg de proteínas de la estirpe expresora de SSIII (pET45b_SSIII). A la vista del resultado, podemos decir que las cuatro clases de SS recombinantes son funcionales, siendo SSI la que presenta la mayor inducción y/o actividad en las condiciones de ensayo y SSII la que presenta la menor inducción y/o actividad - de hecho, el tampón de incubación no lleva citrato y la ausencia del mismo disminuye la actividad de SSII del mismo modo que lo descrito para la SSI de maíz por Boyer y Preiss (Alonso-Casajus *et al.*, 2006).

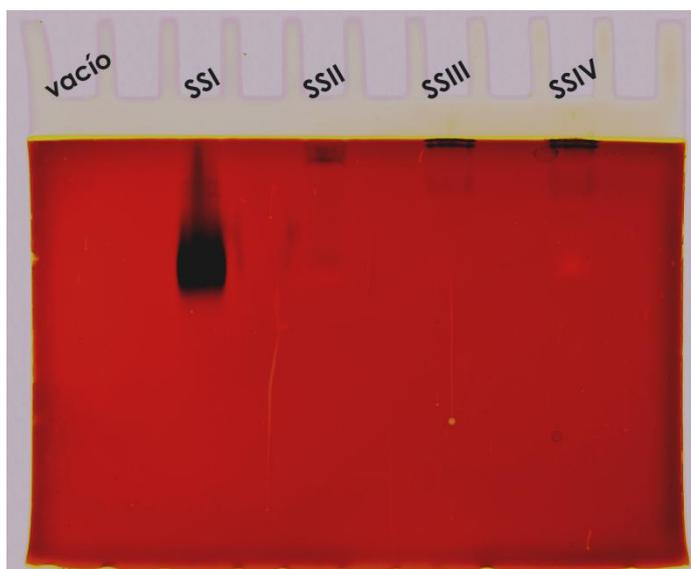


Figura 68. Zimograma de la actividad almidón sintasa de las estirpes de BL21 (DE3) Δ glgCAP transformadas con (A) pET45b_vacio, (B) pET45b_SSI, (C) pET45b_SS3 y (D) pET45b_SS4 fueron inducidas con IPTG durante 3 h a 30 °C y 150 rpm. La inducción se realizó mediante adición de 1mM de IPTG al cultivo de la estirpe crecido hasta una DO_{600nm} de 0,5. Los cultivos inducidos fueron centrifugados para precipitar las células, las cuales fueron resuspendidas en tampón Tris-HCl 100mM pH 7,5 suplementado con PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas y rotas por sonicación (ver página 91). Los cultivos rotos se centrifugaban (20 min a 4 °C y 14000 rpm) y los sobrenadantes fueron cargados en el zimograma. La cantidad de proteínas cargada de cada muestra se basó en pruebas anteriores (ver texto arriba).

Puesta a punto de las condiciones de inducción de SSIV.

La puesta a punto de las condiciones de inducción de SSIV se hizo mediante su inducción en tres condiciones (20 °C y 150 rpm, 25 °C y 100 rpm o 30 °C y 150 rpm) y durante tres tiempos (30, 90 y 180 min) de inducción diferentes y posterior detección por inmunoblot con el anticuerpo anti-pentaHis. Como vemos en la Figura 69, la inducción de SSIV no provoca la aparición de una banda electroforética única, sino la de múltiples bandas. Si comparamos con lo obtenido para la estirpe transformada con el vector pET45b vacío (Figura 86) vemos que casi todas estas bandas son específicas de la presencia del gen SS4, lo cual nos hizo pensar que la banda más alta debía corresponder con la proteína completa (aunque esta banda corresponde con un peso molecular mayor al esperado), mientras que el resto serían versiones fragmentadas por *E.coli* (Figura 73). Vemos también que gran parte de la proteína precipita junto con los restos celulares tras la ruptura y centrifugación de los cultivos, lo cual indicaría que parte de la proteína está siendo enviada a cuerpos de inclusión. A 30 °C y 150 rpm, observamos la mayor presencia de SSIV en cuerpos de inclusión tanto para tiempos de inducción de 90 como de 180 min. Viendo la relación entre la cantidad de proteína soluble (SN) y la proteína en cuerpos de inclusión (pellet) para las diferentes condiciones ensayadas, decidimos quedarnos con la inducción durante 90 min a 25 °C y 100 rpm. Estas condiciones de inducción fueron las empleadas para el resto de inducciones, no solo las de SSIV, de este trabajo.

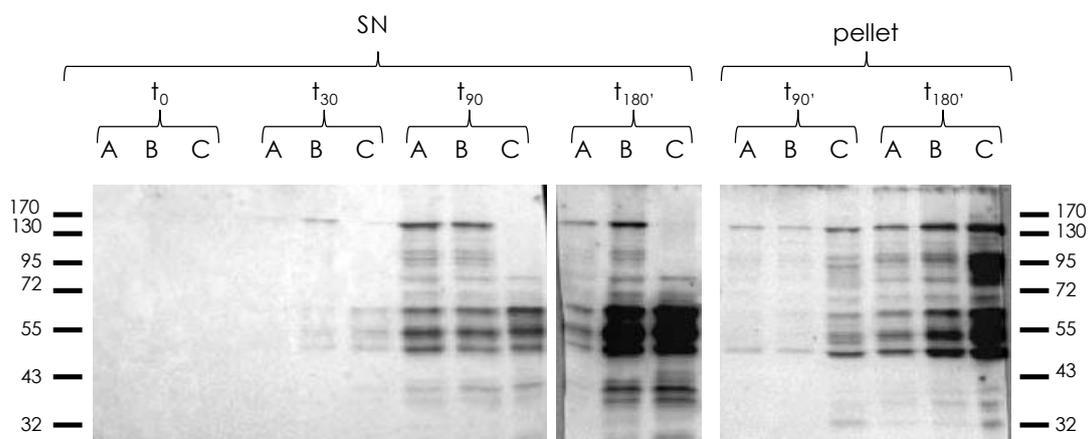


Figura 69. Análisis mediante inmunoblot de la expresión de SSIV en la estirpe de *E.coli* transformada con el vector pET45b_SS4 inducida con IPTG durante 0 (t_0), 30 (t_{30}), 90 (t_{90}) o 180 (t_{180}) min a (A) 20 °C y 150 rpm, (B) 25 °C y 100 rpm o (C) 30 °C y 150 rpm. Los cultivos rotos se centrifugaban (20 min a 4 °C y 14000 rpm) y sobrenadante (SN) y pellet (pellet) eran cargados en geles de acrilamida para la separación de las proteínas de las muestras, su transferencia a filtros de nitrocelulosa e incubación con el anticuerpo anti-pentaHis.

Purificación de SSIV desde cultivos de *E.coli* inducidos.

La purificación de la proteína SSIV expresada en *E.coli* se intentó mediante combinación de técnicas de cromatografía de intercambio iónico, usando una columna HiPrep 16/10 Q FF (GE Healthcare) de intercambio aniónico, y de cromatografía de afinidad, usando una columna Nickel His Trap HP (GE Healthcare). Para ello, los extractos crudos (EC) fueron preparados a partir de 2 l de cultivo inducido de la estirpe BL21 (DE3) Δ glgCAP transformada con pET45b_SS4, en 9 ml de tampón A (ver página 105), suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y PMSF. 8 ml de EC eran inyectados en la columna de intercambio iónico y la elución de las proteínas unidas específicamente se llevaba a cabo con tampón de elución. Las fracciones recogidas fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 70A) y ensayo radiactivo de actividad SS (Figura 71). Las fracciones con mayor actividad, fracciones 1 a 8 (2,5 ml cada una), fueron unidas (pool ii). Vemos en la Figura 70A, que estas fracciones presentan múltiples proteínas. 18 ml del pool ii fueron inyectados en la columna de afinidad. Las fracciones recogidas fueron analizadas del mismo modo que las anteriores: mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 70B) y ensayo radiactivo de actividad SS (Figura 72). La Figura 70B revela que no existe ninguna fracción que contenga una única proteína. La fracción 6 presenta un par de bandas (marcadas con una flecha) del tamaño aproximado de SSIV similares a las observadas por inmunoblot de extractos vegetales. Cuando miramos la actividad de las fracciones (Figura 72) vemos la existencia de dos picos de actividad, uno de ellos corresponde a la fracción 6 y podría corresponder con la presencia de las dos bandas mencionadas, pero el otro (de mayor actividad total) corresponde a la fracción 12, dónde estas dos bandas son minoritarias.

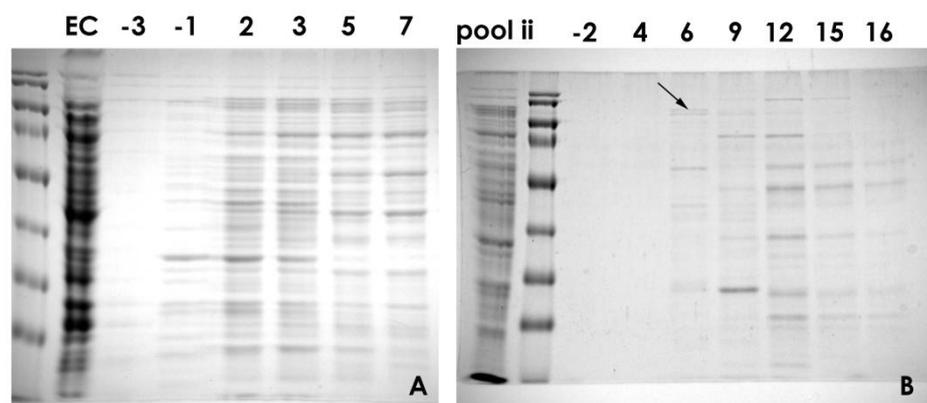


Figura 70. Análisis mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con Coomassie de algunas de las fracciones eluidas de la cromatografía de intercambio iónico (A) y cromatografía de afinidad (B) a partir de un cultivo de la estirpe de BL21 (DE3) Δ glgCAP transformada con pET45b_SSIV. Se cargaron 5 μ l de EC y de pool ii (correspondiente a la suma de las fracciones 1 a 8 de la columna de intercambio iónico) y 10 μ l de las fracciones -3, -1, 2, 3, 5 y 7 de la columna de intercambio iónico y -2, 4, 6, 9, 12, 15 y 16 de la columna de afinidad. Las fracciones -3 y -1 de A y -2 de B corresponden con los lavados de la columna. Las bandas del marcador de peso molecular corresponden (de arriba a abajo) a los siguientes tamaños: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26 y 10 kDa.

Dado el gran número de proteínas presentes en las fracciones con actividad SS eluidas de la columna de afinidad (Figura 70B, fracciones 6 a 12), nos planteamos la identificación de las mismas con objeto de identificar a SSIV y saber que proteínas de *E.coli* estamos arrastrando con

ella en la purificación. Para ello, las proteínas de las fracciones 7 a 14 fueron separadas por electroforesis y teñidas con plata (Figura 73). La tinción con plata es más sensible que la tinción con Coomassie, por eso vemos más bandas en las fracciones en la Figura 73 que en la Figura 70. La identificación de las bandas fue realizada por el servicio de proteómica del IBVF mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. No todas las bandas pudieron ser identificadas. Las bandas a, b, e y g (Figura 73) fueron identificadas como SSIV: la banda a corresponde a un peso molecular superior al predicho para SSIV; la banda b podría ser la proteína SSIV, pues corresponde a un PM aproximado al predicho (113,84 kDa); y las bandas e y g, que corresponden a un peso molecular inferior al predicho, serían fragmentos de SSIV, presumiblemente productos de la proteólisis que son retenidos por la columna debido a que poseen la fusión de poliHis. La banda c es identificada como la NADH deshidrogenasa (o NADH:ubiquinona oxido-reductasa); la banda d, como la UDP-L-Ara4N formiltransferasa/UDP-GlcA C-4'-descarboxilasa; la banda i, como una proteína del ribosoma 70S; y la banda j, como una proteína receptora de AMPc.

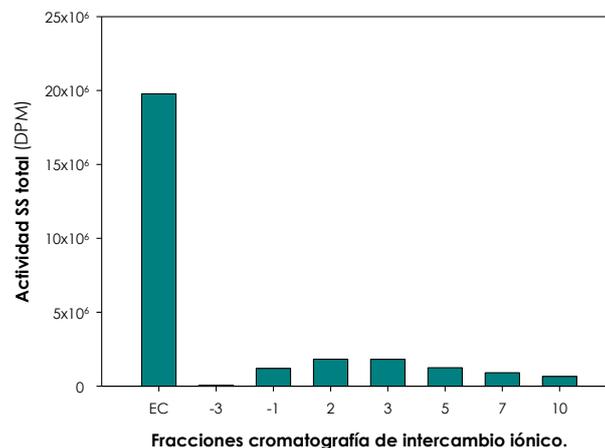


Figura 71. Actividad total (DPM) de las fracciones eluidas de la columna de intercambio iónico y del EC inyectado en la misma (cultivo inducido de BL21 (DE3) Δ glgCAP transformada con pET45b_SSIV). Volumen de EC: 8 ml; volumen de las fracciones -4 a -1 (lavados): 2,5 ml; volumen de las fracciones 1 a 15 (elución): 2,5 ml. Las fracciones 1-8 fueron reunidas en el pool ii.

Los dos picos de actividad observados en la Figura 72 podrían corresponderse con los picos de elución de las bandas a y b. No sabemos si los fragmentos de SSIV correspondientes con las bandas e y g son funcionales. El hecho de que SSIV aparezca, también *in vitro*, como una banda de alto peso molecular (banda a), hizo que nos preguntáramos si el complejo SSIV sería un homo-oligómero de SSIV, lo cual nos llevó a dos aproximaciones: purificación de SSIV mediante cromatografía de exclusión molecular y estudio de la interacción SSIV-SSIV mediante doble híbrido.

Puesto que gran parte de las proteínas contaminantes corresponden con la propia SSIV, decidimos dejar de intentar obtener una fracción de SSIV pura y realizamos el resto de ensayos directamente con los EC de *E.coli*, llevando siempre como control la estirpe transformada con el vector pET45b_vacío.

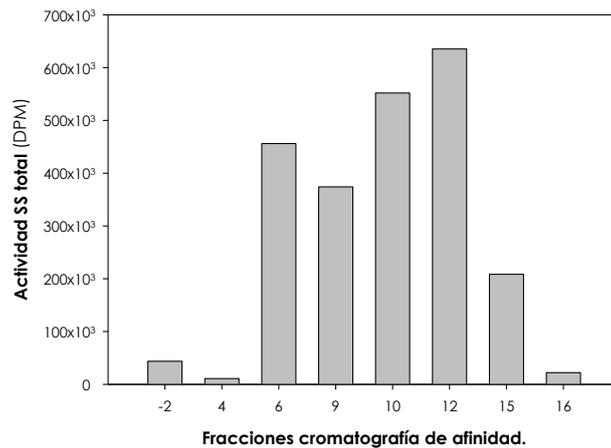


Figura 72. Actividad total (DPM) de las fracciones eluidas de la columna de afinidad a partir del pool ii (Figura 71). Volumen de pool ii: 18 ml; volumen de la fracción -4 a -1: 2,5 ml; volumen de las fracciones 1 a 20: 1,5 ml.

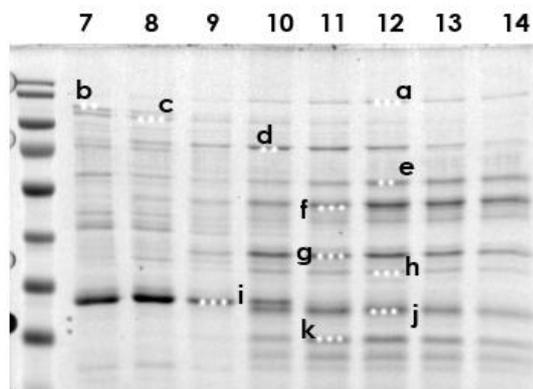


Figura 73. Proteínas de las fracciones 7 a 14 eluidas de la columna de afinidad a partir del pool ii (Figura 71), separadas mediante electroforesis en gel de acrilamida y teñidas con plata. Las bandas a identificar por MALDI-TOF (a-k) fueron picadas con un picador automático (pueden observarse los puntos tomados). Las bandas a, b, e y g fueron identificadas como SSIV.

Estudio del “complejo SSIV” *in vitro*.

Como se explicó en el apartado anterior (página 191), la existencia de una banda (banda a en Figura 73) cuyo PM es mayor que el predicho para SSIV y cuyo pico de elución coincide con la fracción de mayor actividad SS, nos llevó a plantearnos dos aproximaciones: la purificación de SSIV mediante cromatografía de exclusión molecular, para corroborar la existencia del complejo *in vitro*, y el estudio de la interacción SSIV-SSIV mediante doble híbrido, para entender si dicho complejo es o no un homo-oligómero de SSIV.

Purificación de SSIV mediante cromatografía de exclusión molecular.

La purificación de SSIV mediante cromatografía de exclusión molecular se llevó a cabo con una columna Superdex 200 (S200) Tricorn (GE Healthcare). Los EC fueron preparados a partir

de cultivos de 0,5 l de la estirpe BL21 (DE3) Δ glgCAP transformada con pET45b_SS4, en 4 ml de tampón S200 (ver página 106), suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y PMSF, y como método de rotura se empleó la prensa de French. Antes de inyectar en la columna, los EC eran filtrados en columnas de Sefarosa G25 con objeto de limpiar dichos extractos. 200 μ l del EC filtrado fue inyectado en la columna y 30 fracciones de 0,5 ml fueron recogidas y analizadas mediante ensayo radiactivo de la actividad SS del EC y las fracciones 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 y 17. En la Figura 74A, se muestra la actividad total de las fracciones frente a la del EC inyectado en la columna, vemos cómo la actividad presente en los 200 μ l de EC se diluye a su paso por la columna entre las fracciones (de 0,5 ml) eluidas (fundamentalmente entre las fracciones 5 y 13). Si representamos solo las fracciones (Figura 74B), vemos que la proteína SSIV aparece en dos picos de actividad, uno en torno a la fracción 8-9 (proteínas de mayor PM) y otro en torno a la fracción 11 (proteínas de menor PM).

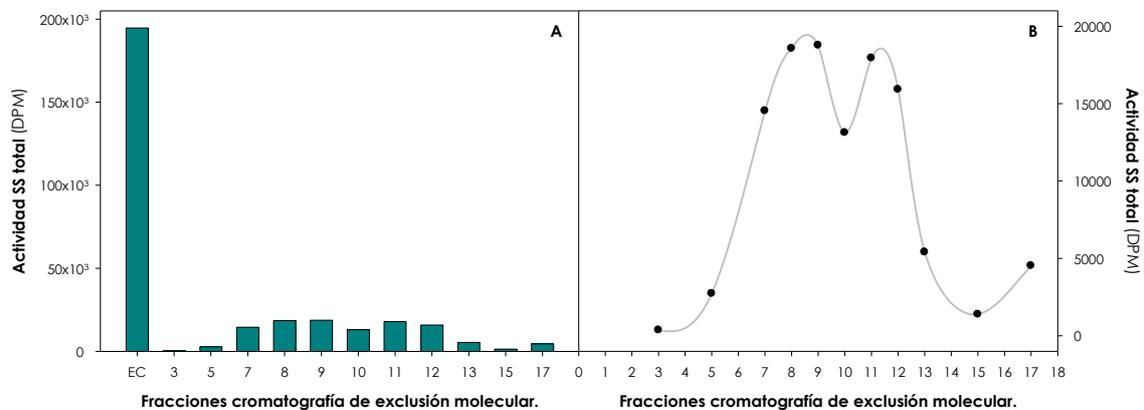


Figura 74. Actividad total (DPM) de las fracciones eluidas de la columna de exclusión molecular. En A, se muestra la actividad total de las fracciones frente a la del EC inyectado en la columna (cultivo inducido de BL21 (DE3) Δ glgCAP transformada con pET45b_SSIV). En B se muestra la actividad de las fracciones, simulando lo que sería el patrón de elución de la proteína (activa). Volumen de EC: 200 μ l; volumen de las fracciones: 0,5 ml. La primera fracción recogida fue a los 6 ml de elución después de la inyección de la muestra.

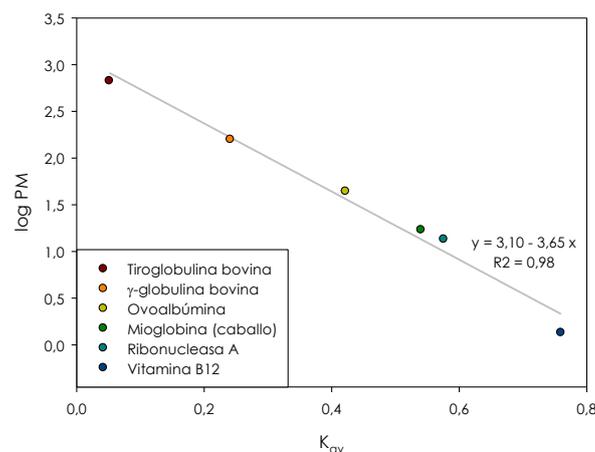


Figura 75. Recta patrón con proteínas de PM conocido: tiroglobulina bovina (670 kDa), γ -globulina bovina (158 kDa), ovaalbúmina (44 kDa), mioglobina de caballo (17 kDa), ribonucleasa A (13,5 kDa) y vitamina B12 (1,35 kDa).

Antes de inyectar el EC, se inyectaban una serie de proteínas de PM conocido y la K_{av} de cada una de ellas era calculada a partir de sus volúmenes de elución (V_e). Representando el logaritmo del PM frente a la K_{av} de estas proteínas, obtenemos una recta (Figura 75) que nos permite conocer a que rango de PM corresponde cada fracción. Estableciendo que el V_e del primer pico de actividad (fracción 8-9) es 9,5-10,5 ml (teniendo en cuenta que la fracción 1 corresponde a un V_e entre 6-6,5 ml) y el del segundo (fracción 11), 11-11,5 ml, podemos decir que los picos de actividad aparecen en las fracciones correspondientes a un tamaño de 3,5-6,1 veces el tamaño de SSIV (fracción 8-9) o de 2,1-2,7 veces (fracción 11) y, por tanto, que SSIV se une también *in vitro* a otras proteínas o a sí misma formando un complejo de mayor PM.

Para afinar los volúmenes de elución de los picos de actividad de SSIV, la cromatografía se repitió tomando fracciones más pequeñas (200 μ l). Además, un tratamiento con DTT fue incorporado (50 mM DTT, 90 min a temperatura ambiente) para ver si la proporción entre un pico y el otro variaba del mismo modo que ocurría con el complejo SSIV *in vivo* (Figura 60). Los niveles de actividad de las fracciones 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 y 33 se recogen en la Figura 76. La diferencia entre los 2 picos fue menos clara en este ensayo, sobre todo en el caso sin DTT, probablemente debido a que, al no haberse ensayado la actividad de todas las fracciones, la resolución es menor. Si comparamos los dos picos de actividad, vemos que hay un incremento del segundo cuando el EC era incubado con DTT. Este pico aparece en la fracción 18, que corresponde a un V_e de aproximadamente 11 ml, que equivale a un PM de 2,4 veces el tamaño de SSIV. Según su PM predicho y la recta patrón obtenida, SSIV debería tener un V_e de 12,82 ml, que en este caso correspondería a la fracción 27, en la cual a penas se detecta actividad. Algunas de las fracciones ensayadas fueron analizadas mediante inmunoblot anti-SSIV (Figura 77), pero no se encontró ninguna correlación clara entre las bandas obtenidas y los picos de actividad.

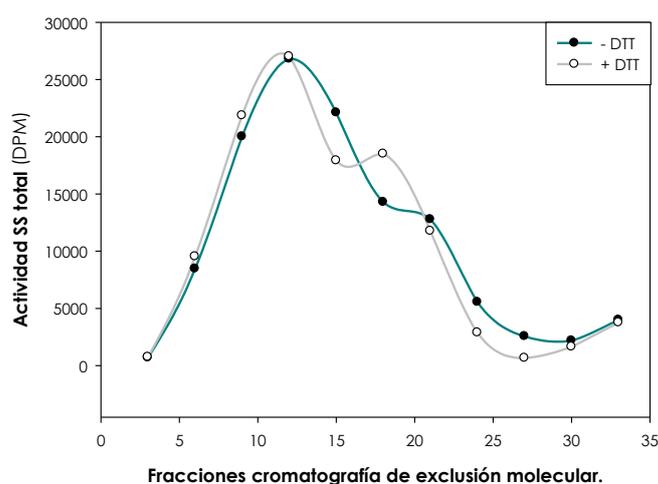


Figura 76. Actividad total (DPM) de las fracciones eluidas de la columna de exclusión molecular a partir de EC de la estirpe expresora de SSIV tratado (gris) y sin tratar (cian) con DTT. Se muestra la actividad de las fracciones, simulando lo que sería el patrón de elución de la proteína (activa) de la columna de exclusión molecular. Volumen de EC: 200 μ l; volumen de las fracciones: 0,2 ml. La primera fracción recogida fue a los 7,5 ml de elución después de la inyección de la muestra.

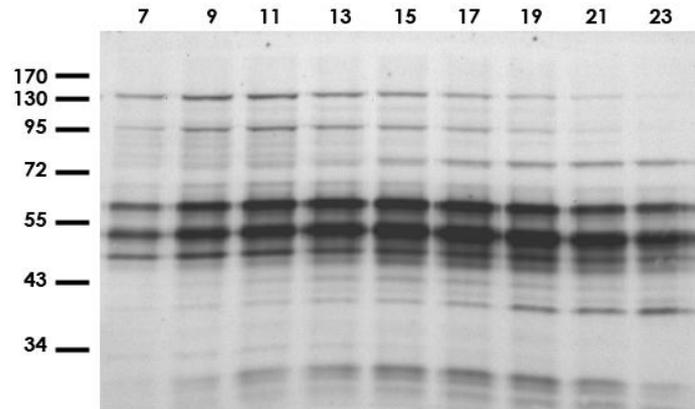


Figura 77. Análisis mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-SSIV de algunas de las fracciones eluidas de la columna de exclusión molecular.

Ensayo de doble híbrido.

Para estudiar la posible interacción de SSIV consigo misma se empleó el sistema "Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System" (Clontech), basado en la reconstrucción del activador transcripcional GAL4 cuando dos proteínas de fusión, una con el dominio de unión al DNA de GAL4 (BD) y otra con el dominio de activación (AD), interaccionan. Tanto la proteína SSIV completa, como sus dominios carboxilo (SSIVtC) y amino (SSIVtN) por separado fueron fusionados al BD y al AD. En la cepa YH2Gold (ver Tabla 5 en la página 70), se expresaron las proteínas de fusión SSIV-BD, SSIVtN-BD y SSIVtC-BD, mediante clonación de los respectivos genes en el vector pGBKT7 (ver Tabla 9 en la página 110), y en la cepa Y187 (ver Tabla 5 en la página 70), se expresaron las proteínas de fusión SSIV-AD, SSIVtN-AD y SSIVtC-AD, mediante clonación de los respectivos genes en el vector pGADT7 (ver Tabla 9 en la página 110). Las clonaciones para el ensayo de doble híbrido fueron realizadas mediante restricción y ligación. Las estirpes de YH2Gold transformadas con pGBKT7_SS4/SS4tN/SS4tC se crecieron en medio SD-Trp-Ura y las estirpes de Y187 transformadas con pGADT7_SS4/SS4tN/SS4tC en medio SD-Leu-Ura. Conjugando las diferentes cepas de YH2Gold con las diferentes cepas de Y187 se comprobó si la proteína SSIV interaccionaba consigo misma. Para ello, las células diploides resultantes de las diferentes conjugaciones se sembraron en dos medios diferentes: SD-Leu-Trp, donde crecían los diploides independientemente de que hubiese o no interacción entre la proteína presa y la proteína cebo, y SD-Leu-Trp-His-Ade, donde los diploides solo crecían si había interacción entre la proteína presa y la proteína cebo.

En todos los casos se obtuvo el mismo resultado: hubo crecimiento en el medio SD-Leu-Trp, indicando que la conjugación estaba funcionando, pero no lo hubo en el medio SD-Leu-Trp-His-Ade, indicando que en las condiciones ensayadas la proteína SSIV no interacciona con ella misma.

Ensayos de auto-glucosilación.

Dado que la síntesis de glucógeno es iniciada gracias a proteínas con actividad auto-glucosilante: glucogenina en animales y levaduras (Boyer & Preiss, 1979) y la propia glucógeno sintasa en bacterias (Lomako *et al.*, 2004), nos planteamos si SSIV tendría actividad auto-glucosilante que le permitiera operar en la iniciación del gránulo de almidón de manera similar a la realizada por la glucogenina. Para el ensayo se usaron EC de cultivos inducidos de las estirpes que expresan SSI, SSII, SSIII y SSIV (dada la imposibilidad de purificar SSIV), así como de la estirpe transformada con el pET45b_vacío como control. Los EC fueron analizados en primer lugar mediante zimograma de la actividad almidón sintasa usando glucógeno como sustrato y sin sustrato. El primero (con sustrato) para comprobar que las proteínas inducidas eran activas y el segundo (sin sustrato) para ver si SSIV era capaz de sintetizar polímeros de glucosa en ausencia de cebador, es decir, usando solamente la ADP-Glucosa presente en el tampón de incubación. Como vemos en la Figura 78A, las cuatro clases de almidón sintasa expresadas en *E.coli* eran activas (no observándose señal en el control). La Figura 78B muestra que solo SSI y SSIII son capaces de sintetizar polímeros de glucosa en las condiciones de ensayo, es decir, usando ADP-Glc como único sustrato, mientras SSII y SSIV no tienen actividad detectable en estas condiciones. A continuación, usando los mismos EC, se realizó el ensayo de autoglucosilación. En la Figura 79C vemos el resultado de la autorradiografía: se observa la aparición de dos señales radiactivas, una correspondiente a la SSI y otra a la SSIII. Por tanto, podemos decir que ni SSII ni SSIV tienen actividad autoglucosilante. Para comprobar si la señal observada en SSI y SSIII era verdadera autoglucosilación, se incorporó un tratamiento con tripsina, de modo que si la señal era autoglucosilación, al degradarse las proteínas la señal radiactiva desaparecería. Comparando la Figura 79A con la Figura 79B, correspondientes a la tinción con Coomassie de las proteínas de las muestras sin tratar y tratadas con tripsina (respectivamente) separadas mediante electroforesis, vemos que el tratamiento con tripsina elimina la mayor parte de las proteínas de la muestra. En la Figura 79D vemos el resultado de la autorradiografía de las muestras tratadas con tripsina: se observa la aparición de las dos señales radiactivas, correspondientes a SSI y SSIII, de modo que podemos decir que la señal radiactiva observada no correspondería a una verdadera autoglucosilación.

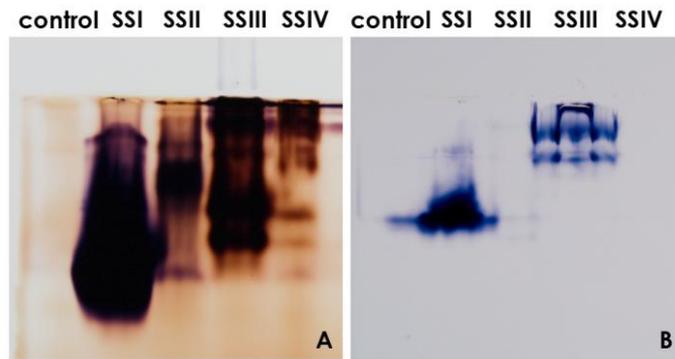


Figura 78. Análisis mediante zimograma de las muestras empleadas en el ensayo de autoglucosilación. Se emplearon dos tipos de geles: con glucógeno (A) y sin sustrato (B), ambos fueron incubados con el mismo tampón de incubación: Tricina 50 mM pH 8,5; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 100mM; β -mercaptoetanol 5mM; MgCl_2 5 mM; BSA 0,25 g/l; y ADP-glucosa 1 mM; y revelados con lugol. Se emplearon 250 μg de proteína de cada muestra. La aparición de señal en (A) indica la presencia de actividad SS en la muestra y en (B), la capacidad de síntesis de polímeros usando ADP-Glc como único sustrato.

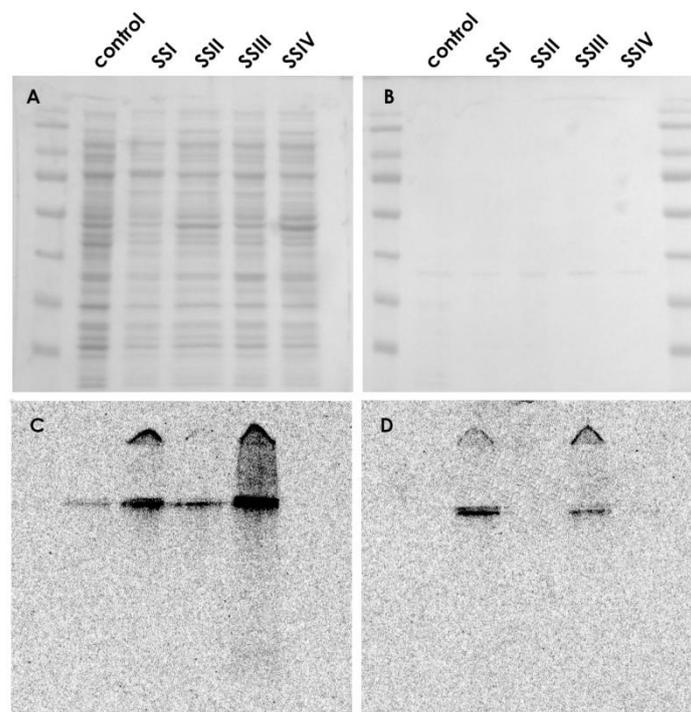


Figura 79. Resultado del ensayo de autoglucosilación sin tratamiento (A y C) y con tratamiento (B y D) con tripsina. El tratamiento consistió en incorporar 1 μl de tripsina 1 mg/ml (en 1 mM HCl pH 3) e incubar durante 2 h a 37 °C. La tripsina degrada las proteínas de modo que si realmente se diera autoglucosilación, al degradarse las proteínas se perderían la señal radiactiva. A y B son los geles teñidos con Coomassie, permiten ver el efecto del tratamiento con tripsina. C y D son las imágenes obtenidas mediante autoradiografía electrónica.

Determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m) de SSIV para la ADP-Glucosa y la amilopectina.

La K_m de SSIV fue calculada para sus dos sustratos: la ADP-Glc (donador de grupos glucosilos) y la amilopectina (aceptor de grupos glucosilos). Para ello la actividad SS fue ensayada (ensayo no radiactivo, ver página 94) para diferentes concentraciones de cada sustrato, usando en cada caso una concentración saturante del otro sustrato. En el caso de la K_m para la amilopectina, se usó una concentración de ADP-Glc de 5 mM y concentraciones crecientes de amilopectina: 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/ml. En el caso de la K_m para la ADP-Glc, se usó una concentración de amilopectina de 10 mg/ml y concentraciones crecientes de ADP-Glc: 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7,5 y 10 mM. Los valores de actividad obtenidos en cada caso quedan recogidos en la Tabla 26. El cálculo de las K_m s se realizó mediante la representación de dobles inversos o Lineweaver-Burk (Figura 80), obteniéndose una $K_m = 0,22$ mM para la amilopectina y una $K_m = 0,38$ mM para la ADP-Glc.

Km de SSIV para la amilopectina = 0,22 mM			
mg/ml amilopectina	nmoles ADP producidos/ml/min	1/V (nmoles⁻¹ ml min)	1/[S] (mg⁻¹ ml)
0,15	9,06	0,11	6,67
0,20	11,22	0,09	5,00
0,30	12,84	0,08	3,33
0,50	16,77	0,06	2,00
1,00	17,66	0,06	1,00
2,00	20,45	0,05	0,50
5,00	22,21	0,05	0,20

Km de SSIV para la ADP-Glc = 0,38 mM			
mM AGP-Glc	nmoles ADP producidos/ml/min	1/V (nmoles⁻¹ ml min)	1/[S] (mg⁻¹ ml)
0,05	4,13	0,24	20,00
0,10	7,06	0,14	10,00
0,25	13,16	0,08	4,00
0,50	17,18	0,06	2,00
1,00	25,24	0,04	1,00
2,00	32,91	0,03	0,50
3,00	27,39	0,04	0,33
5,00	37,74	0,03	0,20
7,50	38,38	0,03	0,13
10,00	38,54	0,03	0,10

Tabla 26. Valores obtenidos en los ensayos de actividad SS para el cálculo de la K_m de SSIV para la amilopectina y la ADP-Glc. Se incluyen también los valores inversos de V (velocidad de reacción = nmoles de ADP producidos/ml/min) y [S] (concentración de sustrato = mg/ml amilopectina o mM ADP-Glc) empleados para el cálculo de las K_m s mediante la representación de dobles inversos o Lineweaver-Burk (Figura 80).

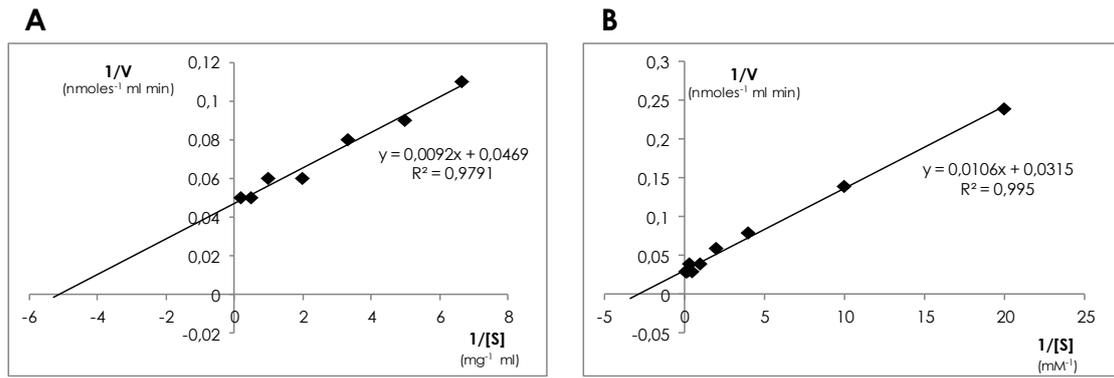


Figura 80. Representación de dobles inversos o Lineweaver-Burk para el cálculo de la K_m de SSIV por amilopectina (A) y ADP-Glc (B). Los valores de $1/V$ y $1/[S]$ representados son los recogidos en la Tabla 26.

ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LA SSIV.

Análisis de la secuencia polipeptídica de SSIV.

La secuencia polipeptídica de SSIV de *Arabidopsis thaliana* (Figura 81) consta de 1040 aminoácidos. El análisis de la misma con el programa ChloroP (Ugalde *et al.*, 2003) indica que los 42 primeros constituyen el péptido de tránsito al cloroplasto (CTP, indicado en verde en la Figura 81). El alineamiento de su secuencia con las de las otras cuatro clases de SSs (Figura 82) y con diferentes GSs muestra la existencia de un dominio carboxilo, con homología con las diferentes clases de SSs (35-50 %) y, también, con las glucógeno sintasas (28-35 %); y un dominio amino, característico de cada clase de SS soluble y ausente en las GSs y la GBSSI.

La SSIV de *A.thaliana* (AtSSIV) presenta una homología del 55 % con la SSIV de *Triticum aestivum* (TaSSIV), del 56 % con la SSIV de *Zea mays* (ZmSSIV), del 62 % con la de *Solanum lycopersicum* (SISSIV) y del 51/55 % con SSIVa/SSIVb de *Oryza sativa* variedad japónica (OsSSIV). La homología de los dominios amino varía entre un 33 y un 69 % (sin considerar los CTPs) y la del dominio carboxilo, entre un 71 y un 89 %.

Dada su alta homología con la GS, el dominio carboxilo de las SSs sería responsable de la actividad glucosiltransferasa, lo cual ha sido probado en el caso de la SSIII (Emanuelsson *et al.*, 1999). Sin embargo, como se muestra más adelante, los ensayos de actividad *in vitro* de las versiones truncadas de SSIV (ver página 214) muestran que el dominio carboxilo de SSIV (SSIVtC) no posee actividad. Parte del dominio amino (la región próxima al dominio carboxilo) es requerida para que SSIV posea actividad glucosiltransferasa.

El dominio amino, ausente en la GBSSI, es característico de cada clase de SS. Dada la alta homología de los dominios carboxilos, es de suponer que las características y diferencias funcionales de las cuatro clases de SSs se deben a sus dominios amino terminales. El análisis del dominio amino de SSIV con el programa Marcoil (Valdez *et al.*, 2008b) predice la existencia de varios dominios *coiled-coil* (CC). Con un umbral (*threshold*) del 90 % encontramos los siguientes dominios CC: del aminoácido 192 al 260 (longitud: 69 aminoácidos), del 280 al 306 (longitud: 27 aminoácidos), del 316 al 344 (longitud: 29 aminoácidos), del 363 al 374 (longitud: 12) y del 380 al 458 (longitud 79 aminoácidos). El programa Paircoil predice un *long coiled-coil* entre los aminoácidos 187 y 409 ($p = 0,025$). El dominio *long coiled-coil* de SSIV ha sido predicho también por otros autores (Delorenzi & Speed, 2002; Rose *et al.*, 2004). El alineamiento de secuencias de SSIV de diferentes especies (Figura 83) muestra un alto grado de conservación de los dominios CC, lo cual es indicativo de la importancia de los mismos para la función de la SSIV. Entre el dominio *long coiled-coil* y el dominio carboxilo aparece otra región altamente conservada (aminoácidos 471 a 544, ver Figura 83), a la cuál no hemos podido asignar una estructura, pero

la cual parece ser imprescindible para que SSIV posea actividad glucosiltransferasa (ver página 214).

```

1  MTTKLSSFCF LTHGLAGISC EREHGSSRRF FYLPSRRLVS TSCKMRQQRG
51  FDSSKRQEVK KGSPKPILSI NSGLQSNND ESDLNGSAD SVPSLKSDAE
101  KGSSIHGSID MNHADENLEK KDDIQTTVEV RRKSKTAKKK GESIHATIDI
151  GHDDGKNLDN ITVPEVAKAL SLNKSEGEQI SDGQFGELMT MIRSAEKNIL
201  RLDEARATAL DDLNKILSDK EALQGEINVL EMKLSETDER IKTAAQEKAH
251  VELLEEQLEK LRHEMISPIE SDGYVLALSK ELETLKLENL SLRNDIEMLK
301  SELDVKDTG ERVVVLEKEC SGLESSVKDL ESKLSVSQED VSQLSTLKIE
351  CTDLWAKVET LQLLLDRATK QAEQAVIVLQ QNQLRNKVD KIEESLKEAN
401  VYKESSEKIQ QYNELMQHKV TLLEEERLEKS DAEIFSYVQL YQESIKEFQE
451  TLESLKEESK KKSRDEPVDD MPWDYWSRLL LTVDGWLLEK KIASNDADLL
501  RDMVWKKDRR IHDTYIDVKD KNERDAISAF LKLVSSPTSS GLYVVHIAAE
551  MAPVAKVGGI GDVVAGLGKA LQRKGHLVEI ILPKYDCMQY DRVRDLRALD
601  TVVESYFDGK LYKNKIWIGT VEGLPVHFIE PQHPSKFFWR GQFYGEQDDF
651  RRFYSYFSRAA LELLLQSGKK PDI IHCHDWQ TAFVAPLYWD LYAPKGLDSA
701  RICFTCHNFE YQGTASASEL GSCGLDVNQL NRPDRMQDHS SGDRVNPVKG
751  AIIFSNIVTT VSPTYAQEVR TAEGGKGLHS TLNFHSKKFI GILNGIDTDS
801  WNPATDPFLK AQFNAKDLOG KEENKHALRK QLGLSSAESR RPLVGCITRL
851  VPQGVHLIR HAIYRTLELG GQFVLLGSSP VPHIQREFEG IEQQFKSHDH
901  VRLLLKYDEA LSHTIYAASD LFIIPSIFEP CGLTQMIAMR YGSIPIARKT
951  GGLNDSVFDI DDDTIPTQFQ NGFTTFQTADE QGFNYALERA FNHYKKDEEK
1001  WMRLVEKVMs IDFSWGSSAT QYEELYTRSV SRARAVPNRT

```

Figura 81. Secuencia polipeptídica de SSIV de *A.thaliana*. En verde se ha marcado el péptido de tránsito al cloroplasto predicho con ChloroP (Lohmeier-Vogel *et al.*, 2008a; Rose *et al.*, 2004). Subrayado en amarillo (dentro del dominio amino) aparecen las regiones predichas por Marcoil (Emanuelsson *et al.*, 1999), con un umbral del 90 %, como parte de un dominio *long coiled-coil*. Con una línea negra se marca una región altamente conservada (ver Figura 83) y sin estructura predicha que, como se mortará más adelante (ver página 215), es fundamental para la actividad glucosiltransferasa de SSIV. En azul aparece el dominio carboxi-terminal de SSIV, con alta homología con las GSs y el resto de clases de SSs (ver Figura 82). Dentro del dominio carboxi-terminal de SSIV, se han subrayado los motivos KXGGL amino y XXGGL carboxilo, altamente conservados e implicados en la catálisis y/o la unión del sustrato (ver página 49). En la página 216 (Figura 88) puede verse un esquema de la proteína.

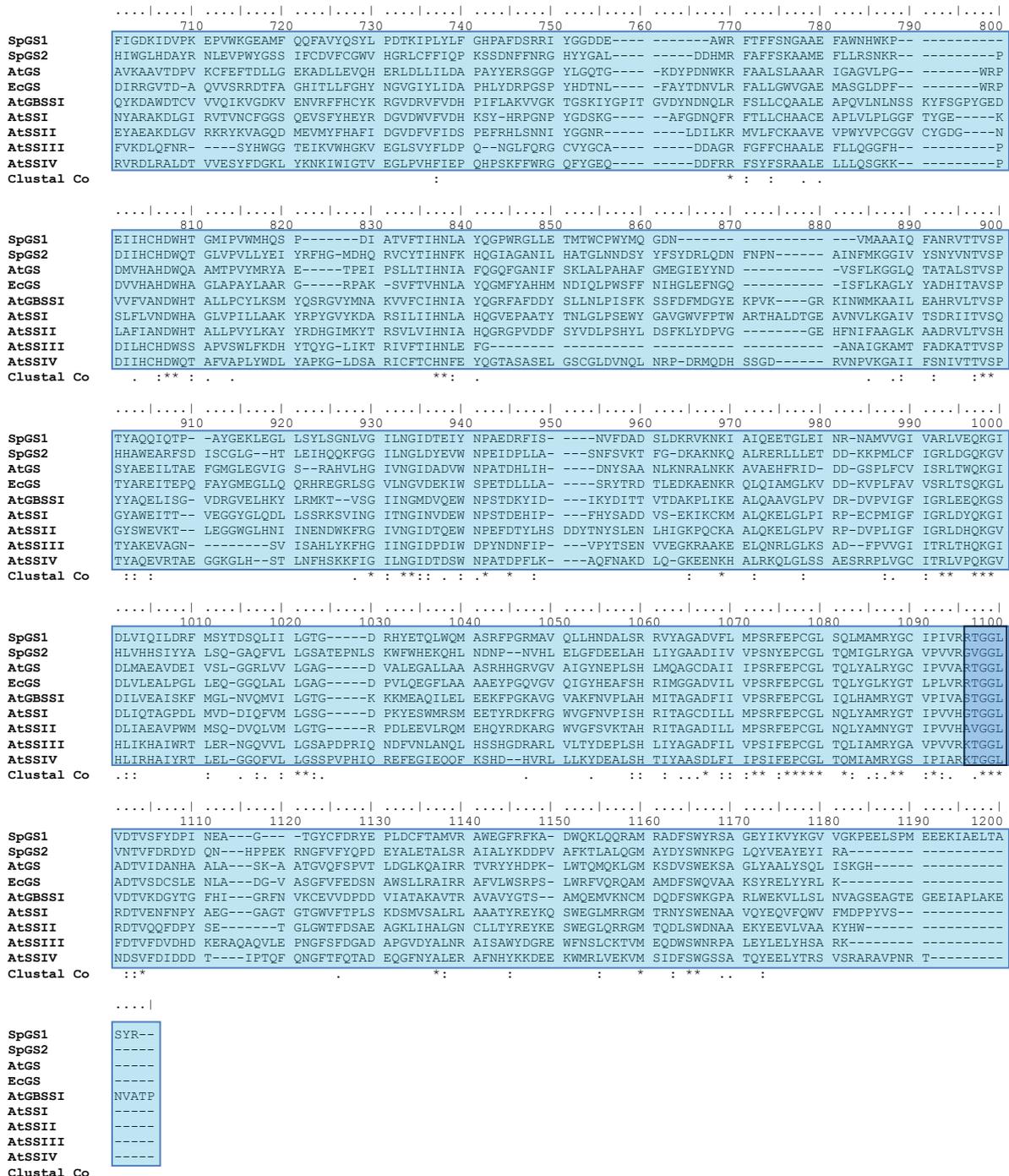


Figura 82. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias polipeptídica de las Glucógeno sintasas (GS) de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (SpGS1 y SpGS2; NP_441947.1 y NP_439945.1 respectivamente), *Agrobacterium tumefaciens* (AtGS; AAD03474.1) y *Escherichia coli* (EcGS; AC176465.1) y las cinco clases Almidón sintasas (SS) de *A. thaliana* (AtGBSSI, AtSSI, AtSSII, AtSSIII y AtSSIV; AEE31537.1, AED93283.1, AEE73621.1, AEE28775.1 y AEE84015.1 respectivamente). En un cuadro azul se han resaltado la alta homología entre los dominios carboxi-terminales de las SSS y las GSs. Dentro del dominio carboxi-terminal, se ha marcado con un recuadro más oscuro los motivos KXGGL amino y XXGGL carboxilo, altamente conservados e implicados en la catálisis y/o la unión del sustrato (ver página 49).

ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO DE LA SSIV.

Previo a este trabajo, Roldán y cols. (Delorenzi & Speed, 2002) confirmaron la complementación de la mutación por la versión completa de SSIV. Con el objetivo de entender la importancia de los dominios amino y carboxilo de SSIV, plantas transgénicas, de fondo mutante *ssIV*, expresando SSIVtN (el dominio amino) y SSIVtC (dominio carboxilo) fueron obtenidas para estudiar la complementación de la mutación *ssIV*. Además, diferentes versiones truncadas de la proteína fueron clonadas y expresadas en *E.coli*. La actividad de estas proteínas fue testada y las Kms de las mismas fue calculada.

Estudios de complementación de la mutación *ssIV* por los dominios amino y carboxilo de SSIV.

Obtención de los plásmidos pCTAPi SS4tN y pCTAPi SS4tC.

El vector pCTAPi es un "vector de salida" del sistema Gateway (ver página 113). Como "vector de entrada" se empleó el pDONR221 (ver Tabla 9, en página 110). Para la clonación de los dominios amino y carboxilo en dicho vector se diseñaron cebadores flanqueantes de la región a clonar que incluían las secuencias de los sitios *attB* (necesarias para la reacción BP) y se usó como molde el plásmido pCTAPi_SS4 (con la versión completa de SS4, incluido el CTP), obtenido por nuestro grupo previamente (Roldán *et al.*, 2007b). Para la fusión del CTP al dominio carboxilo de SS4, se fusionó una diana BamHI al extremo de carboxilo del CTP y al extremo amino del dominio carboxilo. La fusión se realizó mediante corte con BamHI y ligación. Los cebadores empleados y sus características están recogidos en la Tabla 27. Las secuencias fueron clonadas en primer lugar en el vector de clonación pJET1.2 (ver Tabla 9, en página 110) y, a continuación, transferidas al pCTAPi mediante las reacciones BP y LR (ver página 113).

Construcción	Cebadores empleados para la clonación (5'-3')	
SS4tN	Fwd: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGGAGATAGAACCATGGCGACGAAG CTATCGAGCTTC (<i>attB1</i>) Rev : GGGGACCCATTGTACAAGAAAGCTGGGTACAATCCTGAACTGTTGGAGA (<i>attB2</i>)	
	Fwd: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGGAGATAGAACCATG GCGACGAAGCTATCGAGCTTC (<i>attB1</i>) Rev: ggatccCGAAGTAGAACTAATCGACG (BamHI)	Clonación del CTP
SS4tC	Fwd: ggatccGTCGTCACATTGCAGCTGAG (BamHI) Rev: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACGTGCGATTAGGAACAGCT CTT (<i>attB2</i>)	Clonación del dominio carboxilo

Tabla 27. Oligonucleótidos empleados para la clonación de SS4tN y SS4tC en el pJET1.2 y la transferencia de ambas construcciones al vector pCTAPi, mediante Gateway. Los nucleótidos en negrita corresponden a las secuencias de los sitios *attB* indicados entre paréntesis. En azul se muestran las secuencias Shine-Dalgarno y Kozak. Los nucleótidos en minúscula corresponden a la incorporación de la secuencia diana para el enzima de restricción indicado entre paréntesis.

Obtención de líneas transgénicas.

Seis líneas transgénicas fueron obtenidas a partir de la transformación del mutante *ssIV* (Figura 84): tres líneas con pCTAPi_SS4tN (plásmido expresor del dominio amino, incluyendo CTP, de SSIV), denominadas *ssIV::SS4tN-1*, -2 y -3, y otras tres con pCTAPi_SS4tC (plásmido expresor del dominio carboxilo de SSIV con fusión amino terminal del CTP predicho por ChloroP), denominadas *ssIV::SS4tC-1*, -2 y -3.

Como se explicó en materiales y métodos (página 120), la selección de las líneas transgénicas fue realizada mediante fumigación con el herbicida Finale® (sólo las plantas que transformadas son resistentes a éste) y PCRs a partir del DNA genómico y usando los oligos de la Tabla 12. Se seleccionaron las líneas homocigotas y, en ellas, la expresión del transgen fue probada mediante RT-PCRs (extracción de RNA, retrotranscripción y PCR a partir de la preparación de cDNA).

Caracterización de las líneas transgénicas.

Cómo vemos en la Figura 84, ninguna de las seis líneas (y, por tanto, ninguno de los dominios de SSIV por separado) complementa la ausencia de SSIV. Las líneas transgénicas presentan una menor tasa de crecimiento que el WT y un color pálido, del mismo modo que lo descrito para el mutante simple *ssIV* y a diferencia de lo descrito para las transgénicas que expresan la versión completa de SSIV (Roldán *et al.*, 2007b).

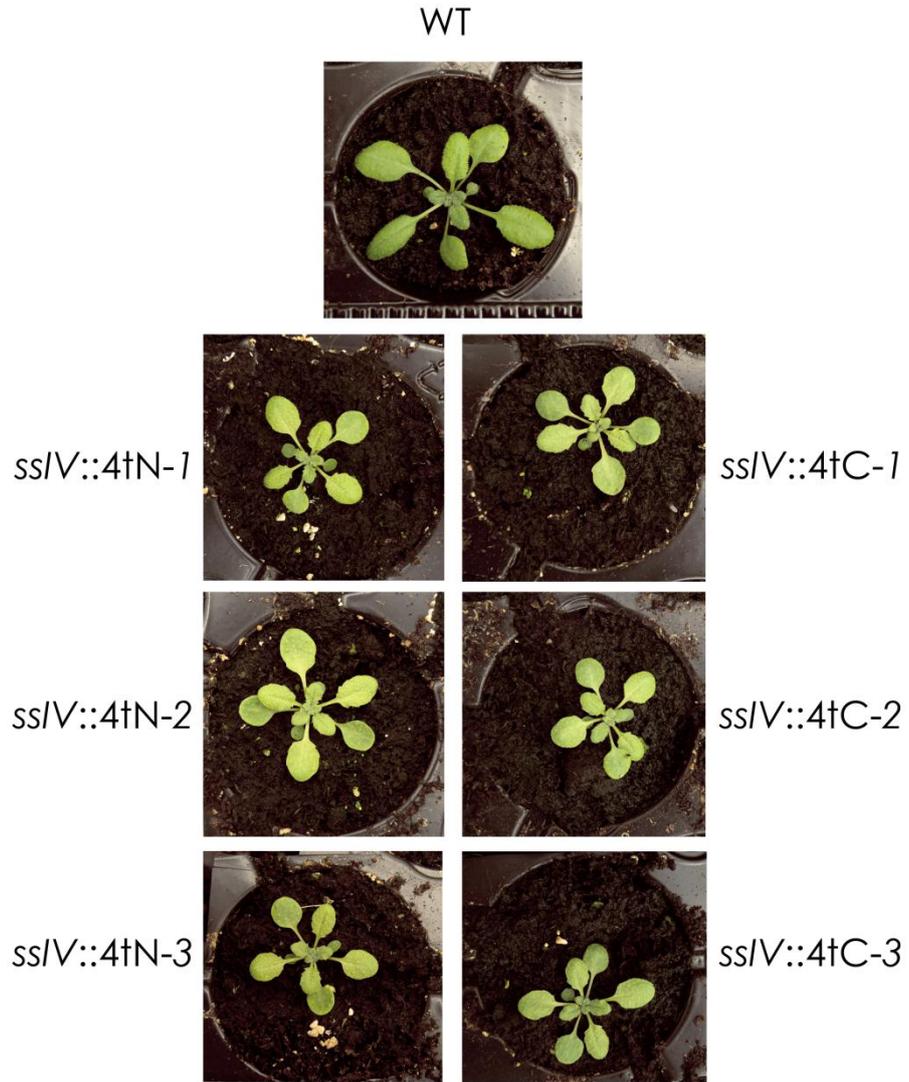


Figura 84. Fotos del WT ecotipo Col-0 y de las seis líneas transgénicas: *ss/V::SS4tN-1*, -2 y -3 y *ss/V::SS4tC-1*, -2 y -3. Las plantas se crecieron en condiciones de DL en una cámara de crecimiento de plantas. Las fotos fueron tomadas aproximadamente 20 días después de la siembra.

Estudio *in vitro* de diferentes versiones truncadas de SSIV.

Clonación de las versiones truncadas SS4.

Dado que el dominio amino de SSIV es exclusivo de ésta mientras que el dominio carboxilo presenta una alta homología con las demás SS, consideramos que las características funcionales de esta proteína residen en su dominio amino y llevamos a cabo la caracterización del mismo, para lo cual diferentes versiones de SSIV fueron clonadas y expresadas en *E.coli*: el dominio carboxilo (SSIVtC) y una serie de versiones truncadas (SSIV.A, SSIV.B, SSIV.C, SSIV.D y SSIV.E) intermedias entre la SSIV completa y SSIVtC, es decir que el dominio amino se fue acortando secuencialmente desde su extremo amino. Las secuencias polipeptídicas de cada una de ellas están recogidas en la Tabla 28 (para una visión esquemática de los diferentes fragmentos ver la Figura 88 en la página 216).

Las secuencias codificantes de SSIV.A, SSIV.B, SSIV.C, SSIV.D, SSIV.E y SSIVtN fueron clonadas en el vector de expresión en *E.coli* pET45b (Tabla 9). Las clonaciones se realizaron mediante PCRs con oligos específicos para cada construcción (Tabla 29) y usando como molde una preparación de cDNA de hojas de Col-0. Los productos de PCR fueron purificados desde los correspondientes geles de agarosa y clonados en el pET45b mediante corte con enzimas de restricción y ligación, pasando primero por el vector pMBL[®]-T (Tabla 9). El vector pET45b permite la expresión de las proteínas recombinantes fusionando a las mismas una cola de 6 His. Como se explica en materiales y métodos (página 91), las proteínas recombinantes fueron expresadas en la estirpe de *E.coli* BL21 (DE3) Δ glgCAP, por carecer de las actividades ADP-glucosa pirofosforilasa, glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa (Roldán *et al.*, 2007b).

Nombre	Secuencia	Tamaño					
SSIV.A	H HHHHHVAKAL SLNKSEGEQI SDGQFGELMT MIRSAEKNIL RLDEARATAL DDLNLKILSDK EALQGEINVL EMKLSETDER IKTAAQEKAH VELLEEQLEK LRHEMISPIE SDGYVLALS K ELETCLKLENL SLRNDIEMLK SELDSVKDTG ERVVVLEKEC SGLESSVKDL ESKLSVSDQED VSQSLSTLKIE CTDLWAKVET LQLLLDRATK QAEQAVIVLQ QNQLRNKVD KIEESLKEAN VYKESSEKIQ QYNELMQHKV TLEERLEKS DAEIFSYVQL YQESIKEFQE TLESLSKEESK KKSREPVDD MPWDYWSRLL LTVDGWLLEK KIASNDADLL RDMVWKKDRR IHDTYIDVKD KNERDAISAF LKLVSSPTSS GLYVVHIAAE MAPVAKVGGL GDVVAGLGKA LQRKGLHVEI ILPKYDCMQY DRVRDLRALD TVVESYFDGK LYKNKIWIGT VEGLPVHFIE PQHPSKFFWR GQFYGEQDDF RRFYSFSRAA LELLQSGKK PDIHCHDWQ TAFVAPLYWD LYAPKGLDSA RICFTCHNFE YQGTASASEL GSCGLDVNQL NRPDRMQDHS SGDRVNPVKG AIIFNSIVTT VSPTYAQEVR TAEGGKGLHS TLNFHSKKFI GILNGIDTDS WNPATDPFLK AQFNAKDLQG KEENKHALRK QGLSSAESR RPLVGCITRL VPQKGVHLIR HAIYRTLELG GQFVLLGSSP IEQQFKSHDH VRLLLKYDEA LSHTIYAASD LFIIPSIFEP CGLTQMIAMR YGSIPIARKT GGLNDSVFDI DDDTIPTQFQ NGFTFQTAD E QGFNYALERA FNHYKKDEEK WMRLVEKVMS IDFSWGSSAT QYEELYTRSV SRARAVPNRT	881 aa (100,36 kDa)					
	SSIV.B	HHHHHIE SDGYVLALS K ELETCLKLENL SLRNDIEMLK SELDSVKDTG ERVVVLEKEC SGLESSVKDL ESKLSVSDQED VSQSLSTLKIE CTDLWAKVET LQLLLDRATK QAEQAVIVLQ QNQLRNKVD KIEESLKEAN VYKESSEKIQ QYNELMQHKV TLEERLEKS DAEIFSYVQL YQESIKEFQE TLESLSKEESK KKSREPVDD MPWDYWSRLL LTVDGWLLEK KIASNDADLL RDMVWKKDRR IHDTYIDVKD KNERDAISAF LKLVSSPTSS GLYVVHIAAE MAPVAKVGGL GDVVAGLGKA LQRKGLHVEI ILPKYDCMQY DRVRDLRALD TVVESYFDGK LYKNKIWIGT VEGLPVHFIE PQHPSKFFWR GQFYGEQDDF RRFYSFSRAA LELLQSGKK PDIHCHDWQ TAFVAPLYWD LYAPKGLDSA RICFTCHNFE YQGTASASEL GSCGLDVNQL NRPDRMQDHS SGDRVNPVKG AIIFNSIVTT VSPTYAQEVR TAEGGKGLHS TLNFHSKKFI GILNGIDTDS WNPATDPFLK AQFNAKDLQG KEENKHALRK QGLSSAESR RPLVGCITRL VPQKGVHLIR HAIYRTLELG GQFVLLGSSP VPHIQREFEG IEQQFKSHDH VRLLLKYDEA LSHTIYAASD LFIIPSIFEP CGLTQMIAMR YGSIPIARKT GGLNDSVFDI DDDTIPTQFQ NGFTFQTAD E QGFNYALERA FNHYKKDEEK WMRLVEKVMS IDFSWGSSAT QYEELYTRSV SRARAVPNRT	778 aa (88,79 kDa)				
		SSIV.C	HHHHHIE CTDLWAKVET LQLLLDRATK QAEQAVIVLQ QNQLRNKVD KIEESLKEAN VYKESSEKIQ QYNELMQHKV TLEERLEKS DAEIFSYVQL YQESIKEFQE TLESLSKEESK KKSREPVDD MPWDYWSRLL LTVDGWLLEK KIASNDADLL RDMVWKKDRR IHDTYIDVKD KNERDAISAF LKLVSSPTSS GLYVVHIAAE MAPVAKVGGL GDVVAGLGKA LQRKGLHVEI ILPKYDCMQY DRVRDLRALD TVVESYFDGK LYKNKIWIGT VEGLPVHFIE PQHPSKFFWR GQFYGEQDDF RRFYSFSRAA LELLQSGKK PDIHCHDWQ TAFVAPLYWD LYAPKGLDSA RICFTCHNFE YQGTASASEL GSCGLDVNQL NRPDRMQDHS SGDRVNPVKG AIIFNSIVTT VSPTYAQEVR TAEGGKGLHS TLNFHSKKFI GILNGIDTDS WNPATDPFLK AQFNAKDLQG KEENKHALRK QGLSSAESR RPLVGCITRL VPQKGVHLIR HAIYRTLELG GQFVLLGSSP VPHIQREFEG IEQQFKSHDH VRLLLKYDEA LSHTIYAASD LFIIPSIFEP CGLTQMIAMR YGSIPIARKT GGLNDSVFDI DDDTIPTQFQ NGFTFQTAD E QGFNYALERA FNHYKKDEEK WMRLVEKVMS IDFSWGSSAT QYEELYTRSV SRARAVPNRT	697 aa (79,83 kDa)			
			SSIV.D	HHHHHHPVDD MPWDYWSRLL LTVDGWLLEK KIASNDADLL RDMVWKKDRR IHDTYIDVKD KNERDAISAF LKLVSSPTSS GLYVVHIAAE MAPVAKVGGL GDVVAGLGKA LQRKGLHVEI ILPKYDCMQY DRVRDLRALD TVVESYFDGK LYKNKIWIGT VEGLPVHFIE PQHPSKFFWR GQFYGEQDDF RRFYSFSRAA LELLQSGKK PDIHCHDWQ TAFVAPLYWD LYAPKGLDSA RICFTCHNFE YQGTASASEL GSCGLDVNQL NRPDRMQDHS SGDRVNPVKG AIIFNSIVTT VSPTYAQEVR TAEGGKGLHS TLNFHSKKFI GILNGIDTDS WNPATDPFLK AQFNAKDLQG KEENKHALRK QGLSSAESR RPLVGCITRL VPQKGVHLIR HAIYRTLELG GQFVLLGSSP VPHIQREFEG IEQQFKSHDH VRLLLKYDEA LSHTIYAASD LFIIPSIFEP CGLTQMIAMR YGSIPIARKT GGLNDSVFDI DDDTIPTQFQ NGFTFQTAD E QGFNYALERA FNHYKKDEEK WMRLVEKVMS IDFSWGSSAT QYEELYTRSV SRARAVPNRT	580 aa (65,96 kDa)		
				SSI.E	HHHHH HNERDAISAF LKLVSSPTSS GLYVVHIAAE MAPVAKVGGL GDVVAGLGKA LQRKGLHVEI ILPKYDCMQY DRVRDLRALD TVVESYFDGK LYKNKIWIGT VEGLPVHFIE PQHPSKFFWR GQFYGEQDDF RRFYSFSRAA LELLQSGKK PDIHCHDWQ TAFVAPLYWD LYAPKGLDSA RICFTCHNFE YQGTASASEL GSCGLDVNQL NRPDRMQDHS SGDRVNPVKG AIIFNSIVTT VSPTYAQEVR TAEGGKGLHS TLNFHSKKFI GILNGIDTDS WNPATDPFLK AQFNAKDLQG KEENKHALRK QGLSSAESR RPLVGCITRL VPQKGVHLIR HAIYRTLELG GQFVLLGSSP VPHIQREFEG IEQQFKSHDH VRLLLKYDEA LSHTIYAASD LFIIPSIFEP CGLTQMIAMR YGSIPIARKT GGLNDSVFDI DDDTIPTQFQ NGFTFQTAD E QGFNYALERA FNHYKKDEEK WMRLVEKVMS IDFSWGSSAT QYEELYTRSV SRARAVPNRT	525 aa (59,29 kDa)	
					SSIViC	HH HHHHVHIAAE MAPVAKVGGL GDVVAGLGKA LQRKGLHVEI ILPKYDCMQY DRVRDLRALD TVVESYFDGK LYKNKIWIGT VEGLPVHFIE PQHPSKFFWR GQFYGEQDDF RRFSYFSRAA LELLQSGKK PDIHCHDWQ TAFVAPLYWD LYAPKGLDSA RICFTCHNFE YQGTASASEL GSCGLDVNQL NRPDRMQDHS SGDRVNPVKG AIIFNSIVTT VSPTYAQEVR TAEGGKGLHS TLNFHSKKFI GILNGIDTDS WNPATDPFLK AQFNAKDLQG KEENKHALRK QGLSSAESR RPLVGCITRL VPQKGVHLIR HAIYRTLELG GQFVLLGSSP VPHIQREFEG IEQQFKSHDH VRLLLKYDEA LSHTIYAASD LFIIPSIFEP CGLTQMIAMR YGSIPIARKT GGLNDSVFDI DDDTIPTQFQ NGFTFQTAD E QGFNYALERA FNHYKKDEEK WMRLVEKVMS IDFSWGSSAT QYEELYTRSV SRARAVPNRT	502 aa (56,85 kDa)

Tabla 28. Secuencias aminoacídicas de las versiones truncadas de SSIV de *A.thaliana*. En verde aparece la cola de 6 His fusionada por la clonación en el pET45b, en negro el dominio amino, subrayado en amarillo las regiones predichas como parte de un dominio long coiled-coil y en morado, el dominio carboxilo. El tamaño predicho incluye la cola de poliHis.

Versión truncada de SS4	Oligonucleótidos usados en este trabajo (5'-3')	Tamaño de banda esperado (pb)
SS4.A	Fwd: CGggatccCGTTCGAAAAGCTTTGTCC (BamHI) Rev: ctcgagTCACGTGCGATTAGGAACAGC (XhoI)	2639 pb
SS4.B	Fwd: CGggatccCATAGAAAGTGATGGTTATG (BamHI) Rev: ctcgagTCACGTGCGATTAGGAACAGC (XhoI)	2330 pb
SS4.C	Fwd: CGggatccCGAATGCACTGATCTATGGG (BamHI) Rev: ctcgagTCACGTGCGATTAGGAACAGC (XhoI)	2087 pb
SS4.D	Fwd: CGggatccCCCGGTTGATGATATGCCTTG (BamHI) Rev: ctcgagTCACGTGCGATTAGGAACAGC (XhoI)	1736 pb
SS4.E	Fwd: CGggatccCAATGAACGTGATGCCATC (BamHI) Rev: ctcgagTCACGTGCGATTAGGAACAGC (XhoI)	1571 pb
SS4tC	Fwd: ggatccGTCGTTACATTGCAGCTGAG (BamHI) Rev: ctcgagTCACGTGCGATTAGGAACAGC (XhoI)	1506 pb

Tabla 29. Oligonucleótidos empleados para la clonación de las versiones truncadas de SS4 y tamaño de la banda esperada en cada caso, usando como molde una preparación de cDNA de hojas de Col-0. Los nucleótidos en minúscula corresponden a la incorporación de la secuencia diana para el enzima de restricción indicado entre paréntesis.

Inducción de las versiones truncadas de SSIV.

La inducción fue probada con varias colonias resultantes de cada transformación y aquella con una mayor inducción fue seleccionada. Para comparar la inducción de las diferentes colonias de una misma transformación, 1ml de cultivo de cada una de ellas, inducido a 25 °C y 100 rpm, fue tomado a las 0 (t_0), 0,5 (t_{30}), 1 (t_1) y 3 (t_3) h después de la inducción. Las cuatro muestras de cada colonia fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 5 min y los sobrenadantes (LB) fueron eliminados. Los pellets fueron resuspendidos en 500 μ l de tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,5 suplementado con PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas y rotas por sonicación (ver página 91). Los cultivos rotos fueron centrifugados (20 min a 4 °C y 14000 rpm) y los sobrenadantes (aproximadamente 30 μ g de proteínas) fueron cargados en geles de poliacrilamida para la separación de las proteínas de las muestras. Como control, se indujo también la estirpe de BL21 (DE3) Δ glgCAP transformada con el pET45b_vacio (sin ningún gen clonado). La Figura 85 muestra la tinción con Coomassie blue de las proteínas, separadas en geles de poliacrilamida, de la colonia elegida de cada transformación a los diferentes tiempos de inducción. El primer gel (Figura 85A) muestra a la estirpe transformada con el vector vacío. Se comprueba que ninguna de las bandas esperadas en las estirpes transformadas incrementa su intensidad con la inducción cuando el vector está vacío. El resto de geles corresponden a las estirpes transformadas con los plásmidos (B) pET45b_SS4 (completa), (C) pET45b_SS4.A, (D) pET45b_SS4.B, (E) pET45b_SS4.C, (F) pET45b_SS4.D, (G) pET45b_SS4.E, (H) pET45b_SS4tC (dominio carboxilo). En cada caso se puede observar el incremento en la intensidad de una banda con

el tiempo de inducción. Estas bandas presentan aproximadamente el tamaño esperado en cada caso (ver tamaños en Tabla 28, página 210). La inducción fue menos evidente en los casos de los fragmentos SSIV.A (Figura 85C) y SSIV.B (Figura 85D), pero la inducción fue confirmada mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-pentaHis (Figura 86). Mediante inmunoblot confirmamos también que parte de cada proteína era degradada y/o enviada a cuerpos de inclusión. Como vemos en la Figura 86, gran parte de todas las proteínas precipita junto con los restos celulares tras la ruptura y centrifugación de los cultivos, lo cual indicaría que parte de las mismas está siendo enviada a cuerpos de inclusión. Además, como ya se vio para la SSIV completa (página 189), las proteínas sufren proteólisis por parte de *E.coli*, de modo que en cada calle observamos una banda (de mayor tamaño) correspondiente al tamaño de la proteína en cuestión y una serie de bandas menores que corresponderían a fragmentos de la misma producidos por *E.coli*. Esta degradación, parece mayor cuanto mayor es la versión de la proteína. Debe tenerse en cuenta que, los cultivos empleados en este ensayo corresponden a una inducción de 3 h a 30°C y 150 rpm y que estas condiciones no son las más adecuadas para la expresión de SSIV, al menos para la versión completa (ver página 189).

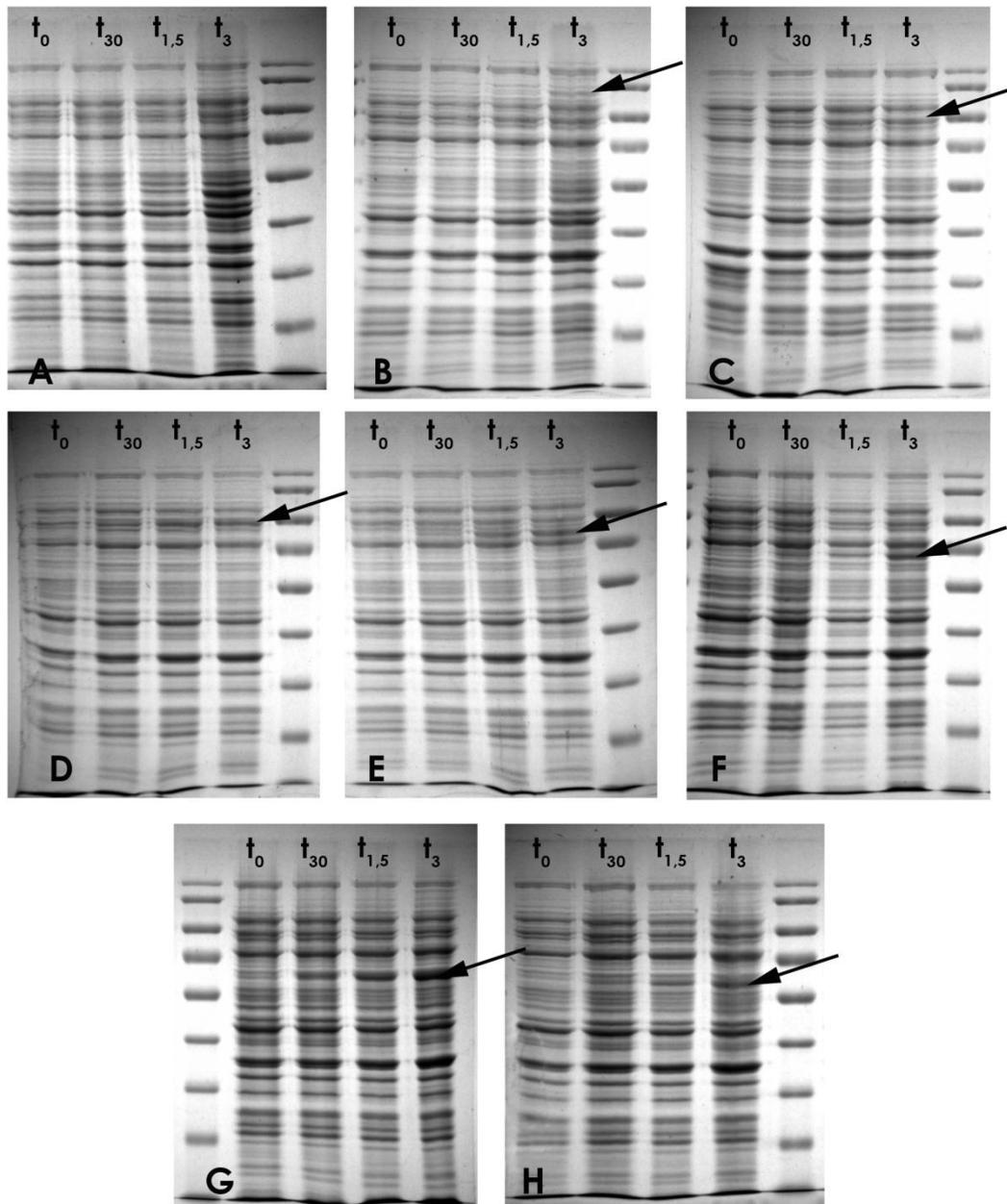


Figura 85. Análisis mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con Coomassie de la inducción por IPTG de las estirpes de BL21 (DE3) Δ glgCAP transformadas con (A) pET45b_vacio (control), (B) pET45b_SS4 (completa), (C) pET45b_SS4.A, (D) pET45b_SS4.B, (E) pET45b_SS4.C, (F) pET45b_SS4.D, (G) pET45b_SS4.E, (H) pET45b_SS4tC (dominio carboxilo). Las estirpes fueron inducidas con IPTG durante 0 min (t_0), 30 min (t_{30}), 1,5 h ($t_{1.5}$) y 3 h (t_3) a 30 °C y 150 rpm. La inducción se realizó mediante adición de 1mM de IPTG al cultivo de la estirpe crecido hasta una DO_{600nm} de 0,5. Muestras de 1 ml de los cultivo fueron tomadas a los diferentes tiempos de inducción. Las muestras eran centrifugadas a 13000 rpm durante 5 min y el sobrenadante (LB) era eliminado. Los pellets fueron resuspendidos en 500 μ l de tampón Tris-HCl 100mM pH 7,5 suplementado con PMSF y cóctel de inhibidores de proteasas y rotas por sonicación (ver página 91). Los cultivos rotos se centrifugaban (20 min a 4 °C y 14000 rpm) y los sobrenadantes (aproximadamente 30 μ g de proteinass) fueron cargados en geles de acrilamida que, tras la separación de las proteínas de las muestras, fueron teñidos con Coomassie blue. Las flechas indican la banda inducida.

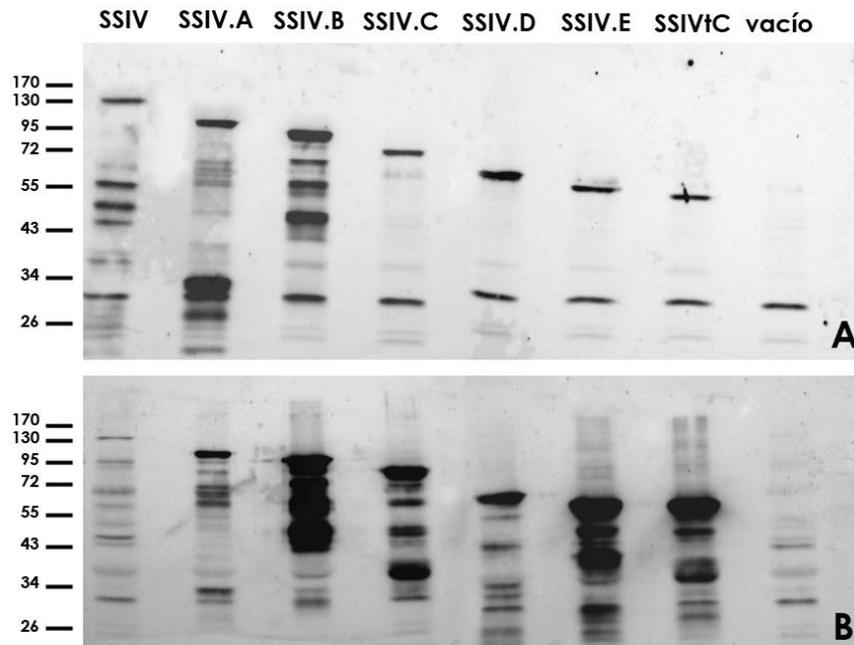


Figura 86. Análisis mediante inmunoblot de la expresión de SSIV y sus versiones truncadas en las estirpes de *E.coli* transformadas con los vectores pET45b_SS4, pET45b_SS4.A, pET45b_SS4.B, pET45b_SS4.C, pET45b_SS4.D, pET45b_SS4.E y pET45b_SS4tC inducidas con IPTG durante 3 h a 30 °C y 150 rpm. Como control se usó la estirpe transformada con el pET24b_vacío. La inducción se realizó mediante adición de 1mM de IPTG al cultivo de la estirpe crecido a una DO_{600nm} de 0.5. Muestras de 1 ml de los cultivos fueron tomadas a los diferentes tiempos de inducción. Las muestras eran centrifugadas a 13000 rpm durante 5 min y los sobrenadantes (LB) eran eliminados. Los pellets fueron resuspendidos en 500 μ l de tampón Tris-HCl 100mM pH 7,5 suplementado con PMSF y cóctel de inhibidores de proteasas y rotas por sonicación (ver página 91). Los cultivos rotos se centrifugaban (20 min a 4 °C y 14000 rpm) y sobrenadante (SN) y pellet (pellet) eran cargados en gels de acrilamida para la separación de las proteínas de las muestras, su transferencia a filtros de nitrocelulosa e incubación con el anticuerpo anti-pentaHis.

Actividad almidón sintasa de las versiones truncadas de SSIV.

Para comprobar cuales de las versiones truncadas de SSIV expresadas en *E.coli* eran funcionales se realizó un zimograma de la actividad almidón sintasa de los cultivos inducidos 3 h a 30 °C y 150 rpm. La cantidad de proteína cargada de cada inducción fue de 150 μ g, sin embargo, dado que la inducción de cada estirpe produce una cantidad diferente de la proteína recombinante correspondiente (Figura 85 y Figura 86) y que una misma inducción no siempre resulta en la producción de una misma cantidad de proteína, la señal obtenida en el zimograma no debe entenderse como una medida cuantitativa de la actividad de cada fragmento, sino como una manera de saber que versiones son activas y cuáles no lo son. La Figura 87 muestra el zimograma de la actividad SS (usando glucógeno como sustrato) obtenido con las versiones completa y truncadas de SSIV. La estirpe con el plásmido vacío se usó como control. El resultado obtenido indicaba que las versiones SSIV.A, SSIV.B, SSIV.C y SSIV.D, así como la SSIV completa, presentaban actividad SS, mientras que las versiones SSIV.E y SSIVtC carecían de actividad en las condiciones de ensayo empleadas.

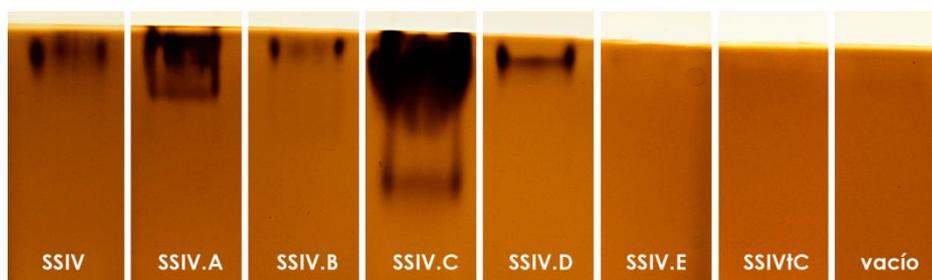


Figura 87. Análisis mediante zimograma de la actividad SS de las versiones truncadas de SSIV.

Obtención de las Kms para ADP-Glucosa y amilopectina de las versiones truncadas de SSIV.

Las Kms de las versiones truncadas de SSIV fueron calculadas para sus dos sustratos: la ADP-Glc (donador de grupos glucosilos) y la amilopectina (aceptor de grupos glucosilos). Para ello la actividad SS fue ensayada (ensayo no radiactivo, ver página 94) para diferentes concentraciones de cada sustrato, usando en cada caso una concentración saturante del otro sustrato. En el caso de las Kms para la amilopectina, se usó una concentración de ADP-Glc de 5 mM y concentraciones crecientes de amilopectina entre: 0,05 y 10 mg/ml. En el caso de las Kms para la ADP-Glc, se usó una concentración de amilopectina de 10 mg/ml y concentraciones crecientes de ADP-Glc entre 0,05 y 10 mM. Los valores de actividad obtenidos en cada caso quedan recogidos en la Tabla 31. El cálculo de las Kms se realizó mediante la representación de dobles inversos o Lineweaver-Burk (Figura 89). Los valores de Km obtenidos quedan recogidos en la Tabla 30:

Proteína	Km amilopectina (mM)	Km ADP-Glucosa (mM)
SSIV	0,22	0,38
SSIV.A	0,27	0,32
SSIV.B	0,23	0,50
SSIV.C	1,30	1,36
SSIV.D	0,13	13,89
SSIV.E	1,38	37,50
SSIVtC	No tiene actividad	

Tabla 30. Recopilatorio de las Kms de SSIV y sus versiones truncadas para la amilopectina y la ADP-Glc.

SSIV.A y SSIV.B presentan valores de Km prácticamente idénticos a los de SSIV completa, indicando que esta región amino terminal del dominio amino no es imprescindible para la actividad glucosiltransferasa de SSIV, sin embargo, la región carboxi terminal del dominio amino parece tener un papel importante en la afinidad de SSIV por la ADP-Glc. Vemos en la Tabla 30 que al seguir acortando el dominio amino, la Km por la ADP-Glc incrementa, es decir, la afinidad por este sustrato es mayor en SSIV.C que en SSIV.D y en SSIV.D es mayor que en SSIV.E, que tiene una Km de 37,5 mM (afinidad por ADP-Glc muy baja). El dominio carboxilo de SSIV (SSIVtC) no muestra actividad, presumiblemente por falta total de afinidad por la ADP-Glc. La región del

dominio amino presente en SSIV.D y ausente en SSIVtC parece fundamental para que el enzima presente actividad glucosiltransferasa. Un análisis informático, mediante alineamiento de las secuencias polipeptídicas de las SSIV de diferentes especies, demuestra que esta zona está altamente conservada (Figura 83). Podemos decir, que esta región (aminoácidos 471 a 544), que no muestra estructura coiled-coil, constituye un dominio conservado fundamental para la actividad SSIV (Figura 88). En cuanto a las Kms observadas para la amilopectina (Tabla 30), no podemos decir que exista una clara relación entre el dominio amino de SSIV y la afinidad por este sustrato.

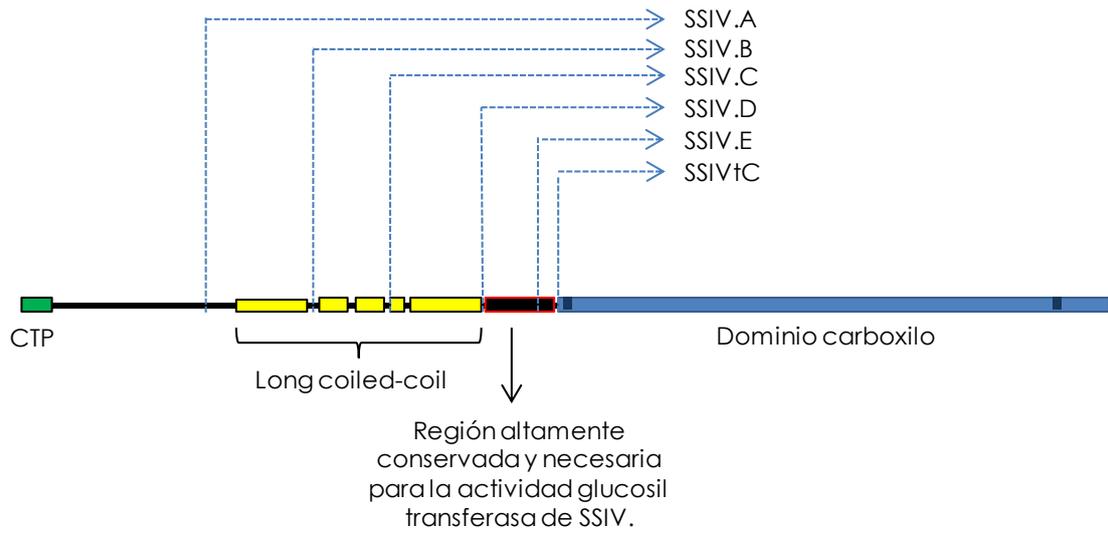


Figura 88. Esquema de los diferentes dominios y motivos de AtSSIV. El rectángulo azul marca el dominio carboxilo y las regiones en su interior, marcadas en azul oscuro, son los motivos KXGGL amino y XXGGL carboxilo, altamente conservados e implicados en la catálisis y/o la unión del sustrato (ver página 216). El rectángulo verde corresponde al péptido de tránsito predicho mediante ChloroP (Alonso-Casajus *et al.*, 2006) y los amarillos, a los motivos coiled-coil predichos mediante (Emanuelsson *et al.*, 1999). La región marcada en rojo no tiene asociada ninguna estructura, pero está altamente conservada y parece fundamental para la actividad glucosiltransferasa de SSIV.

Km de SSIV.A para la amilopeptina = 0,27 mM				Km de SSIV.A para la ADP-Glc = 0,32 mM			
mg/ml amilopeptina	nmoles producidos/ml/min	1/V (nmoles ⁻¹ ml min)	1/[S] (mg ⁻¹ ml)	mM AGP-Glc	nmoles producidos/ml/min	1/V (nmoles ⁻¹ ml min)	1/[S] (mM ⁻¹)
0,07	3,76	0,266	14,29	0,05	0,322	0,32	20,00
0,15	5,62	0,178	6,67	0,10	0,173	0,17	10,00
0,20	6,48	0,154	5,00	0,25	0,088	0,09	4,00
0,35	13,02	0,077	2,86	0,50	0,075	0,08	2,00
0,50	16,00	0,063	2,00	1,00	0,061	0,06	1,00
5,00	12,93	0,077	0,20	2,00	0,054	0,05	0,50
				3,00	0,045	0,05	0,33
				5,00	0,055	0,06	0,20
				7,50	0,047	0,05	0,13
				10,00	0,038	0,04	0,10

Km de SSIV.B para la amilopeptina = 0,23 mM				Km de SSIV.B para la ADP-Glc = 0,50 mM			
mg/ml amilopeptina	nmoles producidos/ml/min	1/V (nmoles ⁻¹ ml min)	1/[S] (mg ⁻¹ ml)	mM AGP-Glc	nmoles producidos/ml/min	1/V (nmoles ⁻¹ ml min)	1/[S] (mM ⁻¹)
0,10	18,99	0,050	10,00	0,05	0,270	0,27	20,00
0,20	26,61	0,040	5,00	0,10	0,139	0,14	10,00
0,30	34,20	0,030	3,33	0,25	0,070	0,07	4,00
0,40	36,48	0,030	2,50	0,50	0,044	0,04	2,00
0,50	38,22	0,030	2,00	1,00	0,042	0,04	1,00
2,00	62,73	0,020	0,50	2,00	0,031	0,03	0,50
5,00	62,49	0,020	0,20	3,00	0,032	0,03	0,33
				5,00	0,034	0,03	0,20
				7,50	0,026	0,03	0,13
				10,00	0,019	0,02	0,10

Km de SSIV.C para la amilopeptina = 1,30 mM				Km de SSIV.C para la ADP-Glc = 1,36 mM			
mg/ml amilopeptina	nmoles producidos/ml/min	1/V (nmoles ⁻¹ ml min)	1/[S] (mg ⁻¹ ml)	mM AGP-Glc	nmoles producidos/ml/min	1/V (nmoles ⁻¹ ml min)	1/[S] (mM ⁻¹)
0,15	16,11	0,062	6,67	0,25	17,53	0,057	4,00
0,20	19,00	0,053	5,00	0,50	25,82	0,039	2,00
0,30	29,02	0,034	3,33	1,00	48,90	0,020	1,00
0,50	49,65	0,020	2,00	2,00	59,88	0,017	0,50
2,00	104,69	0,010	0,50	3,00	78,41	0,013	0,33
5,00	116,82	0,009	0,20	5,00	97,44	0,010	0,20
				7,50	97,33	0,010	0,13
				10,00	97,08	0,010	0,10

Km de SSIV.D para la amilopeptina = 0,13 mM				Km de SSIV.D para la ADP-Glc = 13,89 mM			
mg/ml amilopeptina	nmoles producidos/ml/min	1/V (nmoles ⁻¹ ml min)	1/[S] (mg ⁻¹ ml)	mM AGP-Glc	nmoles producidos/ml/min	1/V (nmoles ⁻¹ ml min)	1/[S] (mM ⁻¹)
0,10	32,67	0,031	10,00	0,25	8,83	0,113	4,00
0,15	39,10	0,026	6,67	0,50	19,25	0,052	2,00
0,20	44,33	0,023	5,00	1,00	45,30	0,022	1,00
0,25	46,34	0,022	4,00	2,00	62,49	0,016	0,50
0,30	57,22	0,017	3,33	3,00	64,88	0,015	0,33
0,50	64,22	0,016	2,00	7,5	109,89	0,009	0,13
1,00	73,69	0,014	1,00				
2,00	75,61	0,013	0,50				
5,00	76,06	0,013	0,20				

Km de SSIV.E para la amilopeptina = 1,38 mM				Km de SSIV.E para la ADP-Glc = 37,50 mM			
mg/ml amilopeptina	nmoles producidos/ml/min	1/V (nmoles ⁻¹ ml min)	1/[S] (mg ⁻¹ ml)	mM AGP-Glc	nmoles producidos/ml/min	1/V (nmoles ⁻¹ ml min)	1/[S] (mM ⁻¹)
0,15	9,55	0,105	6,67	0,80	20,82	0,048	1,25
0,30	17,81	0,056	3,33	2,00	50,70	0,020	0,50
0,50	25,61	0,039	2,00	4,00	110,15	0,009	0,25
1,00	43,96	0,023	1,00	5,00	121,47	0,008	0,20
2,50	66,19	0,015	0,40	7,50	135,09	0,007	0,13
5,00	103,01	0,010	0,20				
10,00	111,75	0,009	0,10				

Tabla 31. Valores obtenidos en los ensayos de actividad SS para el cálculo de las Kms de SSIV.A, SSIV.B, SSIV.C, SSIV.D y SSIV.E para la amilopeptina y la ADP-Glc. Se incluyen también los valores inversos de V (velocidad de reacción = nmoles de ADP producidos/ml/min) y [S] (concentración de sustrato = mg/ml amilopeptina o mM ADP-Glc) empleados para el cálculo de las Kms mediante la representación de dobles inversos o Lineweaver-Burk (Figura 89).

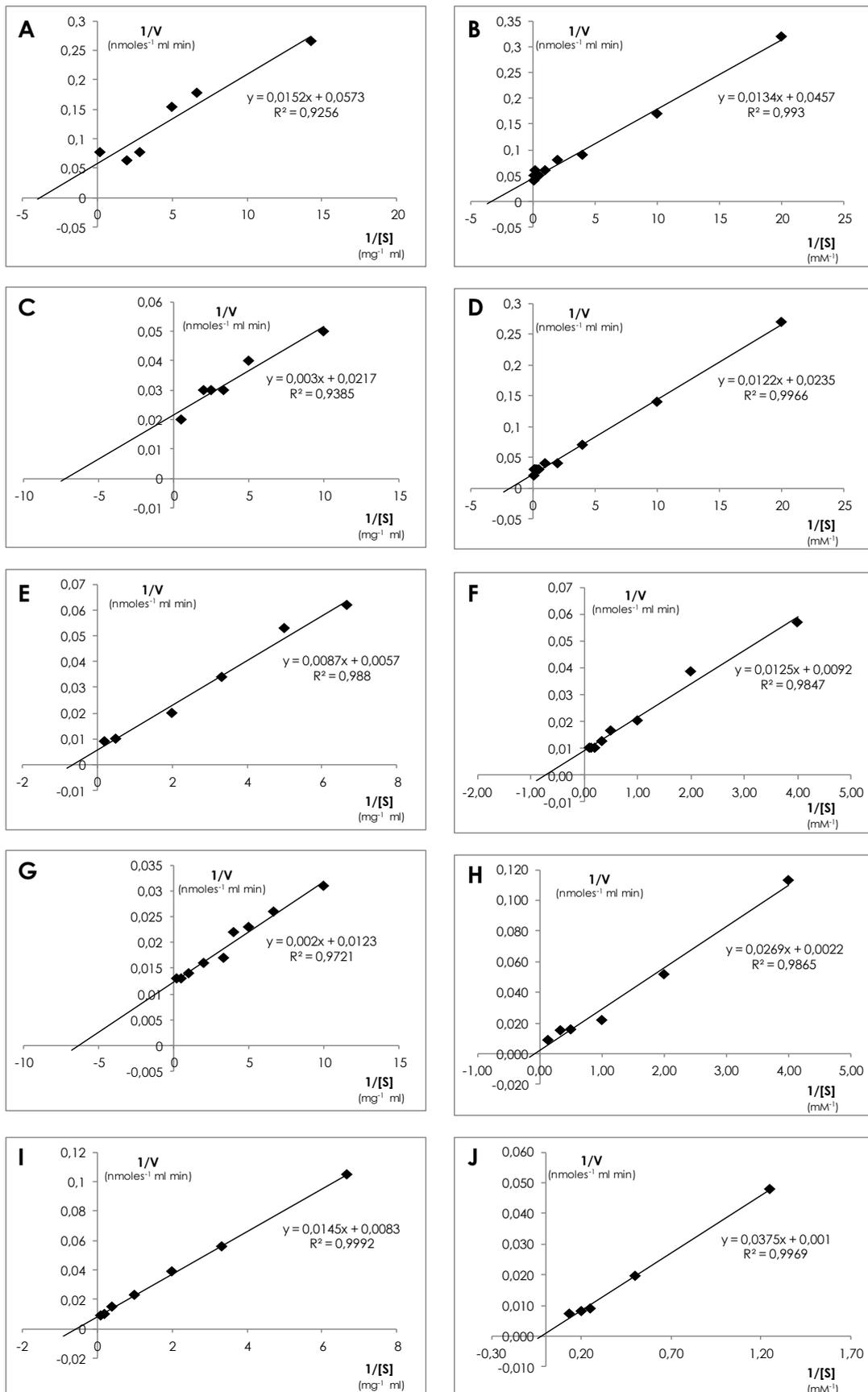


Figura 89. Representación de dobles inversos o Lineweaver-Burk para el cálculo de la K_m de las versiones truncadas SSIV.A (A y B), SSIV.B (C y D), SSIV.C (E y F), SSIV.D (G y H) y SSIV.E (I y J), por amiloptectina (A, C, E, G e I) y ADP-Glc (B, D, F, H y J). Los valores de $1/V$ y $1/[S]$ representados son los recogidos en la Tabla 31.

Discusión.

EL PAPEL FUNDAMENTAL DE SSIV EN EL INICIO DE LA SÍNTESIS DEL GRÁNULO DE ALMIDÓN.

Como ya se comentó en la introducción (página 58), poco se conoce acerca del proceso de inicio de la síntesis del gránulo de almidón. Nuestro grupo ha demostrado que la almidón sintasa de Clase IV (SSIV) juega un importante papel en este punto (Roldán *et al.*, 2007b; Szydlowski *et al.*, 2009). La caracterización de los mutantes SS simples (*ssIII*, *ssIV*), dobles (*ssIssIV*, *ssIIssIV*, *ssIIIssIV*) y triples (*ssIssIIssIII*, *ssIssIIssIV*) nos han permitido un mayor entendimiento de la implicación de SSIV en la síntesis de almidón en hojas de *A.thaliana*. En este apartado discutiré las evidencias acerca del papel fundamental de SSIV en la iniciación del gránulo de almidón.

SSIV es necesaria y suficiente para la síntesis del número correcto de gránulos de almidón en hojas de *A.thaliana*.

Datos previos de nuestro grupo (Roldán *et al.*, 2007b) han mostrado, mediante la caracterización del mutante simple *ssIV* de *A.thaliana*, carente de la actividad almidón sintasa de Clase IV (SSIV), que la ausencia de dicha actividad provoca la acumulación de un único gránulo de almidón por cloroplastos (Figura 14), salvo excepciones en las que se observan dos. Los resultados indican que SSIV es necesaria para la síntesis del número correcto de gránulos de almidón por cloroplastos observados en plantas silvestres y sugieren que dicha enzima está implicada en el proceso de iniciación del gránulo de almidón. En este sentido, encontramos que la actividad *in vivo* de SSIV supone una parte inapreciable de la actividad glucosiltransferasa total de la planta – el mutante *ssIV* posee prácticamente la misma actividad SS soluble que el WT y en el mutante *ssIssIIssIII* no se detecta dicha actividad (Figura 27) -, sugiriendo que su función principal debe ser diferente a la de elongación de las cadenas de amilopectina. Por el contrario, la ausencia de otras SSs provoca una disminución de la actividad glucosiltransferasa total (Figura 27) y cambios en el contenido y/o la estructura del almidón (Delvallé *et al.*, 2005b; Zhang *et al.*, 2008b), pero no afecta al número de gránulos por cloroplastos.

Parte de este trabajo ha consistido en la obtención y caracterización de mutantes dobles y triples carentes de SSIV y una o dos de las demás SSs solubles. El efecto de la mutación del gen SS4 se ve incrementado cuando además eliminamos otras SSs: en los mutantes *ssIssIV*, *ssIIssIV* (Figura 19), *ssIIIssIV* y *ssIssIIssIV* (Figura 24) encontramos también un único gránulo por cloroplasto, pero además se observa la aparición de cloroplastos vacíos (Figura 19, Figura 24 y Figura 26). En el caso particular del doble mutante *ssIIIssIV* es especialmente difícil localizar cloroplastos que posean síntesis de almidón, siendo el contenido de almidón en dicho mutante demasiado bajo como para ser cuantificado mediante los métodos ensayados. Los mutantes *ssIssIV*, *ssIIssIV* y *ssIssIIssIV* presentan un contenido de almidón/gpf acorde con lo esperado del efecto aditivo de

las mutaciones que poseen, sin embargo, el contenido de almidón del mutante *ssllssIV* no es cuantificable, sugiriendo una cierta sinergia entre las proteínas SSIII y SSIV y, por tanto, que SSIII tendría alguna función extra a la de elongación de glucanos, al menos en ausencia de SSIV (ver página 227). Por su parte, el triple mutante *ssllsslll* (que solo posee la SS soluble de Clase IV y la GBSSI) acumula muy poco almidón (Figura 22), como resultado de su baja actividad glucosiltransferasa (no detectable con los métodos empleados), pero posee un número correcto de gránulos. Podemos decir, por tanto, que SSIV es necesaria y suficiente para la síntesis del número correcto de gránulos de almidón por cloroplasto. Otros indicios de la implicación de SSIV en un proceso diferente al resto de SSs, son (1) su disposición en partículas definidas asociadas a la superficie de uno de los polos del gránulo de almidón (Figura 64, SSIV no aparece distribuida por todo el estroma); y (2) la presencia en los gránulos de almidón de plantas carentes de SSIV, de una zona en el centro de los mismos menos electrodensa al microscopio electrónico (Zhang *et al.*, 2008b) y ausente en los gránulos de plantas silvestres (Roldán *et al.*, 2007a), lo cual, como se discutirá a continuación (ver página 223), podría estar indicando un inicio diferente del gránulo en estos mutantes. Todo ello nos lleva a suponer que SSIV es necesaria para el inicio del gránulo de almidón en condiciones normales, de modo que en su ausencia la síntesis solo puede tener lugar de manera estocástica (azarosa) y facilitada por la presencia del resto de SSs. La síntesis en ausencia de SSIV dejaría de estar controlada y SSIII jugaría un papel particularmente importante (ver página 227), dado el drástico fenotipo del mutante *ssllssIV*.

Los gránulos de almidón iniciados en ausencia de SSIV difieren de los gránulos normales.

Los gránulos de almidón del mutante *ssIV* no presentan alteración de la tasa amilosa/amilopectina ni cambios importantes en la estructura de la amilopectina - la comparación de los perfiles de distribución multimodal de las cadenas en la molécula de amilopectina según su longitud (distribución CL) del mutante *ssIV* y el WT indican que la ausencia de SSIV tiene un efecto minoritario sobre la estructura de la amilopectina: solo se observa una ligera disminución en el número de cadenas de entre 7 y 10 residuos de glucosa (Roldán *et al.*, 2007b) -, a diferencia de lo descrito para los mutantes simples *ssl*, *ssll* y *sslll* que presentan cambios en la distribución CL, asociados al papel específico de SSI, SSII y SSIII en la elongación de las cadenas de la amilopectina (ver página 47), y una mayor relación amilosa/amilopectina en los casos de los mutantes *ssll* y *sslll*, pero no en el mutante *ssl* (Roldán *et al.*, 2007b). Los mutantes dobles *ssllssIV* y *ssllsslll* presentan cambios en la distribución CL resultado de la suma de las alteraciones observadas en los mutantes simples (Szydłowski *et al.*, 2011a). Los mutantes triples *ssllsslll* y *ssllssllssIV* presentan una mayor relación amilosa/amilopectina que el WT (aproximadamente un 41 y un 42 % respectivamente), probablemente como consecuencia del incremento de la eficiencia de la GBSSI (la cual tiene una menor afinidad por la ADP-Glc que el resto de SSs). *ssllsslll* presenta una distribución CL similar a la esperada de la suma de de las alteraciones observadas en los mutantes simples *ssl*, *ssll* y *sslll*, pero no idéntica, lo cual sería debido a cierto solapamiento de función entre las enzimas ausentes en el triple mutante (Zhang

et al., 2008b; Szydlowski *et al.*, 2011a). La distribución CL del mutante *ssllsllsIV* es idéntica a la del mutante *ssllsll* (Szydlowski *et al.*, 2009; Szydlowski *et al.*, 2011a), sugiriendo de nuevo que SSIV no juega un papel importante en la determinación de la estructura de la amilopectina.

Sin embargo, los gránulos de almidón presentes en los cloroplastos de todos los mutantes carentes de SSIV presentan un mayor tamaño que los presentes en cloroplastos de plantas silvestres (Figura 14, Figura 15, Figura 19 y Figura 24). La explicación más simple es que, en cloroplastos de plantas carentes de SSIV, todo el *pool* de ADP-Glc sería empleado en la elongación de las cadenas de glucosa del único gránulo presente, permitiendo un mayor crecimiento del mismo en comparación con los gránulos del WT, en cuyos cloroplastos, el *pool* de ADP-Glc se distribuye en el crecimiento de los 5-7 gránulos existentes (Roldán *et al.*, 2007b).

Otra característica observada en los gránulos de almidón de los mutantes carentes de SSIV, es la presencia de una zona en el centro de los mismos menos electrodensa al microscopio electrónico y ausente en los gránulos de plantas silvestres (Roldán *et al.*, 2007a). Esta zona menos electrodensa podría indicar un inicio del gránulo diferente a lo habitual: al carecer de SSIV, la síntesis del gránulo tendría lugar a partir de un "centro de nucleación" diferente. Además, hemos observado la imposibilidad de la completa degradación del almidón en los mutantes carentes de SSIV (Figura 35). Mientras las plantas WT, el mutante simple *sslll* y el mutante triple *ssllsllslll* no presentan almidón cuantificable tras 56 h de oscuridad, los mutantes carentes de SSIV - sin tener en cuenta el mutante *ssllsllsIV*, que no posee almidón cuantificable - poseen cierta cantidad de almidón aún después de 104 h de oscuridad (un mayor número de horas de oscuridad compromete la supervivencia de la planta). Es posible que este "centro de nucleación alternativo" empleado por los mutantes carentes de SSIV no pueda ser degradado (al menos, no tras 104 h de oscuridad) por las enzimas degradativas del almidón.

La imposibilidad de obtener plantas carentes de SSIV sin almidón mediante crecimiento en oscuridad prolongada recuerda a lo documentado para *Ostreococcus tauri* (Ral *et al.*, 2004). Como se comentó en la introducción (ver página 63), *O.tauri* es el único miembro de *Chloproplastida* carente de SSIV descrito hasta la fecha y presenta, al igual que los cloroplastos de mutantes carentes de SSIV, un único gránulo de almidón cuya degradación completa nunca se ha conseguido – la incubación en oscuridad continua provoca la pérdida de la viabilidad antes de que el almidón haya sido consumido (Ral *et al.*, 2004).

SSIV es necesaria para la síntesis de almidón en raíces de *A.thaliana*.

Nuestros datos muestran que SSIV jugaría el mismo papel en el inicio de la síntesis de almidón en hojas que en raíces. El mutante *ssllsllsIV*, al igual que lo descrito para el mutante *aps1* (Ventriglia *et al.*, 2008), carece de acumulación de almidón en las células de la columela. El mutante *ssIV*, por su parte, presenta un menor contenido de almidón en el ápice de la raíz que

el WT (Crumpton-Taylor, 2010), lo cual correspondería con la existencia de amiloplastos incapaces de iniciar la síntesis de almidón, del mismo modo que la ausencia de SSIV, junto con alguna otra SS, provoca la aparición de cloroplastos vacíos en hojas.

Como se comentó en la introducción (ver página 28), los gránulos de almidón de las células de la columela se denominan estatolitos y están relacionados con la percepción de la gravedad por la raíz. El almidón no es absolutamente requerido para la percepción de la gravedad, pero es necesario para un completo y sensible gravitropismo (Kiss *et al.*, 1996; Kiss & Edelmann, 1999). Las raíces del mutante *ssllsIV*, carente de estatolitos, responden a la gravedad – todas terminan creciendo en el sentido correcto – pero la respuesta de estas es más lenta, menos sensible, que la de las raíces de plantas WT. En el caso del mutante *ssIV*, se ha documentado el mismo efecto: las raíces con mayor contenido de almidón responden mejor a la gravedad que las que poseen un contenido menor (Crumpton-Taylor, 2010).

Posible papel de SSIV en el inicio de la síntesis de almidón.

A la vista de los resultados mostrados y discutidos arriba, podemos afirmar que SSIV desempeña un papel crucial en el inicio del gránulo de almidón en hojas y raíces de *A.thaliana* y proponemos que funcionaría como parte de un complejo ("complejo de nucleación", [ver página](#)) que permitiría la formación del centro de nucleación necesario para la síntesis de un nuevo gránulo de almidón. Una vez formado, el centro de nucleación serviría de cebador para el resto de SSs y constituiría el hilum del gránulo de almidón en formación. La formación del complejo de nucleación sería fundamental para la síntesis del número de gránulos por cloroplasto observado en plantas silvestres y, aunque no sabemos qué papel desempeñaría SSIV dentro del mismo, su presencia parece ser imprescindible para la función del complejo.

Cuestiones que se plantean son la identificación del precursor usado para la formación del centro de nucleación y si éste es sintetizado por el propio complejo o por otras enzimas. Diferentes autores han propuesto (ver página 58) que en el inicio del gránulo de almidón podrían jugar un papel importante proteínas de tipo glucogenina (*glycogenin-like proteins*). En este sentido, hemos comprobado que SSIV no tiene actividad auto-glucosilante, al menos en las condiciones ensayadas, descartando así su posible similitud a las proteínas iniciadoras de la síntesis de glucógeno en animales y levaduras (glucogenina; Lomako *et al.*, 2004) o bacterias (la propia glucógeno sintasa; Ugalde *et al.*, 2003). Debe tenerse en cuenta, que SSIV podría tener propiedades enzimáticas diferentes al formar parte del complejo *in vivo*.

El número de gránulos por cloroplasto está altamente regulado, siendo de 5-7 gránulos/cloroplasto en plantas WT. El hecho de que en ausencia de SSIV el número de gránulos/cloroplasto se convierta en un suceso estocástico (azaroso) nos indica que SSIV está implicada en la regulación del número de gránulos por cloroplastos. Sin embargo, aunque se ha comprobado que la sobreexpresión de SSIV incrementa en un 30-40 % el contenido de almidón en hojas de *A.thaliana* (Gámez-Arjona *et al.*, 2011), no ha sido posible comprobar si el motivo de

la mayor acumulación es un mayor número de gránulos por cloroplastos o un mayor tamaño de los mismos. Además, se ha descrito que la disminución de la expresión de SSIV a la mitad, no afecta (de manera detectable) al número de gránulos sintetizados por cloroplastos (Crompton-Taylor, 2010). De modo que, el efecto sobre el número de gránulos observado en los mutantes carentes de SSIV podría no ser debido a la ausencia de la proteína reguladora, sino a la imposibilidad de formación del complejo de nucleación y a la formación, menos eficiente, de "centros de nucleación alternativos" (ver a continuación, página 225). El número de gránulos que se sintetizan por cloroplasto podría ser regulado a través de SSIV, pero también por algún otro mecanismo que impidiese la formación de más de 5-7 complejos de iniciación por cloroplasto de manera independiente de SSIV, siendo esta necesaria para la formación de dichos complejos. La identificación del resto de componentes del complejo de nucleación y la función de cada uno de ellos, permitirá esclarecer el modo en el que la regulación del número de gránulos es llevada a cabo en cloroplastos de plantas WT.

SSIV tendría, además de su papel en la iniciación del gránulo, capacidad para elongar las cadenas de amilopectina, al igual que el resto de SSs. Hemos comprobado que la proteína expresada en *E.coli* posee actividad glucosiltransferasa (Figura 74, Figura 78, Figura 87 y Tabla 26188) y hemos mostrado que el mutante *ssIIssIII* posee un número normal de gránulos (Figura 24), lo cual sugiere que, en ausencia de SSI, SSII y SSIII, SSIV es capaz de llevar a cabo la elongación de las cadenas de amilopectina. Sin embargo, será necesaria la obtención de un cuádruple mutante *ssIIssIIIgbssl* (en el cual SSIV sea la única SS activa) para confirmar dicha capacidad.

Síntesis estocástica de almidón en ausencia de SSIV.

La presencia de almidón en los cloroplastos de los mutantes carentes de SSIV indica que la síntesis de almidón es posible en ausencia de esta enzima, aunque de un modo bastante menos eficiente. Nosotros proponemos que, en ausencia de SSIV, la síntesis de almidón se convertiría en un proceso estocástico (Figura 90), no controlado. En ausencia de SSIV el complejo de nucleación o no se formaría o no sería funcional, de modo que la formación del centro de nucleación sería azarosa y menos probable a medida que se eliminan otras clases de SSs, ya que cómo se ha mostrado: en el mutante simple *ssIV* la síntesis de almidón es más probable que en los mutantes *ssIIssIV* y *ssIIIssIV*, los cuales presentan una menor acumulación de almidón al final del día (Figura 18) y algunos cloroplastos vacíos (Figura 19); y en ellos, más probable que en el triple mutante *ssIIssIIIssIV*, que presenta un menor contenido de almidón al final del día (Figura 23) y un mayor número de cloroplastos vacíos (Figura 24). En el mutante *ssIIIssIV*, el contenido de almidón acumulado al final del día no es cuantificable (Figura 18 y Figura 39 **Figura 20**) por ser demasiado bajo, indicando que SSIII juega un papel importante en el inicio del gránulo de almidón en ausencia de SSIV (lo cual será discutido en la página 227).

En ausencia de SSIV, la iniciación de la síntesis de almidón estaría impedida, lo cual provocaría la acumulación de ADP-Glc. Recientemente, se ha comprobado que los niveles de ADP-Glc del mutante *ssIV* son aproximadamente 59 veces superiores a los del WT ((Crompton-Taylor, 2010). La acumulación de altos niveles de ADP-Glc podría favorecer la síntesis de polímeros solubles de glucosa y la acumulación de éstos podría permitir la cristalización espontánea de los mismos, formando un "centro de nucleación alternativo" sobre el que las SSs y el resto de enzimas implicadas en la síntesis podrían funcionar. Se ha demostrado (Lorén *et al.*, 2001; Ziegler *et al.*, 2005), que bajo condiciones apropiadas, los glucanos pueden experimentar separación de fase seguida de nucleación y formación de una estructura cristalina. La tasa y la frecuencia de formación de núcleos cristalinos estables en el estroma del cloroplasto de manera espontánea dependerán de factores biológicos y fisicoquímicos, que incluyen la concentración, el tamaño y la estructura de los glucanos, así como condiciones tales como la naturaleza y concentración de proteínas. El inicio del gránulo a través de este mecanismo no requeriría de síntesis de un cebador específico, pero estaría favorecido por la presencia de otras SSs, en especial por la presencia de SSIII (ver en página 227). En este sentido, el papel del complejo de nucleación (del que formaría parte SSIV) podría ser el de optimizar las condiciones para permitir la nucleación de glucanos sintetizados por el mismo complejo o por otras enzimas.

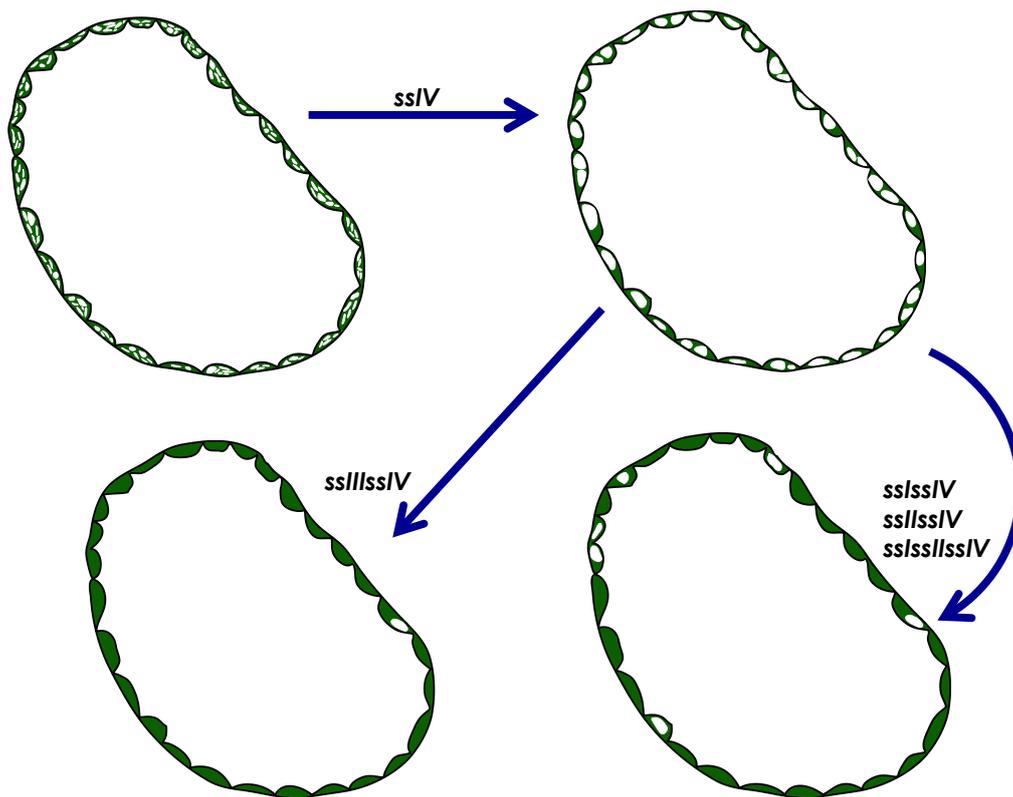


Figura 90. Síntesis estocástica de almidón en ausencia de SSIV. SSIV es fundamental para la iniciación del gránulo de almidón en cloroplastos de plantas WT. En ausencia de SSIV, el proceso se vuelve "azaroso" (dependiente de factores biológicos y fisicoquímicos) y menos frecuente que el WT, lo que da lugar a la acumulación de los 1-2 gránulos por cloroplasto observados en el mutante *ssIV*. La pérdida aditiva de SSI y/o SSII hace aún menos frecuente la iniciación del gránulo en los mutantes *ssIssIV*, *ssIIssIV* y *ssIIIssIV*, en los cuales se observan cloroplastos vacíos. La eliminación de SSIII junto con SSIV es la combinación con el efecto más drástico: el mutante *ssIIIssIV* no presenta un contenido de almidón cuantificable y solo visualizando una amplia superficie de la hoja somos capaces de encontrar algún cloroplasto con un gránulo de almidón (Figura 20).

Síntesis estocástica de almidón en cotiledones.

A diferencia de lo observado en hojas y raíces, el mutante *ssIIIssIV*, presenta acumulación de almidón en los cotiledones (Figura 40 y Figura 41). En el mismo sentido, se ha descrito que el mutante *ssIV* no presenta un contenido de almidón homogéneo, sino que el contenido depende de la edad de la hoja (Ziegler *et al.*, 2005): las más jóvenes no presentan almidón, las intermedias presentan un menor contenido que el WT, y las más maduras y los cotiledones presentan más almidón que el WT.

El hecho de que el mutante *ssIV* presente grandes diferencias de acumulación de almidón entre hojas jóvenes (sin almidón) y maduras (con alto contenido de almidón), apoyaría la teoría de la síntesis estocástica de almidón en ausencia de SSIV: mientras más vieja es la hoja, mayor número de gránulos se habrán iniciado espontáneamente. En el mismo sentido, se ha descrito que el mutante *ssIV* no presenta un contenido de almidón homogéneo, sino que el contenido depende de la edad de la hoja (Crumpton-Taylor, 2010): las más jóvenes no presentan almidón, las intermedias presentan un menor contenido que el WT, y las más maduras y los cotiledones presentan más almidón que el WT.

Importancia de SSIII en ausencia de SSIV.

Según nuestra hipótesis, en ausencia de SSIV, el sistema habitual de inicio de la síntesis de almidón en cloroplastos no funcionaría, provocando la acumulación del donador de grupos glucosilos, la ADP-Glc. En estas condiciones SSIII parece desempeñar un papel crítico, o al menos, más importante que el de SSI o SSII. El doble mutante *ssIIIssIV*, a diferencia de *ssIV*, *ssIIIssIV* y *ssIIssIIIssIV*, no presenta un contenido cuantificable de almidón, indicando que el efecto de las mutaciones *ssIII* y *ssIV* no es aditivo - dado que el mutante *ssIII* posee un mayor contenido de almidón que el WT (a las 16 h de luz bajo un fotoperiodo de DL, ver Figura 23).

Hemos demostrado que SSI y SSIII son capaces de sintetizar polímeros de glucosa usando ADP-Glc como único sustrato (Figura 79). En ausencia de SSIV podría ocurrir que la producción de glucanos, a partir de ADP-Glc, por SSIII permitiese la nucleación espontánea, lo cual puede ocurrir bajo las condiciones adecuadas (Lorén *et al.*, 2001; Ziegler *et al.*, 2005), como se comentó en el punto anterior (página 226). La SSIII presenta una baja afinidad por la ADP-Glc ($K_m = 4,08$; Ziegler *et al.*, 2005), de modo que su función cobraría importancia en condiciones de acumulación de dicho sustrato, situación que se da en el mutante *ssIV*. El incremento de la síntesis de glucanos, como consecuencia de la mayor actividad de SSIII a altas concentraciones de ADP-Glc, junto a otra serie de condiciones, podría facilitar la formación de centros de nucleación alternativos. La aparición de estos centros de nucleación alternativos ocurriría con una baja eficiencia.

Cómo se comentó en el punto anterior (en esta misma página), el mutante *ssIV* presenta grandes diferencias de acumulación de almidón entre hojas jóvenes y maduras (Crumpton-Taylor, 2010): no es posible detectar almidón en las hojas más jóvenes, mientras que, en las más

maduras, el contenido de almidón (tanto al final del día como al final de la noche) es superior al de las hojas equivalentes del WT. Si nuestra hipótesis es correcta, las hojas jóvenes serían incapaces de formar centros de nucleación y, por tanto, de sintetizar almidón, con lo cual los cloroplastos comenzarían a acumular ADP-Glc. A medida que aumentase la edad de la hoja, se alcanzarían concentraciones de ADP-Glc a las cuales la actividad de SSIII cobraría una mayor importancia y provocaría la acumulación de glucanos solubles. En las hojas de edad intermedia empezarían a formarse centros de nucleación espontáneos y algunos cloroplastos formarían un gránulo de almidón, el cual alcanzaría un gran tamaño dada la alta concentración de donador de grupos glucosilos (ADP-Glc) y la presencia de un único gránulo aceptor de los mismos. En las hojas más maduras, el proceso de nucleación espontánea facilitado por los glucanos sintetizados por SSIII habría tenido lugar en todos los cloroplastos (en diferentes momentos durante el desarrollo de la hoja), incluso más de una vez en algunos cloroplastos. Ahora bien, esta síntesis de almidón promovida por SSIII sería dependiente de las otras SSs (SSI y SSII), puesto que en los mutantes *ss/ssIV*, *ss/IIssIV* y, sobre todo, *ss/IIss/IV* se observan cloroplastos vacíos incluso en hojas maduras. La aparición de SSI, SSII y SSIII junto con otras proteínas como parte de diferentes complejos de alto peso molecular ha sido documentada en endospermo de maíz y trigo (Tetlow *et al.*, 2004; Tetlow *et al.*, 2008; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2009), lo cual podría explicar la interdependencia de dichas enzimas a la hora de permitir la síntesis estocástica de almidón.

Aún con todo, es posible encontrar algún cloroplasto con un gránulo de almidón en el mutante *ss/IIIssIV*, indicando que aún es posible que se den las condiciones necesarias para la nucleación espontánea de glucanos solubles, eso sí, con una mucho menor frecuencia. Dado que SSI también posee capacidad de síntesis de glucanos en presencia de ADP-Glc como único sustrato, bien podría ser esta SS la que en situaciones extremas y con muy baja eficacia permitiese la síntesis de almidón. La obtención del triple mutante *ss/IIss/IIIssIV* podría ser interesante en este sentido.

LA ACUMULACIÓN DE ADP-GLC PRINCIPAL RESPONSABLE DE LOS EFECTOS PLEIOTRÓPICOS OBSERVADOS EN LOS MUTANTES CARENTES DE SSIV.

Aún teniendo en cuenta la importancia de SSIV en la iniciación del gránulo, es difícil entender la relación entre el bloqueo de la síntesis de almidón, que su ausencia provoca, y el conjunto de efectos pleiotrópicos observados en todos los mutantes carentes de SSIV. El efecto más drástico de su ausencia lo encontramos en el doble mutante *ssIIIssIV*: baja tasa de crecimiento, bajos niveles de clorofilas, fuerte inducción de antocianinas,... aunque todos los mutantes carentes de SSIV presentan - en menor grado que este - las mismas características. Se podría pensar que los efectos tan drásticos observados en el mutante *ssIIIssIV* son debidos a su extremadamente bajo contenido de almidón. Sin embargo, cuando uno compara este mutante con otros mutantes con un contenido de almidón similar, como *aps1* (carente de la subunidad pequeña de la ADP-glucosa pirofosforilasa, Ventriglia *et al.*, 2008) o *pgm1* (carente de la fosfoglucomutasa plastidial; Caspar *et al.*, 1985), encuentra que ninguno tiene un fenotipo tan drástico como él.

En este apartado se discutirán los múltiples efectos de la ausencia de SSIV, basándonos en los resultados de la caracterización del mutante *ssIIIssIV* en comparación con el WT, sus parentales los mutantes *ssIII* y *ssIV* y el mutante *aps1*, con el objetivo de entender qué hace diferente al mutante *ssIIIssIV* de otros mutantes como *aps1* y llegar a un mejor entendimiento de la importancia de SSIV.

Efecto de la ausencia de SSIV sobre el metabolismo del almidón.

La principal alteración en el metabolismo del almidón observada en el mutante *ssIV* fue la menor tasa de recambio (*turnover*) del mismo en comparación con el WT. El mutante *ssIV* presenta una menor acumulación de almidón que el WT al final del día (Figura 18; Roldán *et al.*, 2007b), consecuencia de su menor tasa de síntesis, y una mayor acumulación que éste al final de la noche, debido a su menor tasa de degradación (Roldán *et al.*, 2007b). La mayor acumulación en el mutante *ssIV* que en el WT al final de la noche fue comprobada mediante comparación del tamaño de los gránulos de almidón por microscopía electrónica de transmisión (Figura 15; Roldán *et al.*, 2007b).

En condiciones normales, las plantas adaptan su tasa de degradación de almidón a la cantidad del mismo acumulada al final del día y a la longitud de la noche, para sacar el mayor provecho del almidón sintetizado durante el día - el contenido de almidón al final de la noche

es prácticamente cero -, evitando al mismo tiempo situaciones de hambre durante la noche, como consecuencia del agotamiento prematuro de las reservas. En el caso del mutante *ssIV*, la incompleta movilización de las reservas de almidón durante la noche, influiría negativamente sobre su tasa de crecimiento, pues supondría el consumo de recursos en la producción de un componente de reserva improductivo (Graf *et al.*, 2010; Pantin *et al.*, 2011). Sin embargo, esta no parece ser (como se discutirá en el siguiente punto, página 232) la principal causa del fenotipo observado en los mutantes carentes de SSIV.

Los niveles de las actividades involucradas en el metabolismo del almidón en el mutante *ssIV* fueron determinados por nuestro grupo en un trabajo previo a esta tesis (Roldán *et al.*, 2007b). No se observó disminución de los niveles de las actividades almidón sintasa (SS) soluble, ADP-Glc pirofosforilasa (AGPasa), almidón ramificante (SBE) o desproporcionante (DPE), ensayadas *in vitro*, ni de las actividades ISA1 (isoamilasa), pululanasa o RAM1 (β -amilasa), ensayadas mediante zimograma, en dicho mutante. El único cambio en las actividades relacionadas con el metabolismo del almidón observado en el mutante *ssIV* (tanto por zimograma como mediante ensayo *in vitro*) fue un incremento de la actividad α -glucano fosforilasa. Tanto la isoforma cloroplástica (PHS1), como la citosólica (PHS2) aparecían incrementadas en el mutante *ssIV*. Mediante Q-PCR se comprobó que este incremento se correlacionaba directamente con un incremento de la expresión de ambos genes, por lo que es de suponer que el incremento de actividad no es debido a una posible interacción entre SSIV y PHS, sino a las alteraciones en el metabolismo del almidón provocadas por la ausencia de SSIV en el mutante. Se puede concluir que la disminución de las tasas de síntesis y degradación de almidón en el mutante *ssIV* no es provocada por el efecto pleiotrópico de la mutación sobre otras actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del mismo. Asumiendo que la velocidad de síntesis y degradación de almidón son dependientes de la superficie disponible (Roldán *et al.*, 2007b), una posible explicación a la baja tasa de recambio de este mutante podría basarse en la incapacidad de dicho mutante para sintetizar más de 1 o 2 gránulos de almidón por cloroplasto (Figura 14). En esta situación, la superficie del gránulo disponible a las enzimas biosintéticas y degradativas sería inferior a la disponible si la misma cantidad de almidón se distribuyese en los 5-7 gránulos presentes en plantas WT.

En este trabajo se han ensayado (mediante ensayos *in vitro* y zimogramas) los niveles de las actividades involucradas en el metabolismo del almidón en los mutantes dobles *ssIssIV*, *ssIIssIV* y *ssIIIssIV* y triples *ssIssIIssIII* y *ssIssIIssIV*, con el objetivo principal de determinar si la ausencia de un contenido cuantificable de almidón en el mutante *ssIIIssIV* era provocada por la alteración de otras actividades relacionadas con el metabolismo del almidón a consecuencia de las mutaciones (efecto pleiotrópico de la mutación de los genes SS3 y SS4). En este sentido, hemos comprobado que el mutante *ssIIIssIV* posee actividad glucosiltransferasa soluble (Figura 27), es decir, la SSI y la SSII son activas en dicho mutante, pero son incapaces por si solas de permitir la síntesis de un contenido de almidón cuantificable. Las actividades SBE, AGPasa, α -amilasa y pululanasa (Tabla 13 y Figura 30) no aparecen modificadas en el mutante *ssIIIssIV* (ni en ninguno de los mutantes carentes de SSIV, Figura 31). El incremento de la actividad α -glucano fosforilasa

observado en el mutante *ssIV* (Roldán *et al.*, 2007b) se observa también en el mutante *ssIIIssIV*, y parece ser una característica de los mutantes carentes de SSIV, aunque un mayor número de ensayos hubiese sido necesario para confirmar que los incrementos observados en los mutantes *ssIV*, *ssIIIssIV* y *ssIIIssIV* con respecto al WT son estadísticamente significativos (Tabla 13). Para el mutante *ssIIIssIV* hemos comprobado que, al igual que ocurre en el mutante simple *ssIV*, el incremento de la actividad fosforilasa es debido a un incremento de la expresión de los genes *PHS1* y *PHS2* (Tabla 14), por lo que (al igual que se ha comentado para el mutante simple *ssIV*) el incremento de dicha actividad sería provocado por la alteración del metabolismo del almidón del mutante *ssIIIssIV*. El doble mutante *ssIIIssIV* posee además un incremento de los niveles de las actividades β -amilasa, *ISA1* (e *ISA3* en menor medida) y *PGM3* (Tabla 13 y Figura 30). El incremento de la actividad β -amilasa se observa también en el mutante triple *ssIIIssIV* (y en el *ssIIIssIII*, aunque de manera no significativa estadísticamente) y parece más asociado a la presencia de un contenido muy bajo de almidón (el mayor incremento se observa en *ssIIIssIV* que posee el menor contenido de almidón); el incremento de las actividades *ISA1* e *ISA3* se observa también en su parental el mutante *ssIII*; y el incremento de la actividad *PGM3* parece el resultado de los incrementos en ambos mutantes simples parentales (*ssIII* y *ssIV*). Aunque el significado biológico de estos incrementos nos es desconocido, no parece que la mutación de *SS3* y *SS4* tenga un efecto pleiotrópico sobre otras enzimas del metabolismo del almidón que pudiese explicar el bajo contenido de almidón en el doble mutante *ssIIIssIV*.

En cuanto a la actividad SS soluble (Figura 27), hemos mostrado que la disminución observada en los mutantes dobles y triples se correlaciona con la disminución observada en los mutantes simples parentales. En este sentido, no somos capaces de detectar actividad en el mutante triple *ssIIIssIII*, del mismo modo que no se detecta una disminución de la actividad total en el mutante simple *ssIV*. Como ya se ha mencionado (ver página 221), concluimos de esto que, aunque SSIV tiene actividad glucosiltransferasa *in vitro* (expresada en *E.coli*), dicha actividad del enzima es minoritaria en la planta.

Respecto a la actividad GBSSI, se observa una disminución de la actividad respecto al WT en todos los mutantes carentes de actividad SSIV. Esta disminución de la actividad GBSSI es debida probablemente al gran tamaño de los gránulos observados en los mismos y no a una disminución de la cantidad de proteína o de la actividad de la misma. Para el ensayo de esta actividad se usó el almidón extraído de los mutantes (ver página 95), dado que GBSSI se localiza en el interior de los gránulos (ver página 50). La difusión de la ADP-Glc de la mezcla de reacción al interior del gránulo se ve dificultada con el tamaño del gránulo, de modo que podemos suponer que la menor actividad GBSSI, asociada a los mutantes carentes de SSIV, es debida a la menor disponibilidad de sustrato durante el ensayo en el interior de los grandes gránulos de dichos mutantes en comparación con los gránulos de plantas WT (o mutantes *ssIII* y *ssIIIssIII*). Esta hipótesis se ve reforzada por el incremento, respecto al WT, de la actividad GBSSI detectado en el mutante *ssIIIssIII*, cuyos gránulos de almidón son más pequeños que los del WT.

Podemos concluir que la ausencia de SSIV no influye *per se* sobre el resto de actividades implicadas en el metabolismo del almidón. Sin embargo, SSIV afecta al número de gránulos por

cloroplasto, lo cual repercute en el tamaño del, generalmente, único gránulo sintetizado por cloroplasto provocando la disminución de la tasa de síntesis y degradación del mismo. El mayor tamaño del gránulo sería responsable de la disminución de la actividad GBSSI asociada a la mutación SSIV. El incremento de la actividad α -glucano fosforilasa puede tener diferentes explicaciones, dado que existen múltiples teorías acerca de su función (ver páginas 35 y 60). Tradicionalmente, se asocia a esta proteína con la degradación de almidón y, desde este punto de vista, se podría pensar que el bajo suministro de azúcares (debido a la baja acumulación de almidón y la baja tasa de degradación del mismo) provocaría el incremento de dicha actividad con el fin de incrementar la producción de azúcares a partir de los maltooligosacáridos solubles presentes en la célula.

Efecto de la ausencia de SSIV sobre la tasa de crecimiento.

Está ampliamente documentado que el correcto metabolismo del almidón es importante para el óptimo crecimiento de *Arabidopsis* en un ciclo día-noche: los mutantes ineficientes en la síntesis de almidón presentan fenotipos de crecimiento lento. Se ha demostrado que la longitud de la noche compromete el crecimiento de estos mutantes: en la mayoría de los casos, se ha visto que bajo condiciones de luz continua, la tasa de crecimiento normal es restaurada en estos mutantes, apoyando la idea del papel crucial del almidón transitorio durante el periodo de oscuridad (Roldán *et al.*, 2007b). La incompleta movilización de las reservas de almidón durante la noche, influiría también en el crecimiento, pues supondría el consumo de recursos en la producción de un componente de reserva improductivo (Caspar *et al.*, 1985; Graf *et al.*, 2010).

Hemos mostrado que todos los mutantes carentes de SSIV presentan una tasa de crecimiento inferior a la del WT (Figura 17 y Figura 22), de modo que a los 25 días de crecimiento bajo un fotoperiodo de DL, el peso fresco/planta del mutante simple *ssIV* es la mitad que el del WT; el de los mutantes *ssIV* y *ssIV*, 6 veces inferior al mismo; el del triple mutante *ssIV*, 15 veces menor; y el del mutante *ssIV*, 27 veces inferior al de su WT, siendo éste el que presenta un efecto más drástico de las mutaciones sobre el crecimiento. En cuanto al mutante *aps1* (carente, al igual que *ssIV*, de un contenido de almidón cuantificable), su peso fresco/planta a los 25 días de crecimiento bajo un fotoperiodo de DL no difiere del WT (Figura 38); lo cual muestra que un muy bajo contenido de almidón no es suficiente para explicar la bajísima tasa de crecimiento del mutante *ssIV*. En este sentido, el mutante triple *ssIV*, que posee una baja acumulación de almidón (26,8 % respecto al WT) crece peor que el WT (Figura 22) y el mutante *ssIV* (Figura 17), pero mejor que los mutantes dobles *ssIV*, *ssIV* y *ssIV* (Figura 17) o el mutante triple *ssIV* (Figura 22) - que poseen un contenido de almidón (al final del periodo de luz y bajo un fotoperiodo de DL) igual o superior al del mutante *ssIV* (Figura 23) -, siendo su peso fresco a los 25 días de crecimiento bajo un fotoperiodo de DL, una tercera parte del de su correspondiente WT.

En el caso del mutante *aps1*, hemos comprobado que, efectivamente, la duración de la noche determina su tasa de crecimiento. El mutante crece peor que el silvestre en condiciones de DC, pero igual que este, en condiciones de DL y LC (**Figura 38**). En condiciones de DL, el crecimiento del mutante *aps1* depende también del resto de condiciones de crecimiento (intensidad lumínica, temperatura, humedad); así, cuando fue crecido en fitotrón, el mutante creció igual que el WT (Figura 38), mientras que, cuando fue crecido en una cámara de crecimiento de plantas, presentó una tasa de crecimiento inferior a la del WT (Figura 49). En cualquier caso, el crecimiento del mutante *aps1* es dependiente de la longitud de la noche. Sin embargo, hemos comprobado que ni el mutante *ssIV* ni el mutante *ssIIIssIV* revierten su fenotipo de crecimiento lento en condiciones de LC, dando a entender que la ausencia de SSIV provoca, además del bloqueo de la síntesis de almidón, alguna otra alteración metabólica que afecta a la tasa de crecimiento. De modo que, aunque no puede ignorarse el efecto de la menor tasa de síntesis y degradación de almidón sobre la tasa de crecimiento de los mutantes carentes de SSIV, no parece que la alteración del metabolismo del almidón sea la principal responsable de la menor tasa de crecimiento de los mismos.

Se ha mostrado también (Figura 43) que el desarrollo de las raíces está muy afectado en el doble mutante *ssIIIssIV*. Durante la noche el mutante *ssIIIssIV* consume rápidamente los azúcares solubles acumulados durante el día, pero cuando estos se agotan las respuestas de hambre de carbono se disparan; una de las primeras es el cese del crecimiento de la raíz. Esta respuesta ha sido descrita en el mutante *pgm1* (carente, al igual que *ssIIIssIV* y *aps1*, de un contenido de almidón cuantificable) y en plantas WT sometidas a una prolongación del periodo de oscuridad (Pantin *et al.*, 2011). El efecto de la ausencia de almidón sobre el crecimiento de la raíz revierte cuando el mutante *ssIIIssIV* es crecido con un aporte de sacarosa, confirmando que la inhibición del crecimiento es parte de la respuesta a hambre de carbono de la planta y sin que el resto de fenotipos revierta (no almidón, no gravitropismo, menor tasa de crecimiento que el WT, color pálido,...).

Efecto de la ausencia de SSIV sobre la acumulación de azúcares.

El bloqueo en el uso del carbono fijado fotosintéticamente como consecuencia de la ausencia de SSIV y la disminución de la tasa de síntesis de almidón parece afectar exclusivamente a los niveles de glucosa (Figura 44), al menos en las condiciones ensayadas. El mutante simple *ssIV* y el mutante doble *ssIIIssIV* presentan un incremento de los niveles de glucosa de entre el 30-40 % respecto al WT. El incremento es mayor en el mutante *aps1*, en torno a un 70 % más que el WT. Probablemente, el incremento en los tres mutantes de los niveles de glucosa sea debido a la acumulación de maltooligosacáridos solubles, cuya degradación produce, entre otros, glucosa. Los mutantes *ssIII* y *aps1* presentan niveles mayores de sacarosa que el WT (Figura 44). En el caso del mutante *ssIII*, sería debido a su mayor tasa de fijación de CO₂ (Figura 45), que sería también responsable de su mayor contenido en almidón. En el caso

del mutante *aps1* sería debido a que, en ausencia de síntesis de almidón (de un contenido cuantificable), una mayor parte del carbono fijado se dirige a la síntesis de sacarosa. Los mutantes *ssIV* y *ssIIIssIV* (y suponemos que todos los mutantes carentes de SSIV), a diferencia de *aps1*, no parecen estar dirigiendo el exceso de carbono fijado (la parte que debería ir destinada a la síntesis de almidón) al aumento de la síntesis de sacarosa.

Efecto de la ausencia de SSIV sobre el contenido de pigmentos.

La ausencia de SSIV parece estar directamente relacionada con la caída de los niveles de clorofilas (Figura 32) y carotenoideides (Figura 33): todos los mutantes carentes de SSIV presentan niveles de clorofilas a y b y de carotenoideides inferiores al WT – observándose, en ambos casos, la caída más drástica en el mutante *ssIIIssIV* -, mientras que los mutantes *ssIII* y *ssIIssIII* presentan niveles normales de ambos tipos de pigmentos. El mutante *aps1* presenta niveles de clorofilas y carotenoideides superiores a los de los mutantes carentes de SSIV, aunque acumula un 10 % menos de clorofilas que el WT. De nuevo los datos estarían indicando, que la disminución de estos pigmentos no es consecuencia directa del bajo contenido en almidón, sino que la ausencia de SSIV provoca alguna otra alteración metabólica. Clorofilas y carotenoideides son los pigmentos responsables de la captación de luz, forman parte de los complejos antenas. El exceso de energía permite la formación de moléculas de clorofila en estado triplete (^3Chl) (bien mediante captación directa de energía por parte de éstas, bien mediante transferencia desde carotenoides), las cuales pueden interaccionar con el O_2 produciendo oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y provocando daño fotooxidativo (Smith & Stitt, 2007b; Mimuro & Katoh, 1991; Niyogi, 1999). La disminución de la síntesis de clorofilas y carotenoideides sería un modo de evitar o disminuir la producción de ROS provocada por el exceso de energía. El menor contenido en clorofilas sería responsable de que todos los mutantes carentes de SSIV presenten un color verde pálido.

Al contrario que los niveles de clorofilas y carotenoideides, todos los mutantes carentes de SSIV presentan niveles de antocianinas superiores a los del WT y los mutantes *ssIII* y *ssIIssIII* (Figura 33). El incremento observado en el mutante *ssIIIssIV* (aproximadamente 6 veces más que el WT) es mucho mayor que el incremento observado en el resto de mutantes carentes de SSIV o en el mutante *aps1* (Figura 53). La fuerte inducción de los niveles de antocianinas en el mutante *ssIIIssIV* explicaría la coloración rojiza de los extractos ácidos del mismo (Figura 91.). El incremento de las antocianinas tendría un papel fotoprotector: se ha demostrado que actúan a modo de protector solar, protegiendo a los tejidos de la fotoinhibición (Tzvetkova-Chevolleau *et al.*, 2007). En este sentido, los parámetros de estrés oxidativo ensayados mostraron la existencia de un mayor nivel de peroxidación de lípidos de membrana respecto al WT tanto en los mutantes *ssIV* y *ssIIIssIV*, como en el mutante *aps1*. Los niveles de peroxidación lipídica no difieren entre los mutantes *ssIIIssIV* y *aps1*, indicando que la mayor inducción de los mecanismos fotoprotectores en el mutante *ssIIIssIV* son suficientes para evitar daños por estrés oxidativo.

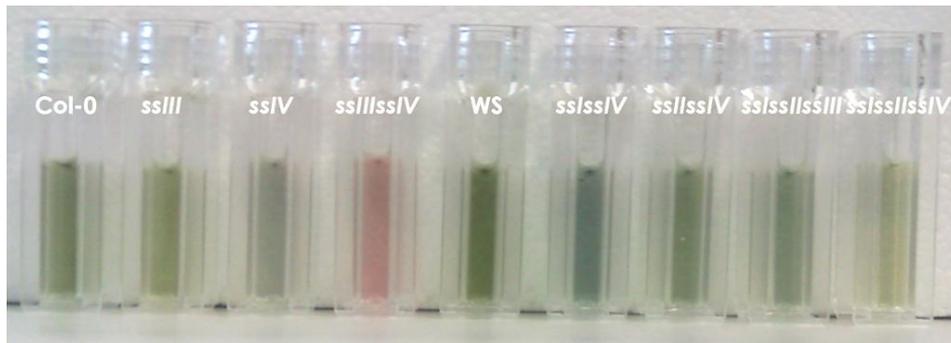


Figura 91. Extracción de antocianidas de los mutantes SS y sus WT (Col-0 y WS).

Efecto de la ausencia de SSIV sobre la fotosíntesis.

Para comprender el efecto de la ausencia de SSIV sobre la fotosíntesis, ha resultado imprescindible el estudio comparativo de los mutantes *aps1* y *sslIsslV* (ambos con un contenido de almidón no cuantificable), mediante análisis del intercambio de gases (IRGA) y de la emisión de fluorescencia de la clorofila (PAM).

A la vista de los resultados obtenidos mediante IRGA y PAM, podemos decir que en los mutantes carentes de SSIV, la menor tasa de crecimiento es debida a una menor tasa de asimilación de CO₂ en las condiciones de crecimiento (Figura 45). Esta menor tasa de fijación de CO₂ parece provocada por el enlentecimiento de la cadena de transporte de electrones (Figura 48, ϕ PSII) y del ciclo de Calvin-Benson (Tabla 16, menor A_{sat}). Este enlentecimiento de las reacciones fotoquímicas y bioquímicas de la fotosíntesis no ocurren en el mutante *aps1* en las condiciones de crecimiento (Figura 57 y Tabla 21) - el cual posee una tasa de fijación de CO₂ (Figura 54) y un rendimiento cuántico del flujo de electrones (Figura 57, ϕ PSII) iguales a los del WT en dichas condiciones -, indicando que no es el defecto en la acumulación de almidón lo que provoca el enlentecimiento de la cadena de transporte de electrones y el ciclo de Calvin-Benson (y con ello, la menor tasa de crecimiento) de los mutantes carentes de SSIV, sino el punto de la ruta dónde está bloqueada la misma. Esto nos permite hipotetizar que la acumulación de ADP-Glc podría ser la principal responsable de los efectos pleiotrópicos de la ausencia de SSIV y de las diferencias fenotípicas entre los mutantes *sslIsslV* y *aps1* (ver a continuación).

La ausencia de SSIV provoca una disminución de la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m). F_v/F_m de los mutantes *sslV* y *sslIsslV* (Tabla 19) es inferior a los valores que se consideran normales para este parámetro (Nagata *et al.*, 2003; Maxwell & Johnson, 2000), indicando la existencia de daño en el aparato fotosintético (Brooks & Niyogi, 2011) y/o de mecanismos de fotoprotección (Bilger *et al.*, 1995). Actualmente existe una alta controversia acerca de si la disminución de F_v/F_m representa un sistema de fotoprotección reversible o de inactivación irreversible del PSII; además, algunos autores consideran que la inactivación del PSII podría ser el último recurso de los mecanismos de fotoprotección (Osmond *et al.*, 1999; Nilsen & Orcutt, 1996). En este sentido, la disminución de los niveles de clorofilas y carotenoides, así como el incremento de los

niveles de antocianinas, pueden considerarse mecanismos de fotoprotección frente al bloqueo de la cadena de transporte de electrones.

En relación con la existencia de fotoinhibición (fotoinactivación) se llevó a cabo la medida de tres parámetros de estrés oxidativo (estrés provocado por el incremento de la producción de ROS, especies reactivas del oxígeno): nivel de carbonilación de proteínas, nivel de peroxidación de lípidos de membrana y contenido en peróxido de hidrógeno (Tabla 20). No se observan diferencias significativas entre el WT y ninguno de los mutantes a nivel de carbonilación de proteínas. Sin embargo, los mutantes *sslV*, *sslVsslV* y *aps1* presentan un mayor nivel de peroxidación de lípidos de membrana que el WT y los mutantes *sslVsslV* y *aps1* presentan un mayor contenido en peróxido de hidrógeno que el mismo. De este modo, aunque el mutante *sslVsslV* si presenta un mayor nivel de estrés oxidativo que el WT, éste no difiere prácticamente del nivel observado en el mutante *aps1* y, por tanto, la diferencia en cuanto a F_v/F_m observada entre estos mutantes no sería provocada por un mayor nivel de estrés oxidativo, sino por las variaciones en el contenido de pigmentos descritas en el punto anterior (ver página 234), las cuales, probablemente, evitan mayores niveles de estrés oxidativo en el mutante *sslVsslV* (fotoprotección).

La acumulación de ADP-Glc en los mutantes carentes de SSIV es responsable de las alteraciones fenotípicas de los mismos.

Como se explicó en la Introducción (ver página 29), el sustrato para la síntesis de almidón en plantas superiores es la ADP-Glc (donador glucosílico activado). En células fotosintéticas, el suministro de ADP-Glc conecta con el ciclo de Calvin-Benson a través de tres pasos enzimáticos: (1) la fructosa-6-fosfato (F6P), un intermediario del ciclo de Calvin, es convertida en glucosa-6-fosfato (G6P) por la fosfoglucoisomerasa cloroplastídica (PGI), (2) la G6P es convertida por la fosfoglucomutasa plastidial (PGM1) en glucosa-1-fosfato (G1P), que a su vez (3) es sustrato de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), la cual cataliza la síntesis de ADP-Glc y pirofosfato inorgánico (PPI) a partir de G1P y ATP. Los tres pasos son reversibles bajo condiciones celulares, pero el último es prácticamente irreversible debido a la hidrólisis del PPI a ortofosfato (Pi) por la pirofosfatasa alcalina plastidial (Anderson *et al.*, 1997; Weiner *et al.*, 1987) (Figura 92A).

Comparando la situación en los mutantes *sslVsslV* y *aps1* (Figura 92), ambos con un contenido de almidón no cuantificable, podemos imaginar que en el primero (Figura 92B) el bloqueo en la síntesis de almidón provocaría la acumulación de ADP-Glc, mientras que en el segundo (Figura 92C), se acumularía glucosa-1-P (G1P) y, por tanto, dado que las reacciones previas son reversibles, triosas-P (TP). La acumulación de TP explicaría los niveles de sacarosa observados en *aps1* (Figura 44). Apoyando esta idea están los valores estimados de tasa de uso de TP (TPU; Tabla 18 y Tabla 23): para *aps1* se estima un valor inferior que para el mutante *sslVsslV* o el WT. Es decir, a altas concentraciones de CO₂, el uso de las TP limita la fijación de carbono en este mutante antes que en el WT o el mutante *sslVsslV*. En el caso de este último, puesto que la

reacción de la AGPasa es metabólicamente irreversible (gracias a la hidrólisis del PPi) y la actividad AGPasa no está afectada (Tabla 13), la síntesis de ADP-Glc impediría la acumulación de TP observada en *aps1* (la TPU no difiere de la del WT). La acumulación de niveles de ADP-Glc superiores a los del WT ha sido documentada para el mutante *ssIV* (George *et al.*, 2010). Las medidas se realizaron a mitad del periodo de luz (en un ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad). El mutante *ssIV* posee aproximadamente 59 veces más ADP-Glc que el WT (ecotipo WS), mientras los mutantes *ssII* y *ssIII* presentan niveles iguales que éste y el mutante *ssI* presenta dos veces la cantidad de ADP-Glc del WT. Todo ello, nos lleva a proponer que la acumulación de ADP-Glc podría ser la principal responsable del fenotipo de los mutantes carentes de SSIV. La acumulación de ADP-Glc, supondría una disminución del *pool* cloroplastídico de ADP. El descenso de los niveles de ADP provocaría una disminución en la síntesis de ATP mediada por fotofosforilación y esto, a su vez, una reducción en la fijación de CO₂ (al disminuir la tasa de regeneración de ribulosa 1,5-bisfosfato) por el ciclo de Calvin-Benson y un bloqueo en la transferencia de electrones entre los fotosistemas. Ante una situación como esta la planta respondería disminuyendo los niveles de clorofilas y carotenoides e incrementando los niveles de antocianinas, para disminuir los daños por fotoinhibición.

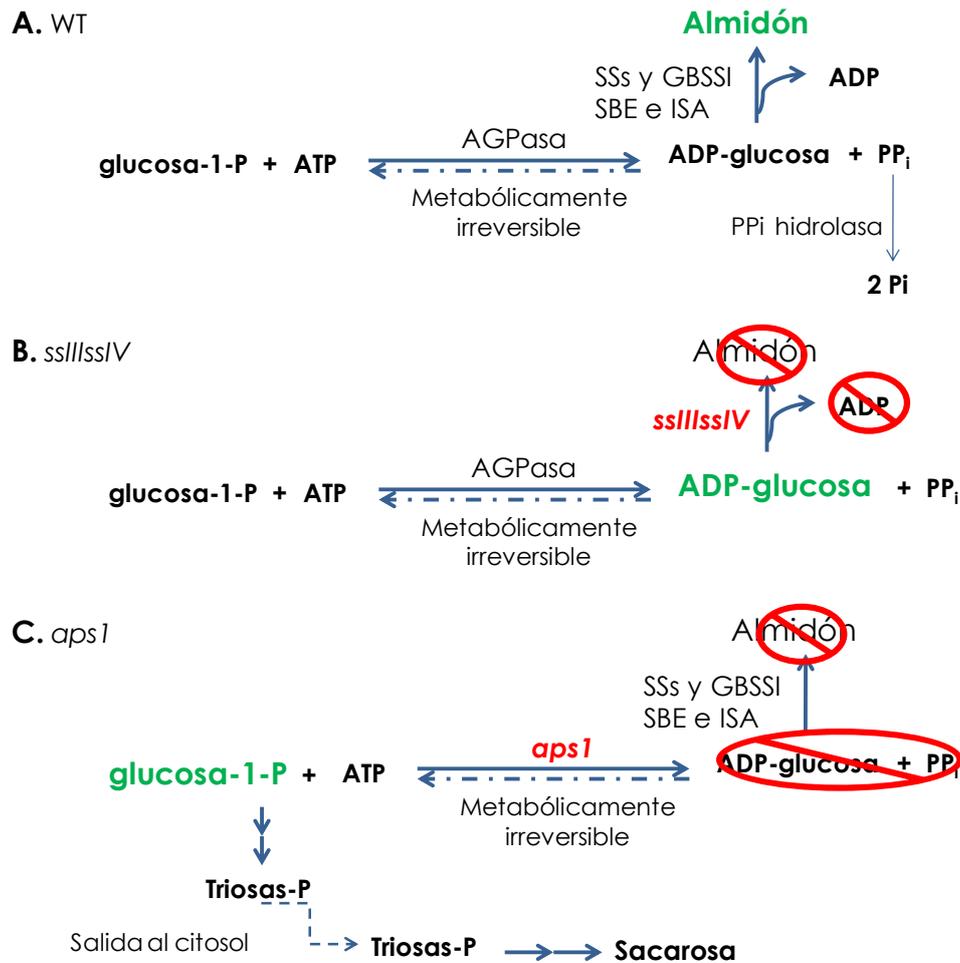


Figura 92. Esquema del efecto de las mutaciones *sslIIIsslIV* (B) y *aps1* (D) sobre la ruta de síntesis de almidón (A). Además del bloqueo de la síntesis de almidón, la ausencia de *SSIII* y *SSIV* provoca la acumulación de ADP.Glc (puesto que la reacción de la AGPasa es metabólicamente irreversible, mientras que la de *APS1* provoca la acumulación de G1P, lo que origina una mayor síntesis de sacarosa).

Sin embargo, los datos muestran que el mutante *sslsslIII*, que posee un número correcto de gránulos, presenta una tasa de crecimiento mayor que los mutantes dobles *sslsslIV*, *sslsslIV* y *sslIIIsslIV*, así como niveles de pigmentos iguales a los del WT. Aparentemente estos datos serían contrarios a nuestra teoría acerca de la acumulación de ADP-Glc, ya que el mutante *sslsslIII*, con un contenido de almidón al final del día similar al de *sslsslIV* debería de acumular niveles similares de ADP-Glc y, por tanto, pese a tener capacidad de iniciación de un número correcto de gránulos, poseería características similares a éste. Como ya se comentó (página 227) el mutante *sslIV* no parece acumular el mismo contenido de almidón en todas sus hojas, sino que hay una gran diferencia entre hojas jóvenes y maduras: las hojas jóvenes prácticamente carecen de almidón y las maduras poseen un contenido superior al de hojas de la misma edad del WT. Debemos considerar, por tanto, que en todos los mutantes carentes de *SSIV*, los cloroplastos de hojas jóvenes carecen de almidón y los de hojas maduras poseen cloroplastos vacíos y cloroplastos con un único gránulo (siendo el caso extremo el del mutante *sslIIIsslIV*, que apenas posee cloroplastos en las hojas maduras en los que se observe la síntesis de almidón). De este modo, podemos asumir que el uso de las rosetas completas en nuestros ensayos permite obtener los valores medios de las hojas de diferentes edades, es decir,

la media entre los dos extremos presentes en la planta. Con esta idea en mente, podemos considerar que la situación en el triple mutante *sslsslsslll* es diferente a la de los mutantes carentes de SSIV, aunque acumula un contenido de almidón similar a *sslsslssIV*, a diferencia de este, *sslsslsslll* lo hace de manera homogénea en todas las hojas, de modo que no acumularía niveles lo suficientemente altos de ADP-Glc en ninguna de ellas como para desencadenar las respuestas de los mutantes carentes de SSIV. Por otro lado, las características del mutante *sslsslsslll* también podrían deberse a la implicación de SSIV en algún otro proceso, por ejemplo que SSIV estuviese implicada en la regulación de la AGPasa. Si esto fuese así, la AGPasa no sería inhibida en ausencia de SSIV lo cual contribuiría a la acumulación de ADP-Glc en los mutantes carentes de la misma, mientras que en el mutante *sslsslsslll*, la acumulación de ADP-Glc provocaría a través de algún mecanismo no descrito hasta la fecha la inhibición de la AGPasa evitándose los efectos nocivos que provoca su acumulación. El mutante *sslsslsslll*, a diferencia de los mutantes carentes de SSIV, sería capaz de regular los niveles de ADP-Glc mediante la regulación de la actividad AGPasa. Para llegar a un mejor entendimiento del mutante *sslsslsslll* más ensayos serían necesarios. El contenido de ADP-Glc en hojas del triple mutante no ha sido cuantificado y el valor de actividad AGPasa obtenido, aunque inferior al del WT, carece de significancia estadística y más réplicas serían necesarias.

Explicación del fenotipo de los mutantes carentes de SSIV.

Caracterización del mutante *sslsslssIV*.

En base a la idea de que la acumulación de ADP-Glc, y no la ausencia de almidón, es responsable de las características fenotípicas del mutante *sslsslssIV*, podemos imaginar la secuencia de eventos que unen la ausencia de SSIII y SSIV con la baja tasa de crecimiento, independiente de las horas de oscuridad, y el color pálido de dicho mutante. Como se recoge en la Figura 93, la ausencia de SSIV impide la iniciación del gránulo de almidón de manera "normal" (mediante formación del complejo de nucleación del que forma parte SSIV) y la ausencia de SSIII hace que la síntesis estocástica del gránulo sea muy poco frecuente, de modo que en el doble mutante el contenido de almidón es prácticamente cero. Este hecho provocaría situaciones de hambre de carbono durante la noche que desencadenarían el bloqueo nocturno del crecimiento y la activación del catabolismo. Por otro lado, el bloqueo de la síntesis de almidón, provocado por la ausencia de SSIII y SSIV, hace que se alcancen altas concentraciones de ADP-Glc en el interior del cloroplasto, lo que se traduce en el secuestro de la mayor parte del *pool* cloroplastídico de ADP y en una muy baja concentración de ATP cloroplastídico. La fuerte disminución de la concentración de ADP llevaría a la disminución de la actividad ATPasa y, por tanto, al enlentecimiento del transporte de electrones. Dicho enlentecimiento desencadenaría las respuestas de fotoprotección por parte de la planta, entre ellas los cambios en el contenido de pigmentos antena y fotoprotectores (la disminución del contenido en clorofilas sería responsable del color pálido del mutante), con el objeto de disminuir la presión de excitación que llevaría a daños en el aparato fotosintético y al incremento de ROS. La disminución de F_v/F_m y de ϕ_{PSII} serían consecuencia de los fenómenos de fotoinhibición/fotoprotección. La mayor respuesta de fotoprotección del mutante *sslsslssIV* en

comparación con *aps1*, haría que el nivel de estrés oxidativo observado en ambos mutantes sea parecido. La disminución del contenido de ATP del cloroplasto, por su parte, provocaría una disminución de la actividad de las enzimas del ciclo de Calvin-Benson, llevando a la disminución de la fijación de CO₂ y a la menor tasa de crecimiento.

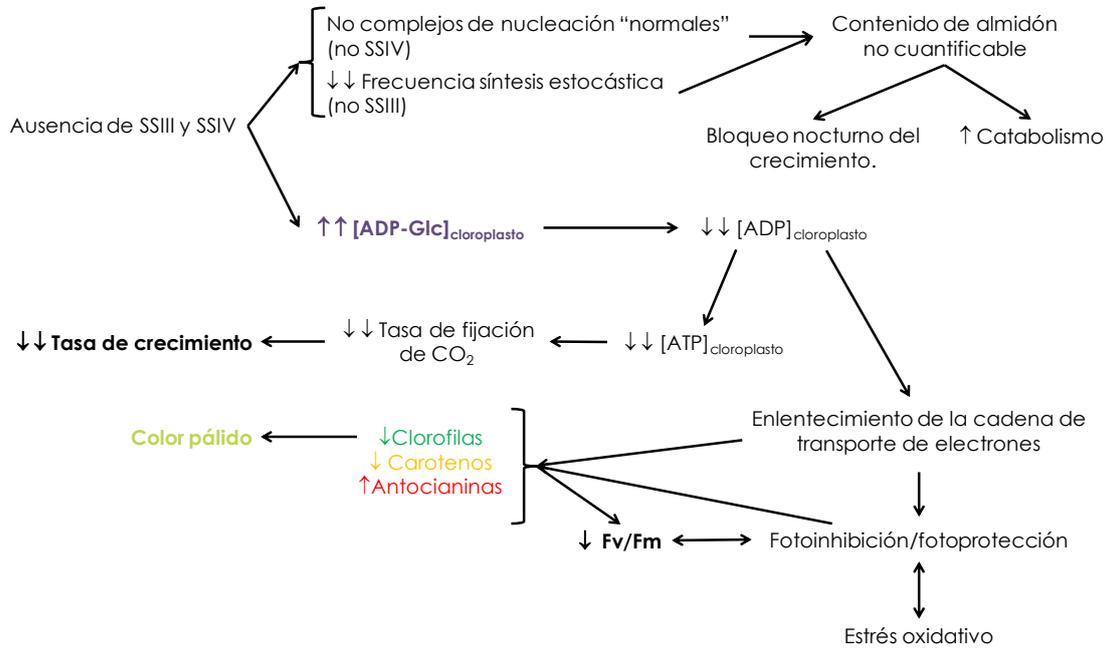


Figura 93. Esquema de la situación en el mutante *ssIIIssIV* evidenciando que sus características fenotípicas son consecuencia del incremento en la concentración de ADP-Glc.

Se ha mostrado además que la eliminación de APS1 en el mutante *ssIIIssIV* revierte el fenotipo de éste a un fenotipo *aps1*, en el cual la tasa de crecimiento es dependiente de la longitud de la noche. En el mutante *aps1*, el bloqueo de la síntesis de almidón es traducido en un incremento de la síntesis de glucosa y sacarosa. El mutante *pgm1* (carente de la fosfoglucomutasa plastidial; Crumpton-Taylor, 2010) ha sido más estudiado en este sentido que el mutante *aps1*. *pgm1* tampoco acumula un contenido cuantificable de almidón y se ha descrito (Caspar *et al.*, 1985) que la menor tasa de crecimiento del mismo es debida al bloqueo del catabolismo disparado por el hambre de carbono durante la noche. *pgm1* acumula grandes cantidades de azúcares durante el día, los cuales son consumidos rápidamente durante las primeras horas de la noche, provocando una situación de hambre de carbono al final del periodo de oscuridad que dispara la represión de muchos genes necesarios para la biosíntesis y el crecimiento. De este modo, al inicio del periodo de luz, la utilización del carbono esté inhibida y se acumulan altas cantidades de azúcares. La inhibición del crecimiento del mutante *pgm1*, y por analogía de los mutante *aps1* y *aps1ssIIIssIV*, dependerá de la longitud del periodo de oscuridad y de la intensidad de las respuestas al hambre de carbono disparadas. Una menor longitud de la noche supondría una situación menos grave de hambre de carbono y un menor bloqueo del crecimiento; el crecimiento en luz continua evita las situaciones de hambre de carbono por lo que estos mutantes presentan un crecimiento igual al del WT. La fijación de CO₂ en el mutante *aps1* no está alterada en las condiciones de crecimiento (Figura

54; para las medidas con IRGA las plantas fueron crecidas bajo un fotoperíodo de día largo, DL), por lo que el menor crecimiento se debe a la inhibición del mismo al final de la noche/principio del día (dependiente de la duración de la noche), no a una menor tasa de fijación de CO₂ (independiente de la duración de la noche) como ocurre en *ssIIIssIV*. Altas intensidades lumínicas o concentraciones de C_i, provocarían en los mutantes *aps1* y *aps1ssIIIssIV* una disminución de fijación de CO₂ debido a una menor actividad de las enzimas del ciclo de Calvin-Benson. La disminución de la actividad de dichas enzimas sería consecuencia, en el caso de estos mutantes, de la incapacidad de acumulación de un mayor contenido de sacarosa (menor tasa de uso de las triosas-P), lo cual explicaría la menor A_{sat} y A_{max} respecto al WT de estos mutantes. Al eliminar APS1 del mutante *ssIIIssIV* estamos impidiendo la acumulación de ADP-Glc y con ello las alteraciones que dan lugar a su fenotipo. En las condiciones de cultivo, el mutante *aps1ssIIIssIV* crece incluso mejor que el mutante simple *ssIV*.

Podemos considerar que la situación en el mutante *ssIV* se ve "aliviada" respecto al mutante *ssIIIssIV* debido a que SSIII facilita la síntesis estocástica de almidón, de modo que en hojas jóvenes la situación sería más parecida a la de dicho mutante, mientras que en las hojas más maduras sería más parecida a la del WT. Considerando esto, podemos entender que, en la mayoría de los casos, la situación del mutante *ssIV* (los valores obtenidos en los diferentes ensayos) sea intermedia entre la del WT y el mutante *ssIIIssIV*.

Como conclusión podemos considerar que la ausencia de SSIV da lugar a todas las alteraciones detalladas para el mutante *ssIIIssIV* y que dicha situación se ve "relajada" gracias a la síntesis estocástica de almidón facilitada por la presencia de SSIII (y en menor medida SSI y SSII) que permite la aparición fenotipos menos drásticos en los mutantes *ssIV*, *ssIIssIV*, *ssIssIV* y *ssIssIIssIV*.

ANÁLISIS DEL DOMINIO N-TERMINAL DE SSIV.

Puesto que el dominio carboxilo de SSIV presenta una alta homología con el resto de Ss, podemos predecir que sus características diferenciadoras se basan en las propiedades que le confiere su dominio amino. El análisis informático del mismo nos permite diferenciar varias regiones (Figura 81 y Figura 88): (1) el péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) (aminoácidos 1 a 42), (2) el dominio long coiled-coil (aminoácidos 187 a 409 aproximadamente) y (3) un dominio de estructura desconocida altamente conservado entre diferentes especies y esencial para la actividad glucosiltransferasa de la proteína (aminoácidos 471 a 544). El CTP permitiría el transporte de SSIV desde el citosol (lugar de síntesis) al interior del cloroplasto, dónde hemos comprobado que se localiza (Figura 65). La región entre el CTP y el dominio long coiled-coil no parece estar implicada en la función de SSIV, no tiene estructura asociada ni está conservada en otras especies.

Los dominios coiled-coil (CC) son dominios de oligomerización compuestos de dos o más α -hélices anfipáticas que se enrollan unas alrededor de las otras en una superhélice (Gibon *et al.*, 2004a). Fue una de las primeras estructuras proteicas descubiertas, descrita por primera vez para la proteína del pelo α -queratina (Burkhard *et al.*, 2001). Las secuencias con capacidad de formar CC se caracterizan por un patrón de repetición de siete aminoácidos en el que los residuos en las posiciones primera y cuarta son hidrófobos, y los residuos en las posiciones quinta y séptima son frecuentemente polares o cargados. La estabilidad del CC deriva de un empaquetamiento característico en el cual las cadenas laterales hidrófobas quedan recluidas en un núcleo hidrofóbico ("*knobs-in-holes*"; Crick, 1952). A grandes rasgos, los dominios CC se pueden agrupar en dos clases: CC pequeños (*short coiled-coils*), formados por la repetición de seis o siete héptadas, o CC grandes (*long coiled-coils*), formados por más de cien aminoácidos. Los *short coiled-coils* también se conocen como cremalleras de leucina y se encuentra con frecuencia como motivos de homo- y heterodimerización en factores de transcripción (Crick, 1952; Jakoby *et al.*, 2002). Por su parte, los *long coiled-coils* a menudo están involucrados en la unión de complejos proteicos a grandes estructuras celulares, como el Golgi, los centrosomas o la envoltura nuclear. Cada vez existen más evidencias experimentales de la importancia de las proteínas con dominios *long coiled-coils* en la organización espacial de procesos celulares, sin embargo, aunque varias proteínas con estos dominios han sido descritas en animales y levaduras, el conocimiento en plantas es muy limitado a día de hoy (Vinson *et al.*, 2002).

El dominio CC predicho para SSIV tendría más de 200 aminoácidos y se englobaría dentro de los denominados *long coiled-coils*. Hemos comprobado, mediante la caracterización bioquímica de las versiones truncadas de SSIV, que el dominio *long coiled-coil* no influye en la afinidad de la proteína por ninguno de sus sustratos (amilopectina o ADP-Glc). El hecho de que el dominio esté altamente conservado, cuando aparentemente no influye en la actividad de la proteína, evidencia que SSIV tiene una función diferente a la elongación de las cadenas de

amilopectina. Probablemente esta otra función sea más estructural que catalítica, permitiendo la correcta formación del complejo necesario para la formación del centro de nucleación que inicia la síntesis del gránulo de almidón. El dominio *long coiled-coil* de SSIV le permitiría unirse a algún otro componente (o a varios) del complejo del que forma parte. Actualmente, nuestro grupo está llevando a cabo un escrutinio de posibles interactores de SSIV. Se ha mostrado en este trabajo, mediante ensayos de doble híbrido, que SSIV no interacciona consigo misma. Posibles dianas serían, por ejemplo, aquellas proteínas cloroplásticas implicadas en el metabolismo del almidón que poseen dominios CC: PGM2 (At1g70820), GBSS1 (At1g32900), SSII (At3g01180), SSIII (At1g11720), AMY3 (At1g69830) o GWD1 (At1g10760); ninguna de las cuales posee un dominio CC tan grande como el de SSIV (Rose *et al.*, 2004); pero también podrían serlo proteínas ancladas a la membrana tilacoidal (ya que el complejo SSIV aparece asociado a la misma, ver Figura 65) o proteínas de andamiaje que estén implicadas en la formación o localización del complejo.

La caracterización bioquímica de las versiones truncadas de SSIV mostró también que el dominio carboxilo de ésta, pese a presentar una alta homología con la glucógeno sintasa, no presenta actividad glucosiltransferasa *in vitro*, mientras que Valdez y cols. (Lohmeier-Vogel *et al.*, 2008a) encontraron que el dominio carboxilo de SSIII si presenta actividad glucosiltransferasa y que ésta es modulada por los dominios de unión a almidón (SBD) presentes en su dominio amino. La región entre el dominio carboxilo y el *long coiled-coil* de SSIV parece fundamental para la afinidad de la proteína por la ADP-Glc (Tabla 30) y, por tanto, para que esta posea actividad glucosiltransferasa. No hemos podido predecir la adquisición de estructura secundaria por parte de esta región y más análisis serían necesarios para conocer de qué modo determina la actividad de la proteína.

EL COMPLEJO SSIV Y SU ANCLAJE A LAS MEMBRANAS TILACOIDALES.

La inmunolocalización de SSIV, con anticuerpos específicos, en extractos vegetales y extractos de cloroplastos purificados desvela que ésta se encuentra mayoritariamente formando parte de un complejo de alto peso molecular y que, sólo una pequeña parte, se encuentra en su forma monomérica (siendo posible que esta porción de la proteína se libere del complejo debido a la manipulación de las muestras).

La formación de complejos macromoleculares por parte de las enzimas de la ruta de biosíntesis de almidón en endospermo de maíz y trigo (Valdez *et al.*, 2008a; Tetlow *et al.*, 2004; Tetlow *et al.*, 2008; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008) ha sido demostrada mediante el uso de diferentes técnicas. Los diferentes ensayos coinciden en incluir las SSs de clase I, II y III y la SBE, junto con otras proteínas (conocidas o no) dentro de diferentes complejos de alto peso molecular. Tetlow y cols. describen dos complejos en amiloplastos de trigo, uno de 260 KDa y otro de 180 KDa. En el primero identifican a SSI, SSIIa y SBE (no identifican si SBEIIa o SBEIIb) y suponen que diferentes combinaciones de estas proteínas serían posibles. En el segundo identifican solo a SBE y predicen que el complejo sería en realidad un homodímero de alguna de las dos isoformas (SBEIIa o SBEIIb). Hennen-Bierwagen y cols. describen la existencia de dos tipos de complejos en amiloplastos de maíz, uno de 600 KDa y otro de 300 KDa. El primero incluiría a SSIII, SSIIa, SBEIIa y SBEIIb junto con otras proteínas, entre ellas: la AGPasa (ADP-Glc pirofosforilasa) y la PPK (piruvato ortofosfato dikinasa); el segundo, a SSIIa, SBEIIa y BEIIb. La SSIV no fue detectada en ninguno de los estudios realizados, pero ninguno de ellos contó tampoco con anticuerpos específicos frente a ella.

En *Arabidopsis* no se han descrito, hasta la fecha, complejos similares. Sin embargo, en este trabajo se ha mostrado la existencia de al menos un complejo macromolecular en cloroplastos de hojas de *Arabidopsis* implicado en la síntesis de almidón y, del cual, SSIV formaría parte. Suponemos que SSIV interaccionaría con una o varias proteínas del complejo a través de su dominio *long coiled-coil*. Una de las funciones de este complejo, cómo se ha discutido previamente (página 224), sería la de permitir la formación de los centros de nucleación necesarios para la síntesis de los 5-7 gránulos de almidón por cloroplasto, función para la cual SSIV sería imprescindible, por ser requerida estructuralmente (en su ausencia el complejo no podría formarse) o funcionalmente (es requerida por jugar algún papel crucial en el proceso de nucleación).

Hemos demostrado además que el "complejo SSIV" está anclado a las membranas tilacoidales (Figura 65). Al carecer de dominios transmembranas, asumimos que la asociación de SSIV a las mismas debe estar basada en su interacción (directa o indirecta) con alguna proteína transmembrana que formase también parte del complejo. Es posible que el complejo SSIV no se

localice al azar en la membrana tilacoidal, sino en zonas concretas permitiendo el posicionamiento de los gránulos de almidón, ya que existen evidencias de que las proteínas con dominios *long coiled-coil* están implicadas en la organización espacial de diferentes procesos celulares (Hennen-Bierwagen *et al.*, 2009). Hemos mostrado también que SSIV aparece asociada a uno de los polos del gránulo de almidón (Figura 64, Rose *et al.*, 2004), aunque no parece existir una unión fuerte entre la proteína y el gránulo (Figura 63). En este sentido, se ha descrito recientemente (Lohmeier-Vogel *et al.*, 2008a) la existencia en cloroplastos de una proteína (At5g39790) que posee un dominio de unión a carbohidratos (CBM) y un dominio CC (de aproximadamente 60 aminoácidos), la cual se cree tendría un papel de andamiaje en el metabolismo del almidón. Aunque los autores postulan que SSIV podría ser una de las dianas de esta proteína, más estudios serían necesarios.

Por último, hemos comprobado que el complejo SSIV está presente durante todo el ciclo día/noche, indicando que, aún en el caso de que los niveles de RNAm de SSIV oscilen durante el ciclo (Lohmeier-Vogel *et al.*, 2008a), esta oscilación no afecta a los niveles de proteína SSIV ni a su localización en el cloroplasto (Figura 62).

Conclusiones.

- La Almidón Sintasa (SS) soluble de Clase IV (SSIV) es imprescindible para la nucleación inicial del gránulo de almidón. En su ausencia, el número de gránulos se ve reducido a uno o dos los cuales presentan ciertas peculiaridades respecto a los gránulos de plantas silvestres: diferente estructura del hilum, mayor tamaño, tasas de síntesis y degradación inferiores y la imposibilidad de degradarlos completamente.
- SSIV forma parte de un “complejo de nucleación” que permite la nucleación de un sustrato inicial (probablemente algún o algunos maltoligosacáridos solubles) o facilita las condiciones en las que dicha nucleación ocurre espontáneamente. En su ausencia, la nucleación se vuelve un proceso azaroso, poco frecuente y dependiente de la presencia del resto de SSs, principalmente de la presencia de SSIII. La eliminación de SSIII en un fondo genético *ssIV* hace que el contenido de almidón sea inferior al límite de detección de los ensayos empleados.
- El dominio amino de SSIV posee un péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) (aminoácidos 1 a 42), un dominio long coiled-coil (aminoácidos 187 a 409 aproximadamente) y un dominio de estructura desconocida altamente conservado entre diferentes especies y esencial para la actividad glucosiltransferasa de la proteína (aminoácidos 471 a 544).
- SSIV forma parte de un complejo macromolecular asociado a la membrana tilacoidal. La interacción de SSIV con algún o algunos de los componentes de dicho complejo ocurre a través de su dominio *long coiled-coil*. SSIV no interacciona consigo misma.
- El dominio carboxilo de SSIV no posee actividad glucosiltransferasa, pese a su alta homología con la Glucógeno Sintasa bacteriana. La región entre el dominio carboxilo y el *long coiled-coil* parece fundamental para la afinidad de la SSIV por ADP-glucosa (ADP-Glc) y, por tanto, para su actividad glucosiltransferasa.
- Las características fenotípicas observadas en los mutantes carentes de SSIV son provocadas por la acumulación de ADP-Glc resultante del bloqueo de la síntesis de almidón. El bloqueo de la síntesis de almidón, provocado por la ausencia de SSIV, hace que se alcancen altas concentraciones de ADP-Glc en el interior del cloroplasto, lo que se traduce en unas bajas concentraciones de ADP y ATP cloroplastícos. La disminución de la concentración de ADP provoca el enlentecimiento de la cadena de transporte de electrones, que desencadena las respuestas de fotoprotección por parte de la planta, entre ellas cambios en el contenido de pigmentos antena y fotoprotectores. Los fenómenos de fotoinhibición/fotoprotección provocados por el enlentecimiento de la cadena de transporte de electrones dan lugar a la disminución del rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) y el rendimiento cuántico aparente (ϕ_{PSII}) en las condiciones de cultivo. La disminución del contenido de ATP del cloroplasto provoca el enlentecimiento del ciclo de Calvin-Benson, llevando a la disminución de la fijación de CO_2 y a la menor tasa de crecimiento.

Bibliografía.

- Alonso-Casajus, N., Dauvillee, D., Viale, A.M., Munoz, F.J., Baroja-Fernandez, E., Moran-Zorzano, M.T., Eydallin, G., Ball, S., Pozueta-Romero, J. 2006. Glycogen phosphorylase, the product of the glgP Gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188:5266-72
- Alonso, M., Lomako, J., Lomako, W., Whelan, W. 1995. Catalytic activities of glycogenin additional to autocatalytic self-glucosylation. *The Journal of biological chemistry* 270:15315-19
- Anderson, J.M., Park, Y.I., Chow, W.S. 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum* 100:214-23
- Andriotis, V.M., Pike, M.J., Kular, B., Rawsthorne, S., Smith, A.M. 2010. Starch turnover in developing oilseed embryos. *New Phytol* 187:791-804
- Ardila, F.J., Tandecarz, J.S. 1992. Potato Tuber UDP-Glucose:Protein Transglucosylase Catalyzes Its Own Glucosylation. *Plant Physiol* 99:1342-7
- Baker, N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* 59:89-113
- Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J.N., Tirtiaux, C. 2011. The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *J Exp Bot*
- Ball, S., Guan, H., James, M., Myers, A., Keeling, P., Merville, G., Buleon, A., Colonna, P., Preiss, J. 1996. From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* 86:349-52
- Ball, S., Morell, M. 2003. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Ann. Rev. Plant Biol.* 54:207-33
- Baroja-Fernandez, E., Munoz, F., Zandueña-Criado, A., Moran-Zorzano, M., Viale, A., Alonso-Casajus, N., Pozueta-Romero, J. 2004. Most of ADP x glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13080-85
- Beatty, M., Rahman, A., Cao, H., Woodman, W., Lee, M., Myers, A., James, M. 1999. Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize. *Plant physiology* 119:255-66
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. 1993. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* 316:1194-99
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A., Lejeune, P. 1993. Physiological Signals That Induce Flowering. *Plant Cell* 5:1147-55
- Bilger, W., Schreiber, U., Bock, M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102:425-32
- Björkman, O., Demmig, B. 1987. Photon yield of O₂; evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489-504
- Blankenship, R.E. 2002. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Oxford: Blackwell Sci.
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J., Douce, R. 1983. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. I. Electrophoretic and immunochemical analyses. *The Journal of biological chemistry* 258:13273-80

- Borovsky, D., Smith, E., Whelan, W. 1976. On the mechanism of amylose branching by potato Q-enzyme. *European journal of biochemistry / FEBS* 62:307-12
- Bouchez, D., Camilleri, C., Caboche, M. 1993. A binary vector based on BASTA resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* 316:1188-93
- Boyer, C.D., Preiss, J. 1979. Properties of citrate-stimulated starch synthesis catalyzed by starch synthase I of developing maize kernels. *Plant Physiol.* 64:1039-42
- Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54
- Brooks, M.D., Niyogi, K.K. 2011. Use of a pulse-amplitude modulated chlorophyll fluorometer to study the efficiency of photosynthesis in *Arabidopsis* plants. *Methods Mol Biol* 775:299-310
- Brown, D., Zeef, L., Ellis, J., Goodacre, R., Turner, S. 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *The Plant cell* 17:2281-95
- Buege, J.A., Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-10
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol* 23:85-112
- Buleon, A., Gallant, D., Bouchet, B., Mouille, C., Dhulst, C., Kossmann, J., Ball, S. 1997. Starches from A to C - *Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. *Plant physiology* 115:949-57
- Burkhard, P., Stetefeld, J., Strelkov, S.V. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in Cell Biology* 11:82-88
- Burton, R., Bewley, J., Smith, A., Bhattacharyya, M., Tatge, H., Ring, S., Bull, V., Hamilton, W., Martin, C. 1995. Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 7:3-15
- Burton, R., Jenner, H., Carrangis, L., Fahy, B., Fincher, G., Hylton, C., Laurie, D., Parker, M., Waite, D., van Wegen, S., Verhoeven, T., Denyer, K. 2002. Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 31:97-112
- Bustos, R., Fahy, B., Hylton, C., Seale, R., Nebane, N., Edwards, A., Martin, C., Smith, A. 2004. Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 101:2215-20
- Butler, W.L. 1978. Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 29:345-78
- Caemmerer, S., Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376-87
- Caspar, T., Huber, S., Somerville, C. 1985. Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant physiology* 79:11-17
- Caspar, T., Lin, T., Kakefuda, G., Benbow, L., Preiss, J., Somerville, C. 1991. Mutants of *Arabidopsis* with Altered Regulation of Starch Degradation. *Plant physiology* 95:1181-88

- Clontech laboratories, I. 2010. *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual*
- Clough, S.J., Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16:735-43
- Commuri, P., Keeling, P. 2001. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 25:475-86
- Craig, J., Lloyd, J.R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T.L., Martin, C., Hedley, C.L., Smith, A.M. 1998. Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *The Plant cell* 10:413-26
- Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leyland, N., Reynolds, H., Pastori, G., Wellburn, F., Baker, N., Wellburn, A., Mullineaux, P. 1999. Elevated Glutathione Biosynthetic Capacity in the Chloroplasts of Transgenic Tobacco Plants Paradoxically Causes Increased Oxidative Stress. *THE PLANT CELL ONLINE* 11:1277-92
- Crevillén, P., Ballicora, M., Mérida, A., Preiss, J., Romero, J. 2003. The different large subunit isoforms of *Arabidopsis thaliana* ADP-Glucose pyrophosphorylase confer distinct kinetic and regulatory properties to the heterotetrameric enzyme. *The Journal of biological chemistry* 278:28508-15
- Crick, F.H. 1952. Is alpha-keratin a coiled coil? *Nature* 170:882-3
- Critchley, J., Zeeman, S., Takaha, T., Smith, A., Smith, S. 2001. A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 26:89-100
- Crumpton-Taylor, M. 2010. *Starch granule number and size in Arabidopsis thaliana leaves*. University of East Anglia, Norwich
- Czechowski, T., Bari, R.P., Stitt, M., Scheible, W.R., Udvardi, M.K. 2004. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J* 38:366-79
- Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., Kreis, M. 2002. Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiology* 130:577-90
- Chatterjee, M., Berbezuya, P., Vyasa, D., Coates, S., Barsby, T. 2005. Reduced expression of a protein homologous to glycogenin leads to reduction of starch content in *Arabidopsis* leaves. *Plant science (Shannon, Ireland)* 168:501-09
- D'Hulst, C., Mérida, A., Planchot, V., Roldán, I., Delvalle, D., Wattedled, F. 2007. Plants defective for soluble starch synthase IV (SSIV) activity, methods for obtaining the same, and uses thereof.
- D'Hulst, C., Mérida, A. 2010. The priming of storage glucan synthesis from bacteria to plants: current knowledge and new developments. *New Phytologist* 188:13-21
- Dauvillee, D., Colleoni, C., Mouille, G., Morell, M., D'apos;Hulst, C., Wattedled, F., Lienard, L., Delvalle, D., Ral, J., Myers, A., Ball, S. 2001. Biochemical characterization of wild-type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant physiology* 125:1723-31
- Dauvillee, D., Chochois, V., Steup, M., Haebel, S., Eckermann, N., Ritte, G., Ral, J.-P., Colleoni, C., Hicks, G., Wattedled, F., Deschamps, P., D'apos;Hulst, C., Liénard, L., Cournac, L., Putaux, J.-L., Dupeyre, D., Ball, S.G. 2006. Plastidial phosphorylase is required for normal starch

- synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48:274-85
- de Paula, R.M., Wilson, W.A., Terenzi, H.F., Roach, P.J., Bertolini, M.C. 2005. GNN is a self-glucosylating protein involved in the initiation step of glycogen biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Arch Biochem Biophys* 435:112-24
- Delatte, T., Trevisan, M., Parker, M.L., Zeeman, S.C. 2005. Arabidopsis mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 41:815-30
- Delmer, D.P. 1972. The Purification and Properties of Sucrose Synthetase from Etiolated *Phaseolus aureus* Seedlings. *Journal of Biological Chemistry* 247:3822-28
- Delorenzi, M., Speed, T. 2002. An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. *Bioinformatics* 18:617-25
- Delvallé, D., Dumez, S., Wattedled, F., Roldán, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Mérida, Á., D'Hulst, C. 2005a. Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J.* 43:398-412
- Delvallé, D., Dumez, S., Wattedled, F., Roldán, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Mérida, Á., D'Hulst, C. 2005b. Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 43:398-412
- Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H., Smith, A. 1996. The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant Journal* 10:1135-43
- Denyer, K., Hylton, C.M., Jenner, C.F., Smith, A.M. 1995. Identification of Multiple Isoforms of Soluble and Granule-Bound Starch Synthase in Developing Wheat Endosperm. *Planta* 196:256-65
- Denyer, K., Johnson, P., Zeeman, S., Smith, A. 2001a. The control of amylose synthesis. *Journal of Plant Physiology* 158:479-87
- Denyer, K., Johnson, P., Zeeman, S., Smith, A.M. 2001b. The control of amylose synthesis. *J. Plant Physiol.* 158:479-87
- Denyer, K., Waite, D., Edwards, A., Martin, C., Smith, A. 1999a. Interaction with amylopectin influences the ability of granule-bound starch synthase I to elongate malto-oligosaccharides. *The Biochemical journal* 342 Pt 3:647-53
- Denyer, K., Waite, D., Motawia, S., Møller, B.L., Smith, A.M. 1999b. Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *The Biochemical journal* 340 (Pt 1):183-91
- Deschamps, P., Colleoni, C., Nakamura, Y., Suzuki, E., Putaux, J.-L., Buléon, A., Haebel, S., Ritte, G., Steup, M., Falcón, L.I., Moreira, D., Löffelhardt, W., Raj, J.N., Plancke, C., d'Hulst, C., Dauvillée, D., Ball, S. 2008. Metabolic Symbiosis and the Birth of the Plant Kingdom. *Molecular Biology and Evolution* 25:536-48
- Dian, W., Jiang, H., Wu, P. 2005. Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. *J Exp Bot* 56:623-32
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127-45

- Edner, C., Li, J., Albrecht, T., Mahlow, S., Hejazi, M., Hussain, H., Kaplan, F., Guy, C., Smith, S., Steup, M., Ritte, G. 2007. Glucan, Water Dikinase Activity Stimulates Breakdown of Starch Granules by Plastidial beta-amylases. *Plant physiology* 145:17-28
- Edwards, A., Borthakur, A., Bornemann, S., Venail, J., Denyer, K., Waite, D., Fulton, D., Smith, A., Martin, C. 1999a. Specificity of starch synthase isoforms from potato. *European journal of biochemistry / FEBS* 266:724-36
- Edwards, A., Fulton, D., Hylton, C., Jobling, S., Gidley, M., Rössner, U., Martin, C., Smith, A. 1999b. A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *The Plant Journal* 17:251-61
- Edwards, A., Marshall, J., Denyer, K., Sidebottom, C., Visser, R., Martin, C., Smith, A. 1996. Evidence that a 77-kilodalton protein from the starch of pea embryos is an isoform of starch synthase that is both soluble and granule bound. *Plant physiology* 112:89-97
- Edwards, A., Marshall, J., Sidebottom, C., Visser, R.G., Smith, A.M., Martin, C. 1995. Biochemical and molecular characterization of a novel starch synthase from potato tubers. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 8:283-94
- Eimert, K., Wang, S., Lue, W., Chen, J. 1995. Monogenic recessive mutations causing both late floral initiation and excess starch accumulation in Arabidopsis. *The Plant cell* 7:1703-12
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8:978-84
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D. 1982. Stomatal Conductance and Photosynthesis. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 33:317-45
- Fedorova, E., Thomson, R., Whitehead, L.F., Maudoux, O., Udvardi, M.K., Day, D.A. 1999. Localization of H⁺-ATPases in soybean root nodules. *Planta* 209:25-32
- Fettke, J., Albrecht, T., Hejazi, M., Mahlow, S., Nakamura, Y., Steup, M. 2010. Glucose 1-phosphate is efficiently taken up by potato (*Solanum tuberosum*) tuber parenchyma cells and converted to reserve starch granules. *New Phytol* 185:663-75
- Fondy, B.R., Geiger, D.R. 1982. Diurnal Pattern of Translocation and Carbohydrate Metabolism in Source Leaves of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol* 70:671-6
- Fu, Y., Ballicora, M., Leykam, J., Preiss, J. 1998. Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* 273:25045-52
- Fujita, N., Kubo, A., Francisco, P.B., Nakakita, M., Harada, K., Minaka, N., Nakamura, Y. 1999. Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. *Planta* 208:283-93
- Fujita, N., Yoshida, M., Asakura, N., Ohdan, T., Miyao, A., Hirochika, H., Nakamura, Y. 2006. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant physiology* 140:1070-84
- Fulton, D.C., Edwards, A., Pilling, E., Robinson, H.L., Fahy, B., Seale, R., Kato, L., Donald, A.M., Geigenberger, P., Martin, C., Smith, A.M. 2002. Role of granule-bound starch synthase in determination of amylopectin structure and starch granule morphology in potato. *The Journal of biological chemistry* 277:10834-41
- Furukawa, K., Tagaya, M., Inouye, M., Preiss, J., Fukui, T. 1990. Identification of lysine 15 at the active site in *Escherichia coli* glycogen synthase. Conservation of Lys-X-Gly-Gly sequence in the bacterial and mammalian enzymes. *J Biol Chem* 265:2086-90

- Gómez-Arjona, F.M., Li, J., Raynaud, S., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Ovecka, M., Ragel, P., Bahaji, A., Pozueta-Romero, J., Mérida, Á. 2011. Enhancing the expression of starch synthase class IV results in increased levels of both transitory and long-term storage starch. *Plant Biotechnology Journal*
- Gao, M., Fisher, D., Kim, K., Shannon, J., Gultinan, M. 1997. Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb. Isolation and characterization of a Sbe2a cDNA. *Plant physiology* 114:69-78
- Geiger, D., Servaites, J. 1994. Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 45:235-56
- Geiger, D.R., Servaites, J.C., Fuchs, M.A. 2000. Role of starch in carbon translocation and partitioning at the plant level. *Functional Plant Biology* 27:571-82
- George, G.M., van der Merwe, M.J., Nunes-Nesi, A., Bauer, R., Fernie, A.R., Kossmann, J., Lloyd, J.R. 2010. Virus-induced gene silencing of plastidial soluble inorganic pyrophosphatase impairs essential leaf anabolic pathways and reduces drought stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* 154:55-66
- Gibon, Y., Bläsing, O.E., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J.H.M., Fisahn, J., Höhne, M., Günther, M., Stitt, M. 2004a. Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant Journal* 39:847-62
- Gibon, Y., Bläsing, O.E., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J.H.M., Fisahn, J., Höhne, M., Günther, M., Stitt, M. 2004b. Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39:847-62
- Gibon, Y., Pyl, E., Sulpice, R., Lunn, J., Hohne, M., Gunther, M., Stitt, M. 2009. Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant Cell and Environment* 32:859-74
- Gietz, R.D., Woods, R.A. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350:87-96
- Gil, R., Latorre, A., Moya, A. 2004. Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environmental Microbiology* 6:1109-22
- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exper. Hematol.* 30:503-12
- Glaring, M.A., Koch, C.B., Blennow, A. 2006. Genotype-Specific Spatial Distribution of Starch Molecules in the Starch Granule: A Combined CLSM and SEM Approach. *Biomacromolecules* 7:2310-20
- Gordon, A.J., Ryle, G.J.A., Webb, G. 1980. The Relationship between Sucrose and Starch during 'Dark' Export from Leaves of *Uniculum* Barley. *Journal of Experimental Botany* 31:845-50
- Govindjee. 2004. Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Probe of Photosynthesis*, ed. Papageorgiou, G.C., Govindjee, pp. 2-42: Kluwer Academic Publishers.

- Graf, A., Schlereth, A., Stitt, M., Smith, A. 2010. Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Guan, H., Kuriki, T., Sivak, M., Preiss, J. 1995. Maize branching enzyme catalyzes synthesis of glycogen-like polysaccharide in *glgB*-deficient *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:964-67
- Guan, H., Li, P., Impart-Radosevich, J., Preiss, J., Keeling, P. 1997. Comparing the Properties of *Escherichia coli* Branching Enzyme and Maize Branching Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 342:92-98
- Habermann, G., Caruso Machado, E., Domingos Rodrigues, J., Lázaro Medina, C. 2003a. CO₂ assimilation, photosynthetic light response curves, and water relations of "Pêra" sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Braz. J. Plant Physiol.* 15:79-87
- Habermann, G., Machado, E.C., Rodrigues, J.D., Medina, C.L. 2003b. CO₂ assimilation, photosynthetic light response curves, and water relations of "Pêra" sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Braz. J. Plant Physiol* 15:79-87
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-80
- Harn, C., Knight, M., Ramakrishnan, A., Guan, H., Keeling, P., Wasserman, B. 1998. Isolation and characterization of the *zSSIa* and *zSSIb* starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant molecular ...*
- Harrison, C., Hedley, C., Wang, T. 1998. Evidence that the *rug3* locus of pea (*Pisum sativum* L.) encodes plastidial phosphoglucomutase confirms that the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose-6-phosphate. *Plant Journal* 13:753-62
- Häusler, R.E., Schlieben, N.H., Schulz, B., Flügge, U.-I. 1998. Compensation of decreased triose phosphate/phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco. *Planta* 204:366-76
- Hawker, J.S., Ozbun, J.L., Ozaki, H., Greenberg, E., Preiss, J. 1974. Interaction of spinach leaf adenosine diphosphate glucose alpha-1,4-glucan alpha-4-glucosyl transferase and alpha-1,4-glucan, alpha-1,4-glucan-6-glycosyl transferase in synthesis of branched alpha-glucan. *Arch Biochem Biophys* 160:530-51
- Hejazi, M., Fettke, J., Kötting, O., Zeeman, S.C., Steup, M. 2010. The Laforin-like dual-specificity phosphatase *SEX4* from *Arabidopsis* hydrolyzes both C6- and C3-phosphate esters introduced by starch-related dikinases and thereby affects phase transition of alpha-glucans. *Plant physiology* 152:711-22
- Hejazi, M., Fettke, J., Paris, O., Steup, M. 2009. The Two Plastidial Starch-Related Dikinases Sequentially Phosphorylate Glucosyl Residues at the Surface of Both the A- and B-Type Allomorphs of Crystallized Maltodextrins But the Mode of Action Differs. *PLANT PHYSIOLOGY* 150:962-76
- Hennen-Bierwagen, T., Lin, Q., Grimaud, F., Planchot, V., Keeling, P., James, M., Myers, A. 2009. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts. *Plant physiology* 149:1541-59

- Hennen-Bierwagen, T., Liu, F., Marsh, R., Kim, S., Gan, Q., Tetlow, I., Emes, M., James, M., Myers, A. 2008. Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant physiology* 146:1892-908
- Henrissat, B., Deleury, E., Coutinho, P.M. 2002. Glycogen metabolism loss: a common marker of parasitic behaviour in bacteria? *Trends Genet* 18:437-40
- Hill, L.M., Smith, A.M. 1991. Evidence that glucose 6-phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by the plastids of developing pea embryos. *Planta* 185:91-96
- Hirose, T., Terao, T. 2004. A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 220:9-16
- Honda, D., Yokota, A., Sugiyama, J. 1999. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J Mol Evol* 48:723-39
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S., Hoekema, A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2:208-18
- Hussain, H., Mant, A., Seale, R., Zeeman, S., Hinchliffe, E., Edwards, A., Hylton, C., Bornemann, S., Smith, A., Martin, C., Bustos, R. 2003. Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *The Plant cell* 15:133-49
- Iglesias, A., Barry, G., Meyer, C., Bloksberg, L., Nakata, P., Greene, T., Laughlin, M., Okita, T., Kishore, G., Preiss, J. 1993. Expression of the potato ADP-glucose Pyrophosphorylase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 268:1081-86
- Imparl-Radosevich, J., Li, P., Zhang, L., McKean, A., Keeling, P., Guan, H. 1998. Purification and characterization of maize starch synthase I and its truncated forms. *Arch Biochem Biophys* 353:64-72
- Ishizaki, Y., Taniguchi, H., Maruyama, Y., Nakamura, M. 1983. Debranching enzymes of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). I. Purification and some properties of potato isoamylase. *Agricultural and biological chemistry* 47:771-79
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. 2002. bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 7:106-11
- Jane, J., Kasemsuwan, T., Leas, S., Ia, A., Zobel, H., II, D., Robyt, J. 1994. Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch - Stärke* 4:121-29
- Jenkins, P.J., Cameron, R.E., Donald, A.M. 1993. A Universal Feature in the Structure of Starch Granules from Different Botanical Sources. *Starch - Stärke* 45:417-20
- Jiang, H., Dian, W., Liu, F., Wu, P. 2004. Molecular cloning and expression analysis of three genes encoding starch synthase II in rice. *Planta* 218:1062-70
- Jobling, S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Curr Opin Plant Biol* 7:210-8
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A., Flugge, U.I. 1998. Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 10:105-17
- Kautsky, H., Apel, W., Amann, H. 1960. Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. XIII. Die Fluoreszenzkurve und die Photochemie der Pflanze. *Biochem Zeit* 332:227-92

- Kirchberger, S., Leroch, M., Huynen, M.A., Wahl, M., Neuhaus, H.E., Tjaden, J. 2007. Molecular and biochemical analysis of the plastidic ADP-glucose transporter (ZmBT1) from *Zea mays*. *J Biol Chem* 282:22481-91
- Kirchberger, S., Tjaden, J., Neuhaus, H.E. 2008. Characterization of the Arabidopsis Brittle1 transport protein and impact of reduced activity on plant metabolism. *Plant J* 56:51-63
- Kiss, J.Z., Edelmann, R.E. 1999. Spaceflight experiments with Arabidopsis starch-deficient mutants support a statolith-based model for graviperception. *Advances in Space Research* 24:755-62
- Kiss, J.Z., Wright, J.B., Caspar, T. 1996. Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* 97:237-44
- Kofler, H., Hausler, R.E., Schulz, B., Groner, F., Flugge, U.I., Weber, A. 2000. Molecular characterisation of a new mutant allele of the plastid phosphoglucomutase in Arabidopsis, and complementation of the mutant with the wild-type cDNA. *Mol Genet* 263:978-86
- Kotting, O., Kossmann, J., Zeeman, S., Lloyd, J. 2010. Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Curr Opin Plant Biol*
- Kötting, O., Santelia, D., Edner, C., Eicke, S., Marthaler, T., Gentry, M.S., Comparot-Moss, S., Chen, J., Smith, A.M., Steup, M., Ritte, G., Zeeman, S.C. 2009. STARCH-EXCESS4 is a laforin-like Phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell* 21:334-46
- Kozlov, G., Elias, D., Cygler, M., Gehring, K. 2004. Structure of GlgS from Escherichia coli suggests a role in protein-protein interactions. *BMC Biology*
- Kruger, N., Bulpin, P., ap Rees, T. 1983. The extent of starch degradation in the light in pea leaves. *Planta* 157:271-73
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5
- Langeveld, S., Vennik, M., Kottenhagen, M., Van Wijk, R., Buijk, A., Kijne, J., de Pater, S. 2002. Glucosylation activity and complex formation of two classes of reversibly glycosylated polypeptides. *Plant physiology* 129:278-89
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-48
- Lavintman, N., Cardini, C.E. 1973. Particulate UDP-glucose: Protein transglucosylase from potato tuber. *FEBS Lett* 29:43-46
- Lavintman, N., Tandecarz, J., Carceller, M., Mendiara, S., Cardini, C.E. 1974. Role of uridine diphosphate glucose in the biosynthesis of starch. Mechanism of formation and enlargement of a glucoproteic acceptor. *Eur J Biochem* 50:145-55
- Lawlor, D.W., Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25:275-94
- Leterrier, M., Holappa, L., Broglie, K., Beckles, D. 2008. Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: functional and evolutionary implications. *BMC Plant Biol* 8:98

- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, T.P., Franke, R.B., Graham, I.A., Katayama, K., Kelly, A.A., Larson, T., Markham, J.E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K.M., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R., Ohlrogge, J. 2010. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* 8:e0133
- LI-COR Biosciences, I. 2005. *Using the LI-6400. Portable Photosynthesis System*. Lincoln, Nebraska
- Li, J., Almagro, G., Munoz, F.J., Baroja-Fernandez, E., Bahaji, A., Montero, M., Hidalgo, M., Sanchez-Lopez, A.M., Ezquer, I., Sesma, M.T., Pozueta-Romero, J. 2012. Post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase in response to light is not a major determinant of fine regulation of transitory starch accumulation in arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol* 53:433-44
- Li, Z., Chu, X., Mouille, G., Yan, L., Kosar-Hashemi, B., Hey, S., Napier, J., Shewry, P., Clarke, B., Appels, R., Morell, M.K., Rahman, S. 1999a. The localization and expression of the class II starch synthases of wheat. *Plant physiology* 120:1147-56
- Li, Z., Rahman, S., KosarHashemi, B., Mouille, G., Appels, R., Morell, M. 1999b. Cloning and characterization of a gene encoding wheat starch synthase I. *Theoretical and Applied Genetics* 98:1208-16
- Li, Z., Sun, F., Xu, S., Chu, X., Mukai, Y., Yamamoto, M., Ali, S., Rampling, L., Kosar-Hashemi, B., Rahman, S., Morell, M. 2003. The structural organisation of the gene encoding class II starch synthase of wheat and barley and the evolution of the genes encoding starch synthases in plants. *Functional & Integrative Genomics* 3:76-85
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc.
- Lin, T., Caspar, T., Somerville, C., Preiss, J. 1988a. A Starch Deficient Mutant of *Arabidopsis thaliana* with Low ADPglucose Pyrophosphorylase Activity Lacks One of the Two Subunits of the Enzyme. *Plant physiology* 88:1175-81
- Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C., Preiss, J. 1988b. Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* 86:1131-35
- Lin, T.P., Preiss, J. 1988. Characterization of d-Enzyme (4-alpha-Glucanotransferase) in *Arabidopsis* Leaf. *Plant Physiol* 86:260-5
- Lindahl, M., Florencio, F.J. 2003. Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:16107-12
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* 25:402-08
- Lohmeier-Vogel, E., Kerk, D., Nimick, M., Wrobel, S., Vickerman, L., Muench, D., Moorhead, G. 2008a. *Arabidopsis* At5g39790 encodes a chloroplast-localized, carbohydrate-binding, coiled-coil domain-containing putative scaffold protein. *BMC Plant Biol* 8:120
- Lohmeier-Vogel, E.M., Kerk, D., Nimick, M., Wrobel, S., Vickerman, L., Muench, D.G., Moorhead, G.B. 2008b. *Arabidopsis* At5g39790 encodes a chloroplast-localized, carbohydrate-binding, coiled-coil domain-containing putative scaffold protein. *BMC Plant Biol* 8:120
- Lomako, J., Lomako, W., Whelan, W. 1988. A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J.* 2:3097-103

- Lomako, J., Lomako, W., Whelan, W. 2004. Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1673:45-55
- Lorén, N., Hermansson, A.M., Williams, M.A.K., Lundin, L., Foster, T.J., Hubbard, C.D., Clark, A.H., Norton, I.T., Bergström, E.T., Goodall, D.M. 2001. Phase Separation Induced by Conformational Ordering of Gelatin in Gelatin/Maltodextrin Mixtures. *Macromolecules* 34:289-97
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-75
- Lu, Y., Gehan, J., Sharkey, T. 2005. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant physiology* 138:2280-91
- Lucas, M.M., Van de Sype, G., Hérouart, D., Hernández, M.J., Puppo, A., de Felipe, M.R. 1998. Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate root nodules. *Protoplasma* 204:61-70
- Ludewig, F., Sonnewald, U., Kauder, F., Heineke, D., Geiger, M., Stitt, M., Müller-Rober, B., Gillissen, B., Kuhn, C., Frommer, W. 1998. The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO₂. *FEBS Letters* 429:147-51
- Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, J. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252:1162-4
- Lytovchenko, A., Bieberich, K., Willmitzer, L., Fernie, A. 2002. Carbon assimilation and metabolism in potato leaves deficient in plastidial phosphoglucomutase. *Planta* 215:802-11
- Lloyd, J., Kossmann, J., Ritte, G. 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science* 10:130-37
- Maddelein, M., Libessart, N., Bellanger, F., Delrue, B., D Hulst, C., Van den Koornhuysse, N., Fontaine, T., Wieruszkeski, J., Decq, A., Ball, S. 1994. Toward an Understanding of the Biogenesis of the Starch Granule. *Journal of Biological Chemistry* 269:25150-57
- Matheson, N. 1996. The chemical structure of amylose and amylopectin fractions of starch from tobacco leaves during development and diurnally-nocturnally. *Carbohydrate Research* 282:247-62
- Mattanovich, D., Ruüker, F., Machado, A.C., Laimer, M., Tegner, F., Steinkellner, H., Himmler, G., Katinger, H. 1989. Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. *Nucl. Acids Res.* 17:6747
- Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* 51:659-68
- McMurtrie, R.E., Wang, Y.P. 1993. Mathematical models of the photosynthetic response of tree stands to rising CO₂ concentrations and temperatures. *Plant, Cell & Environment* 16:1-13
- Mérida, A., Rodríguez-Galán, J., Vincent, C., Romero, J. 1999. Expression of the Granule-Bound Starch Synthase I (Waxy) gene from Snapdragon Is developmentally and circadian clock regulated. *Plant physiology* 120:401-10
- Michalska, J., Zauber, H., Buchanan, B., Cejudo, F., Geigenberger, P. 2009. NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9908-13
- Mikkelsen, R., Mutenda, K., Mant, A., Schumann, P., Blennow, A. 2005. Alpha-glucan, water dikinase (GWD): a plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1785-90

- Mimuro, M., Kato, T. 1991. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. *Pure and Applied Chemistry* 63:123-30
- Mizuno, K., Kobayashi, E., Tachibana, M., Kawasaki, T., Fujimura, T., Funane, K., Kobayashi, M., Baba, T. 2001. Characterization of an isoform of rice starch branching enzyme, RBE4, in developing seeds. *Plant and Cell Physiology* 42:349-57
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W., Liu, Y., Hwang, I., Jones, T., Sheen, J. 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300:332-36
- Morell, M., Blennow, A., Kosar-Hashemi, B., Samuel, M. 1997. Differential expression and properties of starch branching enzyme in developing wheat endosperm. *Plant physiology* 113:201-08
- Morell, M.K., Kosar-Hashemi, B., Cmiel, M., Samuel, M.S., Chandler, P., Rahman, S., Buleon, A., Batey, I.L., Li, Z. 2003. Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 34:173-85
- Moustafa, A., Reyes-Prieto, A., Bhattacharya, D. 2008. Chlamydiae Has Contributed at Least 55 Genes to Plantae with Predominantly Plastid Functions. *PLoS ONE* 3:e2205
- Mukerjee, R., Yu, L., Robyt, J. 2002. Starch biosynthesis: mechanism for the elongation of starch chains. *Carbohydr Res* 337:1015-22
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K. 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *PLANT PHYSIOLOGY* 125:1558-66
- Muñoz, F., Baroja-Fernández, E., Morán-Zorzano, M., Viale, A., Etxeberria, E., Alonso-Casajús, N., Pozueta-Romero, J. 2005. Sucrose synthase controls both intracellular ADP glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant and Cell Physiology* 46:1366-76
- Muñoz, F., Teresa Morán Zorzano, M., Alonso-Casajús, N., Baroja-Fernández, E., Etxeberria, E., Pozueta-Romero, J. 2006. New enzymes, new pathways and an alternative view on starch biosynthesis in both photosynthetic and heterotrophic tissues of plants. *Biocatalysis and Biotransformation* 24:63-76
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15:473-97
- Murray, M.G., Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8:4321-26
- Myers, A., Morell, M., James, M., Ball, S. 2000. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant physiology* 122:989-97
- Nagata, T., Todoriki, S., Masumizu, T., Suda, I., Furuta, S., Du, Z., Kikuchi, S. 2003. Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in Arabidopsis. *J Agric Food Chem* 51:2992-9
- Nakamura, T., Vrinten, P., Hayakawa, K., Ikeda, J. 1998. Characterization of a granule-bound starch synthase isoform found in the pericarp of wheat. *Plant physiology* 118:451-59
- Nakamura, Y., Takahashi, J., Sakurai, A., Inaba, Y., Suzuki, E., Nihei, S., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., Miyashita, H., Ikemoto, H., Kawachi, M., Sekiguchi, H., Kurano, N. 2005. Some Cyanobacteria Synthesize Semi-amylopectin Type α -Polyglucans Instead of Glycogen. *Plant and Cell Physiology* 46:539-45

- Nakamura, Y., Utsumi, Y., Sawada, T., Aihara, S., Utsumi, C., Yoshida, M., Kitamura, S. 2010. Characterization of the Reactions of Starch Branching Enzymes from Rice Endosperm. *Plant and Cell Physiology* 51:776-94
- Neuhaus, H.E., Henrichs, G., Scheibe, R. 1993. Characterization of Glucose-6-Phosphate Incorporation into Starch by Isolated Intact Cauliflower-Bud Plastids. *Plant Physiol* 101:573-78
- Neuhaus, H.E., Kruckeberg, A.L., Feil, R., Stitt, M. 1989. Reduced-activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*. *Planta* 178:110-22
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M. 1996. *The Physiology of Plants under Stress: Abiotic Factors*. New York: John Wiley and Sons
- Niyogi, K.K. 1999. PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:333-59
- Ohdan, T., Francisco, P.B., Sawada, T., Hirose, T., Terao, T., Satoh, H., Nakamura, Y. 2005. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *Journal of Experimental Botany* 56:3229-44
- Olsson, T., Leverenz, J.W. 1994. Non-uniform stomatal closure and the apparent convexity of the photosynthetic photon flux density response curve. *Plant, Cell & Environment* 17:701-10
- Osmond, C.B., Anderson, J.M., Ball, M.C., Egerton, J.J.G. 1999. Compromising efficiency: the molecular ecology of light-resource utilization in plants. In *Physiological Plant Ecology*, ed. Preiss, M.C., Scholes, J.D., Barker, M.G.: British Ecological Society
- Overlach, S., Diekmann, W., Raschke, K. 1993. Phosphate Translocator of Isolated Guard-Cell Chloroplasts from *Pisum sativum* L. Transports Glucose-6-Phosphate. *PLANT PHYSIOLOGY* 101:1201-07
- Pantin, F., Simonneau, T., Rolland, G., Dauzat, M., Muller, B. 2011. Control of leaf expansion: a developmental switch from metabolics to hydraulics. *Plant Physiol* 156:803-15
- Parsons, R., Ogston, S.A. Dundee Scientific. *Photosyn Assistant - Windows software for analysis of photosynthesis*. Dundee (UK)
- Patron, N., Keeling, P. 2005. Common evolutionary origin of starch biosynthetic enzymes in green and red algae. *J. Phycol.* 41:1131-41
- Pilling, E., Smith, A. 2003. Growth ring formation in the starch granules of potato tubers. *Plant physiology* 132:365-71
- Pitcher, J., Smythe, C., Cohen, P. 1988. Glycogenin is the priming glucosyltransferase required for the initiation of glycogen biogenesis in rabbit skeletal muscle. *European journal of biochemistry / FEBS* 176:391-95
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975:384-94
- Preiss, J. 1988. *Biosynthesis of starch and its regulation*. 181-295 pp.
- Prioul, J.L., Chartier, P. 1977. Partitioning of Transfer and Carboxylation Components of Intracellular Resistance to Photosynthetic CO₂ Fixation: A Critical Analysis of the Methods Used. *Annals of Botany* 41:789-800

- Quentmeier, H., Ingold, E., Seitz, H.U. 1987. Purification of an autocatalytic protein-glycosylating enzyme from cell suspensions of *Daucus carota*. *Planta* 171:483-88
- Rabino, I., Mancinelli, A.L. 1986. Light, temperature, and anthocyanin production. *Plant Physiol* 81:922-4
- Rahman, S., Kosar-Hashemi, B., Samuel, M., Hill, A., Abbott, D., Skerritt, J., Preiss, J., Appels, R., Morell, M. 1995. The major proteins of wheat endosperm starch granules. *Aust. J. Plant Physiol.* 22:793-803
- Ral, J.-P., Derelle, E., Ferraz, C., Wattedled, F., Farinas, B., Corellou, F., BulÉon, A., Slomianny, M.-C., Delvallé, D., Hulst, C., Rombauts, S., Moreau, H., Ball, S. 2004. Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri*. *Plant physiology* 136:3333-40
- Rathore, R., Garg, N., Garg, S., Kumar, A. 2009. Starch phosphorylase: role in starch metabolism and biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol* 29:214-24
- Ritte, G., Lloyd, J., Eckermann, N., Rottmann, A., Kossmann, J., Steup, M. 2002. The starch-related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7166-71
- Rohila, J., Chen, M., Cerny, R., Fromm, M. 2004. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 38:172-81
- Roldán, I., Lucas, M., Delvalle, D., Planchot, V., Jimenez, S., Perez, R., Ball, S., Hulst, C., Mérida, A. 2007a. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 49:492-504
- Roldán, I., Lucas, M.M., Delvalle, D., Planchot, V., Jimenez, S., Perez, R., Ball, S., Hulst, C., Mérida, A. 2007b. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J.* 49:492-504
- Rolland, F., Moore, B., Sheen, J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant cell Supplement*:185-205
- Romero-Puertas, M.C., Palma, J.M., Gómez, M., Del Río, L.A., Sandalio, L.M. 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell & Environment* 25:677-86
- Rose, A., Manikantan, S., Schraegle, S., Maloy, M., Stahlberg, E., Meier, I. 2004. Genome-wide identification of *Arabidopsis* coiled-coil proteins and establishment of the ARABI-COIL database. *Plant physiology* 134:927-39
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., Weisshaar, B. 2003. *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* 53:247-59
- Rothschild, A., Tandecarz, J. 1994. UDP-glucose:protein transglucosylase in developing maize endosperm. *Plant science (Shannon, Ireland)* 97:119-27
- Ruuska, S., Girke, T., Benning, C., Ohlrogge, J. 2002. Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. *The Plant cell* 14:1191-206
- Rydberg, U., Andersson, L., Andersson, R., Åman, P., Larsson, H. 2001. Comparison of starch branching enzyme I and II from potato. *European Journal of Biochemistry* 268:6140-45

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual. . *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Santelia, D., Kötting, O., Seung, D., Schubert, M., Thalmann, M., Bischof, S., Meekins, D.A., Lutz, A., Patron, N., Gentry, M.S., Allain, F.H., Zeeman, S.C. 2011. The phosphoglucan phosphatase like sex Four2 dephosphorylates starch at the C3-position in Arabidopsis. *Plant Cell* 23:4096-111
- Santelia, D., Zeeman, S.C. 2011. Progress in Arabidopsis starch research and potential biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology* 22:271-80
- Satoh, H., Shibahara, K., Tokunaga, T., Nishi, A., Tasaki, M., Hwang, S., Okita, T., Kaneko, N., Fujita, N., Yoshida, M., Hosaka, Y., Sato, A., Utsumi, Y., Ohdan, T., Nakamura, Y. 2008. Mutation of the plastidial {alpha}-Glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *The Plant cell* 20:1833-49
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I., Coupland, G. 1998. The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 23:1219-29
- Schneegurt, M.A., Sherman, D.M., Nayar, S., Sherman, L.A. 1994. Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J Bacteriol* 176:1586-97
- Schneegurt, M.A., Sherman, D.M., Sherman, L.A. 1997. Composition of the carbohydrate granules of the cyanobacterium, *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *Archives of Microbiology* 167:89-98
- Schneider, A., Häusler, R., Kolukisaoglu, Ü., Kunze, R., Graaff, E., Schwacke, R., Catoni, E., Desimone, M., Flügge, U. 2002. Arabidopsis thaliana knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished. *Plant Journal* 32:685-99
- Schreiber, U. 2004. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, ed. Papageorgiou, G.C., Govindjee, pp. 279-319
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10:51-62
- Schulze, W., Schulze, E., Stadler, J., Heilmeyer, H., Stitt, M., Mooney, H. 1994. Growth and reproduction of Arabidopsis thaliana in relation to storage of starch and nitrate in the wild-type and in starch-deficient and nitrate-uptake-deficient mutants. *Plant Cell and Environment* 17:795-809
- Sehnke, P., Chung, H., Wu, K., Ferl, R. 2001. Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98:765-70
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., Goff, S.A. 2002. A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* 14:2985-94
- Shannon, J., Garwood, D., Whistler, R., Bemiller, J., Paschall, E. 1984. *Genetics and physiology of starch development*. 25-86 pp.
- Sharkey, T.D., Bernacchi, C.J., Farquhar, G.D., Singaas, E.L. 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C(3) leaves. *Plant Cell Environ* 30:1035-40

- Shure, M., Wessler, S., Fedoroff, N. 1983. Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell* 35:225-33
- Shvaleyeva, A., Coba de la Peña, T., Rincón, A., Morcillo, C., Lucas, M., Pueyo, J. 2009. Flavodoxin overexpression reduces cadmium-induced damage in alfalfa root nodules. *Plant and Soil*
- Singh, D., Lomako, J., Lomako, W., Whelan, W., Meyer, H., Serwe, M., Metzger, J. 1995. beta-Glucosylarginine: a new glucose-protein bond in a self-glucosylating protein from sweet corn. *FEBS Lett* 376:61-64
- Sivak, M., Preiss, J., Taylor, S. 1998. Starch: basic science and biotechnology. *Advances in Food and Nutrition Research* 41:199
- Smith, A. 2008. Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54:546-58
- Smith, A., Stitt, M. 2007a. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell and Environment* 30:1126-49
- Smith, A., Zeeman, S. 2006. Quantification of starch in plant tissues. *Nat Protoc* 1:1342-45
- Smith, A.M. 2001. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules* 2:335-41
- Smith, A.M., Stitt, M. 2007b. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* 30:1126-49
- Smith, S., Fulton, D., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S., Smith, A. 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in Arabidopsis leaves. *Plant physiology* 136:2687-99
- Sonnewald, U., Basner, A., Greve, B., Steup, M. 1995. A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Mol Biol* 27:567-76
- Stitt, M., Quick, W. 1989. Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. *Physiol Plant* 77:633-41
- Streb, S., Delatte, T., Umhang, M., Eicke, S., Schorderet, M., Reinhardt, D., Zeeman, S. 2008. Starch granule biosynthesis in Arabidopsis is abolished by removal of all debranching enzymes but restored by the subsequent removal of an endoamylase. *The Plant cell* 20:3448-66
- Streb, S., Egli, B., Eicke, S., Zeeman, S.C. 2009. The debate on the pathway of starch synthesis: a closer look at low-starch mutants lacking plastidial phosphoglucomutase supports the chloroplast-localized pathway. *Plant Physiol* 151:1769-72
- Sun, J., Okita, T., Edwards, G. 1999. Modification of carbon partitioning, photosynthetic capacity, and O₂ sensitivity in arabidopsis plants with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant physiology* 119:267-76
- Szydlowski, N., Ragel, P., Hennen-Bierwagen, T.A., Planchot, V., Myers, A.M., Merida, A., d'Hulst, C., Wattedled, F. 2011a. Integrated functions among multiple starch synthases determine both amylopectin chain length and branch linkage location in Arabidopsis leaf starch. *J Exp Bot* 62:4547-59
- Szydlowski, N., Ragel, P., Hennen-Bierwagen, T.A., Planchot, V., Myers, A.M., Mérida, Á., d'Hulst, C., Wattedled, F. 2011b. Integrated functions among multiple starch synthases determine both amylopectin chain length and branch linkage location in Arabidopsis leaf starch. *J Exp Bot* 62:4547-59

- Szydlowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M.M., Roldan, I., Montero, M., Munoz, F.J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., Pozueta-Romero, J., D'Hulst, C., Merida, A. 2009. Starch granule initiation in *Arabidopsis* requires the presence of either class IV or class III starch synthases. *Plant Cell* 21:2443-57
- Takeda, Y., Guan, H., Preiss, J. 1993. Branching of amylose by branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr Res* 240:253-63
- Tatge, H., Marshall, J., Martin, C., Edwards, E., Smith, A. 1999. Evidence that amylose synthesis occurs within the matrix of the starch granule in potato tubers. *Plant Cell and Environment* 22:543-50
- Tauberger, E., Fernie, A.R., Emmermann, M., Renz, A., Kossmann, J., Willmitzer, L., Trethewey, R.N. 2000. Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate. *Plant J* 23:43-53
- Tcherkez, G., Bligny, R., Gout, E., Mahe, A., Hodges, M., Cornic, G. 2008. Respiratory metabolism of illuminated leaves depends on CO₂ and O₂ conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:797-802
- Tenorio, G., Orea, A., Romero, J., Mérida, A. 2003a. Oscillation of mRNA level and activity of granule-bound starch synthase I in *Arabidopsis* leaves during the day/night cycle. *Plant Mol Biol* 51:949-58
- Tenorio, G., Orea, A., Romero, J.M., Mérida, A. 2003b. Oscillation of mRNA level and activity of granule-bound starch synthase I in *Arabidopsis* leaves during the day/night cycle. *Plant Mol. Biol.* 51:949-58
- Tetlow, I., Beisel, K., Cameron, S., Makhmoudova, A., Liu, F., Bresolin, N., Wait, R., Morell, M., Emes, M. 2008. Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant physiology* 146:1878-91
- Tetlow, I., Wait, R., Lu, Z., Akkasaeng, R., Bowsher, C., Esposito, S., Kosar-Hashemi, B., Morell, M., Emes, M. 2004. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *The Plant cell* 16:694-708
- Tetlow, I.J. 2006. Understanding storage starch biosynthesis in plants: a means to quality improvement. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 84:1167-85
- Tomlinson, K., Craig, J., Smith, A. 1998. Major differences in isoform composition of starch synthase between leaves and embryos of pea (*pisum sativum* L.). *Planta* 204:86-92
- Tomlinson, K., Lloyd, J., Smith, A. 1997. Importance of isoforms of starch-branching enzyme in determining the structure of starch in pea leaves. *Plant Journal* 11:31-43
- Tsai, C.Y. 1974. The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochem Genet* 11:83-96
- Tsai, H., Lue, W., Lu, K., Hsieh, M., Wang, S., Chen, J. 2009. Starch synthesis in *Arabidopsis* is achieved by spatial cotranscription of core starch metabolism genes. *Plant physiology* 151:1582-95
- Tzvetkova-Chevolleau, T., Franck, F., Alawady, A.E., Dall'Osto, L., Carriere, F., Bassi, R., Grimm, B., Nussaume, L., Havaux, M. 2007. The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 50:795-809

- Ugalde, J., Parodi, A., Ugalde, R. 2003. De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100:10659-63
- Valdez, H., Busi, M., Wayllace, N., Parisi, G., Ugalde, R., Gomez-Casati, D. 2008a. Role of the N-terminal starch-binding domains in the kinetic properties of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 47:3026-32
- Valdez, H.A., Busi, M.V., Wayllace, N.Z., Parisi, G., Ugalde, R.A., Gomez-Casati, D.F. 2008b. Role of the N-terminal starch-binding domains in the kinetic properties of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 47:3026-32
- van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J., Buleon, A., Visser, R., Ball, S. 1998. Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin. *Journal of Biological Chemistry* 273:22232-40
- Ventriglia, T., Kuhn, M.L., Ruiz, M.T., Ribeiro-Pedro, M., Valverde, F., Ballicora, M.A., Preiss, J., Romero, J.M. 2008. Two *Arabidopsis* ADP-glucose pyrophosphorylase large subunits (APL1 and APL2) are catalytic. *Plant physiology* 148:65-76
- Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A.A., Moll, J.R., Bonovich, M. 2002. Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol* 22:6321-35
- Viola, R., Nyvall, P., Foster, J., Sommerville, L. 1999. An HPLC method for the assay of starch synthase. *Phytochemistry* 50:947-51
- Viola, R., Nyvall, P., Pedersén, M. 2001. The unique features of starch metabolism in red algae. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 268:1417-22
- Visser, R.G., Somhorst, I., Kuipers, G.J., Ruys, N.J., Feenstra, W.J., Jacobsen, E. 1991. Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol Gen Genet* 225:289-96
- Vitha, S., Zhao, L., Sack, F.D. 2000. Interaction of root gravitropism and phototropism in *Arabidopsis* wild-type and starchless mutants. *Plant Physiol* 122:453-62
- Wang, S., Yeh, K., Tsai, C. 1999. Molecular characterization and expression of starch granule-bound starch synthase in the sink and source tissues of sweet potato. *Physiologia Plantarum*
- Wang, T., Bogracheva, T., Hedley, C. 1998. Starch: As simple as A, B, C? (Review article). *J Exp Bot* 49:481-502
- Wang, Z., Tobin, E. 1998. Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93:1207-17
- Wattebled, F., Dong, Y., Dumez, S., Delvallé, D., Planchot, V., Berbezy, P., Vyas, D., Colonna, P., Chatterjee, M., Ball, S., D'Hulst, C. 2005. Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phyto-glycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant physiology* 138:184-95
- Wayllace, N., Valdez, H., Ugalde, R., Busi, M., Gomez-Casati, D. 2010a. The starch-binding capacity of the noncatalytic SBD2 region and the interaction between the N- and C-terminal domains are involved in the modulation of the activity of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* 277:428-40
- Wayllace, N.Z., Valdez, H.A., Ugalde, R.A., Busi, M.V., Gomez-Casati, D.F. 2010b. The starch-binding capacity of the noncatalytic SBD2 region and the interaction between the N-

- and C-terminal domains are involved in the modulation of the activity of starch synthase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* 277:428-40
- Weiner, H., Stitt, M., Heldt, H.W. 1987. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 893:13-21
- Weise, S., Schrader, S., Kleinbeck, K., Sharkey, T. 2006. Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phosphorolytic breakdown of transitory starch. *Plant physiology* 141:879-86
- Weise, S.E., Kiss, J.Z. 1999. Gravitropism of inflorescence stems in starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Int J Plant Sci* 160:521-7
- Wirtz, W., Stitt, M., Heldt, H.W. 1980. Enzymic determination of metabolites in the subcellular compartments of spinach protoplasts. *Plant Physiol* 66:187-93
- Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima, J.P., Okura, V.K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G.E., Almeida, N.F., Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Karp, P.D., Bovee, D., Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M.J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z.Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S.V., Tomb, J.F., Gordon, M.P., Olson, M.V., Nester, E.W. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294:2317-23
- Yu, T., Lue, W., Wang, S., Chen, J. 2000. Mutation of *arabidopsis* plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant physiology* 123:319-25
- Yu, T., Zeeman, S., Thorneycroft, D., Fulton, D., Dunstan, H., Lue, W., Hegemann, B., Tung, S., Umemoto, T., Chapple, A., Tsai, D., Wang, S., Smith, A., Chen, J., Smith, S. 2005. α -Amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. *The Journal of biological chemistry* 280:9773-79
- Yu, T.S., Kofler, H., Hausler, R.E., Hille, D., Flugge, U.I., Zeeman, S.C., Smith, A.M., Kossmann, J., Lloyd, J., Ritte, G., Steup, M., Lue, W.L., Chen, J., Weber, A. 2001. The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* 13:1907-18
- Zeeman, S., ap Rees, T. 1999. Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* 22:1445-53
- Zeeman, S., Delatte, T., Messerli, G., Umhang, M., Stettler, M., Mettler, T., Streb, S., Reinhold, H., Kötting, O. 2007a. Starch breakdown: recent discoveries suggest pathways and novel mechanisms. *Functional Plant Biology* 34:465-73
- Zeeman, S., Smith, S., Smith, A. 2002a. The priming of amylose synthesis in *Arabidopsis* leaves. *Plant physiology* 128:1069-76
- Zeeman, S., Smith, S., Smith, A. 2004a. The breakdown of starch in leaves. *New Phytologist* 163:247-61
- Zeeman, S., Smith, S., Smith, A. 2007b. The diurnal metabolism of leaf starch. *The Biochemical journal* 401:13-28
- Zeeman, S., Thorneycroft, D., Schupp, N., Chapple, A., Weck, M., Dunstan, H., Haldimann, P., Bechtold, N., Smith, A., Smith, S. 2004b. Plastidial α -glucan phosphorylase is not required

- for starch degradation in *Arabidopsis* leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plant physiology* 135:849-58
- Zeeman, S., Tiessen, A., Pilling, E., Kato, K., Donald, A., Smith, A. 2002b. Starch synthesis in *Arabidopsis*. Granule synthesis, composition, and structure. *Plant physiology* 129:516-29
- Zeeman, S., Umemoto, T., Lue, W., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, A., Chen, J. 1998. A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyglycogen. *The Plant cell* 10:1699-711
- Zeeman, S.C., Kossmann, J., Smith, A.M. 2010. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61:209-34
- Zhang, L., Hausler, R.E., Greiten, C., Hajirezaei, M.R., Haferkamp, I., Neuhaus, H.E., Flugge, U.I., Ludwig, F. 2008a. Overriding the co-limiting import of carbon and energy into tuber amyloplasts increases the starch content and yield of transgenic potato plants. *Plant Biotechnol J* 6:453-64
- Zhang, X., Colleoni, C., Ratushna, V., Sirghie-colleoni, M., James, M., Myers, A. 2004. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Mol Biol* 54:865-79
- Zhang, X., Myers, A.M., James, M.G. 2005a. Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant physiology* 138:663-74
- Zhang, X., Myers, A.M., James, M.G. 2005b. Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiol.* 138:663-74
- Zhang, X., Szydlowski, N., Delvalle, D., Hulst, C., James, M., Myers, A. 2008b. Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 8:96
- Ziegler, G., Creek, J., Runt, J. 2005. Spherulitic crystallization in starch as a model for starch granule initiation. *Biomacromolecules* 6:1547-54