



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UN/M
POSGRADO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**FACTORES INVOLUCRADOS EN LA
DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN EN HOJAS DE
PLANTAS DE FRIJOL SOMETIDAS A ESTRÉS
POR DEFICIENCIA DE FOSFATO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A:
LILIA ANGÉLICA BERNAL GRACIDA

Tutor: DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS



México, D. F.

Octubre 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección del **Dr. J. Eleazar Martínez Barajas** en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El **Comité Tutorial** que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Dr. Heliodoro Celis Sandoval	Instituto de Fisiología, UNAM

Agradezco al Dr. James Lloyd de Riso National Laboratory los anticuerpos contra la proteína GWD que se utilizaron en este estudio.

Agradezco a la Dra. Ma. del Carmen Nuñez Santiago del Departamento de Alimentos y Biotecnología, UNAM, la asesoría y el apoyo brindados en la medición de los gránulos de almidón por difracción de rayo láser.

Este proyecto fue apoyado parcialmente por PAIP-UNAM 6290-14 y por DGAPA-UNAM IN207907.

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACyT para la realización de la presente tesis.

El **Jurado de Examen Doctoral** estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Rosario A. Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Mario Rocha Sosa	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dra. Gloria Saab Rincón	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Irma Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM

A todos los que me apoyaron en esta etapa de mi vida personal y profesional:

!!! GRACIAS !!!

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE LAS FIGURAS	v
ÍNDICE DE LAS TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	2
Capítulo II. ANTECEDENTES	4
II.1 La deficiencia de fosfato	4
II.2 El almidón	6
II.3 La síntesis de almidón en hojas	6
II.3.1 La síntesis de la amilosa	7
II.3.2 La síntesis de la amilopectina	9
II.4 Los gránulos del almidón	12
II.4.1 Otros componentes del gránulo	15
II.5 La degradación del almidón	15
II.6 La interacción gránulo de almidón-enzima	19
II.7 La acumulación del almidón	21
Capítulo III. HIPÓTESIS	23
Capítulo IV. OBJETIVOS	24
IV.1 Objetivo general	24
IV.2 Objetivos particulares	24

Capítulo V. MATERIAL Y MÉTODOS	25
V.1 Material biológico	25
V.2 Determinación de fosfato	25
V.3 Cuantificación de amilosa	26
V.4 Determinación de almidón	26
V.5 Determinación de glucosa	27
V.6 Medición de la actividad de α -amilasa	27
V.7 Medición de la actividad de β -amilasa	27
V.8 Medición de la actividad de almidón fosforilasa	28
V.9 Determinación de azúcares reductores	28
V.10 Determinación de proteína	29
V.11 Purificación de la β -amilasa	29
V.12 Efecto de las condiciones redox sobre la actividad de la β -amilasa	29
V.13 Asimilación de carbono y distribución de fotosintatos	30
V.14 Síntesis y degradación del almidón	30
V.15 Purificación de los gránulos de almidón	30
V.16 Cinética de autodegradación de los gránulos de almidón	31
V.17 Cinética de degradación de los gránulos de almidón con β -amilasa	31
V.18 Lavado de los gránulos de almidón con dodecil sulfato de sodio (SDS)	31
V.19 Análisis de las proteínas de los gránulos de almidón	32
A. Proteínas débilmente unidas (superficiales)	32
B. Proteínas fuertemente unidas (internas)	32
V.20 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	32
V.21 Tinción con plata	33
V.22 Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida	34
V.23 Western blot	34
V.24 Medición de la actividad de la Rubisco	35
V.25 Activación e inactivación de la Rubisco	35
V.26 Ensayo de asociación de proteínas	35
V.27 Purificación de cloroplastos	36

V.28 Medición de glutatión oxidado (GSSG)	37
V.29 Detección <i>in situ</i> de H ₂ O ₂ con diaminobencidina	37
Capítulo VI. RESULTADOS	38
VI.1 Causas de la acumulación de almidón en hojas maduras de frijol durante la deficiencia de fosfato	38
VI.2 Patrón de la acumulación del almidón inducida por la deficiencia de fosfato	40
VI.3 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre algunas características de los gránulos de almidón	41
VI.3.1 Tamaño de los gránulos	42
VI.3.2 Contenido de fosfato y amilosa	42
VI.4 La deficiencia de fosfato modifica la asociación de proteínas con el gránulo de almidón	43
VI.4.1 Proteínas asociadas a los gránulos de almidón	43
VI.4.2 Asociación de las proteínas 14-3-3	45
VI.4.3 Asociación de la glucan agua dicinasa a los gránulos de almidón	46
VI.5 Efecto del estrés por deficiencia de fosfato sobre la actividad de las enzimas que degradan almidón	47
VI.5.1 Purificación de la β-amilasa	48
VI.5.2 Análisis cinético de las β-amilasas purificadas	50
VI.5.3 Estudio de la regulación por óxido-reducción de la β-amilasa	50
VI.6 Las proteínas asociadas a los gránulos de almidón modifican la susceptibilidad de los gránulos al ataque enzimático	51
VI.7 Efecto del estado redox sobre la degradación del almidón	53
Capítulo VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	59
Capítulo VIII. CONCLUSIONES	67
Capítulo IX. PERSPECTIVAS	68

ANEXO 1

Artículo publicado: *J Plant Physiol* (2005) 162:979-976.

ANEXO 2

Artículo publicado: *Rev Centro Inv ULSA* (2006) 7:77-90.

ÍNDICE DE LAS FIGURAS

	Página
Figura II.1. Síntesis de almidón en cloroplastos.	8
Figura II.2. Esquema del empaquetamiento de las cadenas laterales de amilopectina en las lamelas.	13
Figura II.3. Estructura del gránulo de almidón.	13
Figura II.4. Tipos de estructuras cristalinas del almidón.	14
Figura II.5. Vía propuesta para la degradación del almidón de hojas en <i>Arabidopsis</i> .	19
Figura II.6. Acumulación de azúcares en hojas maduras de plantas de frijol cultivadas por tres semanas.	21
Figura VI.1. Distribución de marca (^{14}C) en carbohidratos de hojas maduras de frijol.	38
Figura VI.2. Contenido de ^{14}C en almidón después de un período de luz (síntesis) y después de un período de oscuridad (degradación).	39
Figura VI.3. Curso temporal de la degradación de almidón.	39
Figura VI.4. Contenido de fosfato en las hojas de plantas de frijol colectadas a diferentes horas del día.	40
Figura VI.5. Acumulación de almidón en hojas maduras de plantas de frijol de tres semanas de edad.	41
Figura VI.6. Tamaño de los gránulos de almidón de las hojas de frijol de tres semanas.	42
Figura VI.7. Proteínas asociadas a gránulos de almidón.	43
Figura VI.8. Identidad de algunas proteínas asociadas a gránulos de almidón.	44
Figura VI.9. Proteínas asociadas a los gránulos de almidón de hojas de plantas de frijol cultivados con y sin Pi.	44
Figura VI.10. Proteínas que se unen a gránulos de almidón lavado después de estar en contacto con proteínas de extractos totales.	45
Figura VI.11. A. Inmunodetección de proteínas 14-3-3 s de frijol. B. Ausencia de inmunodetección de proteínas 14-3-3 en la fracción de proteínas asociadas a gránulos de almidón	46
Figura VI.12. Detección de la proteína GWD.	47
Figura VI.13. Actividad amilolítica después de la precipitación diferencial con PEG.	49

Figura VI.14. β -amilasas purificadas a partir de hojas de frijol.	49
Figura VI.15. Secuencia de la β -amilasa de soya.	49
Figura VI.16. A. Actividad de la enzima β -amilasa en diferentes condiciones de óxido-reducción. B. Gel de actividad amilolítica.	51
Figura VI.17. Efecto de las proteínas asociadas sobre la degradación de los gránulos de almidón.	52
Figura VI.18. Efecto de la asociación de albúmina (BSA) y concanavalina A (ConA) a los gránulos de almidón sobre la actividad de β -amilasa.	53
Figura VI.19. Unión de β -amilasa a los gránulos de almidón de hoja en condiciones oxidantes y reductoras.	54
Figura VI.20. Efecto del estado redox sobre la degradación de los gránulos de almidón de plantas que crecieron en suficiencia y deficiencia de Pi.	55
Figura VI.21. Efecto protector del almidón sobre la actividad de la β -amilasa.	56
Figura VI.22. Cambios en la actividad de la β -amilasa con H_2O_2 en presencia y ausencia de almidón.	57
Figura VI.23. Efecto protector del almidón sobre la actividad de la β -amilasa (A) y la Rubisco (B).	57
Figura VI.24. Detección de H_2O_2 en hojas de frijol.	58
Figura VI.25. Actividad de β -amilasa en extractos de hojas de plantas de frijol.	58
Figura VII.1. Alineamiento de las secuencias de las proteínas BAM de <i>Arabidopsis</i> y la proteína Gm BMY1 de soya.	62

ÍNDICE DE LAS TABLAS

	Página
Tabla II.1. Enzimas que se sabe participan ó podrían participar en la degradación del almidón transitorio en <i>Arabidopsis</i> .	16
Tabla IV.1. Composición de la solución para obtener el gradiente de Percoll	36
Tabla VI.1. Contenido de fósforo en hojas de plantas de frijol.	41
Tabla VI.2. Características de los gránulos de almidón de hoja de frijol.	43
Tabla VI.3. Actividad de la β -amilasa en hojas de plantas de frijol de tres semanas de edad.	48
Tabla VI.4. Parámetros cinéticos de la β -amilasa purificada de hojas de frijol.	50

ABREVIATURAS

ADP-glc	ADP-glucosa
AGPasa	ADP glucosa pirofosforilasa
AMY	α -amilasa
BAM	β -amilasa
BE	Enzima ramificadora
BSA	Albúmina de suero bovino
DBE	Enzima desramificadora
DP	Grado de polimerización
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
GBSS	Almidón sintasa unida al gránulo
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
GWD	Glucan, agua dicinasa
ISA	Isoamilasa
LDA	Dextrinasa límite
P	Fósforo
Pi	Fosfato
PEG	Polietilén glicol

PF	Peso fresco
PPi	Pirofosfato
PWD	Fosfoglucon, agua dicinasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
SS	Almidón sintasa
U	Unidad internacional de actividad enzimática

RESUMEN

El fósforo es un macronutriente esencial para el crecimiento y metabolismo de las plantas. Su deficiencia provoca múltiples cambios, algunos de ellos constituyen la base de adaptaciones metabólicas que incrementan la toma de fosfato y/o la eficiencia de su uso. Estas modificaciones, aunque valiosas, con frecuencia son insuficientes y la deficiencia de fosfato reduce la productividad en muchas de las tierras dedicadas a la agricultura. En este trabajo se evaluó el efecto de la deficiencia de fosfato sobre el metabolismo del almidón en hojas de plantas de frijol. Los resultados indicaron que el proceso de degradación se volvió menos eficiente, lo que genera su acumulación. La deficiencia de fosfato produce efectos muy amplios y en el caso particular de la degradación del almidón las investigaciones realizadas permitieron ubicar cambios a diferentes niveles: en las características del almidón, en la asociación de proteínas a la superficie de los gránulos y en la regulación de la actividad de β -amilasa.

El almidón de las hojas de las plantas que crecieron en ausencia de fosfato está menos fosforilado y los niveles de amilosa se incrementaron. Esto sugiere que el proceso de síntesis también fue afectado. Además, la deficiencia de fosfato disminuyó la cantidad de proteínas asociadas a la superficie de los gránulos, proteínas que modifican las propiedades del almidón o favorecen su degradación (por ejemplo, se redujo la unión de la proteína glucan agua dicinasa, la cual es responsable de la fosforilación del almidón).

La β -amilasa contribuye de manera importante a la degradación del almidón en frijol. La falta de fosfato incrementó su actividad; sin embargo, los cambios que esa condición indujo sobre las propiedades del almidón hicieron que la enzima fuera menos eficiente.

En este trabajo también se encontró que la interacción entre la β -amilasa y los gránulos de almidón es muy importante, pues gracias a ella la enzima se protege de la inactivación por oxidación, y es posible que ésta sea la causa que la mantiene activa durante la noche. Los datos obtenidos sugieren que la deficiencia de fosfato hizo que el ambiente celular se tornara más oxidante. Sin embargo, esa condición también favorece la unión de la β -amilasa al gránulo. Desde un punto de vista fisiológico este hecho es relevante pues es probable que gracias a ello, a pesar de los cambios que induce la deficiencia de fosfato, las plantas mantengan la capacidad para degradar el almidón.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

A pesar de que el frijol es esencial en la dieta de muchos mexicanos, su producción es insuficiente pues está rodeada de una problemática difícil de resolver: normalmente se le cultiva en tierras poco productivas. Es común que los insumos aplicados (fertilizantes, insecticidas, fungicidas, etc.) no sean suficientes y los canales de comercialización tampoco son adecuados. Ante la imposibilidad de incrementar la superficie destinada a su cultivo, o que se cultive en tierras de mayor calidad, se hace necesario intentar resolver los problemas tecnológicos que limitan su producción. Se ha estimado que el promedio del rendimiento de los cultivos de frijol en países en desarrollo es menor al 20% de su potencial (Yan *et al.*, 1995), lo cual muestra que hay amplias posibilidades para lograr mejoras sustanciales. La deficiencia de fósforo (P) tiene su origen en la gran facilidad con que este elemento se combina con otros y forma complejos que las plantas no pueden aprovechar. Así, la cantidad de P total en el suelo puede llegar a ser muy alta; sin embargo, el fosfato inorgánico (Pi, que es la forma asimilable por las plantas) rara vez excede 10 μM . La baja proporción de P asimilable en el suelo es uno de los grandes problemas que en México y en el mundo limitan la productividad de los cultivos. Para sobrevivir en esos ambientes, las plantas han perfeccionado estrategias que les permiten tanto aumentar la disponibilidad de Pi, como incrementar la eficiencia con que se usa el poco Pi disponible (Bieliski, 1973). En el caso particular del frijol, el estudio de las manifestaciones fisiológicas de la falta de Pi puede contribuir a generar criterios útiles para la selección de genotipos más tolerantes.

Dentro de las plantas el fósforo participa en numerosos procesos bioquímicos, por lo que su ausencia tiene múltiples efectos. Una de las manifestaciones más evidentes es la acumulación de almidón en las hojas (Cierezko y Barbachowska; 2000; Dietz y Helios, 1990; Rao *et al.*, 1993). Normalmente, el almidón se sintetiza y almacena en los cloroplastos durante el día, y se degrada por la noche para proveer de fotosintatos a los tejidos de demanda (Zeeman *et al.*, 2002a). Este suministro de carbono en el período de oscuridad es esencial para el crecimiento de las plantas (Smith, 2005). La deficiencia de Pi al provocar la acumulación de almidón en las hojas, podría de manera indirecta limitar el crecimiento de las plantas.

El almidón es un polímero de glucosa que constituye el principal producto de almacenamiento en semillas y otros órganos (Tetlow *et al.*, 2004b). Representa el 80% de la ingesta calórica mundial, se utiliza como alimento animal y es una importante materia prima para la industria (Guan y Keeling 1998). La importancia económica y social que adquirieron durante el siglo pasado las bebidas alcohólicas producidas a partir de cereales, favoreció la investigación científica dirigida a conocer la naturaleza y regulación del proceso de degradación de almidón en el endospermo, el cual actualmente se entiende con profundidad tanto a nivel bioquímico como molecular (Smith *et al.*, 2003). Sin embargo, la degradación del almidón en endospermo de cereales es muy diferente a la forma en que este proceso ocurre en otras especies e incluso en otros órganos vegetales de los mismos cereales.

Todas las células vegetales sintetizan y degradan almidón en algún punto de su desarrollo. No obstante, existen notables diferencias: en órganos de almacenamiento como tubérculos, raíces y embriones puede acumularse por períodos muy largos, en meristemos y órganos en desarrollo la acumulación puede prolongarse por días o semanas, mientras que en las hojas se acumula durante el día y se degrada en la noche. La cantidad de almidón presente en un órgano representa un balance entre los procesos de su síntesis y degradación. Si bien existen dudas acerca de algunos puntos críticos del proceso de síntesis, comparativamente se conoce menos acerca del proceso de degradación.

En lo que a la acumulación de almidón que se observa en plantas cultivadas en deficiencia de Pi se refiere, se ha sugerido que podría ser una adaptación a la deficiencia de Pi, pues en su síntesis se libera Pi que puede ser usado en otros procesos. También, se ha propuesto que la deficiencia de Pi, al incrementar la relación triosa-P/Pi, activa a la ADP glucosa pirofosforilasa (Preiss y Romeo, 1994) y, de manera indirecta, se favorece la síntesis de almidón (Cierezko y Barbachowska, 2000; Kondracka y Rychter, 1997). Sin embargo, también existe la posibilidad de que la acumulación de almidón sea el resultado de la disminución en su degradación (Usuda y Shimogawara, 1991).

En este contexto, este trabajo se encaminó a la búsqueda de evidencias que permitieran entender las bases bioquímicas de la acumulación de almidón en las hojas de frijol que crecen en deficiencia de Pi.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

II.1 La deficiencia de fósforo

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) representa el 50% de las leguminosas que se consumen a nivel mundial (Broughton *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2003). En algunos países de Centro y Sudamérica el frijol es un cultivo básico pues constituye la principal fuente de proteínas presentes en la dieta (Hernández, 2007). Sin embargo, la producción de frijol se ve limitada por diferentes factores entre los que destacan los bajos niveles de nitrógeno y fósforo en el suelo (Graham *et al.*, 2003). Después del nitrógeno, el P es el segundo macronutriente que limita el crecimiento de las plantas (Schachtman *et al.*, 1998); para que el crecimiento vegetativo sea óptimo debe alcanzarse un nivel de P entre 0.05% y 0.5% de la materia seca de la planta (Marschner, 1995; Schachtman *et al.*, 1998). Este elemento participa en numerosos procesos (respiración, síntesis y estabilidad de la membrana celular, activación/inactivación de enzimas, reacciones redox, señalización, metabolismo de carbohidratos, fijación de nitrógeno, etc.), lo cual puede explicar el que sea tan necesario; sin embargo, a niveles mayores al 1% de la materia seca, el P se vuelve tóxico.

Aunque es un macronutriente, la disponibilidad de P en los suelos es frecuentemente limitada, a grado tal que algunos micronutrientes llegan a ser más abundantes (Bielecki, 1973).

La falta de P tiene muchos efectos, pero una de las respuestas más notorias de las plantas que sufren deficiencia en P es la reducción en el crecimiento de la parte aérea (tallos, hojas, yemas axilares, etc.), así como la disminución en el número (Lynch *et al.*, 1991) y tamaño de las hojas (Marschner, 1995). La disminución en el número de hojas implica cambios en la actividad del meristemo apical; mientras que la reducción en su tamaño puede estar relacionada con cambios en la división y/o en la expansión celular (Chiera *et al.*, 2002). La producción de clorofila no se ve afectada, por lo que al disminuir el tamaño de las hojas, éstas adquieren un color verde más oscuro (Chiera *et al.*, 2002).

La deficiencia de P tiene menor efecto sobre el crecimiento de la raíz; sin embargo, induce cambios en su morfología y estructura: se incrementa el número de raíces

adventicias, disminuye la ramificación de raíces laterales y aumenta la densidad y el tamaño de los pelos radicales. En conjunto estas modificaciones son importantes para maximizar la exploración de las capas superiores del suelo (Fragoso 2004; Lynch, 1995; Lynch y Brown 2001; Schachtman *et al.*, 1998). La modificación más relevante, en *Arabidopsis* y en otras especies vegetales es la multiplicación de pelos radicales (Schachtman *et al.*, 1998; Schmidt, 2001). Estas extensiones de las células epidérmicas incrementan el contacto de la raíz con el suelo y aumentan el volumen de suelo explorado. Se ha estimado que hasta el 63% del P que las plantas toman del suelo entra por los pelos radicales (Grotz y Guerinot, 2002). El crecimiento de los pelos radicales es muy rápido, por lo que, su aparición constituye una respuesta casi inmediata de las raíces a condiciones ambientales cambiantes (Bates y Lynch 2000a). Sin embargo, la variabilidad genética es responsable de las diferencias en la capacidad de diferentes variedades para producir pelos radicales en respuesta a la deficiencia de P.

En otras especies como *Lupinus albus*, la deficiencia de P induce la formación de raíces proteoides, las cuales son raíces laterales primarias con grupos de raíces secundarias y terciarias (Watt y Evans, 1999) especializadas en la exudación de ácidos orgánicos que pueden solubilizar el P de los iones metálicos que lo inmovilizan (Neumann *et al.*, 1999). Las células corticales de raíces de plantas de *Phaseolus vulgaris* que sufren deficiencia de Pi muestran la aparición de grandes vacuolas, invaginaciones del plasmalema y mitocondrias amorfas (Wanke *et al.*, 1998). Por otro lado, los efectos de la deficiencia de P son dependientes de la etapa de desarrollo de las plantas. En etapas avanzadas la formación de órganos reproductivos se retarda, el número de flores disminuye y la senescencia prematura de las hojas restringe la formación de semillas (Marschner, 1995). Sin embargo, independientemente de la etapa de desarrollo, la falta de P hace que las plantas crezcan más lentamente y acumulen menos biomasa (Bates y Lynch, 2000b).

Los cambios estructurales y morfológicos anteriormente mencionados también involucran modificaciones importantes en el metabolismo del carbono. En este sentido destacan reacciones metabólicas alternas que reducen la demanda de Pi, tanto en la glucólisis como en la respiración al usar el pirofosfato (PPi) en lugar del ATP lo que permite hacer un uso más eficiente del P disponible (Rychter y Mikulska, 1990; Theodorou y Plaxton, 1993).

En soya la deficiencia en Pi reduce la cantidad y la actividad de la Rubisco, lo que se refleja en una menor tasa fotosintética, al mismo tiempo que las hojas acumulan almidón y

sacarosa (Lauer *et al.*, 1989). En frijol no se han observado cambios en la actividad fotosintética (Ciereszko y Barbachowska, 2000). Sin embargo, en ambos casos se han observado incrementos en los niveles de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón) y cambios importantes en las actividades de enzimas como sacarosa fosfato sintasa, sacarosa sintasa, invertasas, ADP glucosa pirofosforilasa (Ciereszko y Barbachowska, 2000) y UDP glucosa pirofosforilasa (Ciereszko *et al.*, 2001). Se ha sugerido que estos cambios forman parte de una estrategia general para adaptar el metabolismo a las necesidades que plantea la deficiencia en Pi.

II.2 El almidón

El almidón es un polisacárido que las plantas superiores usan para almacenar energía y que en la dieta de los humanos constituye la principal fuente de carbohidratos (Blennow *et al.*, 2002). Es una macromolécula altamente organizada que forma gránulos insolubles en agua. En las hojas verdes los gránulos se encuentran en los cloroplastos, mientras que en los órganos de reserva como semillas y tubérculos se almacenan en los amiloplastos (Sajilata *et al.*, 2006). El tamaño y la forma de los gránulos de almidón es característico de cada especie botánica; en tubérculos de papa llegan a medir 100 μm , en tanto que los de raíz de la planta de taro miden de 1-3 μm (Smith *et al.*, 2001). La forma puede ser desde esférica hasta elipsoidal o lenticular. Los gránulos de arroz, exhiben formas angulosas, mientras que otros que han sido modificados genéticamente presentan morfologías complejas (Donald, 2004).

II.3 La síntesis de almidón en hojas

El almidón es uno de los principales productos de la fotosíntesis. La conversión de intermediarios del Ciclo de Calvin en ADP-glucosa, el sustrato para las almidón sintasas (SS, de sus siglas en inglés), se muestra en la Figura II.1.

Las isoformas cloroplásticas de la fosfoglucoisomerasa y de la fosfoglucomutasa catalizan la conversión de fructosa 6-fosfato en glucosa 1-fosfato, metabolito que junto con el ATP es utilizado por la ADP glucosa pirofosforilasa (AGPasa) para generar ADP-glucosa y pirofosfato. El control del flujo de carbono hacia la biosíntesis del almidón en hojas se atribuye a la modulación de la actividad de la AGPasa. La reacción catalizada por esta enzima es reversible pues bajo condiciones fisiológicas, se asume que la alta

actividad de la pirofosfatasa alcalina cloroplástica dirige la actividad de la enzima hacia la producción de ADP-glc (Weiner *et al.*, 1987). La actividad de la AGPasa es regulada alostéricamente: inhibida por los niveles de Pi y activada por 3-PGA (Preiss, 1988). La relación de estos dos metabolitos cambia con el suministro y demanda de fotosintatos: cuando el suministro excede la demanda, la relación 3-PGA/Pi en el estroma es alta, la AGPasa se activa y se acelera la síntesis del almidón (Stitt y Quick 1989). La actividad de esta enzima también se regula por las condiciones redox: puede inactivarse cuando los azufres de las cisteínas que se localizan en el dominio C-terminal de la subunidad pequeña de la enzima se oxidan y forman un puente disulfuro entre las dos subunidades. La reducción rompe el puente y activa a la AGPasa (Fu *et al.*, 1998). En el cloroplasto la activación redox de esta enzima podría estar ligada al sistema ferredoxina/tiorredoxina y de esta manera a los cambios de estado redox entre el día y la noche, encontrándose activada (parcialmente) durante el día y prácticamente inactiva en la noche (Hendriks *et al.*, 2003). Este mecanismo puede evitar la fuga de intermediarios metabólicos hacia la vía de biosíntesis durante la noche. La activación de la AGPasa en estado reducido también es sensible al estado metabólico del cloroplasto: vías de señalización en las que participan SnRK1 (sucrose-non fermenting-1-related protein kinase) y la hexocinasa hacen que se active cuando los niveles de glucosa y sacarosa son elevados (Tiessen *et al.*, 2003). También, existen evidencias de que la trealosa 6-fosfato, que funciona como intermediario de las vías de señalización por azúcares, podría favorecer la acumulación de almidón (Kolbe *et al.*, 2005; Zeeman *et al.*, 2007). Lo que refleja un complejo sistema de regulación que permite el uso mas apropiado de los carbohidratos.

II.3.1 La síntesis de la amilosa

El almidón está compuesto de poliglucanos lineales y ramificados. Las almidón sintasas (SS) son enzimas que catalizan la formación de enlaces glucosídicos α -1,4, por medio de la transferencia del residuo glucosa de la ADP-glc al extremo no reductor de una cadena de glucanos. Las ramificaciones son generadas por las enzimas ramificadoras (BE, de sus siglas en inglés), mientras que las enzimas desramificadoras (DBE, de sus siglas en inglés), podrían estar involucradas en modificar las cadenas ramificadas en formas capaces de cristalizar (Zeeman *et al.*, 2007).

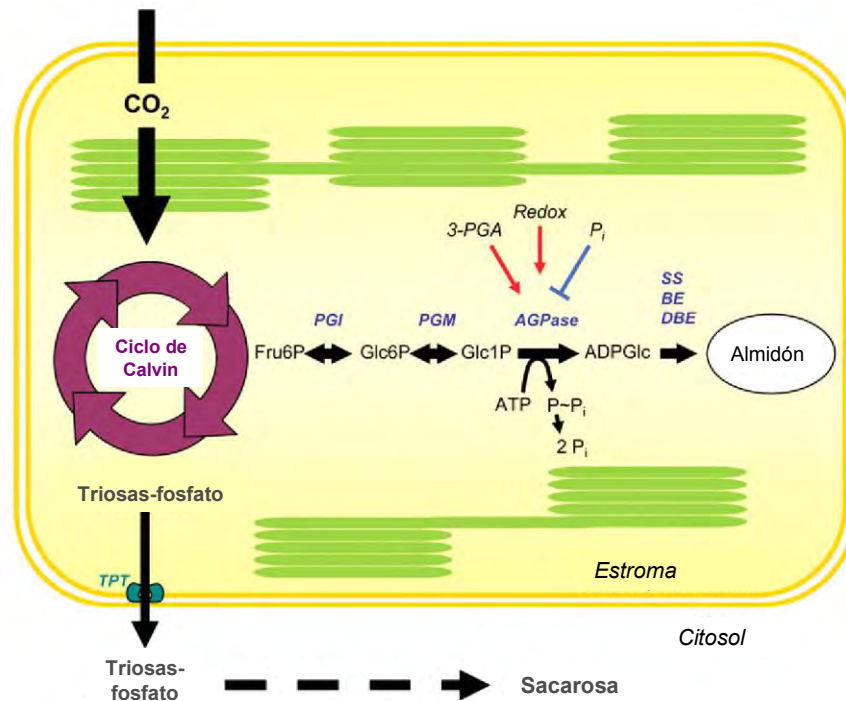


Figura II.1. Síntesis de almidón en cloroplastos. Abreviaturas: Fru6P, fructosa 6-fosfato; Glc1P, glucosa 1-fosfato; Glc6P, glucosa 6-fosfato; TPT, translocador triosa-fosfato / fosfato; PGI, fosfoglucoisomerasa; PGM, fosfoglucomutasa; AGPase, ADP glucosa pirofosforilasa; SS, almidón sintasa, BE, enzimas ramificadoras; DBE, enzimas desramificadoras. Tomada de Zeeman 2007.

La amilosa es un polímero lineal formado por cadenas de glucosas unidas por enlaces α -1,4, que constituyen el 20-30% del gránulo de almidón en los órganos de almacenamiento y 4-20% en los gránulos provenientes de las hojas (Hovenkamp-Hermelink *et al.*, 1988; Zeemann, 2002b). Su peso molecular se encuentra en el orden de 10^5 - 10^6 (Kossmann y Lloyd, 2000). La localización exacta de la amilosa en el gránulo no ha sido determinada de manera concluyente, pero se ha sugerido que se encuentra principalmente en la región menos cristalina, la parte amorfa (Gallant, 1997; Jobling, 2004). Se sabe que la amilosa se sintetiza por medio de la acción catalítica de la isoforma de almidón sintasa que está unida al gránulo (GBSS, de sus siglas en inglés), pues mutantes que carecen de GBSS en maíz (Shure *et al.*, 1983), arroz (Sano 1984; Villareal y Juliano, 1986), trigo (Nakamura *et al.*, 1995), papa, sorgo, amaranto, cebada y chícharo (Kossmann y Lloyd, 2000) sintetizan gránulos de almidón sin amilosa. Además, en papa y arroz la disminución por RNA antisentido de la expresión de GBSS produjo gránulos de almidón con contenido de amilosa considerablemente reducido. Estas mutantes se denominan “cerosas” debido a que dan como resultado endospermos opacos, los cuales son más susceptibles a la degradación (Gallant *et al.*, 1997). No se sabe cómo la GBSS cataliza la síntesis de

amilosa, ni qué es lo que impide que las enzimas ramificadoras actúen para generar cadenas laterales, pues además de la GBSS que se encuentra siempre unida al gránulo hay otras enzimas involucradas en el metabolismo del almidón que también tienen capacidad de asociarse a los gránulos. Se ha especulado que la GBSS es la única enzima cuya actividad está permanentemente asociada a los gránulos mientras, que las BE lo hacen transitoriamente (Kossmann y Lloyd, 2000). Por otro lado, se han encontrado enzimas ramificadoras bacterianas que son capaces de actuar en regiones del gránulo donde las ramificadoras de plantas no lo hacen, generando un material ramificado con características intermedias entre la amilosa y la amilopectina (Kortstee *et al.*, 1998). Otra de las preguntas aún sin resolver se relaciona con el recambio e incorporación en los gránulos de almidón de los intermediarios que están entre ADPglc y el almidón. Hasta ahora ha sido imposible sintetizar almidón *in vitro*, pero en experimentos en donde gránulos de almidón se incubaron con ADP-(¹⁴C) glucosa por períodos cortos (una hora), la marca se incorporó en amilopectina, mientras que después de incubaciones más largas (24 horas) la marca se encontró principalmente en la fracción de amilosa (Denyer *et al.*, 1996). De estos resultados, se concluyó que la GBSS primero extiende las cadenas de las moléculas de amilopectina y que a partir de éstas, se generan las cadenas que constituyen la amilosa (Kossmann y Lloyd, 2000). Existen varias posibilidades para explicar el crecimiento de las cadenas de amilosa; una de ellas es que las endoamilasas hidrolizan a la amilopectina y den lugar a cadenas de amilosa. La otra es que la GBSS tenga una segunda actividad mediante la cual libere las cadenas de glucanos que previamente haya elongado. Dado que todas las mutantes que se han descrito como libres de amilosa presentan reducción de la actividad de GBSS, la última opción parece la más probable (Kossmann y Lloyd, 2000).

II.3.2 La síntesis de la amilopectina

La amilopectina es un polisacárido semicristalino, altamente ramificado, con un esqueleto de enlaces α -1,4 y 4-5% de puntos de ramificación α -1,6 (Blennow *et al.*, 2002). Es el componente mayoritario de la mayoría de los almidones. La amilopectina es una molécula más grande que la amilosa cuyo peso molecular está entre 10^7 - 10^8 . El tamaño y el grado de ramificación de la amilopectina varían ampliamente y esta diversidad estructural contribuye a las diferencias en las propiedades químicas y físicas que se observan entre almidones provenientes de diferentes fuentes (Guan y Keeling, 1998). La amilopectina se

sintetiza predominantemente en la superficie del gránulo con la participación de diversas isoformas de las enzimas SS, BE y DBE. Se han identificado numerosas isoformas de SS (Guan y Keeling, 1998), las cuales elongan las cadenas de glucosas unidas por medio de enlaces α -1,4 a partir del extremo no reductor. De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, se clasifican en 5 familias: GBSS, SSI, SSII, SSIII y SSIV (Patron y Keeling, 2005). GBSS está unida al gránulo y como ya se mencionó sintetiza la fracción lineal del almidón, usando ADP-glc (MacDonald y Preiss, 1985; Tatge *et al.*, 1999; van de Wal *et al.*, 1998) y contribuye a la síntesis de cadenas largas de amilopectina (Fulton *et al.*, 2002). Es capaz de generar cadenas no ramificadas de cientos o hasta miles de residuos de glucosas de longitud (Denyer, 1999). Se ha sugerido que puede alargar tanto maltooligosacáridos solubles (Zeeman *et al.*, 2002a), como las cadenas laterales de la amilopectina (MacDonald y Preiss, 1985). Las otras SS están distribuidas en los gránulos y el estroma (SSI y SSII) o se localizan únicamente en el estroma (SSIII y SSIV). Las evidencias genéticas indican que cada una de las familias de las SS tiene funciones específicas. Las SSI, SSII y SSIII participan en la elongación de cadenas de amilopectina y presentan especificidad por el tamaño de cadena (Commuri *et al.*, 2001; Craig *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1999; Fontaine *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008): las SSI actúan sobre cadenas cortas (grado de polimerización, DP, por sus siglas en inglés; entre 6 y 12), las SSII sobre cadenas de tamaño mediano (DP12-DP25) y las SSIII preferentemente sobre cadenas de mayor longitud (>DP60). La función de SSIV no está claramente definida, pues la disminución de su actividad no genera cambios en la estructura de la amilopectina; se ha propuesto que su función está relacionada con el inicio de la formación del gránulo (Roldan *et al.*, 2007).

Las BE participan en la síntesis del almidón introduciendo los puntos de ramificación α -1,6 por medio de una reacción de glucanotransferasa, en la cual una cadena de glucosas unidas por enlaces α -1,4 es escindida y un segmento del glucano de 6 ó más residuos de glucosa es transferido a esa misma cadena o a una adyacente (Borovsky *et al.*, 1975). Las isoformas de las BE que contribuyen a la biosíntesis de la amilopectina se agrupan en dos clases, nombradas como I (tipo A) y II (tipo B) (Rahman *et al.*, 2001). La clase I transfiere cadenas más largas que la clase II (Guan y Preiss 1993; Takeda *et al.*, 1993). Los estudios realizados con mutantes indican que la acción de estas enzimas se interrelaciona y que actúan de forma secuencial durante la formación de la amilopectina (Nakamura, 2002). Cuando se han mutado las dos clases de BE, no hay formación de amilopectina, únicamente se forman largas cadenas de glucanos y se presentan gránulos

de almidón anormalmente grandes. De manera interesante en *Arabidopsis* no existen genes de las BE clase I y sólo hay dos genes de la clase II. Cuando se mutan estos genes, no hay síntesis de almidón y únicamente se detectan oligosacáridos lineales de cadena corta.

Existen estudios que muestran que mutaciones en las DBE generan formas de glucanos solubles que no son capaces de formar gránulos semicristalinos. Se ha propuesto que las DBE contribuyen a dar a la amilopectina una estructura capaz de formar gránulos. Se sugiere que las SS y las BE generan moléculas de amilopectina demasiado ramificadas, algunas de las cuales son removidas por las DBE lo que da lugar a una amilopectina capaz de cristalizar (Ball *et al.*, 1996; Myers *et al.*, 2000; Zeeman *et al.*, 1998). Las DBE se clasifican en dos grupos: dextrinasas límite (LDA o tipo pululanasa) e isoamilasas (ISA). El grupo de ISA se subdivide en ISA1, ISA2 e ISA3 (Hussein *et al.*, 2003). Se ha observado que en el endospermo, si se muta ISA1 se forma fitoglucógeno (glucano soluble) en lugar de almidón, mientras que en hojas de *Arabidopsis* la formación de fitoglucógeno se presenta cuando se mutan los genes *ISA1* ó *ISA1* e *ISA2*. Las mutaciones de los genes que codifican para LDA e ISA3 no producen fitoglucógeno. Las evidencias genéticas indican que la actividad desramificadora que se requiere para la síntesis normal de almidón está en función de ISA1 e ISA1 más ISA2. Sin embargo, algunos estudios bioquímicos muestran que ISA es un complejo multiproteico cuya composición varía dependiendo de la especie. En las hojas de *Arabidopsis* y en los tubérculos de papa el complejo está formado por ISA1 e ISA2, mientras que en endospermo de cereales aparentemente es un homomultímero compuesto únicamente por ISA1. Aunque en estudios recientes se ha encontrado que en endospermo de arroz, el complejo está formado por las ISAs 1 y 2 pero que ISA2 no tiene actividad desramificadora aún cuando es capaz de unirse a los glucanos. Estos resultados han llevado a sugerir que ISA2 podría tener actividad reguladora ó contribuye a la especificidad de ISA1 (Zeeman *et al.*, 2007; Hussein *et al.*, 2003).

Mucha de la información disponible proviene de experimentos hechos con mutantes o con plantas transgénicas que carecen de las SS, las BE y las DBE, y su interpretación es complicada por varias razones: (1) el hecho de que todas ellas actúan sobre el mismo sustrato y el producto de la actividad de cada una de ellas puede ser sustrato de las otras; (2) la pérdida de la actividad de una enzima puede ser compensada total o parcialmente por otra (Morell *et al.*, 2003); (3) cambios en la actividad de enzimas que participan en

procesos complejos pueden producir efectos pleiotrópicos (Nishi *et al.*, 2001; Singletary *et al.*, 1997), y (4) las enzimas que participan en la síntesis de almidón pueden formar complejos multienzimáticos (Huber *et al.*, 2002; Sehnke *et al.*, 2001; Tetlow *et al.*, 2004a). Las consecuencias de la formación de estos complejos para la actividad de las enzimas y para la biosíntesis del almidón aún están por definirse. Seguramente, este conocimiento llevará a un mejor entendimiento de la orquestación de las enzimas que participan en este proceso.

II.4 Los gránulos de almidón

La estructura básica de los almidones se conoce desde hace algunas décadas, pero el empacamiento interno del gránulo, así como la manera en que su biosíntesis se refleja en este empacamiento y las consecuencias de su estructura sobre su funcionalidad aún no están completamente definidas.

El análisis estructural de los gránulos muestra que las cadenas laterales de la amilopectina forman dobles hélices y están arregladas de tal manera que se forman paquetes que contienen entre 9 y 17 cadenas laterales en intervalos regulares de aproximadamente 9-10 nm de largo sobre el eje de la molécula y dan lugar a las lamelas cristalinas, que se alternan con lamelas amorfas formadas por las regiones donde se localizan los puntos de ramificación y por los espacios entre los agregados de dobles hélices (Figura II.2; Gallant, 1997).

El modelo de “empaquetamiento” (Figura II.3), considera que la amilopectina se constituye de diferentes tipos de cadenas y esto se apoya en las observaciones de las tres diferentes clases de cadenas, A, B, y C, que varían en longitud y que se asocian para formar los paquetes.

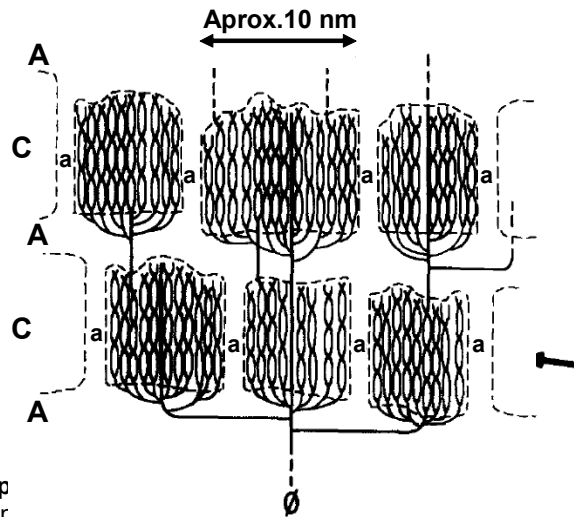
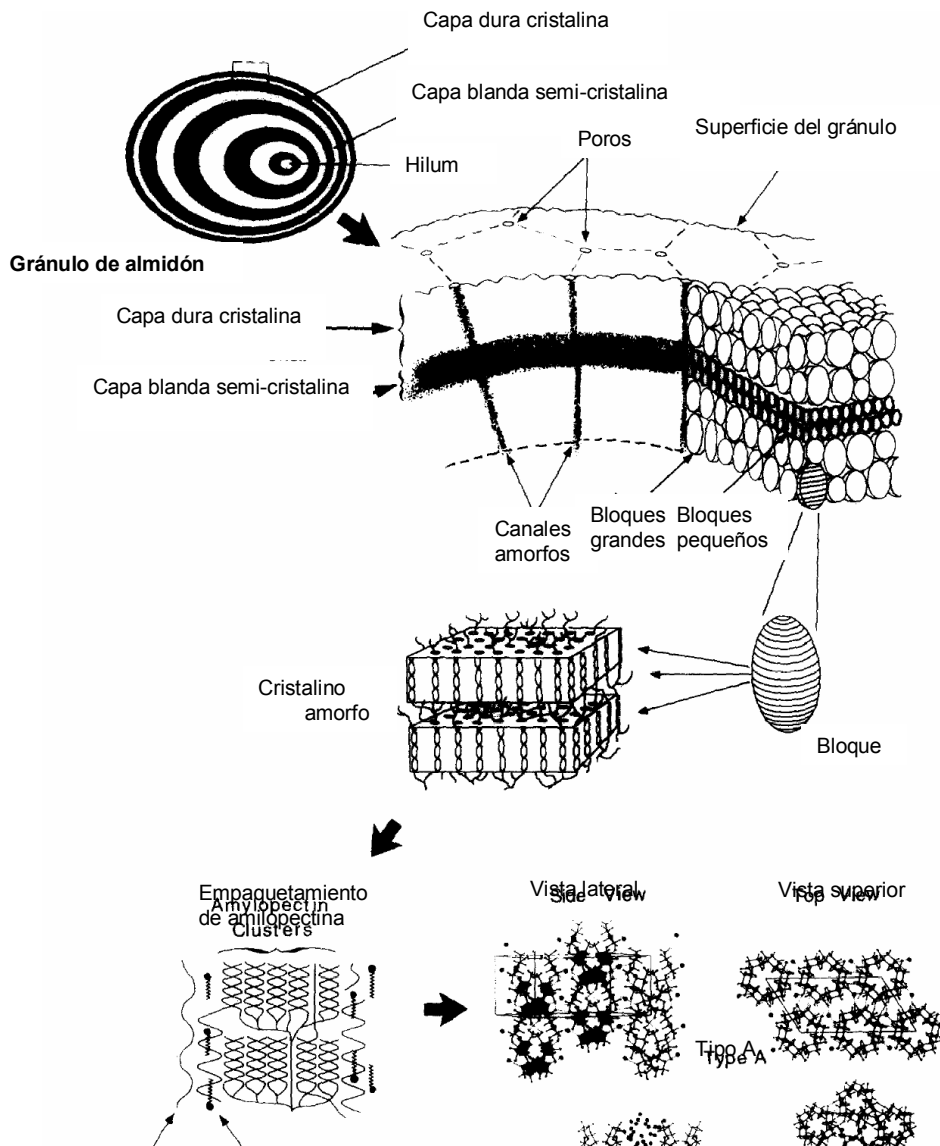


Figura II.2. Esquema del empaquetamiento de la amilopectina en las lamelas. Cada empaquetamiento contiene amilopectina; se localizan entre las lamelas cristalinicas y entre cada paquete de cadenas laterales. A, lamelas amorfas de aproximadamente 4nm de largo (zona de ramificación); C, lamelas cristalinicas de 6 nm de largo en promedio (paquetes de cadenas laterales de amilopectina); a, regiones amorfas entre los paquetes cristalinicos. Tomada de Gallant, 1997.



De acuerdo a la naturaleza del almidón, el empaquetamiento de las cadenas de amilopectina y la cantidad de agua que retienen, se han definido 3 tipos de estructuras cristalinas: A, B y C (Figura II.4; Donald, 2004; Gérard *et al.*, 2000).

Estructura cristalina tipo A: la longitud de las cadenas de amilopectina son más cortas y se encuentran en mayor cantidad que en la estructura cristalina B. Las dobles hélices están tan densamente empaquetadas que la unidad cristalina tiene sólo 4 moléculas de agua. Este tipo de estructura cristalina predomina en el almidón de cereales (Gérard *et al.*, 2000).

Estructura cristalina tipo B: las cadenas de amilopectina son más largas y menos abundantes que en la estructura cristalina A. En la unidad cristalina se acomodan seis dobles hélices en forma hexagonal, la estructura es menos densa y puede albergar hasta 36 moléculas de agua. Esta configuración se encuentra principalmente en el almidón de tubérculos (Donald 2004; Gérard *et al.*, 2000).

Estructura cristalina tipo C: es una combinación del tipo A y B y es la estructura que predomina en el almidón de las leguminosas (Donald 2004; Gérard *et al.*, 2000).

El gránulo crece por superposición, formando capas a las que se denomina anillos de crecimiento, los cuales se pueden apreciar con facilidad en el almidón de papa (Hoseney, 1991). En los gránulos de almidón hay anillos cristalinos que se alternan con zonas amorfas. Cuando se exponen a luz polarizada se obtienen dos índices de refracción diferentes (birrefringencia) y se forma un patrón característico al que se denomina cruz de malta (Badui, 1993).

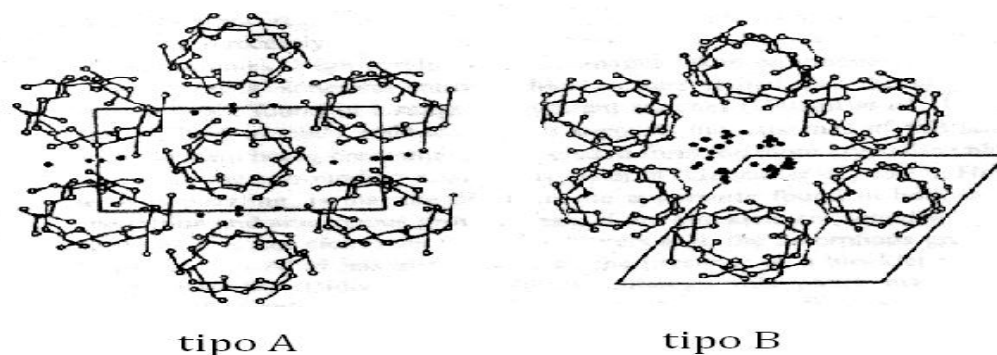


Figura II.4. Tipos de estructuras cristalinas del almidón. Los puntos negros representan las moléculas de agua. Tomada de Tester *et al.*, 2004.

II.4.1 Otros componentes del gránulo

Además de la diferencia en peso molecular, la amilosa y la amilopectina también tienen distinta capacidad para asociarse con otras moléculas. La naturaleza química de la amilosa provoca que forme asociaciones con pequeñas moléculas hidrófobas, por lo que es común que a la fracción de amilosa se encuentre asociada una proporción de lípidos (Morrison, 1995), mientras que la amilopectina contiene grupos fosfatos unidos de manera covalente. El grado de fosforilación varía con el origen botánico del almidón: el que proviene de semillas de cereales presenta niveles de fosforilación apenas perceptibles (<0.01%), mientras que el de tubérculos de papa está altamente fosforilado (0.5%) (Mikkelsen y Blennow, 2005). En las hojas el almidón transitorio aproximadamente el 0.1% de los residuos de glucosa están fosforilados (Yu *et al.*, 2001). Los grupos fosfato están unidos como monoésteres en las posiciones C-3 y C-6 de las unidades de glucosa y aparentemente se incorporan tanto durante la síntesis como durante la degradación del almidón (Nielsen *et al.*, 1994; Ritte *et al.*, 2004). La fosforilación en la posición C-3 puede modificar el empaquetamiento de las dobles hélices (Blennow *et al.*, 2002) y esto, de alguna manera, puede alterar el ordenamiento del gránulo. Se tienen evidencias de que al disminuir el grado de fosforilación, la degradación del almidón también se reduce (Yu *et al.*, 2001; Zeeman y ap Rees, 1999), lo cual sugiere que la fosforilación puede facilitar la asociación de los gránulos con proteínas que participarán en su degradación.

II.5 La degradación del almidón

Durante el día las células fotosintéticas transforman el CO₂ en sacarosa y almidón. La sacarosa se exporta a los tejidos no fotosintéticos y el almidón se almacena en el cloroplasto. Por la noche el almidón se degrada para proveer a toda la planta de carbono, energía y poder reductor.

La degradación del almidón es un proceso esencial para el desarrollo de las plantas que involucra la asociación temporal de los gránulos con muchas enzimas (Ritte *et al.*, 2000). El primer paso es catalizado por una enzima capaz de actuar en la superficie semicristalina del gránulo. Varias enzimas son capaces de degradar los gránulos de almidón *in vitro* pero las evidencias sugerían que la α -amilasa (AMY) era la única que lo hacía *in planta* (Asatsuma *et al.*, 2005). Esta endoenzima, que hidroliza los enlaces glicosídicos α -1,4 (Whitaker, 1994), también actúa sobre gránulos del endospermo de semillas en germinación, donde al liberar cadenas lineales y ramificadas, permite la

acción de otras enzimas sobre los gránulos y glucanos generados. Por esta razón, durante mucho tiempo se pensó que la endo-amilolisis también era la primera etapa en la degradación del almidón de hojas. El hecho de que en el genoma de *Arabidopsis* existan tres genes que codifican isoformas de α -amilasa, una de las cuales (AMY3) se encuentra en el cloroplasto (Tabla II.1; Lloyd *et al.*, 2005), parecía confirmar esta suposición. Sin embargo, Yu, *et al.* (2001) mostraron que en ausencia de AMY3 o de las otras α -amilasas (triple mutante *amy1/amy2/amy3*) la degradación del almidón ocurre de manera normal.

Tabla II.1. Enzimas que se sabe participan ó podrían participar en la degradación del almidón transitorio en *Arabidopsis*.

Enzima	Gen	Localización en plastidios (predicha) ^a
α -Amilasa 1	AMY1	No
α -Amilasa 2	AMY2	No
α -Amilasa 3	AMY3	Sí
β -Amilasa 1	BAM1	Sí
β -Amilasa 2	BAM2	Sí
β -Amilasa 3	BAM3	Sí
β -Amilasa 4	BAM4	No
β -Amilasa 5	BAM5	No
β -Amilasa 6	BAM6	No
β -Amilasa 7	BAM7	No
β -Amilasa 8	BAM8	No
β -Amilasa 9	BAM9	No
Glucan agua dicinasa	GWD1	Dudoso
Fosfoglucan agua dicinasa	PWD	Sí
Almidón fosforilasa cloroplástica	PHS1	Sí
Almidón fosforilasa citosólica	PHS2	No
Enzima desproporcionadora	DPE1	Sí
Transglucosidasa	DPE2	Sí
Isoamilasa 1	ISA1	Dudoso
Isoamilasa 2	ISA2	Sí
Isoamilasa 3	ISA3	Sí
Pululanasa	LDA1	Sí
α -glucosidasa		

Modificada de Lloyd J, 2005.

^aLa predicción se hizo mediante los programas TargetP (Emanuelsson, 2000)

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) y Predotar (<http://www.inra.fr/predotar/>).

El término dudoso se aplicó cuando los resultados en ambos programas eran contradictorios.

Esto sugiere que el ataque inicial en la superficie de los gránulos no requiere una endoamilasa, o que *A. thaliana* posee otra endoamilasa cuya secuencia de aminoácidos es muy diferente por lo que no ha sido identificada como tal. Sin embargo, el hecho de que Asatsuma *et al.* (2005) hayan encontrado que la participación de la isoforma I-1 de α -

amilasa es necesaria para la degradación del almidón en hojas en arroz, demuestra que las características del inicio de la degradación del gránulo de almidón dependen de la especie.

Independientemente de cómo inicie el ataque de los gránulos, actualmente se sabe que la enzima glucan, agua dicinasa (GWD; anteriormente llamada R1) es necesaria en el proceso de degradación de almidón (Caspar *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 2001; Zeeman y ap Rees, 1999). Esta enzima transfiere el fosfato β del ATP al carbón 6 de los glicosilos que forman la amilopectina (Mikkelsen y Blennow, 2004; Ritte *et al.*, 2002). *In vivo* la fosforilación ocurre tanto durante el período de síntesis como en el período de degradación (Nielsen *et al.*, 1994; Ritte *et al.*, 2004). En hojas de papa y en *Chlamydomonas* la actividad es mayor durante la noche, lo cual coincide con que una proporción elevada de la enzima se encuentra unida a los gránulos (Ritte *et al.*, 2000; Ritte *et al.*, 2004). Las mutaciones que eliminan la actividad de GWD reducen tanto los niveles de fosfato en la amilopectina como la velocidad de degradación del almidón. Se ha sugerido que los grupos fosfato, al modificar el empaquetamiento de los gránulos, incrementan la susceptibilidad de la superficie al ataque enzimático; o bien, que la proteína GWD una vez unida al gránulo promueva la unión de otras enzimas a la superficie del gránulo (Blennow *et al.*, 2002; Muhrbeck y Eliasson, 1991). El descubrimiento de que se requiere una segunda dicinasa (PWD, fosfoglucon, agua dicinasa) en la degradación del almidón ha complicado la comprensión de este proceso. PWD actúa en la posición C³ de glucanos fosforilados y en las plantas en donde se ha mutado GWD no hay fosforilación de los gránulos, lo que indica que PWD actúa después de GWD. Se ha sugerido que GWD y PWD generan un patrón de fosforilación de la amilopectina en la superficie del gránulo y que es el patrón de fosforilación lo que facilita el ataque enzimático (Kotting *et al.*, 2005); sin embargo, la información al respecto es incompleta. Mikkelsen *et al.* (2005) presentaron evidencia de que la actividad de la GWD está regulada vía redox y que la fracción de la enzima que se encuentra unida al gránulo está oxidada (forma inactiva). Esta aparente inconsistencia tendrá que ser resuelta, pues la regulación de esta enzima podría controlar el flujo a través de esta vía metabólica.

Contrario a lo que sucede con α -amilasa, las mutaciones en β -amilasa (BAM) y en la enzima desramificadora (ISA3) reducen la degradación del almidón (Delatte *et al.*, 2006; Kaplan y Guy 2005; Scheidig *et al.*, 2002; Wattedbled *et al.*, 2005), indicando que ambas enzimas están involucradas en el proceso. Las formas recombinantes de BAM e ISA3 tienen actividad sobre gránulos intactos *in vitro*, sin embargo su actividad es mayor sobre

sustratos solubles lo que podría atribuirse a que una o ambas enzimas requieren que el sustrato esté fosforilado. Adicionalmente, Ritte *et al.* (2004) y Delatte *et al.* (2006) reportaron que en las primeras etapas de la degradación en la superficie del gránulo aumentan las cadenas cortas de glucanos, mismas que se acumulan en la mutante de *Arabidopsis isa3*, probablemente, porque no son eficientemente removidas. Con esta información, se ha propuesto un modelo donde BAM e ISA3 actúan sobre la superficie del gránulo de una manera interdependiente: BAM al hidrolizar las cadenas externas del glucano ramificado hace que sobre la superficie del gránulo se acumulen cadenas cortas sobre las cuales ya no puede actuar. Al ser removidas por la acción desramificadora de ISA3, se exponen nuevas cadenas sobre las que BAM puede continuar actuando. Sin embargo, la reducción de la actividad y/o mutación de los genes *BAM* e *ISA3* no detiene por completo la degradación del almidón, sugiriendo que también otras enzimas intervienen en el proceso.

Otro grupo de enzimas que también participan en la degradación del almidón son las enzimas desproporcionadoras o enzimas D. La enzima β -amilasa es incapaz de actuar sobre cadenas de menos de cuatro residuos de glucosas, las maltotriosas que se generan durante la degradación son el sustrato de esas enzimas. La enzima D transfiere dos de los glucosilos de la maltotriosa a una cadena mayor de glucanos, la cual es después hidrolizada por β -amilasa. La glucosa restante puede exportarse al citosol a través del transportador de glucosa localizado en la membrana interna del cloroplasto (Tetlow *et al.*, 2004b). Además de la isoforma plastídica de la enzima D, existe una isoforma citosólica llamada DPE2, la cual utiliza la maltosa liberada por el cloroplasto (Chia *et al.*, 2004). Los glucanos lineales pueden también metabolizarse a través de fosforólisis por la enzima α -glucan fosforilasa cloroplástica, generándose glucosa 1-fosfato (Zeeman *et al.*, 1998). La importancia de esta enzima en la degradación del almidón no está definida; ya que se sabe que la maltosa junto con la glucosa son los principales azúcares exportados de los cloroplastos durante la degradación del almidón y que, en plantas deficientes en MEX1 (transportador de maltosa) la maltosa se acumula en el cloroplasto y la degradación del almidón disminuye, por otro lado si se muta el gen de BAM3 se acumula el almidón mientras que, si se muta la α -glucan fosforilasa no hay fenotipo, estas evidencias indican que es la hidrólisis y no la fosforólisis la vía predominante en la degradación del almidón en hojas (Lu *et al.*, 2006; Sonnewald *et al.*, 1995; Zeeman *et al.*, 2004).

En el citoplasma, una de las glucosas de la maltosa se transfiere a un poliglucano ramificado, a través de una reacción de transglicosilación catalizada por la enzima DP2 y

la otra es transformada por la hexocinasa en glucosa 6-fosfato (Smith *et al.*, 2005). El esquema que describe la acción de las enzimas involucradas en la degradación de los gránulos de almidón se presenta en la Figura II.5.

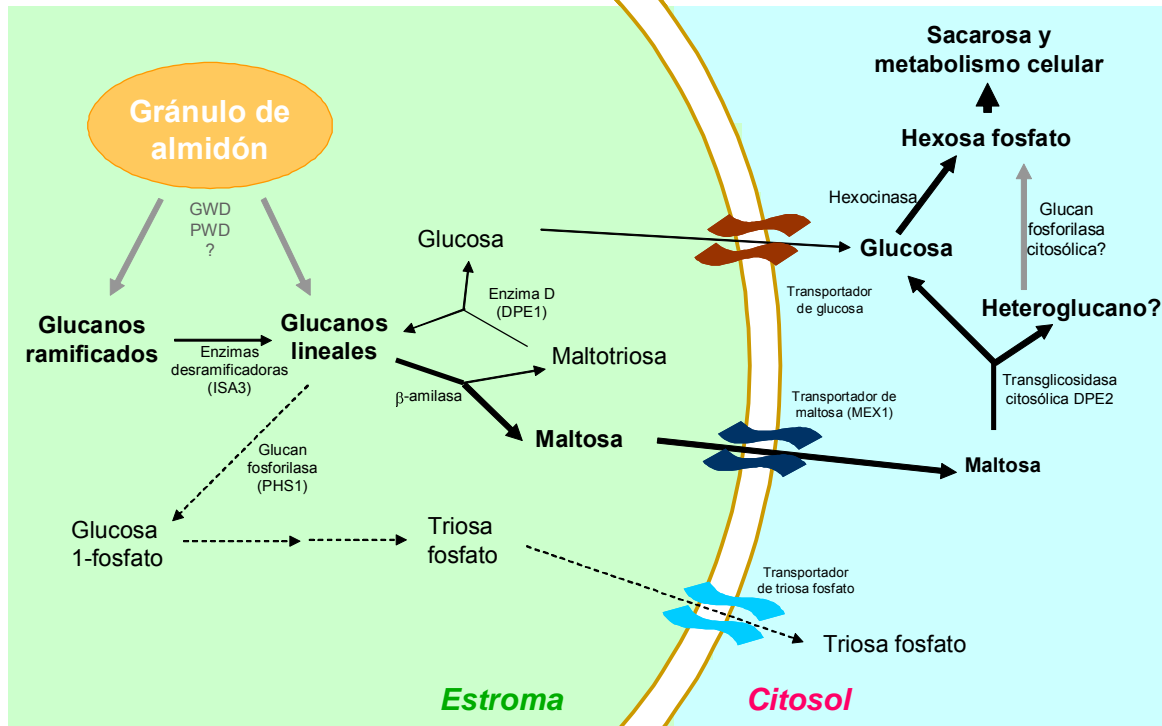


Figura II.5. Vía propuesta para la degradación del almidón en hojas de *Arabidopsis*. Tomada de Smith *et al.*, 2005.

II.6 La interacción gránulo de almidón-enzima

Es muy probable que la asociación de diferentes proteínas a la superficie del gránulo constituya un paso esencial en el proceso de degradación del almidón en hojas (Ritte *et al.*, 2000). Los factores que definen la interacción proteína-almidón aún se encuentran en estudio; no obstante, se sabe que la asociación de algunas proteínas depende de cambios metabólicos promovidos por la transición luz-oscuridad. En el caso de la proteína GWD se ha mostrado que su asociación a los gránulos de almidón es reversible y que al menos *in vitro* no involucra la participación de otras proteínas (Ritte *et al.*, 2000). En hojas de *A. thaliana*, papa, chícharo y frijol, aparentemente la cantidad de la proteína GWD permanece constante (Ritte *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001); sin embargo, para las últimas tres especies se ha mostrado que la proporción de proteína GWD asociada al gránulo se incrementa considerablemente durante el período de degradación (Ritte *et al.*, 2004). Los estudios anteriores muestran que existe una correlación directa entre la unión de GWD y

el grado de fosforilación, pero no se han definido aún las modificaciones que ocurren en la superficie del gránulo durante su degradación que llevan a una mayor asociación de proteínas e incrementan su actividad. Existen evidencias que muestran que en condiciones *in vitro*, los gránulos de almidón con mayor grado de fosforilación son mejores sustratos para la proteína GWD y además son más susceptibles a la degradación amilolítica (Ritte *et al.*, 2004), lo que podría estar sugiriendo que la fosforilación de la superficie del gránulo facilita también la asociación de otras enzimas y que características del gránulo como el nivel de fosfato son relevantes en este proceso. También se ha reportado que la proporción de amilosa y amilopectina, así como el largo de las cadenas de amilopectina, contribuyen a la degradación del almidón. Los almidones que presentan altos contenidos de amilosa tienen mayor resistencia a la degradación enzimática (Gallant *et al.*, 1997). No se conoce cuál es la razón de esta relación, pero cabe la posibilidad de que al ser menor la proporción de amilopectina, los sitios fosforilables también se reduzcan y, en consecuencia, la asociación con proteínas disminuye. Por otro lado, existen evidencias de que la actividad de la proteína GWD se ve favorecida por cadenas largas de amilopectina (DP 30-100; Mikkelsen y Blennow, 2005). Sin embargo, en los estudios reportados por Ritte *et al.* (2004) no se observaron cambios relevantes en el largo de la cadena de las moléculas periféricas de amilopectina durante el ciclo luz-oscuridad, lo que sugiere que, aparentemente, este factor no contribuye a la mayor interacción proteína-almidón. Se ha reportado que la α -amilasa, la β -amilasa y la pululanasa de microorganismos y de cereales como maíz y cebada (Janecek y Sevcik, 1999; Robert *et al.*, 2003; Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005; Svensson *et al.*, 1989) poseen sitios de unión a almidón diferentes al dominio catalítico. Una de las funciones de estos dominios es unir a la enzima a la superficie insoluble del gránulo de almidón. Existen evidencias de que la actividad de estas enzimas sobre sustratos insolubles se pierde si el dominio se elimina, mientras que su actividad hacia sustratos solubles se mantiene (Ji *et al.*, 2003). Se ha sugerido que estos dominios también modifican la superficie del gránulo (Southall *et al.*, 1996), lo que, probablemente permitiría la unión al almidón de otras proteínas que no poseen estos dominios pero que también están involucradas en la degradación del almidón.

II.7 La acumulación del almidón

La respuesta de las plantas a la falta de Pi es compleja, pero una de las manifestaciones más evidentes es la acumulación de almidón en las hojas (Rao *et al.*, 1993; Dietz y Helios,

1990; Cierezko y Barbachowska, 2000). En trabajos previos, se observó que después de tres semanas de deficiencia de Pi las hojas acumulaban gran cantidad de almidón (Figura II.6).

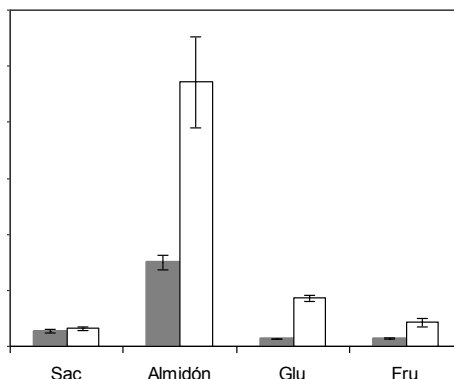


Figura II.6. Acumulación de azúcares en hojas maduras de plantas de frijol cultivadas por tres semanas. Plantas regadas con solución Hoagland completa (■) y plantas regadas con solución Hoagland sin Pi (□). Tomada del artículo que se incluye en el Anexo 1.

En condiciones normales, la mayor parte del almidón que se sintetiza y almacena durante el día en los cloroplastos se degrada por la noche para proveer de fotosintatos a los tejidos de demanda (Zeeman *et al.*, 2002a). El suministro de carbono en el período de oscuridad es tan importante que si la capacidad de degradación del almidón se reduce también disminuye la velocidad de crecimiento (Smith, 2005). Se ha sugerido, que la acumulación de almidón es una adaptación a la deficiencia de fósforo, pues su síntesis libera fósforo que puede ser usado en otros procesos. La deficiencia de fósforo también incrementa la relación triosa-P/Pi, lo cual al activar a la AGPasa (Preiss y Romeo, 1994), puede favorecer la síntesis de almidón. Existen reportes en los que se propone que la acumulación de almidón en hojas de plantas sometidas a deficiencia de fósforo es consecuencia de una mayor síntesis, resultante de la activación de dicha enzima (Cierezko y Barbachowska, 2000; Kondracka y Rychter, 1997). Por otro lado, Usuda y Shimogawara (1991) observaron que la deficiencia de Pi disminuye, tanto la síntesis de almidón, como su movilización durante la noche. De ahí que la acumulación de almidón que se observa en esas condiciones puede ser el resultado de la disminución en su degradación.

No se dispone de información suficiente para evaluar si la acumulación de almidón efectivamente ayuda a las plantas a enfrentar la deficiencia de Pi y tampoco se sabe de qué manera esta condición afecta el balance entre los procesos de síntesis y degradación

del almidón. En este sentido, se consideró que el estudio de la acumulación del almidón en plantas sometidas a deficiencia de Pi es un excelente modelo para estudiar la regulación de los procesos de síntesis y degradación del almidón.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

La deficiencia de fosfato modifica el recambio del almidón, lo que resulta en su acumulación en las hojas de plantas sometidas a este estrés.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Investigar las bases bioquímicas de la acumulación del almidón en hojas de plantas que se cultivaron en deficiencia de fosfato.

IV.2 Objetivos particulares

1. Definir si la acumulación de almidón que se observa durante la deficiencia de Pi se debe a una mayor síntesis o a una menor degradación.
2. Investigar cuál es el patrón de la acumulación de almidón inducido por la deficiencia de fosfato y cuál es su correlación con los niveles de fosfato.
3. Investigar el efecto de la deficiencia de fosfato sobre algunas características del gránulo de almidón.
4. Estudiar el efecto del estrés por deficiencia de fosfato sobre la actividad de las enzimas que degradan almidón.
5. Investigar si la deficiencia de fosfato modifica la susceptibilidad de los gránulos de almidón al ataque enzimático.
6. Investigar cómo la deficiencia de fosfato modifica la asociación de proteínas amilolíticas con el gránulo de almidón.

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 Material biológico

Se trabajó con frijol (*Phaseolus vulgaris* L), del genotipo MAR1 proporcionado por el Dr. Jorge Acosta del INIFAP. Las semillas se desinfectaron con etanol al 70% durante un minuto y con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v), durante 12 min. Se germinaron a temperatura ambiente (23-25°C) en agrolita saturada con agua. Se colocó una plántula por maceta que contenía 350 cm³ de agrolita y se regó cada tercer día con 50 ml de solución Hoagland modificada: 6 mM KNO₃, 4 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 2 mM MgSO₄·7H₂O, 0.009 mM MnCl₂·4H₂O, 0.046 mM H₃BO₃, 0.8 μM ZnSO₄·7H₂O, 0.003 mM CuSO₄·5H₂O, 0.015 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O y 0.01 g l⁻¹ de FeEDTA (Jones, 1982). Se evaluaron dos tratamientos, uno de suficiencia de Pi (Pi⁺) donde la solución de riego contenía 0.5 mmol/L de (NH₄)₂HPO₄ y otro deficiente en Pi (Pi⁻) en el que el (NH₄)₂HPO₄ se reemplazó con (NH₄)₂SO₄. Las plantas se cultivaron en un invernadero con luz natural y una temperatura promedio de 28 °C durante el día y 15 °C durante la noche. La primera hoja verdadera fue cosechada tres semanas después del transplante. El material se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. La hora a la cual se colectaron las hojas varió dependiendo del ensayo.

V.2 Determinación de fosfato

Para la determinación de Pi total se usó el método descrito por Ames (1966). A la muestra (3-5 mg) se le añadieron 20 μl de una solución de Mg(NO₃)₂ al 10% (p/v) en etanol y se incineró con mechero hasta cenizas blancas. Se agregaron 300 μl de HCl 0.5 N y se mantuvo en baño María en ebullición durante 15 min. Después de enfriar se agregaron 700 μl de una solución H₂SO₄ 0.5M, ácido L-ascórbico 81.2 mM y molibdato de amonio 0.29 mM. La muestra se incubó 20 min a 45 °C y se midió la absorbencia a 820 nm. El contenido de Pi se calculó a partir de una curva patrón de KH₂PO₄.

V.3 Cuantificación de amilosa

Para la determinación de amilosa se utilizó un kit de Megazyme International. El almidón purificado a partir de las hojas (25 mg) se suspendió en un ml de dimetil sulfóxido (DMSO) y se calentó con agua en ebullición hasta su disolución. Los lípidos presentes en el almidón se removieron por medio de una precipitación con etanol al 95% (v/v) y con centrifugación a 2000 g por 5 minutos. El almidón se resuspendió en 2 ml de DMSO y se calentó en baño de agua a ebullición por 15 minutos. Se añadieron 4 ml del solvente ConA (acetato de sodio 180 mM (pH 6.4), NaCl 900 mM, CaCl₂·6H₂O 1 mM, MgCl₂·6H₂O 1 mM, MnCl₂·4H₂O 0.5 mM) y la mezcla se agitó vigorosamente. Se diluyó con el mismo solvente hasta 25 ml. Para precipitar la amilopectina se tomó 1 ml de la mezcla anterior y se le agregaron 500 µl de solución de concanavalina A (200 mg de concanavalina en 50 ml de solvente ConA), se separó con centrifugación a 14000 g por 10 minutos. La amilosa se suspendió en una solución de acetato de sodio 100mM (pH 4.5) y se hidrolizó a glucosa con amiloglucosidasa/α-amilasa a 40 °C por 30 minutos. La glucosa se cuantificó con el sistema enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa (GOPOD) incubando a 40 °C por 20 minutos y leyendo la absorbencia a 510 nm. El almidón total se midió hidrolizando una alícuota de la solución de acetato antes de la precipitación de la amilopectina. El contenido de amilosa se calculó como la fracción de la absorbencia a 510 nm de la solución sin amilopectina de la absorbencia de la solución correspondiente al almidón total.

V.4 Determinación de almidón

Las muestras (150-300 mg de hoja) se homogenizaron en etanol al 80% (2 ml) y se calentaron por 30 minutos a 80 °C. El extracto se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos. El precipitado se extrajo con etanol una vez más. Los sobrenadantes se combinaron y esta fracción se usó para la medición de glucosa. La fracción sedimentada se resuspendió en 1.5 ml de agua y se gelatinizó a 90 °C, durante 4 horas. Después, se hidrolizó con 220 U de amiloglucosidasa (EC 3.2.1.3) resuspendida en 1.5 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio 200 mM (pH 4.5) y se incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente, el material se centrifugó a 5000 g por 5 minutos y se cuantificó la glucosa en el sobrenadante.

V.5 Determinación de glucosa

La glucosa se cuantificó mediante un ensayo enzimático con hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). 50 μ l de sobrenadante (ver sección V.4, Determinación de almidón) se mezclaron con 900 μ l de una mezcla compuesta de: Tris-HCl 25 mM (pH 8.0), KCl 50 mM, ATP 1 mM, $MgCl_2$ 3 mM, NAD^+ 0.3 mM y 1 U/ml de enzima hexocinasa (EC 2.7.1.1). Se midió la absorbencia basal a 340 nm y se añadió 1 U/ml de G6PDH (EC 1.1.1.49). La lectura final se hizo cuando ya no hubo cambio en la absorbencia (aproximadamente 30 minutos). La diferencia entre las lecturas final e inicial se utilizó para calcular la concentración de glucosa.

V.6 Medición de la actividad de α -amilasa

La actividad de esta enzima se midió por dos métodos. Método 1 (Zeeman *et al.*, 1998): Las hojas se homogenizaron con un amortiguador de acetato de calcio 15mM (pH 6) y la actividad se midió en 500 μ l de una mezcla de reacción que contenía 50 μ l de extracto enzimático, MOPS 50mM (pH 6.6), 500 U de β -amilasa y 10 mg/ml de almidón azure. Después de incubar a 25 °C por una hora, el almidón no digerido se precipitó con ácido tricloroacético 2.5% p/v y se removió por centrifugación. Se midió la absorbencia en el sobrenadante a 595 nm.

Método 2: Es el método descrito por Worthington, (1988). 50 μ l de extracto enzimático se mezclaron con una cantidad igual de una solución de amilopectina al 1% p/v en solución amortiguadora de fosfato 100mM (pH 6.9). La mezcla se incubó 10 minutos a 37°C y la reacción se detuvo agregando 100 μ l de solución de DNS. Se calentó 5 minutos en Baño María en ebullición, se dejó enfriar y se agregó un ml de agua. Se midió la absorbencia a 540 nm interpolando las lecturas en una curva patrón de maltosa.

V.7 Medición de la actividad de β -amilasa

Las hojas de las plantas de frijol congeladas con nitrógeno líquido se homogenizaron en mortero con una solución amortiguadora de acetato de sodio 50mM (pH 6), EDTA 5mM, DTT 5mM y PMSF 1mM manteniendo una relación 1:2 (p/v). El homogenado se centrifugó a 17000 g durante 5 minutos y el sobrenadante obtenido se utilizó para la medición de la actividad de β -amilasa. Se usaron dos métodos. Método 1 (Zeeman *et al.*, 1998): la

proteína (50 µg) se ensayó en 500 µl de una mezcla de reacción que contenía acetato de sodio 50 mM (pH 5.6), EDTA 5 mM, DTT 5 mM y amilopectina 10 mg/ml. La reacción se incubó a 37 °C por 10 minutos y se detuvo calentando a ebullición durante 10 minutos. El tiempo y cantidad de proteína se determinaron previamente. La maltosa generada se hidrolizó con 40 U de α-glucosidasa incubando a 37 °C por dos horas. La glucosa liberada se midió con hexocinasa y G6PD (ver método IV.6). Método 2 (Worthington, 1988): Se mezclaron 50 µl de extracto enzimático con una cantidad igual de una solución de amilopectina al 1% p/v en solución amortiguadora de acetato 16 mM (pH 4.8). La mezcla se incubó 10 minutos a 37°C y la reacción se detuvo agregando 100 µl de solución de DNS. Se calentó 5 minutos en Baño María en ebullición, se dejó enfriar y se agregó un ml de agua. Se midió la absorbencia a 540 nm y las lecturas se interpolaron en una curva patrón de maltosa. Una unidad de actividad de β-amilasa (U) equivale a la cantidad de enzima necesaria para producir 100 µmoles/minuto.

V.8 Medición de la actividad de almidón fosforilasa

La medición de la actividad de esta enzima se hizo en 100 µl de extracto cloroplástico con el procedimiento descrito por Zeeman *et al.* (1998). La mezcla de reacción contenía MOPS 20 mM (pH 7), Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 20 mM, MgCl₂ 10 mM, NAD 3.4 mM, 1 U de fosfoglucomutasa, 1 U de G6PDH, glucosa-1,6-bifosfato 4 µM y 2.5 mg/ml de amilopectina. Se midió la absorbencia a 340 nm.

V.9 Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se midieron utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Bernfeld (1955). Este reactivo se preparó disolviendo 1 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico en 50 ml de agua. A esta solución se le agregaron lentamente 30 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado. Una vez disueltos se añadieron 20 ml de NaOH 2N y el volumen se llevó a 100 ml con agua. Para la determinación, 100 µl de muestra se mezclaron con 100 µl del reactivo de DNS. La muestra se calentó con agua en ebullición durante 5 minutos. Se dejó enfriar y se adicionó un ml de agua. Se midió la absorbencia a 540 nm y el contenido de azúcares reductores fue calculado a partir de una curva patrón de maltosa.

V.10 Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó siguiendo el método de Bradford (1976), utilizando albúmina bovina como estándar.

V.11 Purificación de la β -amilasa

El tejido se colectó y congeló con nitrógeno líquido. El material se pulverizó en un mortero y se homogenizó con dos volúmenes de solución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM (pH 5), EDTA 2 mM, PMSF 1 mM, β -mercaptoetanol 2 mM. La suspensión se filtró a través de una malla de nylon No. 40 y el filtrado se centrifugó a 10,000 g por 15 minutos. Al sobrenadante se le agregó polietilén glicol (PEG) 10000 hasta alcanzar 35% (p/v), se mantuvo en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 21000 g por 20 minutos. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en amortiguador de extracción y se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos. El sobrenadante se filtró y se cargó a una columna de intercambio catiónico CM-Sepharosa, previamente equilibrada con solución amortiguadora de acetato 20 mM (pH 5). La fracción no unida se dializó en solución amortiguadora Tris 50 mM (pH 7) y se pasó por una columna de intercambio aniónico Q-Sepharosa de donde se eluyó con un gradiente de NaCl (0-1M). Las fracciones con actividad amilolítica se dializaron con solución amortiguadora Tris 50 mM (pH 7) y se cargaron en una columna MonoQ, previamente equilibrada con la solución amortiguadora de Tris 50mM (pH 7). El material se eluyó con un gradiente de NaCl (0-1M). Las fracciones con la mayor actividad se reunieron y se usaron en los ensayos enzimáticos.

V.12 Efecto de las condiciones redox sobre la actividad de la β -amilasa

Para determinar el efecto de la reducción sobre la actividad de la β -amilasa, se le agregó DTT a la enzima purificada, hasta alcanzar una concentración final de 1 ó 10mM. La enzima se incubó a 4 °C durante una hora y la actividad se cuantificó midiendo la producción de azúcares reductores a partir de amilopectina. El efecto de la oxidación se evaluó de manera similar utilizando peróxido de hidrógeno ó glutation oxidado (GSSG), a una concentración final de 10mM.

V.13 Asimilación de carbono y distribución de fotosintatos

Se utilizaron plantas de tres semanas, las cuales se marcaron con ^{14}C (Viola *et al.*, 2001). Para el marcaje se pusieron 50 μCi de ^{14}C (25 μl de $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$) en tubos Ependorff y se colocaron dentro de bolsas de plástico que cubrían la primera hoja de las plantas de frijol. El $^{14}\text{CO}_2$ se generó agregando 200 μl de ácido láctico 3 M. Las plantas se marcaron durante una hora, al término de la cual el marcaje se detuvo con 800 μl de una solución KOH 30% (p/v). Se retiró la bolsa y las plantas se cosecharon 4 horas después. Las plantas se fraccionaron en hojas marcadas (hoja madura), hojas jóvenes y raíces y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis. El material congelado se homogenizó con etanol al 80% en una relación 1:10 (p/v), el extracto se calentó durante 30 minutos a 80 °C y se centrifugó a 5000 g por 10 minutos. Esta operación se repitió usando una relación menor. Los sobrenadantes se mezclaron y se cuantificó la marca incorporada en azúcares solubles. La fracción insoluble se trató siguiendo la metodología descrita para la determinación de almidón. Después de la hidrólisis con amiloglucosidasa, se midió la presencia de marca en la glucosa liberada. Para la cuantificación de la marca incorporada, se usaron 50 μl de sobrenadante al que se le adicionaron 1.4 ml de líquido de centelleo ACSII de Amersham. Las muestras se guardaron en oscuridad por 12 horas y la radiactividad se midió en un contador Beckman modelo LS6000IC.

V.14 Síntesis y degradación del almidón

Las plantas usadas en este experimento se marcaron con ^{14}C como se indicó en la sección anterior. Un grupo de plantas se cosechó 4 h después del marcaje. Se midió la marca incorporada en almidón y estos datos se usaron para estimar la síntesis de este metabolito. Otro grupo de plantas se cosechó al día siguiente (12 horas de oscuridad). Se midió la marca incorporada en almidón y la degradación se estimó por la diferencia con los valores de las plantas cosechadas durante el período luminoso.

V.15 Purificación de los gránulos de almidón

Para la purificación de gránulos de almidón a partir de hojas frijol se siguió el procedimiento descrito por Ritte *et al.* (2000). Las hojas se molieron en un mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizaron con tres volúmenes de una solución amortiguadora que contenía Hepes KOH 100 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM, DTT 5 mM,

PMSF 0.5 mM y Tritón X-100 0.05% (v/v). El material homogeneizado se filtró con dos capas de malla de nylon y se centrifugó a 1000 g por cinco minutos, el sedimento se resuspendió en 10 ml de la misma solución y se centrifugó a la misma velocidad por 5 minutos. Esta operación se repitió otras dos veces; el paquete resultante se resuspendió en dos mililitros de solución amortiguadora y se depositó sobre 15 ml de Percoll al 95% en solución amortiguadora Hepes-KOH 500mM (pH 7.0) y se centrifugó por 15 minutos a 2000 g. Los gránulos de almidón se recuperaron del fondo, se lavaron resuspendiendo en solución amortiguadora y centrifugando a 1000 g por tres minutos. El lavado final se repitió hasta eliminar completamente el material verdoso. El almidón purificado se seco en horno a 55 °C.

V.16 Cinética de autodegradación de los gránulos de almidón

Se suspendieron 10 mg de almidón en 200 µl de Tris 50 mM (pH 7.0) y DTT 5 mM. Se incubaron a 25 °C por diferentes intervalos (0-4 horas). Después del tiempo se tomaron alícuotas que se centrifugaron a 1500 g durante un minuto y se cuantificaron los azúcares reductores en el sobrenadante.

V.17 Cinética de degradación de los gránulos de almidón con β-amilasa

Se incubaron 10 mg de almidón con 20 µg de β-amilasa purificada de hojas de frijol en una solución de Tris 50 mM (pH 7.0) y DTT 5 mM a 25 °C por cuatro horas. Después de ese tiempo la mezcla se centrifugó a 1500 g durante un minuto y se cuantificaron los azúcares reductores en el sobrenadante.

V.18 Lavado de los gránulos de almidón con dodecil sulfato de sodio (SDS)

Para remover las proteínas superficiales de los gránulos de almidón se usó el procedimiento reportado por Kotting (2005). Con este propósito 100 mg de almidón se resuspendieron en 1000 µl de una solución de SDS 0.5% (p/v). El material se mezcló en un agitador orbital durante 15 minutos y se centrifugó durante un minuto a 16000 g. Esta operación se repitió tres veces. Después se dieron tres enjuagues de 15 minutos con solución amortiguadora Tris 50 mM (pH 7.5) y uno más con agua desionizada. El almidón se resuspendió en agua y se utilizó para los ensayos de asociación de proteína.

V.19 Análisis de las proteínas de los gránulos de almidón

A. Proteínas débilmente unidas (superficiales)

Los gránulos de almidón (10 mg) se mezclaron con 100 μ l de solución amortiguadora de muestra: Tris 0.125 M (pH 6.8), SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v) y mercaptoetanol 10% (v/v). Las muestras se agitaron durante 15 minutos de manera intermitente en vortex. Se centrifugaron a 16000 g por 5 minutos y el sobrenadante se calentó a 85 °C por 5 minutos, para posteriormente someterlo a electroforesis desnaturizante.

B. Proteínas fuertemente unidas (internas)

Una vez que se removió la fracción que contenía las proteínas superficiales, la pastilla de almidón se lavó 3 veces con un ml de agua desionizada. Se resuspendió en 50 μ l de solución amortiguadora de muestra y se calentó 10 minutos a 85 °C. El material se centrifugó a 16000 g por 5 minutos y el sobrenadante se analizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Para visualizar las proteínas los geles se tñieron con plata (O'Connell y Stults, 1997; ver sección V.21).

V.20 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Se usaron geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970). La preparación del gel para la electroforesis SDS-PAGE se realizó de la siguiente manera:

	Gel separador (10% acrilamida)	Gel apilador (4% acrilamida)
Acrilamida 30% (p/v), bisacrilamida 2.7% (p/v)	3.33 ml	0.67
Tris 1.5M, ajustado pH 8.8 con HCl	2.50 ml	---
Tris 0.5 M, ajustado pH 6.8 con HCl	---	1.25 ml
Dodecil sulfato de sodio 10% (p/v)	0.10 ml	0.05 ml
Agua desionizada	4.00 ml	3.00 ml
Persulfato de amonio 10% (p/v)	0.10 ml	0.10 ml
TEMED	0.012 ml	0.012 ml
Volumen final	10.00 ml	5.00 ml

La solución amortiguadora para electrodos contenía Tris 0.025 M, glicina 0.192 M (pH 8.3), SDS 0.1% (p/v).

V.21 Tinción con plata

Esta técnica se adaptó de O'Connell y Stults, 1997. Después de la electroforesis desnaturalizante el gel se sometió a las siguientes etapas:

Fijación: Se dieron tres lavados de 30 minutos cada uno, con una mezcla de etanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v).

Enjuague: El gel se mantuvo en una solución de etanol 20% (v/v) durante 10 minutos y después en agua el mismo tiempo.

Sensibilización: Se mantuvo por un minuto en una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l.

Enjuague: Se dieron dos lavados con agua de 20 segundos cada uno.

Tinción con plata: Se usó una solución de AgNO_3 2 g/l y el gel permaneció en ella durante 30 minutos.

Enjuague: Se enjuagó con agua por 5-10 segundos.

Desarrollo de color: El gel estuvo en una solución de formaldehído (37%) 0.7 ml/l, K_2CO_3 anhidro 30 g/l y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l hasta que las bandas alcanzaron la intensidad de color deseada. La reacción se detuvo con una solución de Tris-base 50 g/l y ácido acético 2.5% (v/v).

V.22 Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida

Para la detección de actividad amilolítica en extractos de hoja se hicieron geles nativos (Ritte *et al.*, 2000). El gel separador contenía poliacrilamida al 6% (p/v) y amilopectina al 0.2% (p/v). Después de la electroforesis, los geles se incubaron por una hora a 37°C en una solución que contenía Tris 100 mM (pH 7.2), MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM y DTT 5 mM. Los geles se tiñeron con una solución de lugol: I_2 2.5% (p/v), KI 40% (p/v) y se mantuvieron en ella por 24 horas a 4 °C. Para obtener una mejor definición de las bandas se enjuagaron con agua corriente.

V.23 Western blot

Las proteínas separadas por electroforesis desnaturalizante (Laemmli, 1970) se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 μm de poro por medio de un sistema en

húmedo a razón de 0.75 mA/cm^2 durante una hora. Las membranas se procesaron siguiendo un método similar al de Ferreira y Shaw (1989):

1. Bloquear la membrana sumergiéndola en leche descremada al 5% (p/v) disuelta en PBS (cloruro de sodio 1.4 M, fosfato de potasio monobásico 0.015M, cloruro de potasio 0.03 M, azida de sodio 0.03 M, fosfato dibásico de sodio 0.16M) con Tween 20 al 0.1% (v/v) por un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente.
2. Desechar la solución anterior y agregar el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo fresca. Se probaron con anticuerpos obtenidos contra la proteína GWD diluidos 1:250 (donados por el Dr James LLoyd de Riso National Laboratory, Dinamarca), contra la β -amilasa, diluidos 1:250, contra la concanavalina, diluidos 1:5,000 y contra las proteínas 14-3-3, diluidos 1:250.
3. Incubar por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con agitación suave y constante.
4. Desechar la solución y hacer tres lavados de 10 min con PBS.
5. Agregar la solución del primer paso con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (1:5000).
6. Incubar con agitación constante por 1-2 horas a temperatura ambiente.
7. Hacer tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno.
8. Hacer un lavado con NaCl 0.58% y MgCl_2 al 0.1% en Tris-HCl 100 mM (pH 9).
9. Revelar con 100 μl de cloruro de nitrotetrazolio azul (nBT) (33 mg/ml en DMSO al 70%) y 100 μl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (17 mg/ml en DMSO) en una solución de NaCl 0.58% (w/v) y MgCl_2 al 0.1% (w/v) en Tris-HCl 100 mM (pH 9).

V.24 Medición de la actividad de la Rubisco

La medición de actividad se hizo en el extracto crudo que se preparó moliendo 500 mg de tejido con nitrógeno líquido y homogenizando con una solución amortiguadora que contenía Tricina NaOH 100 mM (pH 8), MgCl_2 10 mM, NaHCO_3 10 mM, EDTA 5 mM, DTT 10 mM y PMSF 1 mM. Se centrifugó a 15000 g por 10 minutos y el sobrenadante se usó para medir la actividad. El ensayo se inició agregando 50 μl de extracto a 50 μl de la mezcla de reacción (Tricina NaOH 100 mM (pH 8), MgCl_2 10 mM, $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (100

$\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) y 0.5 mM RuBP). Después de un minuto a 25 °C, la reacción se detuvo con 200 μl de HCl 3 N en metanol. Las muestras se evaporaron a 65 °C y el $^{14}\text{CO}_2$ incorporado en compuestos estables en ácido se midió en un contador de centelleo Beckman modelo LS6000IC (Martínez-Barajas, 1994).

V.25 Activación e inactivación de la Rubisco

Estos experimentos se realizaron con el objeto de definir si el almidón protegía a la Rubisco de la oxidación con GSSG. Se midió la actividad de la enzima en presencia de DTT 10 mM, GSSG 10 mM ó con GSSG 10 mM más almidón 6 mg/100 μl .

V.26 Ensayo de asociación de proteínas

10 mg de almidón lavado con SDS 0.5% (p/v) se suspendieron en 100 μl de agua, se mezclaron con 100 μl de solución amortiguadora Tris 50 mM (pH 7.0) y 100 μl de β -amilasa purificada o extracto enzimático. La mezcla se depositó en tubos Ependorff de dos mililitros y se mantuvo en agitación rotatoria por 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1500 g por un minuto y se lavó dos veces con solución amortiguadora Tris 50 mM (pH 7.0). La pastilla se resuspendió en 50 μl de solución amortiguadora de muestra (Tris 0.125 M, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), mercaptoetanol 10% (v/v)), con agitación intermitente en vortex durante 15 minutos. Se centrifugó a 16000 g por 5 minutos y el sobrenadante se calentó 5 minutos a 85 °C para, posteriormente, analizarlo en geles de electroforesis desnaturalizante.

V.27 Purificación de cloroplastos

Se hizo una adaptación de la técnica de Weigel y Grazebrook, 2002. Las plantas se mantuvieron en oscuridad por lo menos cinco horas antes de la preparación de los cloroplastos. Se colectó la primera hoja de las plantas, se cortó en tiras delgadas de aproximadamente 2-3 mm. Se le agregaron cinco volúmenes de una solución amortiguadora de homogenización que contenía Hepes 50 mM (pH 7.5), EDTA 2 mM, MgCl_2 1 mM, sorbitol 6.0% (p/v) y albúmina bovina 0.25% (p/v). El tejido se homogenizó en una licuadora dando 5 pulsos cortos de aproximadamente 5 segundos cada uno. El material molido se filtro a través de una malla de nylon y el filtrado se centrifugó a 2000 g

por 8 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento con los cloroplastos se resuspendió cuidadosamente con un pincel en el amortiguador de homogeneización remanente. Este material se cargó con pipeta (usando una punta de un mililitro con la punta recortada) sobre un gradiente de Percoll preparado como se muestra en la Tabla IV.1. Se centrifugó a 6000 g por 10 minutos (sin freno), en un rotor de columpio. Se recuperó la banda de la interfase 40/80 y se centrifugó a 2000 g por 8 minutos. La pastilla se lavó con el amortiguador de homogeneización sin BSA y se centrifugó a 2000 g por 8 minutos. Un sobrenadante claro indica una buena integridad de los cloroplastos. Los cloroplastos se resuspendieron en una solución amortiguadora Tris 20 mM (pH 7.5), DTT 3 mM y 3.4 mg/ml (p/v) de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche).

Tabla IV.1. Composición de la solución para obtener el gradiente de Percoll

	Percoll 80%	Percoll 40%
PBF Percoll	5 ml	8 ml
Agua destilada	-	7.6 ml
EDTA 0.5M (pH 8)	25 µl	80 µl
MgCl ₂ 1 M	8.2 µl	20 µl
MnCl ₂ 1 M	8.2 µl	20 µl
Amortiguador Hepes 1M (pH 7.5)	312 µl	1 ml
Sorbitol 2 M	1 ml	3.3 ml

Las cantidades indicadas son las necesarias para hacer dos gradientes. PBF Percoll: 450 mg PEG 4000, 150 mg BSA, 150 mg Ficoll, 15 ml Percoll.

V.28 Medición de glutatión oxidado (GSSG)

El GSSG se cuantificó de acuerdo con el método de Akerbroom y Sies (1981). El ensayo se basa en la cuantificación de NADPH que se transforma en NADP⁺ por la acción de la enzima glutatión reductasa. 100 µl de muestra se mezclaron con la mezcla de reacción de tal forma que la concentración final sea fosfato 100 mM (pH 7), EDTA 1 mM, NADPH 0.1 mM (disuelto en NaHCO₃ al 5%). Se incubó a 25 °C y se midió la línea basal a 340 nm. La reacción se inició al adicionar 0.1 U de la enzima glutatión reductasa (diluida en amortiguador de fosfato pH 7 y NADPH 10µM) y se siguió la desaparición de NADPH.

V.29 Detección *in situ* de H₂O₂ con diaminobencidina

La 3,3-diamino bencidina (DAB) polimeriza instantáneamente cuando está en contacto con H₂O₂ en presencia de peroxidasa, formando un compuesto café rojizo estable en

diferentes solventes (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Durante el período de oscuridad se cortó la primera hoja verdadera de plantas de tres semanas de edad. Los peciolo se sumergieron en una solución de DAB 1 mg/ml (pH 3.8, es necesario un pH ácido para disolver a la DAB) durante 12 horas en oscuridad. Posteriormente, se decoloraron con etanol en ebullición. Las hojas tratadas se almacenaron en una mezcla de ácido acético 30% (v/v) y glicerol 30% (v/v). El peróxido se detecta visualmente como una coloración parda rojiza en las hojas.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

VI.1 Causas de la acumulación de almidón en hojas maduras de frijol durante la deficiencia de fósforo

Todos los experimentos que a continuación se describen se hicieron con hojas maduras de plantas de frijol del genotipo MAR1 que por 3 semanas fueron regadas con una solución nutritiva completa (500 μM de P_i) o con una carente de P_i . Bajo estas condiciones, la acumulación de almidón que es uno de los síntomas más consistentemente observados en las hojas maduras de las plantas de frijol sometidas a deficiencia de P_i , puede ser el resultado de cambios en el balance entre los procesos de síntesis y degradación. Con el objeto de definir si la deficiencia de P_i incrementa la síntesis de almidón, se analizó la distribución del ^{14}C asimilado entre azúcares solubles y almidón. Se observó que la deficiencia de P_i no induce cambios importantes (Figura VI.1), lo cual sugiere que, al menos en esta etapa de desarrollo, la síntesis no es la causa más importante de la acumulación de almidón que se observa en plantas cultivadas en deficiencia de P_i .

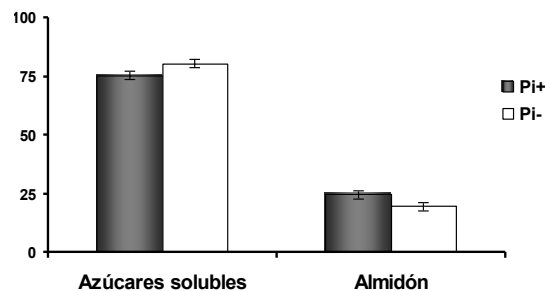


Figura VI.1. Distribución de marca (^{14}C) en carbohidratos de hojas maduras de frijol. Plantas regadas con solución Hoagland completa (■) y plantas regadas con solución Hoagland sin P_i (□).

La mayor parte del almidón que se sintetiza en las hojas se degrada durante la noche. Para evaluar el efecto de la deficiencia de P_i sobre la velocidad de degradación del almidón, se realizó un ensayo en el que se cuantificaron, la incorporación de ^{14}C en el almidón durante el período de luz y la fracción de ^{14}C que permaneció en éste, después de un período de oscuridad. Como se esperaba, las plantas no mostraron diferencia en la síntesis de almidón. Sin embargo, la cantidad de ^{14}C que permaneció en el almidón

después del período de degradación se incrementó en las hojas de las plantas sometidas a deficiencia de Pi (Figura VI.2).

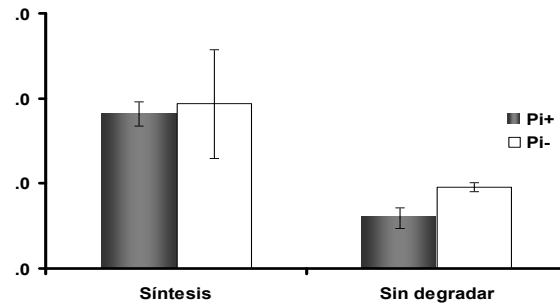


Figura VI.2. Contenido de ¹⁴C en almidón después de un período de luz (síntesis) y después de un período de oscuridad (degradación). Plantas regadas con Pi (■) y plantas regadas sin Pi (□).

Estos resultados sugieren que la acumulación de almidón que se observa en plantas cultivadas en deficiencia de Pi es el resultado de una menor degradación.

Adicionalmente, se analizó la velocidad de degradación de almidón y su relación con la cantidad de Pi durante un período de 18 horas de oscuridad, para lo cual a diferentes intervalos se tomaron muestras de plantas que se pusieron en oscuridad desde las 15:00 horas hasta las 9:00 horas del día siguiente. Los resultados obtenidos se ajustaron a una ecuación de decaimiento exponencial sencilla (Figura VI.3). Se observó que la velocidad con que se degrada el almidón en las plantas que crecen sin fosfato se reduce 30%.

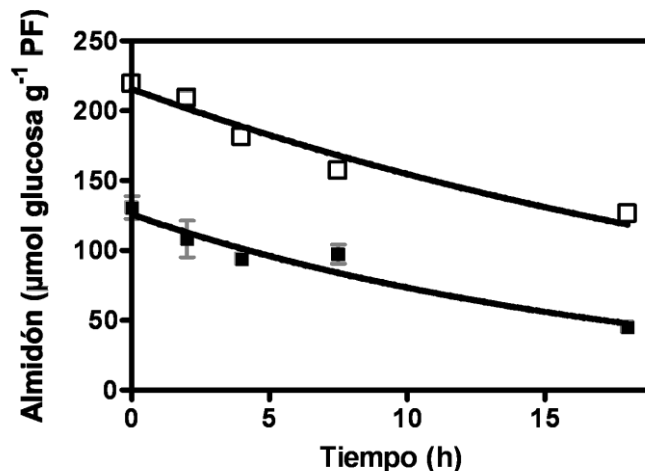


Figura VI.3. Curso temporal de la degradación de almidón. Plantas de frijol de 3 semanas se colocaron en oscuridad a las 15:00 horas (tiempo 0). Los datos reportados corresponden al contenido de almidón en la hoja madura de las plantas. ■ : Plantas cultivadas en suficiencia de fosfato (500 μM Pi). □ : Plantas cultivadas sin fosfato.

En la Figura VI.4, se muestran los cambios en los niveles de Pi durante el período de oscuridad. Como puede observarse, en las hojas de las plantas cultivadas en deficiencia de Pi hay menos fosfato. Tanto en las plantas control, como en las sometidas a deficiencia, los niveles de Pi se reducen ligeramente a lo largo del periodo de degradación del almidón, sin embargo, estos cambios son menores a los registrados en la velocidad de degradación (Figura VI.3).

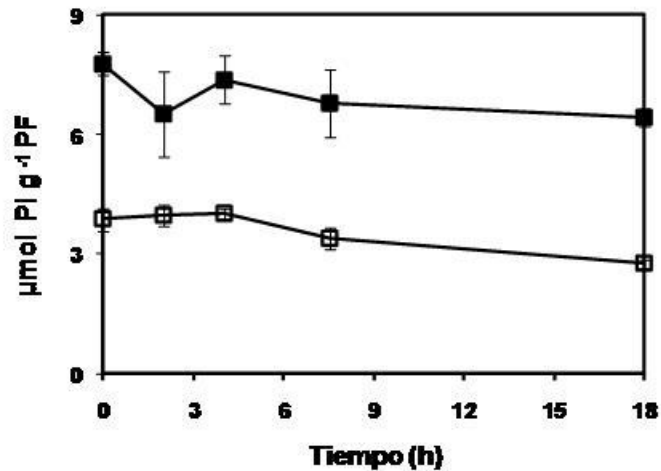


Figura VI.4. Contenido de fosfato en las hojas de plantas de frijol colectadas a diferentes horas del día. Plantas de frijol de 2.5 semanas se colocaron en oscuridad a las 15:00 horas (tiempo 0). Los datos reportados corresponden al contenido de fosfato en la hoja madura de las plantas. ■: Plantas cultivadas en suficiencia de fosfato (500 µM Pi). □: Plantas cultivadas sin fosfato.

VI.2 Patrón de la acumulación de almidón inducido por la deficiencia de fosfato

Se estudió el patrón de acumulación de almidón y su relación con el nivel de Pi. Se encontró que la acumulación de almidón en las hojas de plantas de frijol cultivadas en condiciones de deficiencia de Pi es gradual (Figura VI.5). Este hecho es consistente con la disminución ligera en la velocidad de degradación que se observó (Figura VI.3) y puede conducir, a lo largo de varios días, a la acumulación de grandes cantidades de almidón.

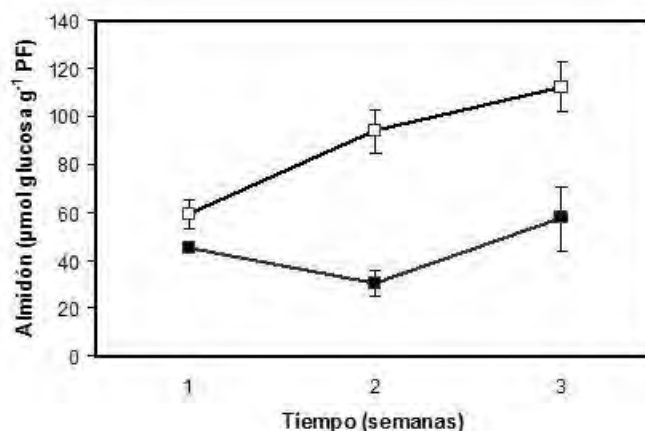


Figura VI.5. Acumulación de almidón en hojas de plantas de frijol. Se usó la primera hoja verdadera de las plantas. ■: Plantas cultivadas en suficiencia de fósforo (500μM Pi). □: Plantas cultivadas sin fósforo.

La evaluación de la cantidad de Pi presente en las hojas mostró un efecto muy claro de los tratamientos. Sin embargo, aun cuando las cantidades de Pi siempre fueron mayores en las plantas regadas con la solución nutritiva completa, en ambos casos se apreció que los niveles fueron más altos en la primera semana y disminuyeron a medida que pasó el tiempo. La diferencia más notable se aprecia en la semana dos (Tabla VI.1). Este comportamiento es un claro indicador de la redistribución del Pi disponible y de como esto puede favorecer el desarrollo de los órganos jóvenes.

Tabla VI.1. Contenido de fósforo en hojas de plantas de frijol

	μmoles Pi g ⁻¹ PF	
	Pi+	Pi-
Semana 1	33.9±3.1	22.1±1.2
Semana 2	14.9±0.5	6.6±0.4
Semana 3	7.2±0.2	4.3±0.5

La cuantificación se hizo en la primera hoja verdadera de las plantas de frijol cultivadas en condiciones de suficiencia (Pi+) o deficiencia de fósforo (Pi-).

VI.3 Efecto de la deficiencia de fósforo sobre algunas características de los gránulos de almidón

Muchas de las enzimas que participan en los procesos de síntesis y degradación del almidón se asocian a la superficie de los gránulos. Por esa razón, se investigó si la deficiencia de Pi podía modificar las propiedades de los gránulos y si tenía algún impacto en la susceptibilidad de los mismos a la degradación.

VI.3.1. Tamaño de los gránulos

Se obtuvo almidón de hojas de plantas crecidas en suficiencia y deficiencia de fosfato (Ritte *et al.*, 2000) y su morfología se comparó por medio de microscopía electrónica de barrido. En ambos casos el tamaño promedio fue de aproximadamente 2-3 μm . También, se observaron partículas de menor tamaño, las cuales fueron más abundantes en el almidón producido por las plantas cultivadas con Pi (Figura VI.6).

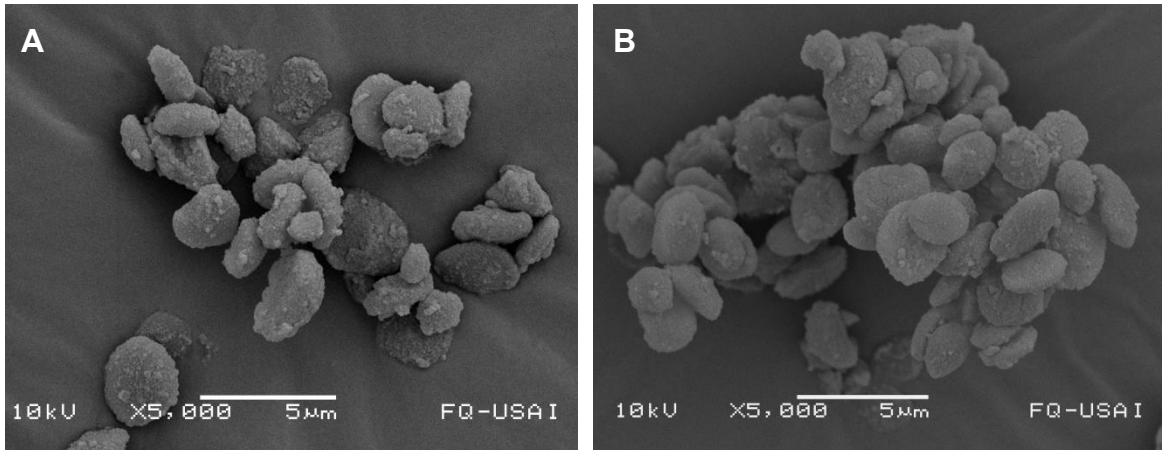


Figura VI.6. Tamaño de los gránulos de almidón de las hojas de frijol de tres semanas. A. Plantas cultivadas en suficiencia de Pi. B. Plantas cultivadas sin Pi.

VI.3.2. Contenido de fosfato y amilosa

La degradación del almidón es un proceso complejo y aún no bien comprendido que requiere la acción conjunta de diversas enzimas. Se ha propuesto que el grado de fosforilación constituye un factor que facilita la asociación de proteínas e incrementa la susceptibilidad del almidón a ser degradado (Blennow *et al.*, 2002; Ritte *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha propuesto que la proporción amilosa/amilopectina también contribuye a modificar la susceptibilidad a la degradación del almidón. En ese contexto, se midieron los niveles de fosfato y amilosa en los gránulos de almidón de hojas de plantas de frijol cultivadas con y sin fosfato (Tabla VI.2), observándose que la deficiencia de Pi reduce a la mitad el contenido de Pi en el almidón y duplica la proporción relativa de amilosa.

Tabla VI.2. Características de los gránulos de almidón de hoja de frijol.

Tratamiento	Fosfato ($\mu\text{moles g}^{-1}$ almidón)	Amilosa (%)	Amilopectina (%)
Pi+	2.1 \pm 0.20	6.6-9.2	90.8-93.4
Pi-	1.2 \pm 0.04	16.3-25.1	74.9-83.7

VI.4. La deficiencia de fosfato modifica la asociación de proteínas con el gránulo de almidón

VI.4.1. Proteínas asociadas a los gránulos de almidón

Recientemente, se estableció que los gránulos interactúan con diferentes proteínas que participan tanto en la síntesis como en la degradación del almidón. Con el objeto de investigar si la reducción en la degradación del almidón que se observa en plantas que crecieron en deficiencia de Pi está relacionada con la capacidad de los gránulos para asociar proteínas, se estudiaron los patrones de proteínas que se encuentran unidas a la superficie o atrapadas en el interior de los gránulos en períodos de luz y oscuridad. En la Figura VI.7 se observa que los gránulos de las plantas cultivadas con Pi tienen más proteínas (tanto superficiales como internas) y la transición luz-oscuridad tiene poco efecto sobre el total de las proteínas unidas. Esta figura también sugiere que la principal diferencia entre el patrón de las proteínas de los gránulos Pi+ y Pi- es el contenido relativo de las diferentes proteínas, ya que muchas de las bandas son idénticas en ambos casos.

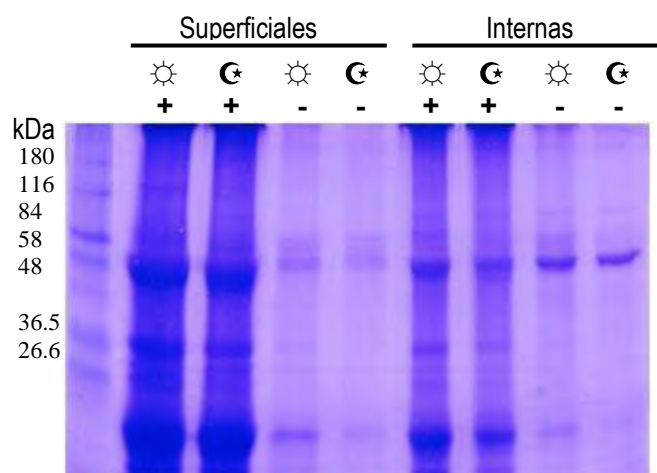


Figura VI.7. Proteínas asociadas a gránulos de almidón. Las proteínas se recuperaron de los gránulos, se analizaron con electroforesis desnaturalizante y se tiñeron con azul de Coomassie. ☀: Muestras colectadas a las 12:00 h. ☾: Muestras colectadas después de 4 horas de oscuridad. + : Almidón de plantas cultivadas con Pi. - : Almidón de plantas cultivadas sin Pi.

Con el fin de establecer la identidad de las proteínas que interactúan con el almidón, se secuenciaron algunas de las bandas más importantes. Los resultados de la secuenciación se muestran en la Figura VI.8.

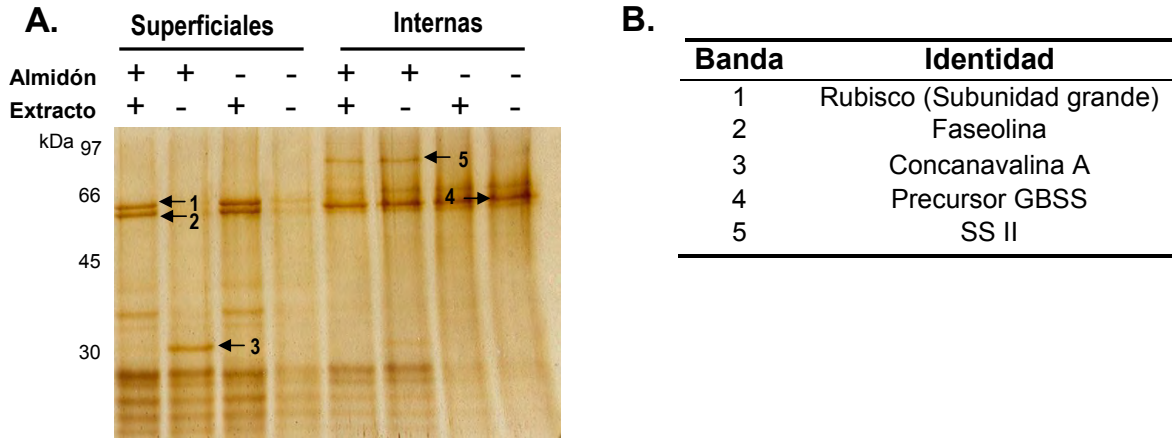


Figura VI.8. Identidad de algunas proteínas asociadas a gránulos de almidón. A. Proteínas que se recuperaron de gránulos de almidón después de estar en contacto con extractos cloroplásticos, se analizaron con electroforesis desnaturalizante y se visualizaron mediante tinción con plata. +: Almidón o extracto de plantas cultivadas con Pi. -: Almidón o extracto de plantas cultivadas sin Pi. B. Identidad de las proteínas que se señalan en el gel A.

Muchas de las proteínas presentes en la superficie de los gránulos pueden ser lavadas con SDS (dodecil sulfato de sodio, por sus siglas en inglés) al 0.5% (Figura VI.9).

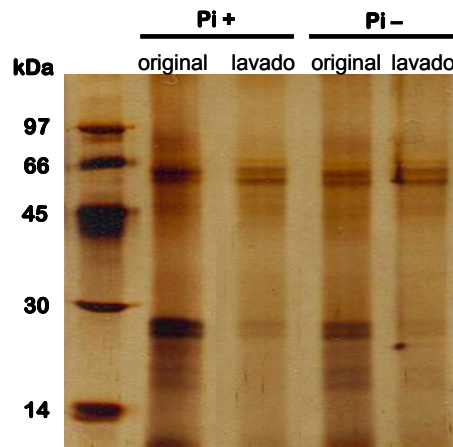


Figura VI.9. Proteínas asociadas a los gránulos de almidón de hojas de plantas de frijol cultivadas con y sin Pi. Las proteínas se separaron con electroforesis desnaturalizante y se tiñeron con plata. El almidón original es el obtenido después de la purificación y el almidón lavado es el purificado y lavado tres veces con SDS 0.5%. Pi+: Plantas cultivadas en suficiencia de fosfato (500 μ M Pi). Pi-: Plantas cultivadas sin fosfato.

Para investigar la capacidad del almidón de unir proteínas se hicieron ensayos en los que el almidón purificado de plantas Pi⁺ y Pi⁻ y lavado con SDS se puso en contacto con extractos de hojas maduras procedentes de plantas cultivadas en condiciones de suficiencia y deficiencia de Pi.

Como se puede observar en la Figura VI.10, la asociación de proteínas con los gránulos es un proceso dinámico que depende fundamentalmente de la naturaleza del gránulo de almidón, pues los gránulos provenientes de plantas cultivadas con Pi tienen mayor capacidad para unir proteínas. Sin embargo, también es influenciada por el contenido de proteínas en el extracto. Este hecho sugiere que en el cloroplasto la interacción de los gránulos con las proteínas que participan en su degradación pudiera estar sometida a una regulación similar.

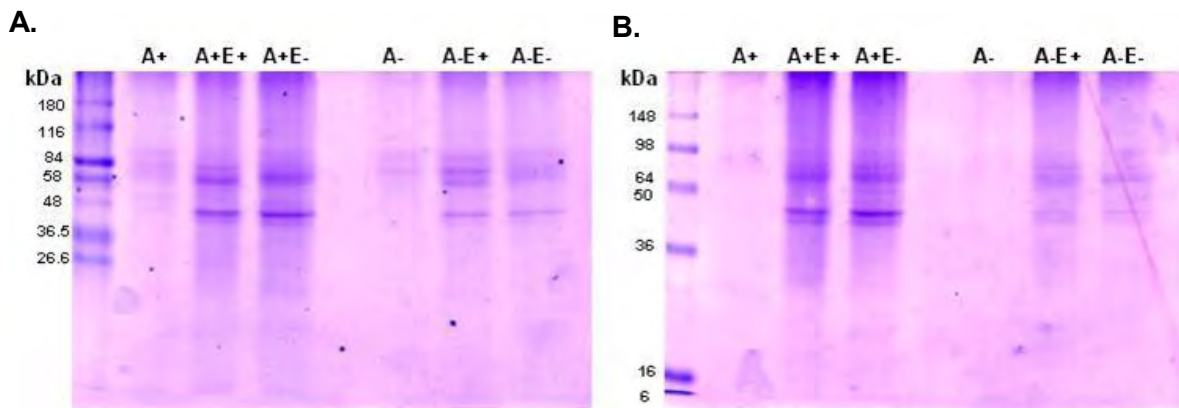


Figura VI.10. Proteínas que se unen a gránulos de almidón lavado después de estar en contacto con proteínas de extractos totales. Las proteínas se analizaron con SDS-PAGE y se visualizaron con azul de Coomassie. A. Los extractos se prepararon con plantas colectadas en el período luminoso. B. Los extractos se prepararon con plantas que estuvieron en oscuridad. M: marcadores masa molecular. A+: gránulos almidón lavado Pi⁺; A⁻: gránulos almidón lavado Pi⁻; E⁺: extracto de hojas de plantas cultivadas con Pi; E⁻: extracto de hojas de plantas cultivadas sin Pi.

VI.4.2 Asociación de las proteínas 14-3-3

Las proteínas 14-3-3 se han encontrado asociadas a los gránulos de almidón de polen de maíz y se ha sugerido que son importantes en la regulación del metabolismo del almidón en hojas, pues mutantes de una isoforma de estas proteínas se caracterizan por acumular almidón (Tetlow, 2004). Por esta razón y dado que entre las proteínas que se encuentran asociadas al almidón algunas tenían masas moleculares semejantes a las reportadas para estas proteínas (38 kDa), se hizo un análisis por western blot utilizando anticuerpos policlonales contra las proteínas 14-3-3.

Como se observa en la Figura VI.11A, los anticuerpos pueden detectar la presencia de las proteínas 14-3-3 en hojas y raíces de plantas de frijol. Se aprecia que en deficiencia de fosfato se incrementa el número de bandas que el anticuerpo reconoce en extractos de hojas jóvenes. Sin embargo, cuando se probaron las proteínas provenientes de los gránulos, no se encontraron asociadas a ellos (Figura VI.11B).

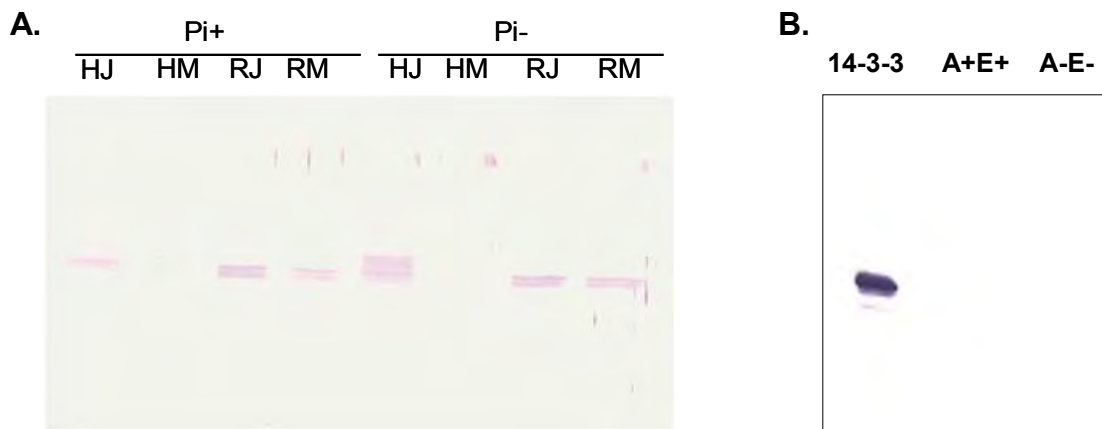


Figura VI.11. A. Inmunodetección de proteínas 14-3-3 en extractos totales de hojas jóvenes (HJ), hojas maduras (HM), raíces jóvenes (RJ) y raíces maduras (RM) de plantas de frijol. Se aplicaron 20 µg de proteína. **B. Ausencia de inmunodetección de proteínas 14-3-3 en la fracción de proteínas asociadas a gránulos de almidón.**

VI.4.3 Asociación de la glucan agua dicinasa a los gránulos de almidón

Por otro lado, junto con el establecimiento de la importancia de la fosforilación del almidón en el proceso de degradación, las proteínas glucan agua dicinasa (GWD, de sus siglas en inglés) y fosfoglucan agua dicinasa (PWD, de sus siglas en inglés) han sido identificadas como las responsables directas de la fosforilación de la amilopectina que está en la superficie de los gránulos (Kotting *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2001; Zeeman y ap Rees, 1999; Caspar *et al.*, 1991). La fosforilación puede modificar el empaquetamiento del gránulo y facilitar el ataque enzimático. Sin embargo, también se ha sugerido que el dominio N-terminal de la proteína GWD (cuya función es hasta ahora desconocida) podría facilitar la asociación de ésta y otras proteínas a los gránulos y promover su degradación (Smith, 2005).

Al investigar el efecto de la deficiencia de fosfato sobre la distribución de la proteína GWD en extractos totales de hojas, en extractos cloroplásticos y en los gránulos de almidón (Figura VI.12), se observó que durante la noche la proteína GWD es movilizad eficientemente al interior de los cloroplastos de las plantas cultivadas en ausencia de

fosfato (Figura VI.12E), sin embargo, por alguna razón se une al gránulo en menor cantidad (Figura VI.12D).

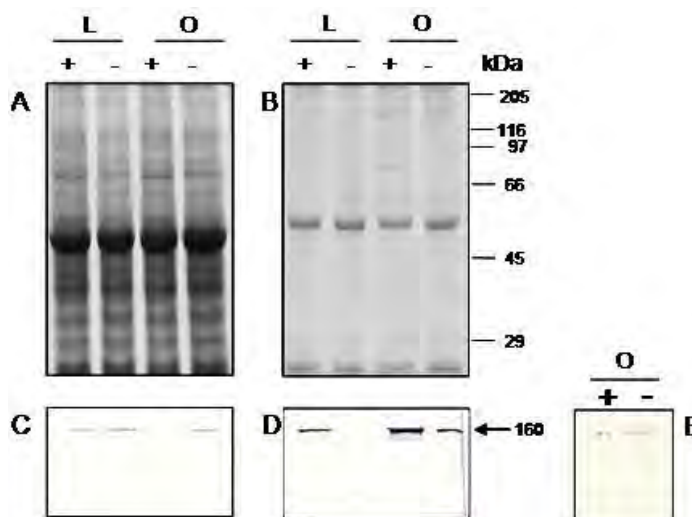


Figura VI.12. Detección de la proteína GWD. A y C en extracto de hoja B y D en gránulos de almidón y E extracto de cloroplastos, de plantas cultivadas con Pi (+) y sin Pi (-); L plantas cosechadas al mediodía y O después de 5 horas de oscuridad. A y B corresponden al análisis por SDS-PAGE, revelado con azul de Coomassie; C, D y E a la inmunodetección con anticuerpos contra GWD de papa. (Figura tomada del artículo que se incluye en el Anexo 1).

VI.5 Efecto del estrés por deficiencia de fosfato sobre la actividad de las enzimas que degradan almidón

Durante mucho tiempo la endo-amilolisis catalizada por α -amilasa fue aceptada como la primera etapa en la degradación del almidón, sin embargo, algunas evidencias muestran que la participación de esta enzima no es requerida en todas las especies. Por otro lado, en la actualidad existe consenso en cuanto al papel primordial de la β -amilasa en la degradación del almidón de hoja, dado que la maltosa, producida por la actividad de esta enzima, ha sido identificada como el principal producto de la degradación de los gránulos de almidón de hoja y la pérdida de las actividades de las enzimas β -amilasa y desramificadora (ISA3) reducen la velocidad de degradación del almidón, lo que conduce a su acumulación. La medición de la actividad de β -amilasa en extractos totales de hoja mostró que la actividad de esta enzima es mayor durante la noche y que se incrementa en las plantas cultivadas sin Pi (Tabla VI.3).

Se implementó la metodología para medir la actividad de las enzimas almidón fosforilasa y α -amilasa en extractos totales de hojas (Zeeman *et al.*, 1998), sin embargo bajo las condiciones utilizadas la actividad de estas dos enzimas no pudo ser detectada.

Tabla VI.3. Actividad de la β -amilasa en hojas de plantas de frijol de tres semanas de edad.

Tratamiento	$\mu\text{mol glu /min/ mg}$
Pi+ 13:00	3.8 \pm 0.4
Pi- 13:00	6.7 \pm 1.4
Pi+ 18:00	3.7 \pm 0.7
Pi- 18:00	6.1 \pm 0.4
Pi+ 22:45	6.3 \pm 1.0
Pi- 22:45	9.6 \pm 1.3

El material se colectó a las horas que se indican en la tabla.

VI.5.1 Purificación de la β -amilasa

No obstante la mayor actividad de β -amilasa, las plantas cultivadas en deficiencia de Pi tienen menor capacidad para degradar el almidón. Por lo cual, se decidió purificar y estudiar detalladamente esta enzima para investigar si la discrepancia se debía a cambios en propiedades de la enzima que pudieran haber sido inducidos por la deficiencia de Pi.

Como punto de partida para la purificación de la β -amilasa a partir de hojas de frijol, el extracto se fraccionó con polietilén glicol 10000 (PEG). En geles nativos se observó que las fracciones estaban enriquecidas en actividades amilolíticas con diferente movilidad electroforética (Figura VI.13), y se decidió purificar por separado la enzima de las fracciones 0-15% y 15-35%. La electroforesis desnaturante de las enzimas purificadas se muestra en la Figura VI.14A, donde se observa el mismo peso molecular aparente. Las enzimas purificadas fueron reconocidas por los anticuerpos contra la β -amilasa de papa (Figura VI.14B).

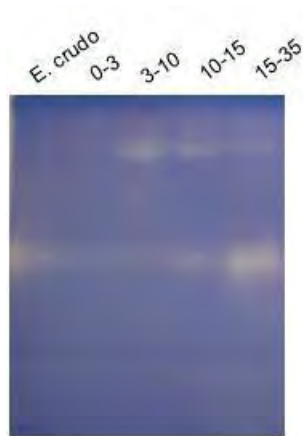


Figura VI.13. Actividad amilolítica después de la precipitación diferencial con PEG. Las proteínas del extracto de hojas que precipitaron a las diferentes concentraciones de polietilén glicol se separaron por electroforesis nativa en geles de poliácridamida y amilopectina y se tiñeron con solución de lugol.

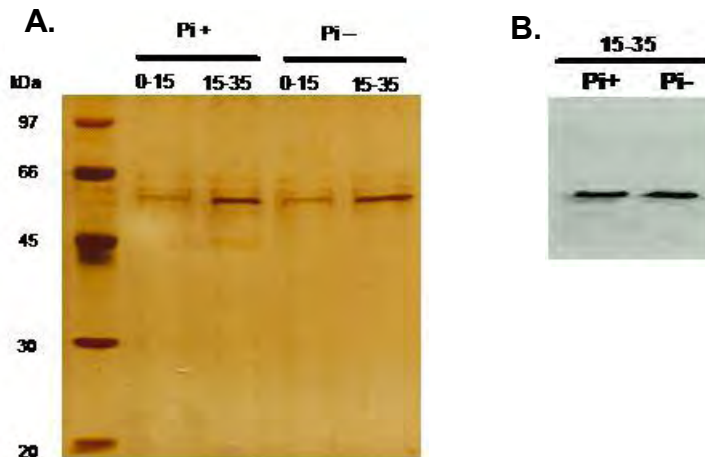


Figura VI.14. β -amilasas purificadas a partir de hojas de frijol. Pi+: Plantas cultivadas en suficiencia de fosfato (500 μ M Pi). Pi-: Plantas cultivadas sin fosfato. A. Electroforesis desnaturalizante y tinción con plata de las fracciones purificadas de 0-15% y 15-35% de PEG. B. Detección por western-blot.

Las enzimas se secuenciaron, encontrándose en ambos casos un alto grado de identidad con la β -amilasa de soja (Figura VI.15)

```

MATSDRNMLL  NYVPVYVMLP  LGVVTVDNVF  EDPDGLKEQL  LQLRAAGVDG  VMVDVWVGII  ELKGPQYDW  SAYRSLFQLV
QECGLTLQAI  MSFHQCGGNV  GDVVNIPIQ  WVLDIGESNP  DIFYTNRSGF  RNKEYLTVGV  DNEPIFHGR  AIEIYSDYMK
SFRENMSDFL  ESGLIIDIEV  GLGPAGELRY  PSYPQSQGWE  FPGIGDFQCY  DKYLKADFKA  AVARAGHPEW  ELPDDAGKYN
DVPESSTGFFK  SNGTYVTEKG  KFFLTWYSNK  LLNHGDQILD  EANKAFLSCK  VKLAIKVSIGI  HWWYKVENHA  AELTAGYYNL
NNRDGYRPIA  RLLSRHHAIL  NFTCLEMRDS  EQPSDAKSGP  QELVQQVLSG  GWREDIRVAG  ENALPRYDAT  AYNQIILNAR
POGVNNGPP  KLSMFGVTYF  RLSDDLQKS  NFNIFKFFVL  KMHADQDYCA  NPQYNHAIT  PWKPSAPKI  P  LEVLLLEATKP
I P P F P W L P E T  D M K V D G

```

Figura VI.15. Secuencia de la β -amilasa de soja en la que se marcan los péptidos identificados en las β -amilasas purificadas de frijol.

VI.5.2 Análisis cinético de las β -amilasas purificadas

Las enzimas de la fracción 15-35% se usaron para investigar si la deficiencia de Pi modificaba las características cinéticas de la β -amilasa. Se calcularon valores de K_m y V_{max} aparentes utilizando como sustrato el almidón purificado de las hojas de las plantas que crecieron en suficiencia de Pi (A+) con la β -amilasa purificada de las mismas plantas (E+) y, por otro lado, el almidón (A-) y la enzima (E-) obtenidos de las plantas que crecieron en deficiencia de Pi. La deficiencia de Pi produjo un aumento significativo en los valores de K_m y V_{max} , sin embargo, al calcular el cociente V_{max}/K_m se observó que no existe diferencia significativa en la eficiencia catalítica de ambas enzimas (Tabla VI.4).

Tabla VI.4. Parámetros cinéticos de la β -amilasa purificada de hojas de frijol.

	K_m aparente (mg/l)	V_{max} (μ mol/min)	V_{max} / K_m (μ mol l/mg min)
E/A (+/+)	0.010 \pm 0.002	5.72 \pm 0.91	560
E/A (-/-)	0.027 \pm 0.001	12.82 \pm 0.49	480

VI.5.3 Estudio de la regulación por óxido-reducción de la β -amilasa

Los resultados anteriores sugieren que es poco probable que la β -amilasa (la actividad total y sus propiedades cinéticas) sea la causa directa de la acumulación de almidón que se observa en las hojas de plantas de frijol que han sido cultivadas sin fosfato; sin embargo, existe la posibilidad de que la deficiencia de Pi afectara su regulación. Algunas enzimas que participan en el metabolismo del almidón como la GWD son reguladas por el estado redox (Mikkelsen *et al.*, 2005). Se ha sugerido que este tipo de regulación es importante para sincronizar diferentes procesos con los ciclos luz-oscuridad. Por lo que, para investigar si la β -amilasa estaba sujeta a una regulación similar y si la deficiencia de Pi modificaba su respuesta a cambios en el estado redox, se realizó un ensayo en el que las enzimas purificadas se mantuvieron en un ambiente oxidante (glutacion oxidado, GSSG), o en uno reductor (ditiotreitól, DTT).

Como se muestra en la Figura VI.16, la β -amilasa redujo su actividad en estado oxidado y la deficiencia de Pi no modificó la respuesta de las enzimas: ambas incrementaron su actividad en estado reducido y la disminuyeron cuando se oxidaron.

La mayor parte del almidón que se acumula en las hojas durante el día se degrada por la noche y existen evidencias que indican que durante la noche prevalece un estado oxidante. Esto sugiere, que la actividad de β -amilasa podría convertirse en una limitante para la degradación eficiente del almidón.

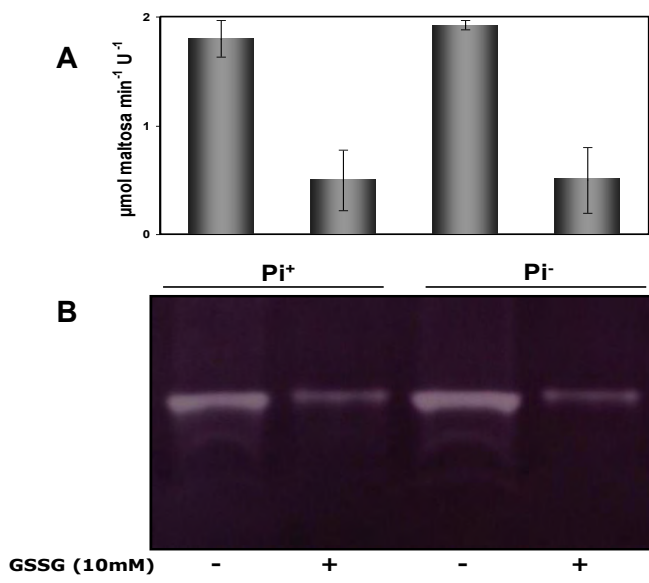


Figura VI.16. A. Actividad de la enzima β -amilasa en diferentes condiciones de óxido-reducción. B. Gel de actividad amilolítica.

VI.6 Las proteínas asociadas a los gránulos de almidón modifican la susceptibilidad de los gránulos al ataque enzimático

Se ha propuesto que muchas de las proteínas que participan en el metabolismo del almidón se encuentran asociadas a la superficie de los gránulos y se ha identificado a la fosforilación que catalizan las enzimas GWD y PWD como un elemento que modifica la hidrofobicidad de la superficie del gránulo y favorece la asociación de proteínas amilolíticas (Reimann *et al.* 2007). Como se mencionó, en este estudio se encontró que la deficiencia de Pi reduce el grado de fosforilación del almidón (Tabla VI.2) y la asociación de la proteína GWD a los gránulos (Figura VI.12). Resultados adicionales sugieren que los gránulos que provienen de plantas cultivadas en deficiencia de Pi tienen menor capacidad de asociar proteínas (Figuras VI.7 y VI.10). Por lo que, se estudió si las proteínas asociadas a la superficie de los gránulos de almidón modificaban la susceptibilidad de los mismos a la β -amilolisis. Dado que el lavado con SDS al 0.5%

permite remover la mayoría de las proteínas asociadas a la superficie de los gránulos (Figura VI.9), se hicieron ensayos para comparar la velocidad de degradación con β -amilasa de gránulos de almidón con y sin proteínas asociadas (Figura VI.17).

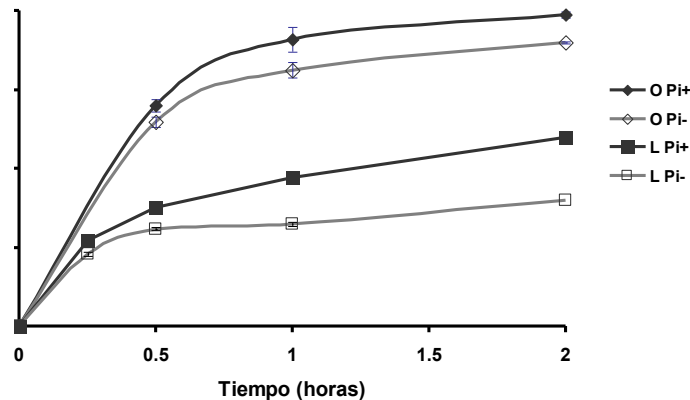


Figura VI.17. Efecto de las proteínas asociadas sobre la degradación de los gránulos de almidón. Los gránulos de almidón fueron aislados de las hojas de plantas de frijol cultivadas con o sin Pi (OPi+, OPi-) o fueron aislados y desproteinizados con SDS al 0.5% (LPi+, LPi).

Como se observa en la Figura VI.17, el almidón que tiene proteínas asociadas se degrada más rápidamente. Por otro lado, el almidón de las plantas que crecieron en deficiencia de Pi es menos susceptible a ser degradado y esta diferencia se incrementa cuando se eliminan las proteínas superficiales. Estos resultados demuestran que las proteínas asociadas a la superficie de los gránulos facilitan la degradación del almidón.

Una pregunta que surgió con estos resultados fue: ¿cualquier proteína que está unida a la superficie de los gránulos favorece la degradación del almidón? Para responderla se hicieron ensayos en los que gránulos de almidón lavados con SDS al 0.5% se pusieron en contacto con albúmina o concanavalina A. Se analizó la capacidad de estas proteínas para unirse a los gránulos y después se midió la susceptibilidad de éstos a la degradación por la β -amilasa. Los resultados muestran que la albúmina no se une a los gránulos, mientras que la concanavalina A si lo hace (Figura VI.18A). No obstante, en ninguno de los casos hay cambios en la susceptibilidad a la degradación del almidón por la β -amilasa (Figura VI.18B).

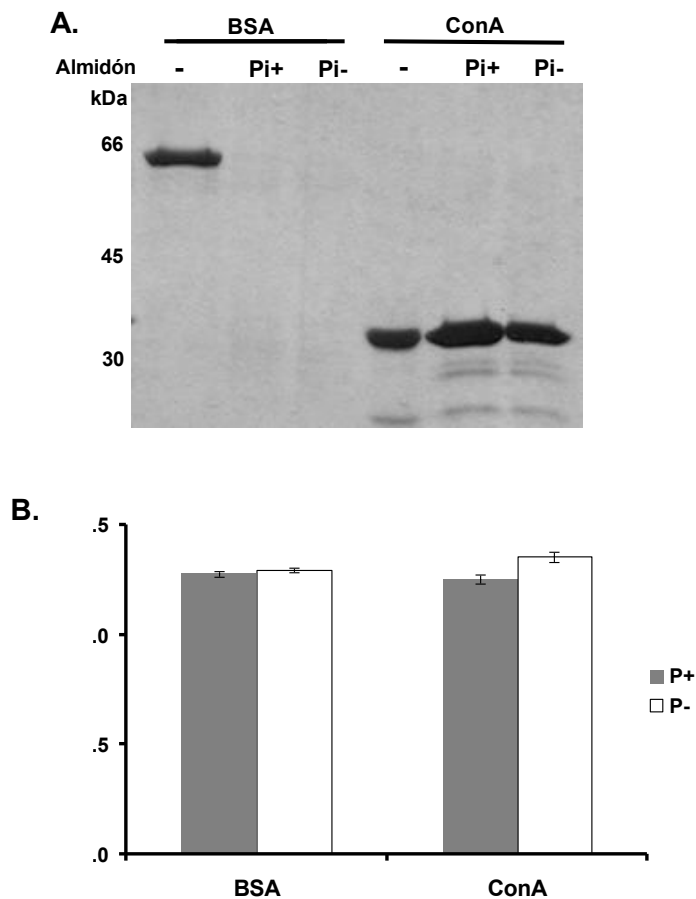


Figura VI.18. Efecto de la asociación de albúmina (BSA) y concanavalina A (ConA) a los gránulos de almidón sobre la actividad de β -amilasa. A. Electroforesis SDS de las proteínas unidas al almidón. B. Azúcares liberados por la β -amilasa de gránulos de almidón obtenidos las hojas de frijol crecidas en presencia (■ P+) y ausencia de fosfato (□ P-).

VI.7 Efecto del estado redox sobre la degradación del almidón

Los datos obtenidos muestran que las plantas que crecen en deficiencia de fosfato tienen una mayor actividad amilolítica *in vitro* (Tabla VI.4), sin embargo eso no es suficiente para que la degradación del almidón *in vivo* sea eficiente. Por otro lado, la actividad de la β -amilasa se incrementa en estado reducido (Figura VI.16), y se ha reportado que durante la noche (cuando tiene lugar la degradación del almidón), las condiciones predominantes son oxidantes (Buchanan, 1980). Esto nos llevó a analizar el efecto de las condiciones oxidantes sobre la capacidad de la β -amilasa para degradar los gránulos de almidón. Para tal efecto, los gránulos de almidón purificados de plantas cultivadas con y sin Pi se incubaron con β -amilasa purificada de plantas cultivadas en las mismas condiciones y se

evaluó tanto la capacidad de las enzimas para unirse a los gránulos como la eficiencia con la que catalizan la hidrólisis de los mismos.

Como se observa en la Figura VI.19B, las condiciones oxidantes favorecen la asociación de la β -amilasa a los gránulos del almidón. Esto es particularmente evidente para los gránulos y la enzima purificados de plantas que crecieron en suficiencia de Pi. La unión de la β -amilasa a los gránulos purificados de plantas cultivadas en deficiencia de Pi es menos dependiente del estado redox, pero también se incrementa en condiciones oxidantes.

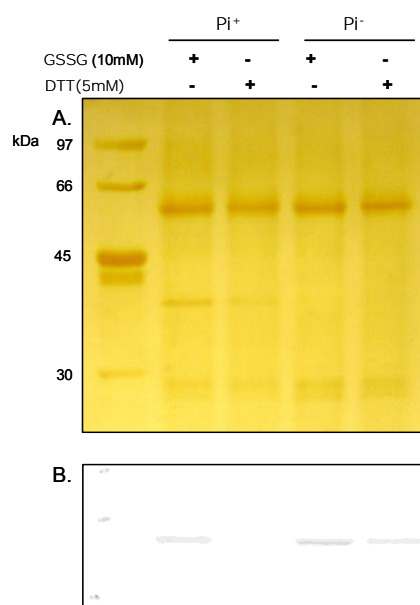


Figura VI.19. Unión de β -amilasa a gránulos de almidón de hoja en condiciones oxidantes y reductoras. Los gránulos de almidón se pusieron en contacto durante 30 minutos con β -amilasa purificada, después de los cuales se suspendieron en amortiguador de muestra con SDS. A. Análisis de las proteínas asociadas a la superficie de los gránulos de almidón con SDS-PAGE y tinción con plata. B. Detección de β -amilasa por western-blot.

Previamente habíamos observado que el tratamiento con GSSG provocaba un 70% de reducción de la actividad de β -amilasa sobre amilopectina (Figura VI.16); sin embargo, en este experimento se observó que esas mismas condiciones tuvieron poco efecto sobre la liberación de glucosa (hidrólisis de almidón) al realizar el ensayo en presencia de almidón. Con gránulos y enzima que provienen de plantas cultivadas con Pi prácticamente no hubo efecto, mientras que con gránulos y enzima purificados de plantas cultivadas en deficiencia de Pi la oxidación disminuyó en apenas 20% la degradación que sufrió el almidón (Figura VI.20).

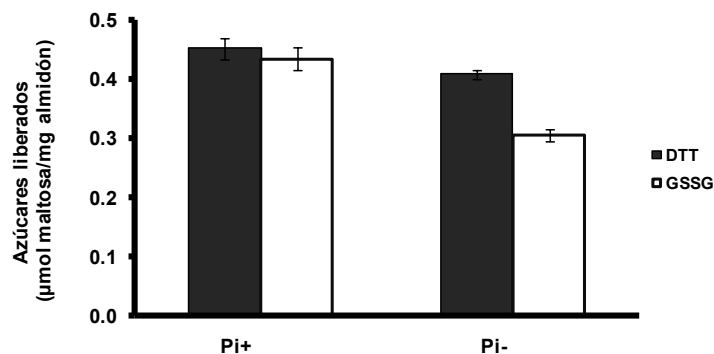


Figura VI.20. Efecto del estado redox sobre la degradación de gránulos de almidón de plantas que crecieron en suficiencia y deficiencia de Pi. Amilolisis con almidón y β -amilasa que provienen de plantas que crecieron con fosfato (Pi+) o sin fosfato (Pi-). El ensayo se realizó en presencia de 5 mM de DTT o 10 mM de GSSG.

Una posible causa de la discrepancia entre los resultados del efecto de la oxidación sobre la actividad de β -amilasa puede ser la diferencia de sustratos, es decir, que la degradación de amilopectina fuera más sensible que la degradación de almidón. Para descartar esta posibilidad, en la Figura VI.21 se muestra un gel de actividad en donde se usó amilopectina como sustrato para analizar la actividad de la β -amilasa después de haber sido incubada en condiciones oxidantes y reductoras tanto en ausencia como en presencia de almidón. Tal como lo habíamos observado (Figura VI.16B), cuando la enzima está sola, la oxidación es responsable de la pérdida de una fracción muy importante de la actividad. Si la incubación se hace en presencia de almidón y después de 30 min se analiza la actividad en el sobrenadante, se observa que la presencia de almidón protege a la β -amilasa.

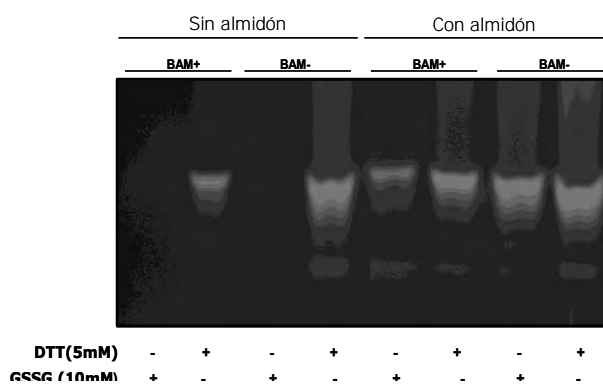


Figura VI.21. Efecto protector del almidón sobre la actividad de β -amilasa (BAM). La enzima purificada de las plantas que se cultivaron con Pi (BAM+) o sin Pi (BAM-) se incubó 30 minutos con DTT 5 mM o GSSG 10 mM y su actividad se evaluó en un gel nativo de poliacrilamida al 6% y amilopectina 2 mg/ml que se tiñó con lugol.

Previamente observamos que la β -amilasa se une a los gránulos (Figura VI.19), sin embargo, el hecho de que la enzima soluble mantenga la actividad hace pensar que la protección podría ser mediada por los productos de la degradación del almidón. En un experimento posterior analizamos si la maltosa podía proteger a la actividad de β -amilasa de la inactivación por oxidación. Los resultados fueron negativos.

La figura VI.22 muestra un curso temporal de la inactivación de β -amilasa, en este caso se uso H_2O_2 como agente oxidante. Como puede observarse la presencia de almidón reduce eficientemente la velocidad con la que la enzima se inactiva. Sin embargo, también es claro que si las condiciones oxidantes prevalecen la enzima finalmente se inactiva.

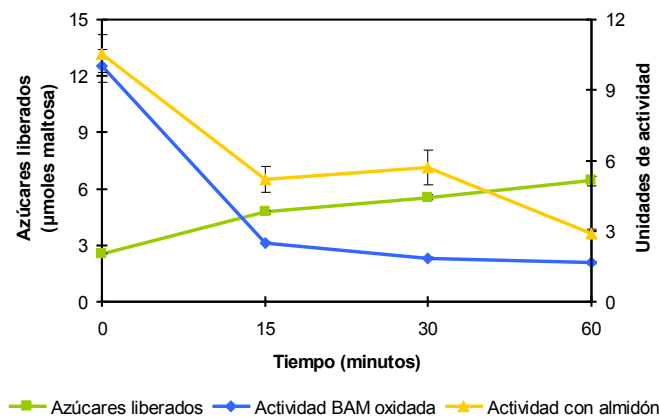


Figura VI.22. Cambios en la actividad de la β -amilasa con H_2O_2 en presencia y ausencia de almidón. La enzima se incubó con 8.5 mM de H_2O_2 o con 8.5 mM de H_2O_2 y almidón 0.02 mg/ μ l.

Este resultado sugiere que durante la noche la presencia de almidón protege a la β -amilasa de la inactivación y que, gracias a ello, el almidón se degrada eficientemente a pesar de que prevalezcan condiciones oxidantes. Con estos resultados la pregunta que surgió fue si el almidón tenía el mismo efecto sobre otras enzimas que también tenían regulación redox, que se encontraban en el cloroplasto y que pudieran unirse a los gránulos de almidón (Figura VI.8B). Para resolverla se midió la actividad de la Rubisco en condiciones oxidantes en presencia y ausencia de almidón y como se muestra en la Figura VI.23, la presencia del almidón no protege a la Rubisco de la inactivación por oxidación.

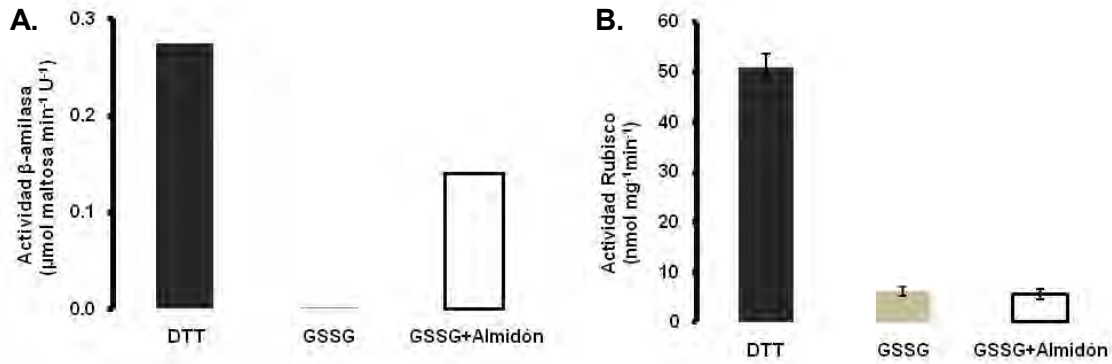


Figura VI.23. Efecto protector del almidón sobre la actividad de la β -amilasa (A) y la Rubisco (B). Las enzimas se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente con DTT 5mM, GSSG 10 mM o GSSG 10 mM y almidón 0.02 mg/ μl .

Utilizamos diferentes técnicas para cuantificar la relación GSH/GSSG y los niveles de H_2O_2 en las hojas de las plantas de frijol y de esta manera saber si la deficiencia de Pi modifica las condiciones de óxido-reducción en ellas. Sin embargo, los resultados no fueron consistentes. Se logró una demostración cualitativa de que la deficiencia de Pi produce un aumento muy discreto en la cantidad de H_2O_2 (Figura VI.24); y esta evidencia sugiere que se podría considerar alS incremento en las condiciones oxidantes como uno de los elementos que contribuyen a que la degradación del almidón sea menos eficiente en plantas cultivadas en ausencia de Pi.

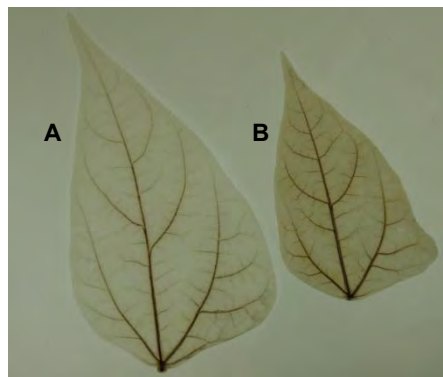


Figura VI.24. Detección de H_2O_2 en hojas de frijol. A) Plantas cultivadas con Pi. B) Plantas que se cultivaron sin Pi.

Finalmente, se hicieron geles de actividad amilolítica en donde se analizó el efecto de las condiciones oxidantes y reductoras sobre la actividad β -amilolítica en extractos totales de hojas de las plantas cultivadas con y sin Pi (Figura VI.25). Se encontró que la enzima del extracto de hojas Pi⁺ tiene una movilidad electroforética diferente a la del extracto Pi⁻ y que ambas responden de manera diferente a los cambios en las condiciones redox.

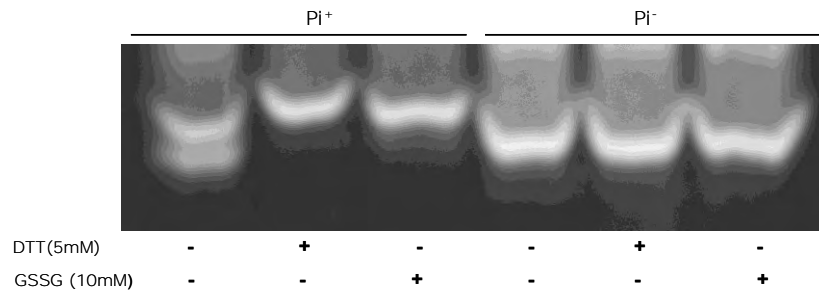


Figura VI.25. Actividad de β -amilasa en extractos de hojas de plantas de frijol. Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida-amilopectina teñido con lugol.

Si bien este resultado apoya nuestra suposición de que la deficiencia de Pi modifica las condiciones redox, también pone de manifiesto la necesidad de realizar investigaciones adicionales para evaluar si el incremento en las condiciones oxidantes es o no un elemento que contribuye a la acumulación de almidón en plantas cultivadas en deficiencia de Pi.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La deficiencia de Pi, que caracteriza a muchos de los suelos dedicados a la agricultura y que produce grandes pérdidas, es una condición que en la mayoría de los casos se origina cuando pH's extremos favorecen la transformación de la especie asimilable (fosfato, H_2PO_4^-) en complejos que las plantas son incapaces de aprovechar. La aplicación de fertilizantes químicos es una alternativa de solución rápida pero parcial y costosa, pues el Pi que se agrega también se convierte en complejos no asimilables. De ahí que sea necesario utilizar nuevos enfoques para resolver este problema. Durante la evolución las especies vegetales han perfeccionado mecanismos que contribuyen a disminuir los efectos de la deficiencia de Pi; sin embargo, el estudio de las respuestas de las plantas a la deficiencia de fosfato forma parte de investigaciones necesarias antes de considerar el diseño o selección de genotipos menos susceptibles a esta condición.

El presente trabajo se ubica dentro de este contexto. Para empezar, debe señalarse que la deficiencia de Pi produce múltiples efectos, como son los cambios en la arquitectura de las raíces, plantas con hojas más pequeñas, acumulación de almidón en las hojas, producción de antocianinas, etc., lo que de alguna manera es lógico debido a la participación del P en muchos procesos. Se decidió investigar la acumulación de almidón por dos razones fundamentales: (1) es uno de los síntomas que de manera más consistente y reproducible se observa en plantas que están sometidas a deficiencia de fosfato y (2) su acumulación implica un desbalance muy importante en las relaciones que se establecen entre tejidos fotosintéticos y aquellos que son dependientes de fotosintatos.

Se ha sugerido que, en la acumulación de almidón en las hojas de plantas cultivadas en deficiencia de Pi están involucrados tanto los procesos de síntesis como de degradación (Preiss y Romeo, 1994; Usuda y Shimogawara 1991). De hecho un incremento en la velocidad de síntesis podría facilitar el reciclaje del poco Pi disponible (Cierezko y Barbachowska, 2000; Kondracka y Rychter, 1997). En este sentido, los datos obtenidos en este trabajo son claros: la acumulación del almidón que se observa en hojas maduras de plantas de frijol, que por tres semanas han sido cultivadas con una solución sin fosfato, es un proceso gradual debido fundamentalmente a una reducción moderada en la capacidad de degradación del almidón sintetizado a lo largo del día (Figura VI.5). Los resultados muestran que la deficiencia de Pi también afecta el proceso de síntesis del

almidón, se incrementa la proporción relativa de amilosa, por lo que no se puede descartar que en condiciones experimentales diferentes (periodos de deficiencia más largos o en otras etapas de desarrollo) la síntesis también pudiera contribuir a su acumulación.

El proceso de degradación del almidón en hojas es complejo. El sistema que mejor se conoce es el de *Arabidopsis* (Zeeman *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2005) aunque este modelo tal vez no sea suficiente para explicar lo que sucede en otras especies (Reimann *et al.*, 2007; Zeeman *et al.*, 2007; Asatsuma *et al.*, 2005). Se propone que de entre muchas enzimas que participan en el proceso, la actividad de β -amilasa es la principal responsable de la degradación de la mayor parte del almidón (Lu y Sharkey 2006; Scheidig *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Zeeman *et al.*, 2007). La maltosa es el principal producto del proceso de degradación y se exporta como tal al citosol en donde se utiliza para formar glucanos, los que luego serán degradados por enzimas allí presentes para finalmente producir sacarosa (Niittylä *et al.*, 2004; Weise *et al.*, 2004; Zeeman *et al.*, 2004). Comparativamente, la información disponible en frijol es escasa. Sin embargo, se ha observado que la maltosa es también el principal producto de la degradación del almidón (Weise *et al.*, 2006) por lo que se supone que la forma como se degrada el almidón en hojas de frijol es muy parecida a lo que se ha reportado en *Arabidopsis*, y que la β -amilasa es también responsable de la degradación de una parte importante del almidón que de manera transitoria se acumula en las hojas. Este hecho puede ayudar a explicar por qué se tuvo tan poco éxito cuando se intentó medir las actividades de la almidón fosforilasa (enzima que degrada al almidón en presencia de Pi y produce glucosa-6-fosfato) y de la α -amilasa (que hidroliza en forma aleatoria los enlaces α -1,4 del almidón), las cuales también podrían participar en el proceso.

La literatura consigna la existencia de múltiples isoenzimas de β -amilasa (Zeeman *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2005). En *Arabidopsis* hay nueve isoformas, que Smith *et al.* (2004) designaron como BAM1 a BAM9, las cuales han sido estudiadas con mayor o menor profundidad. Las primeras cuatro se han ubicado en el cloroplasto y existe evidencia experimental de la participación de BAM3 en la degradación del almidón en el cloroplasto (Delatte *et al.*, 2006; Kaplan *et al.*, 2006). Se ha reportado que BAM1 es regulada por tiorredoxina (Kaplan *et al.*, 2006). BAM4 no tiene actividad amilolítica pero al asociarse al almidón puede facilitar la unión de otras proteínas y contribuir a la regulación del proceso (Fulton *et al.*, 2008). Las otras isoformas se han encontrado fuera del cloroplasto y sus

funciones son desconocidas. BAM5 se encontró en los elementos cribosos del floema (Wang *et al.*, 1995) y la mutación del gen *BAM5* no modifica la función del floema ni la degradación del almidón en la hoja.

Para establecer el efecto de la deficiencia de Pi sobre la degradación del almidón, obtuvimos gránulos de almidón e intentamos purificar a la β -amilasa de los cloroplastos de plantas cultivadas en las dos condiciones. Sin embargo, la gran cantidad de almidón que se acumula en los cloroplastos de las plantas deficientes de Pi los hace muy frágiles y su purificación virtualmente imposible. Por otro lado, dado que las β -amilasas son una familia de proteínas altamente conservadas, con relativamente pocas diferencias entre las isoenzimas que se localizan en el cloroplasto o fuera de él (Fulton *et al.*, 2008), se decidió purificar la actividad de la β -amilasa de hojas y analizar si la falta de Pi había modificado sus propiedades o su interacción con el almidón. El esquema utilizado permitió lograr un alto grado de purificación (Figura VI.14) y el análisis cinético no mostró cambios importantes que pudieran ser atribuidos a la falta de Pi (Tabla VI.4). La enzima purificada se secuenció y se encontró una gran similitud con la β -amilasa de soya (Figura VII.1), pero no se pudo establecer su probable distribución intracelular a partir de la secuencia. Esto constituye una limitación seria de este trabajo. Sin embargo, la enzima purificada tiene características similares a una β -amilasa cloroplástica recientemente descrita: ambas tienen una masa molecular de 60 kDa, son activas como monómero y su actividad es regulada por las condiciones redox (Sparla *et al.*, 2006). Estas propiedades, sumadas a la gran conservación que existe entre las β -amilasas (Fulton *et al.*, 2008; Zeeman *et al.*, 2007) sugieren que su uso podría ser útil para investigar como la deficiencia de Pi afecta el proceso de degradación del almidón. Para tal efecto, también se purificaron gránulos de almidón de plantas cultivadas con y sin Pi, los que se usaron para investigar de qué forma la deficiencia de Pi puede alterar su susceptibilidad a la degradación por β -amilasa.

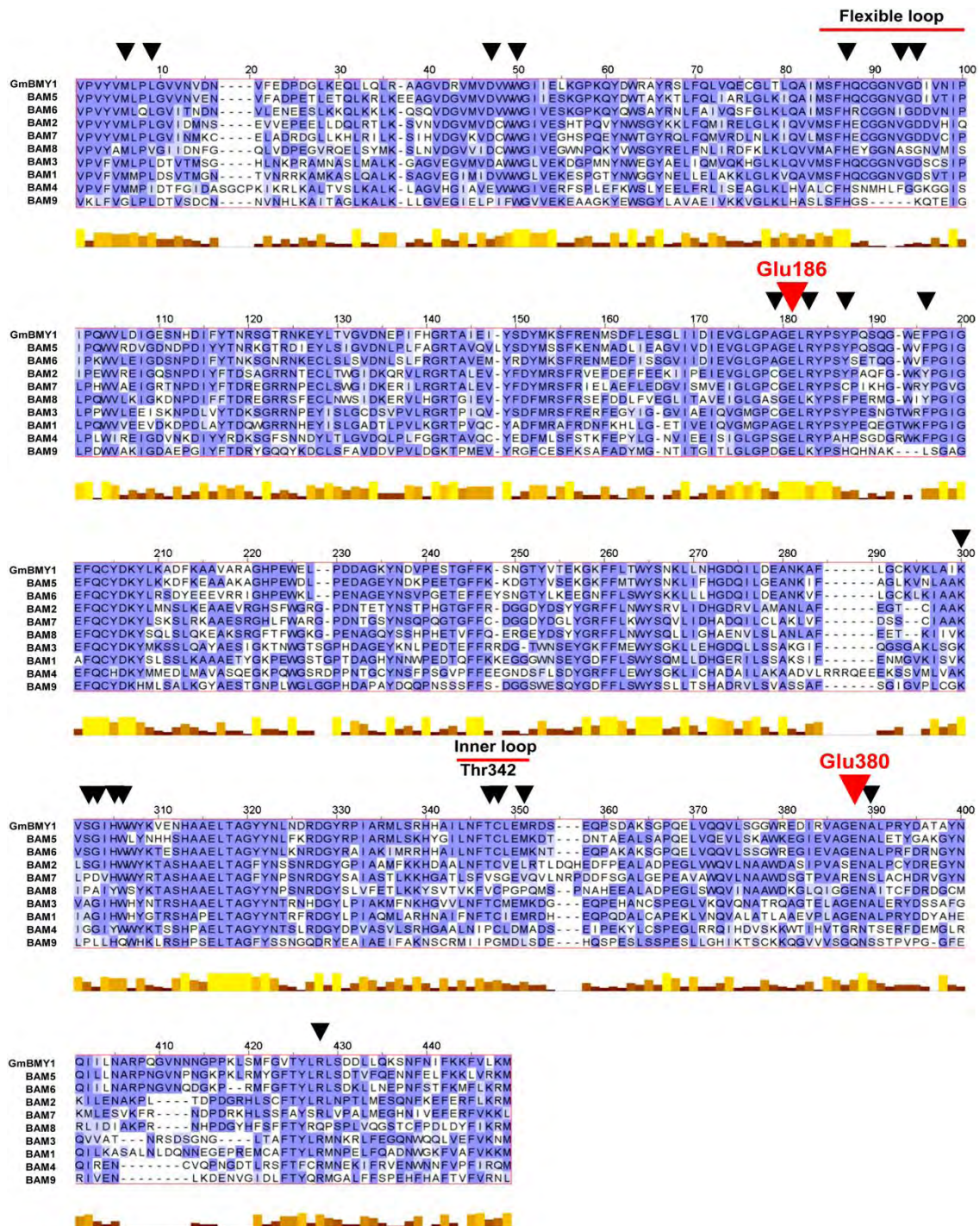


Figura VII.1. Alineamiento de las secuencias de las proteínas BAM de Arabidopsis y la proteína Gm BMY1 de soja (Fulton, *et al.*, 2008).

La superficie de los gránulos de almidón se ha descrito como una estructura hidrofóbica, altamente compacta y organizada (Blennow, 2002; Gallant *et al.*, 1997). Se ha sugerido

que la interacción con diferentes proteínas puede modificar esas características y limitar la velocidad de degradación (Edner *et al.*, 2007; Ritte *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2001). El análisis del almidón que se purificó mostró que efectivamente, hay muchas proteínas que se unen a su superficie (Figura VI.7) y al ser este un fenómeno característico del almidón de hojas que no se presenta en el almidón que se acumula en semillas (datos no mostrados), su presencia podría ser importante para la regulación de los procesos de síntesis y/o degradación del almidón en ese órgano. La falta de Pi reduce la cantidad de proteínas presentes en la superficie (Figura VI.7) y en un experimento de reconstitución en donde los gránulos lavados se incubaron con extractos totales y/o cloroplásticos se descubrió que la unión de las proteínas a la superficie de los gránulos depende tanto de las características del extracto como de los gránulos (Figura VI.10). Al analizar los gránulos de almidón, se observó que la falta de Pi también modifica su composición: contienen más amilosa y están menos fosforilados (Tabla VI.2). Se ha reportado que los almidones que tienen altos contenidos de amilosa tienen mayor resistencia a la degradación enzimática (Gallant *et al.*, 1997). La amilopectina es el sustrato de las enzimas GWD y PWD (Ritte *et al.*, 2006; Kötting *et al.*, 2005; Ritte *et al.*, 2000) y al reducirse su proporción, el grado de fosforilación también será menor. La fosforilación es importante para el proceso de degradación (Blennow *et al.*, 2002), en consecuencia un aumento en la proporción de amilosa puede repercutir en una menor velocidad de degradación. Estos datos muestran que la falta de Pi también afecta el proceso de síntesis, lo que convierte a este sistema en un modelo muy interesante, pues su estudio ayudaría a identificar que actividades enzimáticas podrían ser modificadas para obtener almidones con nuevas propiedades.

La deficiencia de Pi reduce significativamente la cantidad de proteínas (Figura VI.7) siendo la proteína GWD una de las afectadas (Figura VI.12), lo cual a su vez concuerda con el hecho de que el almidón proveniente de plantas cultivadas en deficiencia de Pi está menos fosforilado (Tabla VI.2). No fue posible identificar todas las proteínas que se unen a la superficie de los gránulos de almidón, pero se probó que su presencia facilita la degradación de los gránulos por β -amilasa (Figura VI.17). La unión implica cierto grado de especificidad, pues experimentos con BSA y concanavalina A mostraron que no cualquier proteína se une al gránulo y que el hecho de que algunas se asocien no necesariamente indica que la degradación por β -amilasa se acelerará (Figura VI.18).

La identificación de las proteínas asociadas a la superficie de los gránulos, el establecer qué factores definen su interacción con los gránulos y el conocer cómo su presencia facilita la degradación del almidón son tareas importantes que quedan por resolver.

Por otro lado, muchos procesos están coordinados con los períodos de luz-oscuridad. En el caso particular del almidón que se produce en las hojas es necesario que por la noche se degrade eficientemente para que la planta disponga de azúcares. La actividad de muchas enzimas que están sometidas a este control es sensible a cambios en su estado de óxido-reducción; se mantienen reducidas (y activas) gracias al sistema ferredoxina/tiorredoxina, el cual a su vez es dependiente de la actividad del fotosistema I. Por esta razón, las condiciones de óxido-reducción dentro de los cloroplastos son reductoras durante el día y se vuelven oxidantes durante la noche (Buchanan 1980). Esta regulación permite que enzimas clave en el ciclo de Calvin estén activas durante el día y se inactiven durante la noche (Buchanan y Balmer 2005; Dai *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 1976). Por otro lado, existen evidencias que muestran que diferentes tipos de estrés generan un ambiente oxidante (Lunde *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2005). Por lo que se probaron diferentes estrategias para medir el efecto de la deficiencia de Pi sobre la concentración de H_2O_2 y en la relación GSSG/GSH. No fueron exitosas, pues los resultados fueron inconsistentes. Sin embargo, se logró una estimación cualitativa que sugiere que efectivamente, la deficiencia de Pi incrementa la concentración de H_2O_2 en las hojas (Figura VI.24). Con base en estas ideas se hizo un experimento en el cual se analizó el efecto del estado redox sobre la actividad de la β -amilasa. Al igual que otras enzimas que participan en procesos que están coordinados con la transición luz-oscuridad (enzimas del ciclo de Calvin, AGPasa, GWD, pirofosfatasas), la β -amilasa también se inactiva por oxidación (Figura VI.16). Esto crea una paradoja: las condiciones que probablemente imperan durante la noche, son capaces de inactivar a la β -amilasa y la falta de Pi podría agravar esta situación. Previamente, se había analizado la actividad de β -amilasa en extractos de plantas cultivadas con y sin Pi (Tabla VI.3) observándose que en ambos casos la actividad se incrementa durante la noche y que el aumento es mayor en plantas cultivadas sin fosfato. Sin embargo, la posibilidad de que las condiciones oxidantes que prevalecen de noche en el estroma de los cloroplastos inactiven a la β -amilasa, implica que: (1) la inactivación por oxidación es una característica que la enzima adquiere cuando es purificada, o bien (2) que *in vivo* existe un mecanismo que la protege.

Estudios posteriores mostraron que la actividad de la β -amilasa podía ser protegida si la oxidación se llevaba a cabo en presencia de almidón (Figuras VI.21 y VI.25). Además se observó que la enzima se une a los gránulos y las condiciones oxidantes estimulan la unión (Figura VI.19). La asociación de la β -amilasa a los gránulos de almidón puede explicarse como consecuencia de su mecanismo de acción: se une al almidón y se mantiene unida hasta que se liberan varias moléculas de maltosa (Ishikawa *et al.*, 2007). Esta asociación transitoria al sustrato implica que durante la degradación del almidón la β -amilasa está constantemente uniéndose y liberándose del sustrato. La presencia del almidón protege a la enzima asociada a los gránulos de almidón, pero el producto soluble de la degradación del almidón (maltosa) es incapaz de protegerla de la inactivación por oxidación. En un experimento posterior se analizó la cinética de inactivación (figura VI.22). Se hizo patente que la presencia de almidón hace que el proceso sea más lento pero si las condiciones son muy oxidantes la enzima puede inactivarse a pesar de la presencia de almidón. Con base en estos datos, proponemos que la enzima se asocia a los gránulos de almidón y forma un complejo que la estabiliza y protege de la oxidación. Eventualmente se libera, pero rápidamente se vuelve a asociar a los gránulos. La actividad que se puede medir en la fracción soluble representa esa proporción de moléculas en tránsito y el hecho de que se mantengan activas a pesar de que el medio es suficientemente oxidante como para inactivarlas, implica que la velocidad con la que la enzima se oxida es menor a aquella con la que la enzima se reasocia con el almidón.

Estos hallazgos son relevantes en la medida que permiten resolver una aparente contradicción: la β -amilasa, al igual que otras enzimas del ciclo de Calvin, se inactivan por oxidación (Sparla *et al.*, 2006; Buchanan y Balmer 2005). La presencia de almidón permite que la β -amilasa escape a ese control, ya que puede mantenerse activa si hay almidón y si las condiciones no son muy oxidantes. La GWD también se inactiva por oxidación, pero hay resultados que sugieren que también es activa durante la noche (Mikkelsen *et al.*, 2005). Sería muy interesante investigar si la presencia de almidón puede también protegerla de la oxidación. Sin embargo, este mecanismo no es general: la Rubisco es una de las proteínas cloroplásticas que se puede encontrar en la superficie de los gránulos (Figura VI.8B) y que se inactiva por oxidación, pero la presencia de almidón es incapaz de protegerla (Figura VI.23).

Por mucho tiempo, se pensó que los gránulos de almidón eran estructuras pasivas en el proceso de degradación. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un panorama

totalmente diferente: sus características (que pueden ser modificadas por el ambiente) definen en gran medida qué proteínas se les unen, lo que puede ser importante para regular su actividad. Son muchas las proteínas que se pueden asociar a los gránulos y su estudio seguramente arrojará nuevas sorpresas.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

- En las hojas de plantas de frijol que crecen en deficiencia de Pi la degradación del almidón es menos eficiente, lo que genera una acumulación gradual.
- La deficiencia de Pi modifica características de los gránulos: reduce la fosforilación, cambia la proporción amilosa/amilopectina y el patrón de proteínas asociadas, estos cambios disminuyen su capacidad para unir proteínas cuya presencia favorece la degradación de almidón.
- En plantas cultivadas en deficiencia de Pi, las condiciones redox se tornan más oxidantes. La β -amilasa purificada se inhibe en condiciones oxidantes, lo que podría explicar por qué a pesar de que en las plantas cultivadas en deficiencia de fosfato la actividad de la β -amilasa se incrementa, el almidón no se degrada eficientemente.
- La interacción de la β -amilasa con los gránulos del almidón la protege parcialmente de la inactivación por oxidación.

Capítulo IX

PERSPECTIVAS

Con este trabajo se lograron identificar cambios que se presentan en las plantas que crecen en deficiencia de fósforo y que contribuyen a que la degradación del almidón sea menos eficiente. Sin embargo, existen algunos aspectos cuyo estudio ayudaría a entender los detalles de los mecanismos involucrados, como los siguientes:

- Estudiar la estructura de la amilopectina.
- Identificar proteínas asociadas a los gránulos, estudiar qué determina su asociación y cómo esta asociación promueve la degradación del gránulo.
- Estudiar cómo se modifica la síntesis del almidón.
- Clonar y expresar como proteínas recombinantes a las β -amilasas que se expresan en diferentes condiciones como punto de partida para estudios detallados sobre su regulación redox y su interacción con el almidón.

CAPÍTULO X

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akerbroom TPM, Sies H (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. In: *Methods of Enzymology Vol 77* pp 373-382. Academic Press Inc.
- Ames BN (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 71. Neufeld EF, Ginsburg V eds. Academic Press. pp 54-58.
- Anderson LE, Avron M (1976). Light modulation of enzyme activity in chloroplasts. *Plant Physiol* 57:209-213.
- Asatsuma S, Sawada C, Itoh K, Okito M, Kitajima A (2005). Involvement of α -amylase I-1 in starch degradation in rice chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 46:858-869.
- Badui DS (1993). *Química de los alimentos*. Pearson Educación. México. pp 94-97.
- Ball S, Guan H, James M, Myers A, Keeling P, Mouille G, Buléon A, Colonna P, Preiss J (1996). From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* 86:349–352.
- Bates TR, Lynch JP (2000a). Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot* 87:958-963.
- Bates TR, Lynch JP (2000b). The efficiency of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) root hairs in phosphorus acquisition. *Am J Bot* 87: 964-970.
- Bernfeld P (1955). Amylases, α and β in *Methods in Enzymology Vol I*, (Colowick S and Kaplan N, eds) Academic Press, New York, USA pag 149.
- Bieliski RL (1973). Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* 24: 225-252.
- Blennow A, Engelsen SB, Nielsen TH, Baunsgaard L, Mikkelsen R (2002). Starch phosphorylation: new front line in starch research. *Trends Plant Sci* 7(10): 445-450.
- Borovsky D, Smith EE, Whelan WJ (1975). Purification and properties of potato 1,4- α -D-glucan-1,4- α -D-glucan 6- α -(1,4- α -glucano)-transferase—evidence against a dual catalytic function in amylose-branching enzyme. *Eur J Biochem* 59:615–62.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003). Beans (*Phaseolus* spp.): model food legume. *Plant Soil* 252: 55–128.

- Buchanan BB, Balmer Y (2005). Redox regulation: A broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol* 56:187–220.
- Buchanan BB (1980). Role of light in the regulation of chloroplasts enzymes. *Annu Rev Plant Physiol* 31:341-374.
- Caspar T, Lin TP, Kakefuda G, Benbow L, Preiss J, Somerville C (1991). Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiol* 95:1181-1188.
- Cierezko I, Johanson H, Hurry V (2001). Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and *pho* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* 212:598-605.
- Ciereszko I, Barbachowska A (2000). Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J Plant Physiol* 156: 640-644.
- Commuri PD, Keeling PL (2001). Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. *Plant J* 25:475–486.
- Craig J, Lloyd JR, Tomlinson K, Barber L, Edwards A, Wang TL, Martin C, Hedley CL, Smith AM (1998). Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* 10:413–426.
- Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J (2004). A cytosolic glucosyl-transferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant J* 37: 853-863.
- Chiera J, Thomas J, Ruffy T (2002). Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. *J Exp Bot* 53:473-481.
- Dai S, Schwendtmayer C, Johansson K, Ramaswamy S, Schürmann P, Eklund H. (2000). How does light regulate chloroplast enzymes? Structure–function studies of the ferredoxin/thioredoxin system. *Q Rev Biophys* 33:67–108.
- Delatte T, Umhang M, Trevisan M, Eicke S, Thorneycroft D, Smith SM and Zeeman SC (2006). Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *J Biol Chem* 281:12050–12059.
- Denyer K, Waite D, Motawia S, Møller BL, Smith AM (1999). Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *Biochem J* 340:183–191.
- Denyer K, Clark B, Hilton C, Tatge H, Smith A (1996). The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J* 10:1135-1143.
- Dietz K, Heilos L (1990). Carbon metabolism in spinach leaves as affected by leaf age and phosphorus and sulfur metabolism. *Plant Physiol* 93:1219-1225.
- Dixon DP, Skipsey M, Grundy NM, Edwards R (2005). Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138:2233–2244.

- Donald AM (2004). Understanding starch structure and functionality. En: Starch in food. Structure, function and applications. Eliasson AC (ed). Woodhead Publishing. Cambridge. pp 156-179.
- Edner C, Li J, Albrecht T, Mahlow S, Hejazi M, Hussain H, Kaplan F, Guy C, Smith SM, Steup M, y Ritte G (2007). Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidic β -amylases. *Plant Physiol* 145:17–28.
- Edwards A, Fulton DC, Hylton CM, Jobling SA, Gidley M, Rössner U, Martin C, Smith AM (1999). A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant J* 17:251–261.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300:1005-1016.
- Ferreira BR, Shaw MN (1989). Effect of osmotic stress on protein turnover in *Lemna minor* fronds. *Planta* 179:488-455.
- Fontaine T, D'Hulst C, Maddelein ML, Routier F, Pépin TM, Decq A, Wieruszeski J M, Delrue B, Van den Koornhuysse N, Bossu JP, Fournet B, Ball S (1993). Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule—evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase-II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J Biol Chem* 268:16223–16230.
- Fragoso IS (2004). Respuesta de soya a la deficiencia de fosfato y sobreexpresión de fitasa en plantas transgénicas. Facultad de Química. UNAM.
- Fu Y, Ballicora MA, Leykam JF, Preiss J (1998). Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *J Biol Chem* 273: 25045–25052.
- 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 Physiol* 140:1070–1084.
- Fulton DC, Stettler M, Mettler T, Vaughan CK, Li J, Francisco P, Gil M, Reinhold H, Eicke S, Messerli G, Dorken G, Halliday K, Smith AM, Smith SM, Zeeman SC (2008). β -AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β -amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* 20:1040-1058.
- Fulton DC, Edwards A, Pilling E, Robinson HL, Fahy B, Seale R, Kato L, Donald AM, Geigenberger P, Martin C, Smith AM (2002). Role of granule-bound starch synthase in determination of amylopectin structure and starch granule morphology in potato. *J Biol Chem* 277:10834–10841.
- Gallant D, Bouchet B, Baldwin P (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydr Polym* 32:177-191.

- Gérard C, Planchot V, Colonna P, Bertoft E (2000). Relationship between branching density and crystalline structure of A- and B-type maize mutant starches. *Carbohydr Res* 326: 130-144.
- Graham PH, Rosas JC, Estevez de Jensen C, Peralta E, Tlustý B, Acosta GJ, Arraes PA (2003). Addressing edaphic constraints to bean production: the bean/cowpea CRSP project in perspective. *Field Crop Res* 82: 179–192.
- Grotz N, Guerinot ML (2002). Limiting nutrients: and old problem with new solutions? *Curr Opin Plant Biol* 5:158-163.
- Guan HP, Keeling PL (1998). Starch Biosynthesis: Understanding the functions and interactions of multiple isozymes of starch synthase and branching enzyme. *Trends Glycosci Glycotechnol* 10:307-319.
- Guan HP, Preiss J (1993). Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiol* 102:1269–1273.
- Hendriks JHM, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, Geigenberger P (2003). ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiol* 133:838–849.
- Hernández G, Ramírez M, Valdés-López O, Tesfaye M, Graham MA, Czechowski T, Schlereth A, Wandrey M, Erban A, Cheung F, Wu HC, Lara M, Town CD, Kopka J, Udvardi MK, Vance C (2007). Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiol* 44:753-767
- Hoseney RC (1991). Principios de ciencia y tecnología de los cereales. Editorial Acribia. España. pp 31-72.
- Hovenkamp-Hermelink J, De Vries J, Adamse P, Jacobsen E, Witholt B, Feenstra J (1988). Rapid estimation of the amylose/amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. *Potato Res* 31:241-246.
- Huber SC, MacKintosh C, Kaiser WM (2002). Metabolic enzymes as targets for 14-3-3 proteins. *Plant Mol Biol* 50:1053–1063.
- Hussein H, Mant A, Seale R, Zeeman SC, Hinchliffe E, Edwards A, Hylton C, Bornemann S, Smith AM, Martin C, Bustos R (2003). Three isoforms of ISA contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell* 15:33–149.
- Ishikawa K, Nakatani H, Katsuya Y, Fukasawa Ch (2007). Kinetic and structural analysis of enzyme sliding on a substrate: Multiple attack in β -amylase. *Biochemistry* 46:792-796.
- Janecek S, Sevcik J (1999). The evolution of starch binding domain. *FEBS Lett* 456:119-125.

- Ji Q, Vincken J, Suurs L, Visser R (2003). Microbial starch binding domain as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis. *Plant Mol Biol* 51:789-801.
- Jobling S (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Curr. Opinion Plant Biol* 7:210-218.
- Jones JB (1982). Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *J Plant Nutr* 5:1003-1030.
- Juge N, Nohr J, Le Gal-Coëfet MF, Kramhoft B, Furniss C, Planchot V, Archer D, Williamson G, Svensson B (2006). The activity of barley α -amylase on starch granules is enhanced by fusion of a starch binding domain from *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biochim Biophys Acta* 1764:275-284.
- Kaplan F, Sung DY, Guy CL (2006). Roles of β -amylase and starch breakdown during temperature stress. *Physiol Plant* 126: 120–128.
- Kaplan F, Guy CL (2005). RNA interference of *Arabidopsis* β -amylase 8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant J* 44:730-743.
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P (2005). Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11118–11123.
- Kondracka A, Rychter AM (1997). The role of Pi recycling processes during photosynthesis in phosphate-deficient bean plants. *J Exp Bot* 48: 1461-1468.
- Kong B, Kim J, Kim M, Cherl J (2003). Porcine pancreatic α -amylase hydrolysis of native starch granules as a function of granule surface area. *Biotechnol Prog* 19:1162-1166.
- Kortstee A, Vermeesch A, de Vries B, Jacobsen E, Visser R (1998). The influence of an increased degree of branching on the physico-chemical properties of starch from genetically modified potato. *Carbohydr Polymers* 37:173-184.
- Kossmann J, Lloyd J (2000). Understanding and influencing starch biochemistry. *CRC Crit Rev Plant Sci* 19(3):171-226.
- Kötting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G (2005). Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiol* 137:242-252.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) 227:680-685.
- Lauer MJ, Pallardy SG, Blevins DG, Randall DD (1989). Whole leaf carbon exchange characteristics of phosphate deficient soybeans (*Glycine max* L.). *Plant Physiol* 91: 848-854.

- Lin T, Spilatro S, Preiss J (1988). Subcellular localization and characterization of amylases in *Arabidopsis* leaf. *Plant Physiol* 86:251-259.
- Lloyd JR, Kossmann J, Ritte G (2005). Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci* 10:130-137.
- Loberth R, Ritte G, Willmitzer L, Kossmann J (1998). Inhibition of starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat Biotechnol* 16: 473-477.
- Lu Y and Sharkey TD (2006). The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant Cell Environ* 29:353-366.
- Lunde C, Zygadlo A, Simonsen HT, Nielsen PL, Blennow A, Haldrup A. (2008). Sulfur starvation in rice: the effect on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and oxidative stress protective pathways. *Plant Physiol* 134:508-521.
- Lynch JP, Brown KM (2001). Topsoil foraging-an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant Soil* 237:225-237.
- Lynch JP (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol* 109:7-13.
- Lynch JP, Lauchli A, Epstein E (1991). Vegetative growth of tile common bean in response to phosphorus nutrition. *Crop Sci* 31:380-387.
- MacDonald FD y Preiss J (1985). Partial purification and characterization of granule-bound starch synthases from normal and waxy maize. *Plant Physiol* 78:849-852.
- Marschner H (1995). Mineral nutrition of higher plants. New York, Academic Press.
- Martínez-Barajas (1994). El papel de la rubisco activasa en la regulación de la actividad de la rubisco. Facultad de Química. UNAM.
- Mikkelsen R, Blennow A (2004). Functional characterization of α -glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem J* 377:525-532.
- Mikkelsen R, Mutenda K, Mant A, Schümann, Blennow A (2005). α -Glucan, water dikinase GWD): A plastidic enzyme with redox-regulated and coordinates catalytic activity and binding affinity. *Proc Natl Acad Sci* 102:1785-1790.
- Miller G, Shulaev V, Mittler R (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant* 133:481-489.
- Morell MK, Kosar-Hashemi B, Cmiel M, Samuel MS, Chandler P, Rahman S, Buléon A, Batey IL, Li ZY (2003). Barley sex6 mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *Plant J* 34:172-184.
- Morrison W (1995). Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Food World* 40:437-446.

- Muhrbeck P, Eliasson AC (1991). Influence of the naturally occurring phosphate esters on the crystallinity of potato starch. *J Sci Food Agric* 55, 13–18.
- Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG (2000). Recent progress towards understanding the biogenesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* 122:989–997.
- Nakamura, Y (2002). Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol* 43:718–725.
- Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S, Nagamine T (1995). Production of waxy (amylose-free) wheats. *Mol Gen Genet* 248:253-259.
- Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Romheld V (1999). Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208:373-382.
- Nielsen TH, Wischmann B, Enevoldsen K, Moller BL (1994). Starch phosphorylation in potato tubers proceeds concurrently with *de novo* biosynthesis of starch. *Plant Physiol* 105:111-117.
- Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 303:87-89.
- Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H (2001). Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiol* 127:459–472.
- O'Connell KL y Stults JT (1997). Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *in situ* enzymatic digests. *Electrophoresis* 18(3-4):349-359.
- Patron NJ y Keeling PJ (2005). Common evolutionary origin of starch biosynthetic enzymes in green and red algae. *J Phycol* 41:1131–1141.
- Preiss J, Romeo T (1994). Molecular biology and regulatory aspects of glycogen synthesis in bacteria. In: Cohen WE, Molden KE, eds. Progress in nucleic acid research and molecular biology, Vol 47. San Diego:Academic Press, pp 112-138.
- Preiss J (1988). Biosynthesis of starch and its regulation. In: The Biochemistry of Plants (Preiss J, ed), vol. 14, pp 181–254, Academic Press, San Diego.
- Rahman S, Regina A, Li ZY, Mukai Y, Yamamoto M, Kosar-Hashemi B, Abrahams S, Morell MK (2001). Comparison of starch-branching enzyme genes reveals evolutionary relationships among isoforms. Characterization of a gene for starch-branching enzyme IIa from the wheat D genome donor *Aegilops tauschii*. *Plant Physiol* 125:1314–1324.

- Rao IM, Freeden AL, Terry N (1993). Influence of phosphorus limitation on photosynthesis, carbon allocation and partitioning in sugar beet and soybean grown with a short photoperiod. *Plant Physiol Biochem* 31:223-231.
- Reimann R, Ritte G, Steup M, Appenroth KJ (2002). Association of α -amylase and the R1 protein with starch granules precedes the initiation of net starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*. *Physiol Plant* 114:2-12.
- Reimann R, Ziegler P, Appenroth KJ (2007). The binding of α -amylase to starch plays a decisive role in the initiation of storage starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*. *Physiol Plant* 129:334-341.
- Ritte G, Heydenreich M, Mahlow S, Haebel S, Kötting O, Steup M (2006). Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS Lett* 580(20):4872-4876.
- Ritte G, Scharf A, Eckermann N, Häbel S, Steup M (2004). Phosphorylation of transitory starch is increased during degradation. *Plant Physiol* 135:2068-2077.
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M (2002). The starch-related R1 protein is an α -glucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci* 99(10):7166-7171.
- Ritte G, Loberth R, Steup M (2000). Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules. *Plant J* 21(4):387-391.
- Robert X, Haser R, Gottschalk T, Ratajczak F, Driguez H, Svensson B, Aghajari N (2003). The structure of barley α -amylase isozyme 1 reveals a novel role of domain C in substrate recognition and binding: A pair of sugar tongs. *Structure* 11:973-984.
- Rodriguez-Sanoja R, Oviedo N, Sanchez S (2005). Microbial starch-binding domain. *Curr Opinion in Microb* 8:260-267.
- Roldan I, Wattedled F, Lucas MM, Delvallé D, Planchot V, Jimenez S, Perez R, Ball S, D'Hulst C, Merida A (2007). 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.
- Rychter AM, Mikulska M (1990). The relationship between phosphate status and cyanide-resistant respiration in bean roots. *Physiol Plant* 79:663-667.
- Sajilata MG, Sigal RS, Kulkarni PR (2006). Resistant starch a review. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 5:1-16.
- Sano Y (1984). Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor Appl Genet* 68:467-473.
- Schachtman DP, Reid RJ and Ayling SM (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* 116:447-453.

- Scheidig A, Frölich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J (2002). Downregulation a chloroplast-targeted β -amylase leads to starch-excess phenotype in leaves. *Plant J* 30(5):581-591.
- Schmidt W (2001). From faith to fate: ethylene signaling in morphogenic responses to P and Fe deficiency. *J Plant Nutr Soil Sci* 164:147-154.
- Sehnke PC, Chung HJ, Wu K, Ferl RJ (2001). Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:765–770.
- Shure M, Wessler S, Fedoroff N (1983). Molecular identification and isolation of the *waxy* locus in maize. *Cell* 35:225-233.
- Singletary GW, Banisadr R, Keeling PL (1997). Influence of gene dosage on carbohydrate synthesis and enzymatic activities in endosperm of starch-deficient mutants of maize. *Plant Physiol* 113:293–304.
- Smith AM, Zeeman SC, Smith SM (2005). Starch degradation. *Annu Rev Plant Biol* 56:73-98.
- Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM (2003). Starch mobilization in leaves. *J Exp Bot* 54:577-583.
- Smith AM (2001). The Biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules* 2:334-341.
- Smith SM, Fulton DC, Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C, Zeeman SC, Smith AM (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 Physiol* 136:2687–2699.
- 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* 27:567–576.
- Southall SM, Simpson PJ, Gilbert HJ, Williamson G, Williamson MP (1996). The starch binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett* 447:58-60.
- Sparla F, Costa A, Schiavo FL, Pupillo P, Trost P (2006). Redox regulation of a novel plastid-targeted β -amylase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 141, 840–850.
- Steup M, Robenek H, Melkonian M (1983). In vitro degradation of starch granules isolated from spinach chloroplasts. *Planta* 158:428-436.
- Stitt M, Quick P (1989). Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. *Physiol Plant* 77:663–641.
- Svensson B, Jespersen H, Sierks M, MacGregor E (1989). Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch degrading enzymes. *Biochem J* 264:309-311.

- Takeda Y, Guan HP, Preiss J (1993). Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr Res* 240:253–263.
- Tatge H, Marshall J, Martin C, Edwards EA, Smith AM (1999). Evidence that amylose synthesis occurs within the matrix of the starch granule in potato tubers. *Plant Cell Environ* 22:543–550.
- Tester RF, Karkalas J, Qi X (2004). Starch composition, fine structure and architecture. *J Cereal Sci* 39: 151-165.
- Tetlow IJ, Wait R, Lu Z, Akkasaeng R, Bowsher CG, Esposito S, Kosar-Hashemi B, Morell MK, Emes MJ (2004a). Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell* 16:694-708.
- Tetlow IJ, Morell MK, Emes J (2004b). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* 55:2135-2145.
- Theodorou ME, Plaxton WC (1993). Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol* 99:1680-1685.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* 11:1187-1194.
- Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geigenberger P (2003). Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J* 35:490–500.
- Usuda H, Shimogawara K (1991). Phosphate deficiency in Maize. I. Leaf phosphate status, growth, photosynthesis and carbon partitioning. *Plant Cell Physiol* 32:497-504.
- van de Wal M, D'Hulst C, Vincken JP, Buléon A, Visser R, Ball S (1998). Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin. *J Biol Chem* 273:22232–22240.
- Villareal C y Juliano B (1986). Waxy Gene Factor and Residual Protein of Rice Starch Granule. *Starch/Staerke* 38:118-119.
- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmiroli N, Machray GC, Oparka KJ (2001). Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to simplastical phloem unloading. *Plant Cell* 13:385-398.
- Wang L, Wang Y-L, Porter R (2002). Structures and physicochemical properties of six wild rice starches. *J Agric Food Chem* 50:2695-2699.
- Wang Q, Monroe J, Sjolund RD (1995). Identification and characterisation of a phloem-specific β -amylase. *Plant Physiol* 109:743–75.

- Wanke M, Ciereszko I, Podbielkowska M, Rychter AM (1998). Response to phosphate deficiency in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots. Respiratory metabolism, sugar localization and changes in ultrastructure of bean root cells. *Ann Bot* 82:809-819.
- Watt M, Evans JR. (1999). Linking development and determinacy with organic acid efflux from proteoid roots of white lupin grown with low phosphorus and ambient or elevated atmospheric CO₂ concentration. *Plant Physiol* 120:705-716.
- Wattebled F, Dong Y, Dumez S, Delvallé D, Planchot R, Berbezy P, Vyas D, Colonna P, Chatterjee M, Ball S, D'Hulst C (2005). Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic ISA accumulate phytylglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiol* 138:184–195.
- Weigel D, Glazebrook J (2002). *Arabidopsis. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA. pp 217-221.
- Weiner H, Stitt M, Heldt HW (1987). Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochim Biophys Acta* 893: 13-21.
- Weise SE, Schrader SM, Kleinbeck KR, Sharkey TD (2006). Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phosphorolytic breakdown of transitory starch breakdown. *Plant Physiol* 141:879-986.
- Weise SE, Weber APM, Sharkey TD (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* 218, 474–482.
- Whitaker JR (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. Marcel Dekker Ink. USA. p. 395-412.
- Worthington CC (1988). *Worthington enzyme manual. Enzymes and related biochemicals*. Worthington Biochemical Corporation. USA. pp 38-45.
- Yan X, Stephen E B, Lynch J (1995). Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types. II. Yield response. *Crop Sci* 35:1086-1093.
- Yu T, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstan H, Lue W, Hegemann B, Tung S, Umemoto T, Chapple A, Tsai D, Wang S, Smith AM, Chen J, Smith SM (2005). α -amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. *J Biol Chem* 280:9773-9779.
- Yu TS, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge U, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G, Steup M, Lue WL, Chen J, Weber A (2001). The *Arabidopsis* *sex1* mutant defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* 13:1907-1918.
- Zeeman SC, Smith SM, Smith AM (2007). The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J* 401:13-28.
- Zeeman SC, Thorneycroft D, Schupp N, Chapple A, Weck M, Dunstan H, Haldimann P, Bechtold N, Smith AM, Smith SM (2004). Plastidial α -glucan phosphorylase is not

required for starch degradation in *Arabidopsis* leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plant Physiol* 135:849-858.

Zeeman SC, Tiessen A, Pilling E, Kato KL, Donald AM, Smith A (2002a). Starch synthesis in *Arabidopsis*. Granule synthesis, composition and structure. *Plant Physiol* 129:516-529.

Zeeman SC, Smith SM, Smith AM (2002b). The priming of amylose synthesis in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 128:1069–1076.

Zeeman SC, ap Rees T (1999). Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell Env* 22:1445-1453.

Zeeman SC, Northrop F, Smith AM, ap Rees T (1998). A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolyzing enzyme. *Plant J* 15(3):357-365.

Zeeman SC, Umemoto T, Lue W-L, Au-Yeung P, Martin C, Smith AM, Chen J (1998). A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic ISA accumulates both starch and phytoglycogen. *Plant Cell* 10:699–1711.

Zhang G, Ao Z, Hamaker BR (2006a). Slow digestion property of native cereal starches. *Biomacromolecules* 7: 3252-3258.

Zhang G, Venkatachalam M, Hamaker BR (2006b). Structural basis for the slow digestion property of native cereal starches. *Biomacromolecules* 7: 3259-3266.

Zhang X, Szydlowski N, Delvallé D, D'Hulst C, James MG, Myers AM (2008). Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 8:96.

Zhang X, Myers AM, James MG (2005). Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiol* 138:663–674.

ANEXO 1



Possible role played by R1 protein in starch accumulation in bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings under phosphate deficiency

Lilia Bernal, Patricia Coello, Eleazar Martínez-Barajas*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, México D.F. 04510, Mexico

Received 11 September 2004; accepted 21 December 2004

KEYWORDS

Bean;
Phaseolus vulgaris;
Phosphate deficiency;
R1 protein;
Starch degradation

Summary

The effect of phosphate (Pi) deficiency on starch accumulation was studied in bean (*Phaseolus vulgaris*). After 3 weeks of Pi deprivation total Pi concentration in root and shoot was reduced by 68% and 42%, respectively; however, only shoot growth was affected. In leaves, Pi deprivation induced glucose, fructose and starch accumulation. Pi deficiency did not affect starch synthesis, but it reduced its mobilization during the dark period. At the same time, starch produced by Pi deficient plants have fewer Pi bound and was also less susceptible to β -amylase hydrolysis. R1 protein is the protein responsible of phosphorylating C3 and C6 glucosyl residues of the polyglucan, increasing the hydration capacity and the interaction with amylolytic enzymes. Pi deprivation did not change the amount of R1 protein detected in total extracts but decreased its association with starch granules.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Phosphate (Pi) is one of the major plant nutrients that influence all biochemical processes and developmental phases in plants. In the absence of Pi, plants exhibit characteristic symptoms including enhanced root growth, increase in the root: shoot ratio and accumulation of anthocyanin (Raghothama, 1999). Some plant responses to Pi deprivation

appears to be regulated at the genetic level (Foyer and Spencer, 1986), and not all species respond in the same way to the lack of Pi. Starch accumulation in leaves is one of the more consistently observed biochemical responses (Ciereszko and Barbachowska, 2000).

Starch is accumulated in the chloroplasts of leaves during daytime; little or no degradation occurs in the light, but its degradation starts soon

Abbreviations: Pi, phosphate

*Corresponding author. Tel.: +56 22 52 76; fax: +56 22 53 29.

E-mail address: emtz@servidor.unam.mx (E. Martínez-Barajas).

upon the onset of darkness (Zeeman et al., 2002). The products of starch degradation are exported from chloroplasts to the cytosol and are used as substrates for sucrose synthesis and glycolysis (Stitt et al., 1985). It has been suggested that the accumulation of starch observed in leaves from Pi deficient plants could be due to the low availability of Pi for the triose phosphate translocator located in the chloroplast inner envelope. Then, carbon would be retained in chloroplasts where starch synthesis is facilitated through activation of ADP-glucose pyrophosphorylase by low Pi:3-PGA ratio (Nielsen et al., 1998). However, it has also been shown that Pi deprivation reduces starch mobilization at night (Fredeen et al., 1989; Usuda and Shimogawara, 1991).

Relatively little is known about the regulation of starch degradation in organs other than cereal endosperm (Smith et al., 2003). Presumably, the process is initiated by endoamylase action, liberating malto-oligosaccharides, which are then processed by other enzymes. The process requires the concerted action of a range of phosphorylase and hydrolytic enzymes including endoamylase, exoamylase, disproportionating enzyme, isoamylase, glucoamylase (maltase) and phosphorylase (Blennow et al., 2002). However, there are no data that correlate amylolytic enzymes with regulatory roles. So far, only changes in pH and Pi availability in plastids have been the factors related to nocturnal degradation of starch (Blennow et al., 2002).

On the other hand, it is reasonable to assume that important starch-related reactions take place in the interphase of the insoluble starch particle and the surrounding stroma (Reimann et al., 2002). Therefore, the binding of stromal proteins to the starch granule might be a crucial step in the transitory starch metabolism (Ritte et al., 2000). Several proteins have been isolated from starch granules; among them is R1 (Reimann et al., 2002). R1 is a 160 kDa protein (Loberth et al., 1998) that catalyzes a dikinase-type reaction, transferring the γ -phosphate of ATP to water (resulting in the release of orthophosphate) whereas it uses the α -phosphate to phosphorylate C3 and C6 glucosyl residues of the polyglucan (Ritte et al., 2002). Phosphate groups in starch increase its hydration capacity (Blennow et al., 2002) and it has been suggested that the activity and/or binding of starch degrading enzymes is directly dependent on the number of Pi residues incorporated within starch (Ritte et al., 2002).

In this research, we investigated whether starch accumulation in bean leaves under Pi deficiency is the result of a decrease capacity in its mobilization

during nighttime. We also explored whether the properties of the starch produced under Pi deficiency are directly related to its capacity of being degraded.

Material and methods

Plant material

Bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L., genotype MAR1) were obtained from Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México. They were grown in greenhouse at 25 °C under a 16 h light/8 h dark regime in 350 cm³ plastic pots with agrolite. They were irrigated every day with 50 mL Hoagland solution (Jones, 1982). Plants were cultured for 21 days either with complete nutrient medium (+Pi, control) or without phosphate (−Pi). In the −Pi treatment, 500 μ M ammonium phosphate was substituted by ammonium sulfate. Plants used were at the stage of one mature leaf. Leaves were harvested 4–5 h after the beginning of the light period and frozen in liquid nitrogen.

Sugar extraction and determination

Leaf samples (100–300 mg) were homogenized in 2–3 mL 80% ethanol and extracted twice at 80 °C for 30 min. The soluble fraction was used to determine glucose, fructose and sucrose. Starch was quantified in the insoluble pellet. Glucose and fructose were determined enzymatically. At the first stage of the reaction, ethanol extract was mixed with 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 0.3 mM NAD⁺ and 1 U mL^{−1} yeast hexokinase (EC 2.7.1.1) and basal absorbance at 340 nm was measured. In the second stage 1 U mL^{−1} glucose 6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) was added to the mixture and absorbance at 340 nm was measured when reaction was at equilibrium. The difference between both values was used to calculate glucose concentration. Fructose was measured in the same way after the addition of 1 U mL^{−1} phosphoglucose isomerase (EC 5.3.1.9). Sucrose was measured by the anthrone method (van Handel, 1968). For starch measurement, the ethanol insoluble fraction was resuspended in 1.5 mL of water and incubated at 90 °C for 4 h. After cooling, 220 U amyloglucosidase (EC 3.2.1.3 from *Rhizopus*) in 1.5 mL 200 mM acetate buffer (pH 4.5) were added to each sample. Samples were incubated at 37 °C overnight and glucose was

determined in the supernatant by the enzymatic method described before.

Total phosphate determination

Total Pi in leaf tissue and starch granules was measured as described by Ames (1966). Sample (3.5 mg) was mixed with 20 μ L Mg(NO₃)₂ 10% (w/v) in ethanol and burned to a white ash. Then, 300 μ L HCl 0.5 M were added and sample was incubated in boiling water for 15 min. After cooling, 700 μ L of a solution containing 0.5 M H₂SO₄, 81.2 mM L-ascorbic acid and 0.29 mM ammonium molybdate were added and the sample was incubated for 20 min at 45 °C. Absorbance at 820 nm was registered and Pi content was calculated from standard curve constructed with KH₂PO₄.

In vivo labeling

Mature leaves were labeled with ¹⁴CO₂ as described by Viola et al. (2001). Five hours after the light period started, leaves were sealed in a plastic bag and ¹⁴CO₂ was liberated from 50 μ Ci (2.18 GBq mmol⁻¹) sodium [¹⁴C] bicarbonate by the addition of 200 μ L 3 M lactic acid. Plants were exposed to ¹⁴CO₂ for 1 h before injecting an excess of 3 M KOH to neutralize the acid and to absorb any remaining ¹⁴CO₂. Four hours later, leaves were harvested and frozen with liquid nitrogen. Samples were homogenized and extracted twice with 80% ethanol; radioactivity in soluble and starch (after enzymatic hydrolysis) fractions was determined in a Beckman LS 6000IC liquid scintillation counter.

Isolation of leaf starch granules

Leaf starch granules were isolated according to Ritte et al. (2000). Leaves (15–20 g) were frozen with liquid nitrogen, ground in a cold mortar and homogenized in 50 mL of extraction buffer (100 mM Hepes-KOH pH 8.0, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine and 2 mM aminocaproic acid). The homogenate was filtered through four layers of cheese cloth and centrifuged 5 min at 280g. The remaining pellet was washed twice in 10 mL of extraction buffer. The washed pellet was resuspended in 1.5 mL extraction buffer and layered on top of a 5 mL Percoll cushion (95% Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and 5% (v/v) 0.5 M Hepes-KOH (pH 7.0)) and centrifuged 5 min at 280g. Starch granules were washed with acetone, dried and stored at –80 °C

Starch susceptibility to β -amylase degradation

Susceptibility to β -amylolysis was analyzed in gelatinized and ungelatinized starch granules isolated from leaves of control and –Pi plants (Wang et al., 2002). For gelatinization, samples (1 mg starch granules/100 μ L H₂O) were incubated at 90 °C for 1 h. After cooling, 10 U of β -amylase (E.C. 3.2.1.2) in 100 μ L of 50 mM acetate buffer (pH 4.8) was added to each sample and incubated for 3 h at 30 °C. Maltose produced was determined by adding 2 U of α -glucosidase (E.C. 3.2.1.20) Zeeman et al. (1998). After 2 h at 37 °C, liberated glucose was quantified as above. Glucose from non-gelatinized is reported as a % of the glucose in gelatinized samples.

SDS-PAGE and immunoblotting

Dry starch was mixed with denaturing Laemmli buffer (15 μ L buffer per mg dry starch; Laemmli, 1970) and heated for 5 min at 95 °C. Following centrifugation the supernatant was applied to gels. Leaves were homogenized with 100 mM Hepes-KOH (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF and centrifuged for 5 min at 10,000g at 4 °C. The supernatant (20 μ g) was mixed with denaturing Laemmli buffer and processed as above. SDS-PAGE was performed according to Laemmli (1970) and proteins visualized by staining with Coomassie blue. Western blotting was performed according to Reimann et al. (2002). Antiserum directed against potato R1 protein (kindly donated by Dr. James R. Lloyd) was diluted 1:500 and anti-rabbit IgG (GIBCO, BRL) covalently bound to alkaline phosphatase (diluted 1:5000) was used as a second antibody. Alkaline phosphatase activity was detected according to supplier's instructions.

Results

After 3 weeks of Pi deprivation, total Pi in leaves and roots was reduced by 42% and 67%, respectively (Table 1). Shoot dry weight showed 40% reduction but root biomass was not affected, as a result, the ratio root: shoot increased from 0.39 in control plants to 0.60 in –Pi plants (Table 1).

On the other hand, the first leaf showed a large accumulation of starch, glucose and fructose while sucrose levels remained almost unchanged (Fig. 1). In order to investigate how starch was accumulated, leaves were incubated in presence of ¹⁴CO₂

Table 1. Effect of phosphate deprivation on the growth and total phosphate content of bean plants cultivated for 3 week with phosphate-sufficient (+Pi) and phosphate-deficient (–Pi) Hoagland solution. $n = 6$ and \pm SD values are indicated.

	Root		Shoot		Root/shoot	
	+Pi	–Pi	+Pi	–Pi	+Pi	–Pi
Total phosphate ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)	12.9 ± 1.4	4.2 ± 0.6	13.5 ± 0.1	7.8 ± 0.3	0.39 ± 0.01	0.60 ± 0.06
Dry weight (g)	0.48 ± 0.02	0.43 ± 0.03	1.25 ± 0.08	0.73 ± 0.04		

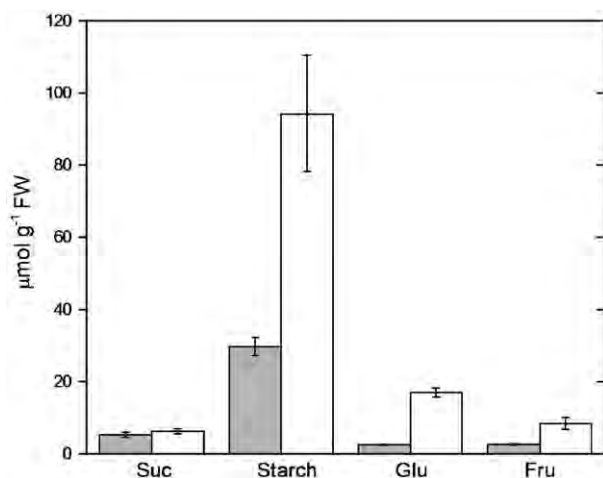


Figure 1. Accumulation of sucrose, starch, glucose and fructose in mature leaves of 3-week-old bean plants irrigated with phosphate-sufficient (■) and phosphate-deficient (□) Hoagland solution. $n = 5$ and \pm SD values are indicated.

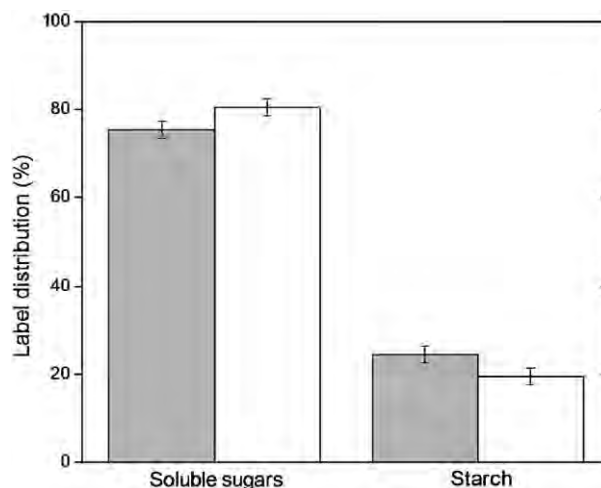


Figure 2. Relative distribution of fixed $^{14}\text{CO}_2$ in leaves of three week old plants irrigated with phosphate-sufficient (■) and phosphate-deficient (□) Hoagland solution. \pm SD values are indicated. $n = 3$ and \pm SD values are indicated.

for 1 h and 4 h later the distribution of the label between soluble sugars and starch was analyzed. Pi deficiency did not affect total CO_2 incorporation (data not shown), and the label distribution was the same in control and Pi deprived plants (Fig. 2). In both cases, 75% and 25% of incorporated label was found in soluble sugars and starch fractions, respectively. Then, it is unlikely that starch accumulation under Pi deprivation is due to elevation of starch synthesis.

To learn how Pi deficiency affected starch degradation, plants were labeled with $^{14}\text{CO}_2$ for 1 h. One group of plants was analyzed 4 h later and another group was incubated in dark for 18 h and incorporated label in starch was analyzed. As it was observed before, Pi deprivation did not affect the amount of starch synthesized during the day (Fig. 3). Interestingly, after the dark period, Pi deficient plants contained 40% more label in starch than control plants did. Additionally, starch accumulation in Pi deficient plants seemed to be a gradual process since there is a small daily increase (Fig. 4). It might suggest that under Pi deficiency,

starch is accumulated because degradation process becomes less efficient.

Starch is partially phosphorylated at C-3 and C-6 glucose positions. Phosphorylation increases starch hydrophilicity and probably favors the interaction with proteins that participate in its degradation (Ritte et al., 2002). Analysis of the amount of Pi showed that starch from Pi deprived plants has 43% less Pi than control plants (Table 2), and was also 19% less susceptible to β -amylase hydrolysis (Table 2).

R1 protein has been described as the enzyme responsible for starch phosphorylation (Ritte et al., 2003) and it has been shown to be associated with starch granules during the night (Ritte et al., 2000). Fig. 5 shows an SDS-PAGE and a western blot of soluble and starch associated proteins from control and Pi-deprived plants at daylight and after 5 h of darkness. During the day, the amount of R1 protein detected in the soluble fraction was not affected by Pi deficiency (Fig. 5C). The darkness period, however, reduced the amount of R1 protein in the soluble fraction of plants cultivated with Pi

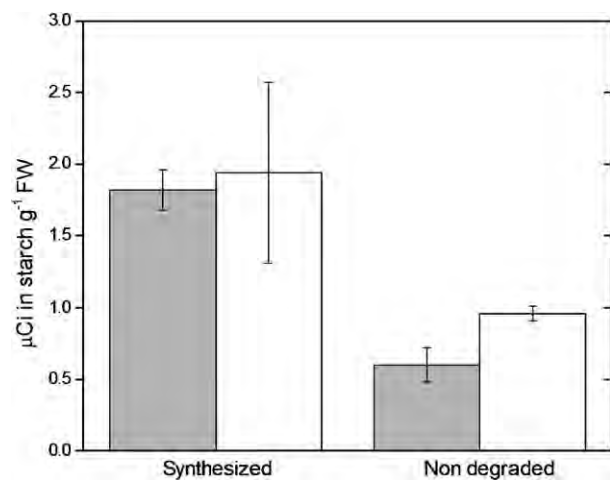


Fig. 3. (^{14}C) label in starch synthesized during the day and in the non-degraded starch after 18 h darkness in mature leaves of 3-week-old bean plants irrigated with phosphate-sufficient (■) and phosphate-deficient (□) Hoagland solution. $n = 3$ and \pm SD values are indicated.

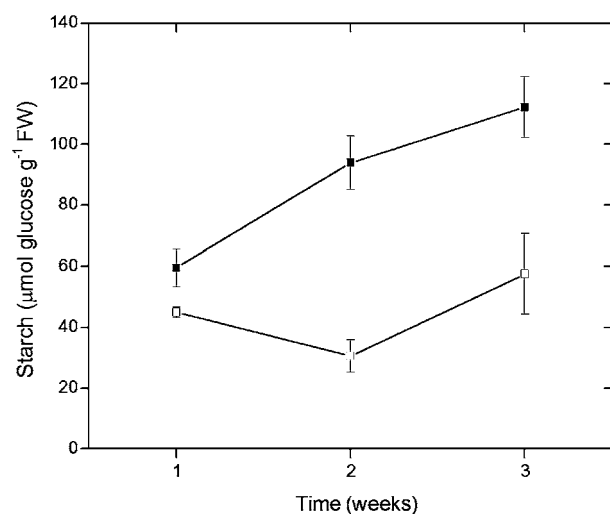


Figure 4. Starch accumulation in the first leaf of bean plants irrigated with phosphate-sufficient (■) and phosphate-deficient (□) Hoagland solution. $n = 5$ and \pm SD values are indicated.

Table 2. Effect of phosphate deprivation on the properties of leaf starch produced by bean plants irrigated for 3 week with phosphate-sufficient (+Pi) and phosphate-deficient (−Pi) Hoagland solution. $n = 3$ and \pm SD values are indicated.

Treatment	Phosphate ($\mu\text{mol g}^{-1}$ starch)	Susceptibility (% β -amylolysis)
+Pi	2.1 ± 0.20	62.6 ± 2.6
−Pi	1.2 ± 0.04	43.3 ± 1.9

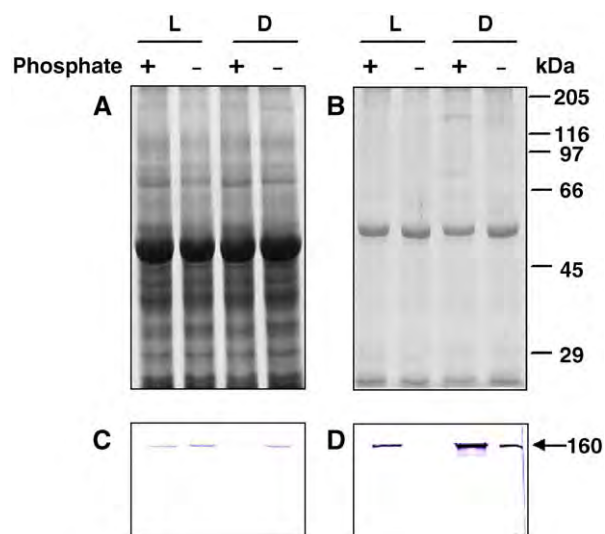


Figure 5. Detection of R1 protein in soluble extracts of mature leaves (A and C) and starch granules (B and D) from plants irrigated with phosphate-sufficient (+Pi) and phosphate-deficient (−Pi) Hoagland solution for 3 week and harvested at noon (L) or after 5 h darkness (D). A and B SDS-PAGE stained with Coomassie blue. C and D western-blot probed with an antiserum directed against R1 from potato.

(Fig. 5C). The analysis of starch associated proteins, showed that during the day, a significant amount of R1 protein is associated to the starch in Pi sufficient plants while almost no R1 protein was detected in Pi deprived plants. In both, Pi sufficient and deprived plants, darkness produced an increment in R1 protein associated with starch granules. However, the redistribution seemed to be more efficient in plants cultivated with Pi, since with a increase in the amount of R1 associated to the granules, a concomitant reduction in the soluble fraction was observed (Fig. 5D), suggesting a very well coordinated movement between cytosol and chloroplasts.

Discussion

As previously demonstrated (Kondracka and Rychter, 1997), Pi deficiency affected growth parameters of bean plants. After three weeks of Pi deficiency, total Pi was reduced 42% and 67% in shoots and roots, respectively, but only shoot growth was affected (Table 1). It has been suggested that maintaining root growth under Pi deficiency, helps plants to trawl for and find assimilable Pi sources (Raghothama, 1999).

Phosphate-deficiency stress induced a large accumulation of starch, glucose and fructose in the first leaf (Fig. 1). However, the $^{14}\text{CO}_2$ assimilation and the distribution between soluble sugars and starch fractions were not significantly affected (Fig. 2). Despite the fact that most of the starch produced each day is degraded at night, the process is less efficient in Pi deprived plants (Fig. 3), and the gradual accumulation of non-degraded starch can explain much of its enhancement in plants cultivated under Pi deficiency (Fig. 4).

Starch is partially phosphorylated at C-3 and C-6 positions, and it has been suggested, that phosphorylation changes the surface charge distribution and increases the hydration of starch, increasing the interaction with amylolytic enzymes (Yu et al., 2001). On the other hand, starch degradation process requires a physical interaction between starch granules and amylolytic enzymes (Reimann et al., 2002). As might be expected, starch from plants cultivated without Pi has 43% less Pi than starch from control plants and is also 19% less susceptible to β -amylase (Table 2). It is therefore possible that the changes in the properties of the starch produced under Pi deficiency (such as the amount of associated Pi), make its degradation in vivo less efficient too.

Recently it was demonstrated that R1 catalyzes starch phosphorylation (Ritte et al., 2003). Because the amount of R1 in the surface of starch granules of *Spirodela polyrhiza* turions correlates well with the rate of starch degradation (Reimann et al., 2002) and leaves of transgenic potato plants with reduced expression of R1 exhibit a starch-excess phenotype (Lobberth et al., 1998), it is reasonable to postulate that the interaction between R1 and starch granules is also important in regulating starch turnover.

In bean, Pi deficiency did not affect the amount of R1 protein detected in the soluble fraction during the day (Fig. 5C); some R1 is in the starch granule fraction but was reduced in granules from Pi deprived plants (Fig. 5D). The association between R1 and starch granules is transient, R1 has been found in the starch granules of leaves from darkened plants whereas light produced its release (Ritte et al., 2000). In potato tubers, starch phosphorylation proceeds concurrently with starch de novo biosynthesis as an integrated part of starch biosynthesis (Nielsen et al., 1994). It is possible that in beans starch phosphorylation also takes place during the synthesis. It may explain the relative high amount of R1 that was found in starch granules from Pi sufficient plants during the day (Fig. 5).

Darkness increased the amount of R1 protein associated to starch granules in both control and Pi deficient plants. However, the amount present in control plants was several times higher than in Pi deficient plants (Fig. 5D). Since a positive correlation between R1 bound to starch granules and starch turnover has been observed (Reimann et al., 2002); it is possible that the reduction in starch degradation observed at night in plants cultivated under Pi deficiency, at least in part results from prevention of the association between starch granules and R1 protein under those circumstances.

Unlike bean leaves, in turions of *S. polyrhiza* starch degradation is mediated by phytochrome and Pi deficiency increased the level of R1 protein associated to starch (Reimann et al., 2002). Avoiding the interaction between R1 protein and starch granules (bean leaves) or preventing R1 release from the complex (*S. polyrhiza* turions) may be two ways of reducing starch degradation.

Under normal circumstances, the amylolytic enzymes do not have regulatory properties, and changes in pH and Pi availability appear to be the factors that control starch turnover (Blennow et al., 2002). However, since alterations in β -amylase (Scheidig et al., 2002), starch phosphorylase (Zee-man et al., 1998) and D-enzyme (Critchley et al., 2001) produce phenotypes characterized by excessive starch accumulation, it will be worth investigating if amylolytic activities are affected by Pi deprivation. Finally, starch turnover is a very complex process (Smith et al., 2003) and Pi deficiency could affect it in multiple ways. The results presented in this paper, show that the interaction between R1 protein and starch granules is affected by Pi deficiency. How Pi availability regulates the interaction between R1 and starch granules, is currently under investigation.

Acknowledgments

We are especially grateful to Dr. James R. Lloyd, Risø Natural Laboratory, Denmark for kindly supplying antiserum against potato R1 and to Laurel Fabila for skilful technical assistance. This research was supported by DGAPA-UNAM (IN201101 and IN201502) and PAIP-FQ (6290-14). L.B. received a scholarship from CONACyT.

References

Ames BN. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Neufeld EF, Ginsburg V, editors.

- Methods in enzymology, vol. VIII. New York, London: Academic Press; 1966. p. 115–8.
- Blennow A, Engelsens SB, Nielsen TH, Baunsgaard L, Mikkelsen R. Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends Plant Sci* 2002;7: 445–50.
- Ciereszko I, Barbachowska A. Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J Plant Physiol* 2000;156: 640–4.
- Critchley JH, Zeeman SC, Takaha T, Smith AM, Smith SM. A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J* 2001;26:89–100.
- Foyer C, Spencer C. The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves. *Planta* 1986;167: 369–75.
- Fredeen AL, Rao IM, Terry N. Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Gliedene max*. *Plant Physiol* 1989;89:225–30.
- Jones JB. Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *J Plant Nutr* 1982;5:1003–30.
- Kondracka A, Rychter AM. The role of Pi recycling processes during photosynthesis in phosphate-deficient bean plants. *J Exp Bot* 1997;48:1461–8.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- Loberth R, Ritte G, Willmitzer L, Kossmann J. Inhibition of starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat Biotechnol* 1998;16:473–7.
- Nielsen TH, Wischmann B, Enevoldsen K, Møller BL. Starch phosphorylation in potato tubers proceeds concurrently with *de novo* biosynthesis of starch. *Plant Physiol* 1994;105:111–7.
- Nielsen TH, Krepp A, Roper-Schwaz U, Stitt M. The sugar-mediated regulation encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant Cell Environ* 1998;21:443–54.
- Raghothama KC. Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999;50:665–93.
- Reimann R, Ritte G, Steup M, Appenroth K- J. Association of α -amylase and R1 protein with starch granules precedes the initiation of net starch degradation in turions of *Spirodela pitorhiza*. *Physiol Plant* 2002;114: 2–12.
- Ritte G, Loberth R, Steup M. Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules. *Plant J* 2000;21:387–91.
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M. The starch-related R1 protein is an α -glucan, water *dikinase*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 7166–71.
- Ritte G, Steup M, Kossmann J, Lloyd JR. Determination of the starch-phosphorylating enzyme activity in plant extracts. *Planta* 2003;216:798–801.
- Scheidig A, Fröhlich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J. Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to starch-excess phenotype in leaves. *Plant J* 2002;30:581–91.
- Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM. Starch mobilization in leaves. *J Exp Bot* 2003;54:577–83.
- Stitt M, Wirtz W, Gerhardt R, Heldt HW, Spencer C, Walker D, Foyer C. A comparative study of metabolite levels in plant material in the dark. *Planta* 1985;166: 354–64.
- Usuda H, Shimogawara K. Phosphate deficiency in maize. I. Leaf phosphate status, growth, photosynthesis and carbon partitioning. *Plant Cell Physiol* 1991;32: 497–504.
- van Handel E. Direct microdetermination of sucrose. *Anal Biochem* 1968;22:280–3.
- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Handcock RD, Marmiroli N, Machray GC, Oparka KJ. Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* 2001;13:385–98.
- Wang L, Wang Y-L, Porter R. Structures and physicochemical properties of six wild rice starches. *J Agric Food Chem* 2002;50:2695–9.
- Yu T-S, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge U-I, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G, Steup M, Lue W-L, Chen J, Weber A. 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* 2001;13: 1907–18.
- Zeeman SC, Northrop F, Smith AM, ap Rees T. A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J* 1998;15:357–65.
- Zeeman SC, Tiessen A, Pilling E, Kato L, Donald AM, Smith AM. Starch synthesis in *Arabidopsis*; granule synthesis; composition and structure. *Plant Physiol* 2002;129: 516–29.

ANEXO 2

Una nueva visión de la degradación del almidón

Lilia Bernal
Investigadora. Escuela de Ciencias Químicas
Universidad La Salle.
E-mail: labg@ulsa.mx

Eleazar Martínez-Barajas
Departamento de Bioquímica
Facultad de Química (UNAM)

Recibido : Agosto de 2005. Aceptado: Octubre de 2005

RESUMEN

Todas las células vegetales sintetizan y degradan almidón en algún punto de su desarrollo; no obstante, existen notables diferencias con relación al destino del almidón producido. En las hojas se sintetiza y acumula durante el día mientras que en la noche se degrada. Esto permite proveer de carbono y mantener diferentes procesos celulares. La regulación de esta vía por lo tanto, deberá estar controlada de tal manera que quede integrada al metabolismo de la planta. La degradación del almidón es un proceso que depende de la estructura del gránulo, de la participación de diversas enzimas y su asociación con el gránulo. Estudios recientes muestran que la degradación del almidón en hojas es diferente a lo que sucede en endospermo y por lo tanto, es necesario construir un modelo particular para este sistema. Los estudios con mutantes y plantas transgénicas muestran que la β -amilasa es responsable de la hidrólisis de la mayor parte del almidón acumulado en hojas y la participación de la α -amilasa parece depender de la especie. Adicionalmente, en este trabajo se propone que las características del gránulo son muy importantes para definir la interacción con las proteínas que van a participar en su degradación.

Palabras clave: gránulo de almidón, degradación de almidón, amilosa, amilopectina, asociación proteína-gránulo de almidón.

ABSTRACT

All plant cells synthesize and degrade starch in determined stage of their development. There are, however, important differences related to its use. In leaves, starch is produced and accumulated at day while it is degraded at night to provide carbon maintaining cellular processes. This means that the pathway regulation is integrated to the whole plant metabolism. Starch degradation is a process that depends on the starch granule structure, the action of several enzymes and the association of these to the starch granule. Recent research reveals that starch degradation in leaves is significantly different from starch endosperm breakdown and these new data have led to build a particular model of this pathway. Studies with mutants and transgenic plants suggest that β -amylase has a major role in the hydrolysis of the accumulated starch in leaves, while the participation of α -amylase is probably species-dependent. Additionally, in this paper is suggested that starch granule characteristics are especially important in regulating the starch interaction between granule and proteins involved in starch metabolism.

Key words: starch granule, starch degradation, amylose, amylopectin, protein-starch granule association.

INTRODUCCIÓN

El almidón es un polímero de glucosa que constituye el principal producto de almacenamiento en semillas y otros órganos (43). Representa el 80% de la ingesta calórica mundial, se utiliza como alimento animal y es una importante materia prima para la industria (10). La importancia económica y social que adquirieron durante el siglo pasado las bebidas alcohólicas producidas a partir de cereales, llevó a una mayor investigación científica dirigida a conocer la naturaleza y regulación del proceso de degradación de almidón en el endospermo, el cual actualmente se entiende con profundidad tanto a nivel bioquímico como molecular (38). Sin embargo, la degradación del almidón en endospermo de cereales puede ser muy diferente a la forma en que este proceso ocurre en otras especies y órganos vegetales.

Todas las células vegetales sintetizan y degradan almidón en algún punto de su desarrollo; no obstante, existen notables diferencias con relación al destino del almidón producido. En órganos de almacenamiento como tubérculos, raíces y embriones puede acumularse por períodos muy largos, en meristemos y órganos en desarrollo la acumulación puede prolongarse por días o semanas, mientras que en las hojas se acumula durante el día y se degrada en la noche. En todos los casos la síntesis y degradación del almidón se llevan a cabo en los plastidios, pero ambos procesos en cada órgano, pueden regularse de manera muy diferente: mientras que el endospermo, al momento de la germinación, puede asemejarse a una bolsa repleta de almidón que recibe a las enzimas hidrolíticas, en las células de las hojas el almidón se degrada y provee de carbono para el mantenimiento de diferentes procesos dentro de la misma; por lo que esta vía debe estar perfectamente integrada a todo el metabolismo. La cantidad de almidón presente en un órgano representa un balance entre los procesos de síntesis y degradación. Si bien existen dudas acerca de algunos puntos críticos del proceso de síntesis, comparativamente se conoce menos acerca del proceso de degradación y de su regulación.

Actualmente se sabe que múltiples isoformas de las enzimas que degradan el almidón, como son α - y β -amilasas, enzimas desramificadoras, almidón fosforilasa, glucosidasas y enzima desproporcionadora están presentes en la mayoría de los órganos estudiados (44). En los últimos años los recursos genómicos disponibles para *Arabidopsis thaliana* y la posibilidad de generar mutantes y plantas transgénicas han contribuido a establecer el papel que cada una de esas enzimas tiene en el proceso.

El objetivo de este trabajo es abordar y discutir el tema de la degradación de almidón desde tres puntos de vista diferentes: el gránulo de almidón, las enzimas involucradas en el proceso y el papel de la interacción gránulo de almidón-enzimas hidrolíticas. Muchos aspectos de la degradación del almidón son comunes a todos los órganos en donde este proceso se ha estudiado; sin embargo, dada la importancia que tiene la degradación del almidón acumulado en las hojas para el desarrollo de las plantas, se buscará hacer énfasis en la regulación de ese proceso en particular.

EL GRÁNULO DE ALMIDÓN

El almidón es una mezcla de polímeros de glucosa (amilosa y amilopectina) que las plantas producen y acumulan en forma de gránulos insolubles que presentan formas y tamaños diversos. Los gránulos son estructuras altamente organizadas cuyas dimensiones y características varían entre especies, los gránulos de tubérculos de papa miden 100 μm (40), mientras que existen otros de 1-3 μm como los de raíz de taro o

los de hoja de *A. thaliana* (33, 51). Algunos gránulos tienen forma esférica o son esferoides aplanados con un surco ecuatorial, mientras que otros son poligonales (46).

La amilosa

Es un polímero lineal formado por cadenas de glucosas unidas por enlaces α -1,4, que constituyen el 20-30% del gránulo de almidón en los órganos de almacenamiento y 4-20% en los gránulos provenientes de las hojas (51, 11). Su peso molecular se encuentra en el orden de 10^5 - 10^6 (17). La localización exacta de la amilosa en el gránulo no ha sido determinada de manera concluyente, pero se ha sugerido que se encuentra principalmente en la región menos cristalina, la parte amorfa (15, 8). Se sabe que la amilosa se sintetiza por medio de la acción catalítica de la isoforma de almidón sintasa, que está unida al gránulo (GBSS), pues mutantes que carecen de GBSS en maíz (36), arroz (33, 45), trigo (24), papa, sorgo, amaranto, cebada y chícharo (17), sintetizan gránulos de almidón sin amilosa. Además, los estudios realizados en papa y arroz en los que se logró reducir la expresión de GBSS por medio de la expresión de RNA antisentido produjeron gránulos de almidón con contenido de amilosa considerablemente reducido. Estas mutantes en cereales se denominan “cerosas” debido a que dan como resultado endospermos opacos, los cuales son más susceptibles a la degradación, mientras que los almidones de papa y de maíz con alto contenido de amilosa son más resistentes (8).

No se sabe como la GBSS cataliza la síntesis de amilosa, ni que es lo que impide que las enzimas ramificadoras actúen para generar cadenas laterales, pues aunque la GBSS se encuentra siempre unida al gránulo, existen otras enzimas involucradas en el metabolismo del almidón que tienen capacidad de asociarse con él. Por ello no puede atribuirse la síntesis de amilosa al hecho de que las enzimas ramificadoras no se encuentren permanentemente asociadas al gránulo. Se ha especulado que probablemente la GBSS es la única enzima que mantiene su actividad asociada a los gránulos mientras que las enzimas ramificadoras no lo hacen, o que probablemente existen zonas en los gránulos donde la GBSS si tiene actividad mientras que las otras enzimas no (17).

Por otro lado, se han encontrado enzimas ramificadoras bacterianas que sí son capaces de actuar en regiones del gránulo de almidón donde las ramificadoras de plantas no lo hacen, generando un material ramificado considerado como un compuesto intermedio entre la amilosa y la amilopectina (16). Sin embargo, aún no se sabe cuales son las características de estas enzimas bacterianas que definen su capacidad para mantenerse activas en la región de la amilopectina. Otra de las preguntas aún sin resolver en la biosíntesis del almidón se relaciona con la generación, recambio e incorporación en los gránulos de almidón de los intermediarios que están entre ADP-glucosa y el almidón. Éstos se sintetizan *in vitro*, pero se han encontrado sólo escasamente *in vivo*, mientras que es imposible sintetizar almidón *in vitro*. En experimentos en donde, los gránulos de almidón se incubaron con ADP- ^{14}C glucosa se encontró que en períodos cortos (una hora) la marca era incorporada en la amilopectina [6], pero después de períodos largos (24 horas) la marca se encuentra principalmente en la amilosa. De estos resultados se concluyó que la GBSS primero extiende las cadenas de las moléculas de amilopectina y que a partir de estas, por hidrólisis, se obtengan cadenas que constituyen la amilosa (17). Existen varias posibilidades que podrían liberar las cadenas de amilosa; una de ellas es que las endoamilasas hidrolicen a la amilopectina y den lugar a cadenas de amilosa y otra que la GBSS tenga una segunda actividad mediante la cual las cadenas de glucanos se liberan después de una elongación progresiva. Dado que todas las mutantes que se han descrito como libres de amilosa presentan reducción de la actividad de GBSS, la última opción sería la más probable (17).

La amilopectina

La amilopectina es un polisacárido semicristalino, altamente ramificado, con un esqueleto de enlaces α -1,4 y 4-5% de puntos de ramificación α -1,6 (3). La amilopectina es una molécula de mayor tamaño que la amilosa y su peso molecular se encuentra entre 10^7 - 10^8 . El peso molecular y el grado de ramificación de la amilopectina varía ampliamente y esta variedad estructural contribuye a las diferencias en las propiedades químicas y físicas del almidón proveniente de diferentes fuentes (10). El análisis estructural de los gránulos muestra que las cadenas laterales de la amilopectina forman dobles hélices y están arregladas de tal manera que se forman paquetes que contienen entre 9 y 17 cadenas laterales en intervalos regulares de aproximadamente 9-10 nm de largo sobre el eje de la molécula y dan lugar a las lamelas cristalinicas, que se encuentran alternadas con lamelas amorfas formadas por las regiones donde se localizan los puntos de ramificación y por los espacios entre los agregados de dobles hélices (figura 1) (8). El modelo de "empaquetamiento" (figura 2), considera que la amilopectina se constituye de diferentes tipos de cadenas y esto se apoya por las observaciones de tres diferentes clases de cadenas, A, B, y C, que varían en longitud y que se asocian para formar los paquetes.

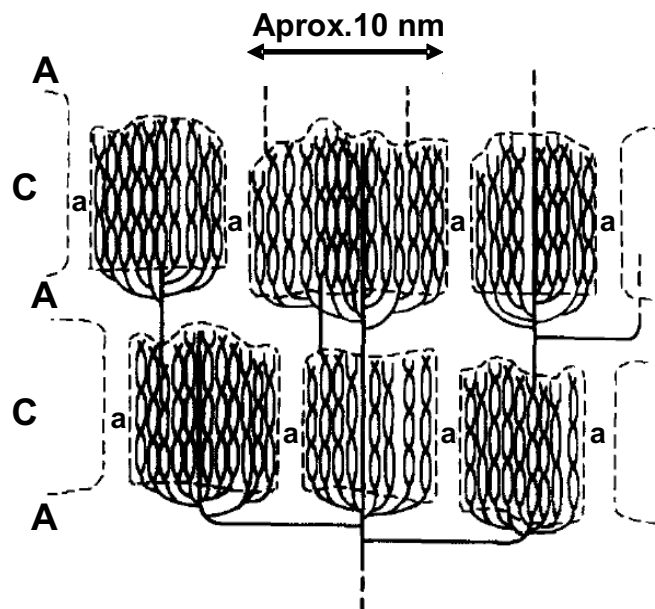


Figura 1. Esquema del empaquetamiento de las cadenas laterales de amilopectina en las lamelas. Cada empaquetamiento contiene entre 9 y 17 cadenas laterales. Las zonas amorfas se localizan entre las lamelas cristalinicas y entre cada paquete de cadenas laterales. A, lamelas amorfas (zona de ramificación) de aproximadamente 4nm de largo; C, lamelas cristalinicas (paquetes de cadenas laterales de amilopectina) de 6 nm de largo en promedio; a, regiones amorfas entre los paquetes cristalinicos. Tomado de Gallant, 1997.

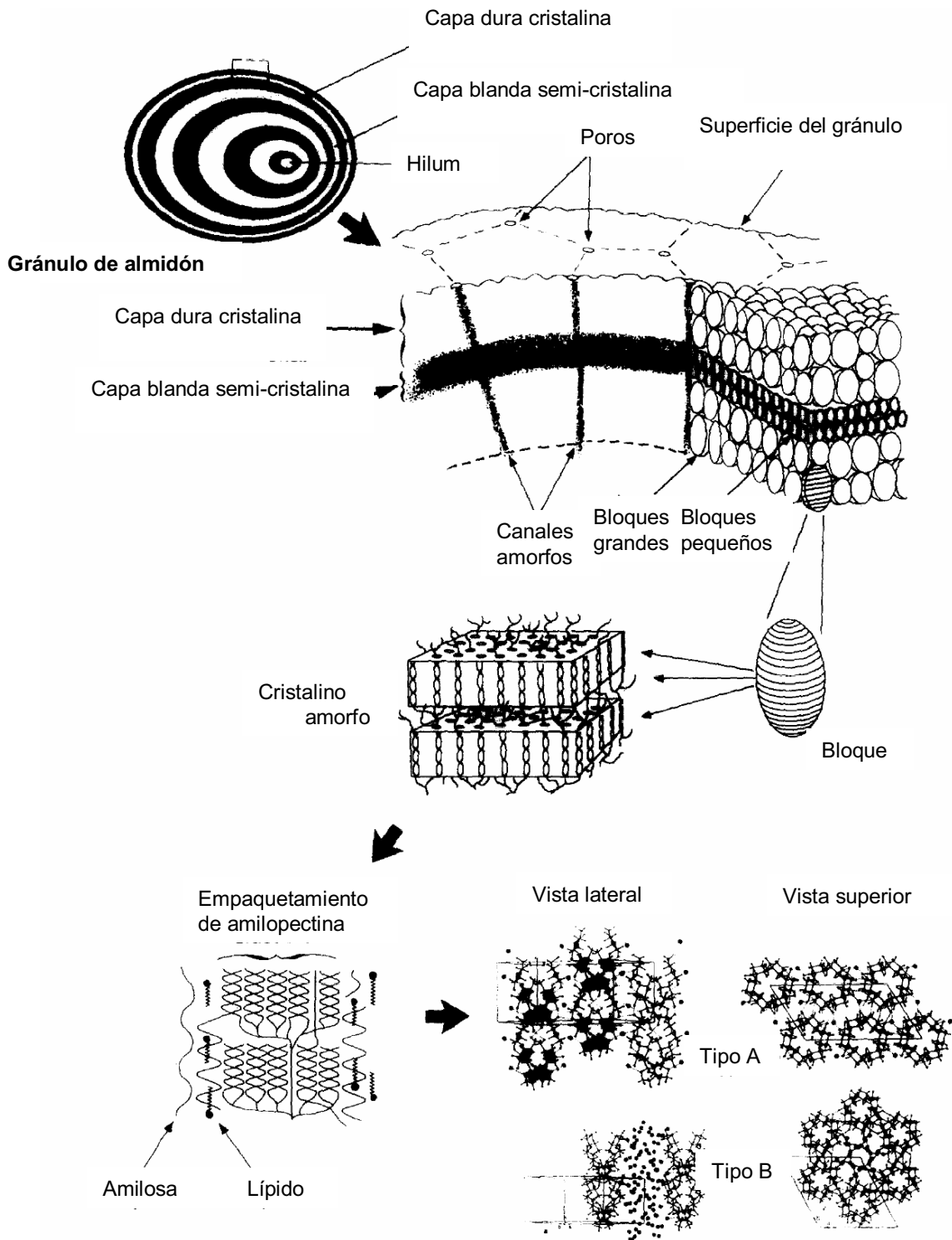


Figura 2. Estructura del gránulo de almidón
Tomado de Gallant, 1997

Los patrones de difracción de rayos X que se obtienen de almidones de diferentes plantas se pueden agrupar en dos tipos principales. El tipo A es característico del almidón de cereales y se distingue por el denso empaquetamiento de las dobles hélices y el tipo B, en el que las dobles hélices están arregladas de tal manera que permiten que moléculas de agua queden incluidas en el arreglo. En algunos almidones principalmente del tipo A, se ha observado la presencia de canales amorfos o poros que podrían estar relacionados con la mayor o menor susceptibilidad del almidón a la degradación enzimática, pues los almidones cuyos gránulos presentan estas estructuras tienden a ser más fácilmente degradados (17). La variación en la susceptibilidad a la degradación de los gránulos de almidón también depende del origen botánico, lo cual evidencia algunas diferencias estructurales (90). Durante la α -amilolisis del almidón, las regiones menos cristalinas, son más fácilmente degradadas que las regiones cristalinas (8). Se ha sugerido que la velocidad de hidrólisis del almidón depende, en gran medida, de la distribución de las zonas cristalina y semi-cristalina, así como del tamaño e interacción de sus componentes.

La amilopectina se sintetiza predominantemente en la superficie del gránulo y participan por lo menos nueve isoformas de enzimas, entre las que se encuentran la enzima almidón sintasa (SS) y las enzimas ramificadoras. Se han identificado numerosas isoformas de SS en plantas (10) y se conoce poco con relación a su función y especificidad. Para entender la función de la enzima SS en la biosíntesis de almidón es necesario también conocer cuál es su interacción con las enzimas desramificadoras pues múltiples isoformas actúan de manera concertada para sintetizar la amilopectina y determinar su estructura (17).

Otros componentes del gránulo

Además del peso molecular, la amilosa y la amilopectina presentan diferencias en la capacidad para asociarse con otras moléculas. La naturaleza química de la amilosa provoca que forme asociaciones con pequeñas moléculas hidrófobas, por lo que es común que a la fracción de amilosa se encuentre asociada una proporción alta de lípidos (23), mientras que la amilopectina contiene grupos fosfatos unidos de manera covalente. El nivel de fosforilación varía con el origen botánico del almidón, encontrándose que el almidón que proviene de cereales presenta niveles de fosforilación apenas perceptibles (<0.01%), mientras que el almidón de papa está altamente fosforilado (0.5%) (21). En las hojas el almidón transitorio presenta aproximadamente 0.1% de residuos de glucosas fosforiladas (49). Los grupos fosfato están unidos como monoésteres en las posiciones C-3 y C-6 de las unidades de glucosa y esta fosforilación parece que ocurre tanto durante la síntesis como durante la degradación del almidón (25, 28). La fosforilación en la posición C-3 principalmente, puede modificar el empaquetamiento de las dobles hélices (3) y esto de alguna manera puede alterar el ordenamiento del gránulo y cambiar la interacción con las proteínas que se asocian con el almidón para llevar a cabo su degradación, pues se tienen evidencias de que si se disminuye el grado de fosforilación también la degradación se ve disminuida (2, 49, 52).

ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN

Durante el día las células de las hojas toman carbono que se convierte a partir de la fotosíntesis en sacarosa y almidón. La sacarosa se exporta a los tejidos no fotosintéticos y el almidón se almacena en el cloroplasto. En la noche este almidón se degrada para proveer a la célula y a otros órganos de carbono, energía y poder reductor. El suministro de carbono a partir del almidón degradado en la noche es esencial para el desarrollo de la planta.

La degradación del almidón involucra la asociación temporal de los gránulos con muchas enzimas (30). El primer paso en este proceso debe ser catalizado por una enzima capaz de actuar en la superficie semicristalina del gránulo. Aunque existen varias enzimas capaces de degradar los gránulos de almidón *in vitro* la única enzima que se ha encontrado que puede hacerlo *in planta* es la α -amilasa (1); esta endoenzima hidroliza los enlaces glicosídicos α -1,4 en polímeros de glucanos (47). En el genoma de *Arabidopsis*, existen tres genes que pueden codificar tres isoformas de α -amilasa, una de las cuales (AMY3) se encuentra en el cloroplasto (tabla 1) (19); sin embargo, Yu, *et al.* [48] mostraron que en ausencia de AMY3 la degradación del almidón ocurre de manera normal. Esto sugiere que el ataque inicial en la superficie de los gránulos no requiere una endoamilasa, o que *A. thaliana* posee otra endoamilasa cuya secuencia de aminoácidos es muy diferente, por lo que no ha sido identificada como tal. Mientras que Asatsuma *et al.* (1) encontraron evidencias de la participación de la isoforma I-1 de α -amilasa en la degradación de almidón de hoja en arroz. Por lo que aún cabe la duda de si es la α -amilasa la enzima responsable de iniciar la degradación del gránulo de almidón y si este evento depende de la especie.

Tabla 1. Enzimas que se sabe actúan ó podrían actuar en *Arabidopsis* sobre enlaces glicosídicos α -1,4 ó α -1,6.

Enzima	Gen	Localización en plastidios (predicha) ^a
α -Amilasa 1	AMY1	No
α -Amilasa 2	AMY2	No
α -Amilasa 3	AMY3	Sí
β -Amilasa 1	BAM 1	Sí
β -Amilasa 2	BAM2	Sí
β -Amilasa 3	BAM3	Sí
β -Amilasa 4	BAM4	No
β -Amilasa 5	BAM5	No
β -Amilasa 6	BAM6	No
β -Amilasa 7	BAM7	No
β -Amilasa 8	BAM8	No
β -Amilasa 9	BAM9	No
Glucan agua dicinasa	GWD1	Dudoso
Fosfogluca agua dicinasa	PWD	Sí
Almidón fosforilasa cloroplástica	PHS1	Sí
Almidón fosforilasa citosólica	PHS2	No
Enzima desproporcionadora	DPE1	Sí
Transglucosidasa	DPE2	Sí
Isoamilasa 1	ISA1	Dudoso
Isoamilasa 2	ISA2	Sí
Isoamilasa 3	ISA3	Sí
Pululanasa	LDA1	Sí
α -glucosidasa		

Modificada de Lloyd J, 2005.

^aLa predicción se hizo mediante los programas TargetP (Emanuelsson, 2000) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) y Predatar (<http://www.inra.fr/predotar/>). El

término dudoso se aplicó cuando los resultados en ambos programas eran contradictorios.

Por otro lado, independientemente de cuál es la enzima que inicie el ataque, actualmente se sabe que la enzima glucan, agua dicinasa (GWD) es necesaria en el proceso de degradación de almidón (4, 49, 52). En papa, se mostró que la enzima GWD transfiere el β -fosfato del ATP a los carbonos 3 o 6 de los glicosilos que forman la amilopectina (22, 29) y aparentemente esta fosforilación *in vivo* ocurre tanto durante el período de síntesis como en el período de degradación (25, 28). La función de la proteína GWD en la degradación se podría explicar con base en que los grupos fosfato influyen en el empaquetamiento del gránulo y, de esta manera, modifican la susceptibilidad de la superficie al ataque enzimático; o bien, que la proteína, a través del dominio que está en el extremo N-terminal y cuya función es hasta ahora desconocida, promueva la actividad de alguna enzima ya sea interaccionando con la superficie del gránulo o bien con la misma proteína (37). El descubrimiento de que una segunda dicinasa (PWD, fosfoglucon, agua dicinasa), se requiere en la degradación del almidón ha incrementado la complejidad de este proceso. Se ha sugerido que GWD actúa junto con PWD generando un patrón de fosforilación de la amilopectina en la superficie del gránulo que lo hace accesible al ataque enzimático, sin embargo, la información al respecto es incompleta (18).

Una vez iniciada la degradación del gránulo del almidón, se generarán glucanos solubles en el estroma del cloroplasto, que pueden metabolizarse a través de fosforólisis por la enzima glucan fosforilasa cloroplástica, generándose glucosa 1-fosfato (53) o por la enzima β -amilasa que cataliza la producción de β -maltosa a partir del extremo no reductor de α -1,4-glucanos. Los estudios que se han realizado indican que la β -amilasa es responsable de la hidrólisis de la mayor parte del almidón acumulado en hojas de papa (35) y en cloroplastos de *A. thaliana* (50) y que la maltosa producida se exporta al citosol por medio de un transportador específico (26).

Las enzimas α -amilasa y β -amilasa hidrolizan los enlaces α -1,4, pero no los α -1,6; esto significa que existen otras enzimas para romper los enlaces que dan lugar a las ramificaciones, mismas que se han nombrado enzimas desramificadoras, que pueden dividirse en isoamilasas o dextrinasas límite, dependiendo de su especificidad por el sustrato. El genoma de *A. thaliana* contiene cuatro genes de enzimas desramificadoras, tres isoamilasas (ISA1, ISA2 e ISA3; tabla1) y una dextrinasa límite. Sin embargo, aparentemente esta última no está involucrada en la degradación de almidón en hojas de *A. thaliana*, pues existe una mutante *knockout* sin actividad de dextrinasa límite que no mostró cambio en su velocidad de degradación del almidón (37). El papel de las isoamilasas no es claro, pues se ha visto que también están involucradas en la síntesis de almidón. En hojas de *A. thaliana*, tubérculos de papa y endospermo de cereales existe evidencia que al reducir o suprimir la actividad de estas enzimas se altera la síntesis de almidón, incrementándose el número de gránulos, reduciéndose su tamaño y promoviendo la síntesis de fitoglucógeno, un polímero soluble de glucosas con enlaces α -1,4 y α -1,6 (37, 19). Aunque ISA1 e ISA2 son necesarias en la síntesis de almidón en hojas de *A. thaliana*, estas enzimas no parecen ser necesarias en la degradación de almidón durante la noche, pues las mutantes *isa1* e *isa2* (*dbe1*) presentan una degradación total del almidón y del fitoglucógeno (19, 37).

Dado que ni la dextrinasa límite ni las enzimas ISA1 e ISA2 parecen participar en la degradación del almidón en hojas, podría sugerirse que la hidrólisis de los puntos de ramificación del almidón se cataliza por ISA3, sin embargo, no existen mutantes en las que se haya reprimido la actividad de esta enzima que pongan de manifiesto la importancia de su participación, pero estudios recientes en los que se utilizaron microarreglos, mostraron que el patrón de expresión de ISA3 es similar al de otras enzimas involucradas en la degradación del almidón (39). No obstante, debe

considerarse la posibilidad de que estén involucradas otras enzimas todavía no identificadas.

Otro grupo de enzimas que también participan en la degradación del almidón son las enzimas desproporcionadoras o enzimas D. La enzima β -amilasa es incapaz de actuar sobre cadenas de menos de cuatro glucosas por lo que genera maltotriosas que serán sustrato de estas enzimas. La enzima D transfiere dos de los glucosilos de la maltotriosa a una cadena mayor de glucanos, permitiendo de esta manera que la molécula generada esté disponible para la hidrólisis de β -amilasa y la glucosa restante puede exportarse al citosol, a través del transportador de glucosa localizado en la membrana interna (43). Además de la isoforma plastídica de la enzima D, existe una isoforma citosólica llamada DPE2. Los estudios en una mutante de DPE2 sugieren que esta enzima utiliza la maltosa liberada por el cloroplasto (5). La maltosa producida por la enzima β -amilasa podría ser hidrolizada a glucosa a través de una α -glucosidasa y después por medio de una hexocinasa convertida en glucosa 6-fosfato, sin embargo, parece ser que se metaboliza a través de una reacción de transglucosilación con la enzima DP2, transfiriendo una de las glucosas de la maltosa a un poliglucano ramificado y liberando una glucosa que la hexocinasa puede transformar en hexosa fosfato (37). El esquema que describe la acción de las enzimas involucradas en la degradación de los gránulos de almidón se presenta en la figura 3.

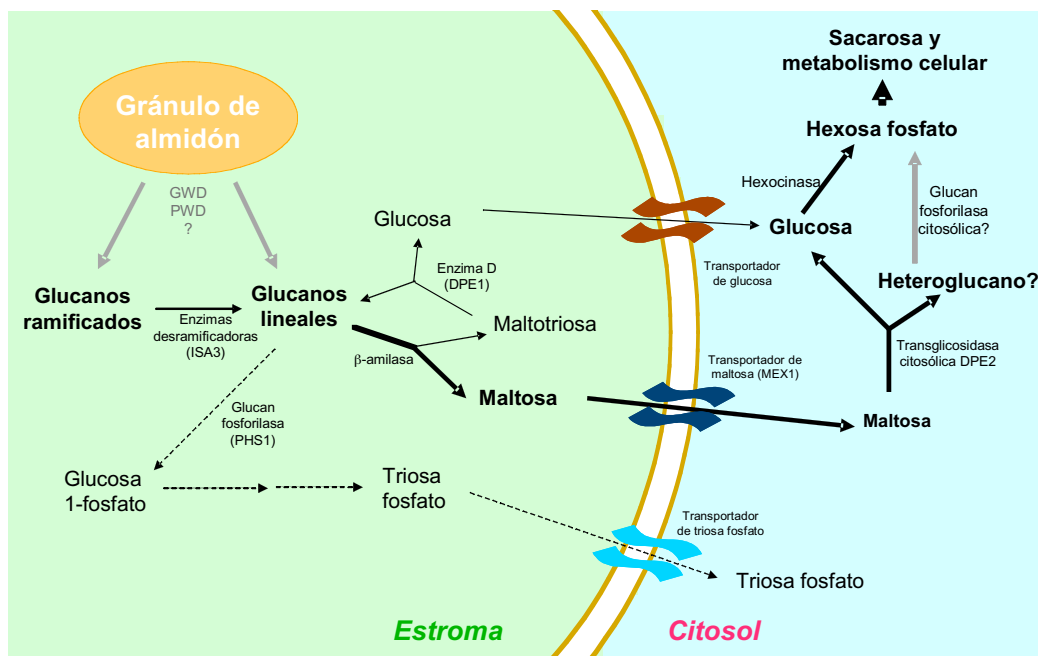


Figura 3. Vía propuesta para la degradación del almidón de hojas en *Arabidopsis*. Tomado de Smith 2005.

LA INTERACCIÓN GRÁNULO DE ALMIDÓN-ENZIMA

Las plantas acumulan almidón en sus hojas durante el día como una fuente de energía para la noche siguiente, lo que sugiere que debe existir un proceso altamente regulado. Como se mencionó anteriormente, aún no se sabe con exactitud que enzima inicia la degradación del almidón; sin embargo, es razonable asumir que las reacciones involucradas tendrán lugar en la interfase del gránulo de almidón y el estroma. Por ello,

la asociación de diferentes proteínas a la superficie del gránulo constituirá un paso esencial en el metabolismo de degradación del almidón (30). Los factores que definen la interacción proteína-almidón aún se encuentran en estudio; no obstante, se sabe que la asociación de algunas proteínas depende del estado metabólico de la célula como es el determinado por los períodos de luz-oscuridad.

En el caso de la proteína GWD (anteriormente llamada R1) se ha mostrado que su asociación a los gránulos de almidón es reversible y que la asociación es una interacción proteína-carbohidrato, que no involucra a otras proteínas, al menos *in vitro* (30). En hojas de *A. thaliana*, papa, chícharo y frijol, aparentemente la cantidad de la proteína GWD permanece constante (30, 49); sin embargo, para las últimas tres especies se ha mostrado que la proporción de proteína GWD asociada al gránulo se incrementa considerablemente durante el período de degradación (2, 28). Los estudios anteriores muestran que existe una coincidencia entre la unión de GWD y el grado de fosforilación, pero no se han definido aún las modificaciones que ocurren en la superficie del gránulo durante su degradación que llevan a una mayor asociación de proteínas e incrementan su actividad. Existen evidencias que muestran que en condiciones *in vitro*, los gránulos de almidón con mayor grado de fosforilación son mejores sustratos para la proteína GWD y además son más susceptibles a la degradación amilolítica (2, 28), lo que podría estar sugiriendo que la fosforilación de la superficie del gránulo facilita también la asociación de otras enzimas y que características del gránulo como el nivel de fosfato son relevantes en este proceso.

También se ha reportado que la proporción de amilosa y amilopectina, así como el largo de las cadenas de amilopectina, contribuyen en la degradación del almidón. Los almidones que presentan altos contenidos de amilosa tienen mayor resistencia a la degradación enzimática que los almidones con niveles bajo (8), no se conoce cuál es la razón de esta relación pero cabría la posibilidad de que dado que la proporción de amilopectina en estos gránulos es menor, entonces la capacidad de fosforilación que sólo se da en esta fracción, también será menor y en consecuencia la asociación de proteínas se verá reducida. Por otro lado, existen evidencias de que la actividad de la proteína GWD se ve favorecida por cadenas largas de amilopectina (DP 30-100) (22); sin embargo, en los estudios reportados por Ritte *et al.* (28) no se observaron cambios relevantes durante el ciclo luz-oscuridad en el largo de la cadena de las moléculas periféricas de amilopectina, lo que sugiere que aparentemente este factor no contribuye a la mayor interacción proteína-almidón.

Además, se sabe que varias de las proteínas que están involucradas en el metabolismo de almidón poseen módulos de unión a almidón diferentes del dominio catalítico (32). Una de las funciones de estos dominios es unir a la enzima a la superficie insoluble del gránulo de almidón y existen evidencias de que la actividad de estas enzimas sobre sustratos insolubles se pierde si el dominio se remueve, mientras que su actividad hacia sustratos solubles se mantiene (14). Se ha sugerido que estos dominios también modifican la superficie del gránulo (41), lo que probablemente permitiría la unión al almidón de otras proteínas que no poseen estos dominios pero que están involucradas en la degradación del almidón. Se ha reportado la presencia de estos dominios en α -amilasa, β -amilasa y pululanasa de microorganismos y plantas como maíz y cebada (13, 31, 32, 42).

CONCLUSIONES

El avance en el conocimiento del genoma de *A. thaliana* ha permitido lograr un mayor entendimiento del proceso de degradación del almidón acumulado en las hojas y hace posible proponer un modelo como el de la figura 3. Sin embargo, no se puede generalizar ni a otros órganos ni a otras especies. Aún no se sabe quién inicia la degradación del gránulo de almidón ni se conoce con exactitud como se da la asociación

de las proteínas con el gránulo por lo que se requieren otras investigaciones que permitan conocer la relación entre la fosforilación y la asociación de las proteínas con el gránulo. Por otro lado, es poco lo que se conoce acerca de la regulación de este proceso y aunque recientemente se han mostrado evidencias de que la actividad de las enzimas biosintéticas se controla post-traduccionalmente (regulación REDOX y fosforilación) y se ha propuesto que el proceso de degradación requiere activación post-traducciona l y/o la formación de complejos proteicos, aún se está lejos de poder entender cómo se controla el flujo a través de esta vía.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece el apoyo de Jimena Rojas Bernal y Javier Andrés Juárez Díaz en la revisión de este documento y el financiamiento otorgado por CONACYT (beca), Facultad de Química UNAM (PAIP 6290-14), DGAPA IN201502 y ULSA Q063/2004.

REFERENCIAS

1. Asatsuma S., Sawada C., Itoh K., Okito M., Kitajima A. "Involvement of α -Amylase I-1 in Starch Degradation in Rice Chloroplasts". *Plant Cell Physiol.*, vol. 46, pp. 858-869, 2005.
2. Bernal, L., Coello, P., Martínez-Barajas E. "Possible Role Played by R1 Protein on Starch Accumulation in Bean Seedlings (*Phaseolus Vulgaris*) under Phosphate Deficiency". *J. Plant Physiol.*, vol. 162, pp. 970-976, 2005.
3. Blennow A, Engelsen SB, Nielsen TH, Baunsgaard L, Mikkelsen R. "Starch Phosphorylation: New Front Line in Starch Research". *Trends Plant Sci.*, vol. 7, núm. 10, pp. 445-450, 2002.
4. Caspar T, Lin TP, Kakefuda G, Benbow L, Preiss J, Somerville C. "Mutants of Arabidopsis with Altered Regulation of Starch Degradation". *Plant Physiol.*, vol. 95, pp. 1181-1188, 1991.
5. Chia T., Thorneycroft D., Chapple A., Messerli G., Chen J. "A Cytosolic Glucosyl-Transferase is Required for Conversion of Starch to Sucrose in *Arabidopsis* Leaves at Night". *Plant J.*, vol. 37, pp. 853-863, 2004.
6. Denyer K, Clark B, Hilton C, Tatge H, Smith A. "The Elongation of Amylose and Amylopectin Chains in Isolated Starch Granules". *Plant J.*, vol. 10, pp. 1135-1143, 1996.
7. Emanuelsson O. *et al.* "Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence". *J. Mol. Biol.*, vol. 300, pp. 1005-1016, 2000.
8. Gallant, D., Bouchet, B., Baldwin P. "Microscopy of Starch: Evidence of a New Level of Granule Organization". *Carbohydrate Polymers*, vol. 32, pp. 177-191. 1997.
9. Gallant, D., Bouchet, B., Buléon A, Perez S. "Physical Characteristics of Starch Granules and Susceptibility to Enzymatic Degradation". *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 46, pp. S3-S16, 1992.
10. Guan, HP y Keeling, PL. "Starch Biosynthesis: Understanding the Functions and Interactions of Multiple Isozymes of Starch Synthase and Branching Enzyme". *Trends in Glycosci and Glycotechnol*, vol. 10, pp. 307-319, 1998.

11. Hovenkamp-Hermelink J, De Vries J, Adamse P, Jacobsen E, Witholt B, Feenstra J. "Rapid Estimation of the Amylose/Amylopectin Ratio in Small Amounts of Tuber and Leaf Tissue of the Potato". *Potato Res.*, vol. 31, pp. 241-246, 1988.
12. Huber KC y BeMiller, JN. "Visualization of Channels and Cavities of Corn and Sorghum Starch Granules". *Cereal Chem.*, vol. 74, pp. 537-545, 1997.
13. Janecek S y Sevcik J. "The Evolution of Starch Binding Domain". *FEBS Lett.*, vol. 456, pp. 119-125, 1999.
14. Ji Q, Vincken J, Suurs L, Visser R. "Microbial Starch Binding Domain as a Tool for Targeting Proteins to Granules During Starch Biosynthesis". *Plant Mol. Biol.*, vol. 51, pp. 789-801, 2003.
15. Jobling, S. "Improving Starch for Food and Industrial Applications". *Curr. Opinion Plant Biol.*, vol. 7, pp. 210-218, 2004.
16. Kortstee A, Vermeesch A, de Vries B, Jacobsen E, Visser R. "The Influence of an Increased Degree of Branching on the Physico-Chemical Properties of Starch from Genetically Modified Potato". *Carbohydr. Polymers*, vol. 37, pp. 173-184, 1998.
17. Kossmann J y Lloyd J. "Understanding and Influencing Starch Biochemistry". *Crit Rev Plant Sci.*, vol. 19, pp. 171-226, 2000.
18. Kotting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G. "Identification of a Novel Enzyme Required for Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. The Phosphoglucan, Water Dikinase". *Plant Physiol.*, vol. 137, pp. 242-252, 2005.
19. Lloyd J, Kossmann J, Ritte G. "Leaf Starch Degradation Comes out of the Shadows". *Trends Plant Sci.*, vol. 10, pp. 130-137, 2005
20. Lloyd JR, Springer F, Buléon A, Muller-Röber B, Willmitzer L, Kossmann J. "The Influence of Alteration in ADP-Glucose Pyrophosphorylase Activities on Starch Structure and Composition in Potato Tubers", *Planta*, vol. 209, pp. 230-238, 1999.
21. Mikkelsen R y Blennow A. "Functional Domain Organization of the Potato α -glucan, Water Dikinase (GWD): Evidence for Separate Site Catalysis as Revealed by Limited Proteolysis and Deletion Mutants". *Biochem. J.*, vol. 385, pp. 355-361, 2005.
22. Mikkelsen R y Blennow A. "Functional Characterization of α -glucan, Water Dikinase, the Starch Phosphorylating Enzyme". *Biochem J.*, vol. 377, pp. 525-532, 2004.
23. Morrison W. "Starch Lipids and How They Relate to Starch Granule Structure and Functionality". *Cer. Foods World*, vol. 40, pp. 437-446, 1995.
24. Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S, Nagamine T. "Production of Waxy (Amylose-Free) Wheats". *Mol. Gen. Genet.*, vol. 248, pp. 253-259, 1995.

25. Nielsen TH, Wischmann B, Enevoldsen K, Moller BL. "Starch Phosphorylation in Potato Tubers Proceeds Concurrently with *de Novo* Biosynthesis of Starch". *Plant Physiol.*, vol. 105, pp. 111-117, 1994.
26. Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman. "A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves". *Science*, vol. 303, pp. 87-89, 2004.
27. Reimann R, Ritte G, Steup M, Appenroth KJ. "Association of α -amylase and the R1 Protein with Starch Granules Precede the Initiation of Net Starch Degradation in Turions of *Spirodela polyrhiza*". *Physiol Plant.*, vol. 114, pp. 2-12, 2002.
28. Ritte G, Scharf A, Eckermann N, Häbel S, Steup M. "Phosphorylation of Transitory Starch is Increased During Degradation". *Plant Physiol.*, vol. 135, pp. 2068-2077, 2004.
29. Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M. "The Starch-Related R1 Protein is an α -glucan, Water Dikinase". *PNAS*, vol. 99, núm. 10, pp. 7166-7171, 2002.
30. Ritte G, Loberth R, Steup M. "Reversible Binding of the Starch-Related R1 Protein to the Surface of Transitory Starch Granules". *Plant J.*, vol. 21, núm. 4, pp. 387-391, 2000.
31. Robert X, Haser R, Gottschalk T, Ratajczak F, Driguez H, Svensson B, Aghajari N. "The Structure of Barley α -amylase Isozyme 1 Reveals a Novel Role of Domain C in Substrate Recognition and Binding: A Pair of Sugar Tongs". *Structure*, vol. 11, pp. 973-984, 2003.
32. Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N Sanchez S. "Microbial Starch-Binding Domain". *Curr. Opinion in Microb.*, vol. 8, pp. 260-267, 2005.
33. Sano Y. "Differential Regulation of *Waxy* Gene Expression in Rice Endosperm". *Theor. Appl. Genet.*, vol. 68, pp. 467-473, 1984.
34. Santacruz S, Koch K, Andersson R, Aman P. "Characterization of Potato Leaf Starch". *J Agric Food Chem.*, vol. 52, pp. 1985-1989, 2004.
35. Scheidig A, Frölich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J. "Downregulation a Chloroplast-Targeted β -amylase Leads to Starch-Excess Phenotype in Leaves". *Plant J.*, vol. 30, núm. 5, pp. 581-591, 2002.
36. Shure M, Wessler S, Fedoroff N. "Molecular Identification and Isolation of the *Waxy* Locus in Maize". *Cell.*, vol. 35, pp. 225-233, 1983.
37. Smith AM, Zeeman SC, Smith SM. "Starch Degradation". *Annu Rev Plant Biol.*, vol. 56, pp. 73-98, 2005.
38. Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM. "Starch Mobilization in Leaves". *J Exp Bot.*, vol. 54, pp. 577-583, 2003.
39. Smith A., Fulton D., Chia T., Thorneycroft D., Chapple A. "Diurnal Changes in the Transcriptome Encoding Enzymes of Starch Metabolism Provide Evidence for both Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation". *Plant Physiol.*, vol. 135, pp. 2687-2699, 2004.

40. Smith AM. "The Biosynthesis of Starch Granules". *Biomacromolecules*, vol. 2, pp. 335-341, 2001.
41. Southall, S.M., Simpson, P.J., Gilbert, H.J., Williamson, G., Williamson, M.P. "The Starch Binding Domain from Glucoamylase Disrupts the Structure of Starch". *FEBS Lett.*, vol. 447, pp. 58-60, 1996.
42. Svensson B, Jespersen H, Sierks M, MacGregor E. "Sequence Homology Between Putative Raw-Starch Binding Domains from Different Starch Degrading Enzymes". *Biochem. J.*, vol. 264, pp. 309-311, 1989.
43. Tetlow IJ, Morell MK, Emes J. "Recent Developments in Understanding the Regulation of Starch Metabolism in Higher Plants". *J Exp Bot.*, vol. 55, pp. 2135-2145, 2004.
44. Trethewey R y Smith A. "Starch Metabolism in Leaves". En RC Leegood, TD Sharkey, S von Caemmerer, eds, *Advances in Photosynthesis*, vol. 9, *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 205-231, 2000.
45. Villareal C y Juliano B. "Waxy Gene Factor and Residual Protein of Rice Starch Granule". *Starch/Staerke*, vol. 38, pp. 118-119, 1986.
46. Wang L, Wang Y, Porter R. "Structures and Physicochemical Properties of Six Wild Rice Starches". *J Agric Food Chem.*, vol. 50, pp. 2695-2699, 2002.
47. Whitaker JR. "Principles of Enzymology for the Food Sciences". Marcel Dekker Inc. U.S.A., pp 400-412, 1994.
48. Yu T, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstan H, Lue W, Hegemann B, Tung S, Umemoto T, Chapple A, Tsai D, Wang S, Smith AM, Chen J, Smith SM. "α-amylase is not Required for Breakdown of Transitory Starch in *Arabidopsis* Leaves". *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 9773-9779, 2005
49. Yu TS, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge U, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G, Steup M, Lue WL, Chen J, Weber A. "The *Arabidopsis* *Sex1* Mutant Defective in the R1 Protein, a General Regulator of Starch Degradation in Plants, and not in the Chloroplast Hexose Transporter". *Plant Cell.*, vol. 13, pp. 1907-1918, 2001.
50. Zeeman SC, Thorneycroft D, Schupp N, Chapple A, Weck M, Dunstan H, Haldimann P, Bechtold N, Smith AM, Smith SM. "Plastidial α-glucan Phosphorylase is not Required for Starch Degradation in *Arabidopsis* Leaves but Has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress". *Plant Physiol.*, vol. 135, pp. 849-858, 2004.
51. Zeeman SC, Tiessen A, Pilling E, Kato KL, Donald AM, Smith A. "Starch Synthesis in *Arabidopsis*. Granule Synthesis, Composition and Structure". *Plant Physiol.*, vol. 129, pp. 516-529, 2002.
52. Zeeman SC, ap Rees T. "Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of *Arabidopsis*". *Plant Cell Env.*, vol. 22, pp. 1445-1453, 1999.
53. Zeeman SC, Northrop F, Smith AM, ap Rees T. "A Starch-Accumulating Mutant of *Arabidopsis Thaliana* Deficient in a Chloroplastic Starch-Hydrolyzing Enzyme". *Plant J.*, vol. 15, pp. 357-365, 1998.