



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL DESARROLLO Y DE LA
DEFICIENCIA DE FÓSFORO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS
ENZIMAS RAMIFICADORAS EN SEMILLAS DE FRIJOL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
ROBERTO CALDERÓN ROJAS

TUTOR PRINCIPAL
DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS, FAC. DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN, INST. DE ECOLOGÍA
DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN, FAC. DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. AGOSTO, 2013



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.

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. 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

Dra. Alicia Gamboa de Buen, Instituto de Ecología, UNAM

Dr. Francisco Ruiz Terán, Facultad de Química, UNAM

Agradezco de manera especial a DGAPA, por su financiamiento en el proyecto IN217811, titulado "Análisis de los efectos del desarrollo y de la deficiencia de fosfato sobre la actividad del complejo SnRK1 en semillas de frijol".

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis, por lo que de igual manera se agradece el apoyo brindado.

El Jurado de Examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Vocal: Dra. Irma Bernal Lugo

Vocal: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Vocal: Dr. Jorge Nieto Sotelo

Secretario: Dr. Mario Rocha Sosa

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

¡¡ GRACIAS !!

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	8
I. ANTECEDENTES	10
II. INTRODUCCIÓN	11
2.1 Frijol	11
2.2 Deficiencia de fósforo.....	13
2.3 Almidón	15
2.4 Enzimas ramificadoras del almidón.....	25
2.5 Regulación de la actividad de las enzimas ramificadoras	29
III. JUSTIFICACIÓN	32
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
V. METODOLOGÍA	34
5.1 Material biológico	34
5.2 Extracción y cuantificación de las enzimas ramificadoras	35
5.3 Establecimiento de las condiciones adecuadas para medir la actividad ramificadora (Ensayo de Tinción con yodo).....	36
5.4 Efecto del desarrollo y de la deficiencia de fósforo sobre la actividad ramificadora en semillas de frijol	37
5.5 Regulación de la actividad de las enzimas ramificadoras. Caracterización en extractos desalados.....	37
5.6 Análisis en geles nativos de los efectos del desarrollo, deficiencia de fósforo y grado de fosforilación sobre la actividad de las enzimas ramificadoras	40
5.7 Papel de la temperatura.....	41
5.8 Purificación de las isoformas termoestables con actividad ramificadora	42

5.9 Caracterización de las isoformas termoestables purificadas	44
5.9 Análisis estadísticos	45
VI. RESULTADOS	46
6.1 Establecimiento de las condiciones ideales para medir la actividad ramificadora	46
6.2 Perfil de actividad ramificadora durante el desarrollo de la semilla de frijol.....	47
6.3 Caracterización de la actividad ramificadora en extractos desalados	48
6.3.1. Efecto del estado de fosforilación.	48
6.3.1.1. Efecto de la concentración de ATP, ADP y AMP.....	49
6.3.1.2. Efecto del tiempo de incubación a 30°C	52
6.3.1.3. Efecto del desarrollo, de la deficiencia de fósforo y del grado de fosforilación sobre la actividad de la enzima ramificadora..	53
6.3.2 Papel de la cinasa SnRK1 en la fosforilación de las enzimas ramificadoras.....	55
6.3.3 Estudio de las propiedades cinéticas de las enzimas ramificadoras.....	56
6.3.4 Análisis del efecto de citrato sobre la actividad de la enzima ramificadora.	59
6.4 Análisis de la actividad de las enzimas ramificadoras en geles nativos	61
6.5 Purificación de las enzimas con actividad ramificadora.....	63
6.6 Caracterización de las isoformas termoestables purificadas	69
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	79
7.1 Efecto de la deficiencia de fósforo y el desarrollo sobre la actividad de las enzimas ramificadoras de semillas de frijol	79
7.2 Efecto de la deficiencia de fósforo sobre la regulación de la enzima ramificadora	80
7.3 Purificación y caracterización de las enzimas ramificadoras	85
VIII. CONCLUSIONES	88
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Página

Figura 1. Estructura de la amilosa. Modificado de Zeeman <i>et al.</i> , (2010).	17
Figura 2. Estructura de la amilopectina. Modificado de Zeeman <i>et al.</i> , (2010).	18
Figura 3. Modelo de la biosíntesis del almidón en los amiloplastos. Modificado de Keeling y Myers (2010).	20
Figura 4. A. Modelo de la isoforma de la enzima ramificadora BEI de arroz cristalizada por Noguchi <i>et al.</i> , (2011). B. Diagrama de las formas maduras de PvSBE1 y PvSBE2. Modificado de Hamada <i>et al.</i> , (2007).	27
Tabla 1. Características generales de las isoformas de las enzimas ramificadoras de semillas de frijol. Modificado de Hamada <i>et al.</i> , (2001).	28
Figura 5. Secuencia consenso de fosforilación por SnRK1.	31
Tabla 2. Modo de preparación de las soluciones de riego Hoagland modificadas.	34
Tabla 3. Composición de geles nativos con amilosa de papa 0.3% como sustrato para determinar actividad ramificadora.	41
Figura 6. Relación de la actividad ramificadora con la cantidad de proteína (A) y el tiempo de reacción (B) a 25°C.	46
Figura 7. Efecto de la disponibilidad de fósforo (Pi ⁺ y Pi ⁻) sobre la actividad ramificadora durante el desarrollo de embriones de frijol a 25°C.	48
Tabla 4. Efecto del ATP y de la fosfatasa alcalina sobre la actividad ramificadora de extractos de embriones de frijol de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones ideales (Pi ⁺).	49
Figura 8. Efecto de la preincubación durante 30 minutos a 30°C en presencia de diferentes concentraciones de ATP, ADP y AMP, sobre la actividad ramificadora en extractos de embriones de 20 DDA provenientes de plantas control (Pi ⁺ , A) y cultivadas en deficiencia de fósforo (Pi ⁻ , B).	50
Figura 9. Efecto de la preincubación durante 30 minutos a 30°C en presencia de 2 mM ATP, ADP, AMP (con el tratamiento de fosforilación descrito) y 2 mM ATP _γ , sobre la actividad ramificadora en extractos de embriones de 20 DDA provenientes de plantas control (Pi ⁺ , A) y cultivadas en deficiencia de fósforo (Pi ⁻ , B).	51
Figura 10. Curva temporal de actividad de las enzimas ramificadoras después de la preincubación a 30°C de extractos de embriones de 20 DDA provenientes de plantas cultivadas en condiciones adecuadas (A, Pi ⁺) y de deficiencia de fósforo (B, Pi ⁻) en ausencia (Ctrl) y en presencia de 2 mM ATP-6 mM MgCl ₂ .	52
Figura 11. Efecto de la disponibilidad de fósforo y el estado de fosforilación sobre la actividad ramificadora durante el desarrollo de embriones de frijol de plantas cultivadas en condiciones adecuadas (A, Pi ⁺) y de deficiencia de fósforo (B, Pi ⁻).	54
Figura 12. Efecto de la cinasa SnRK1 parcialmente purificada a partir de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (C ⁺) y de deficiencia de Pi (C ⁻), sobre la actividad ramificadora presente en extractos desalados elaborados con los mismos materiales (E ⁺ y E ⁻) en presencia de 0 y 100 mM de citrato de sodio pH 7.0.	56

Figura 13. Cinética de saturación de actividad ramificadora de extractos provenientes de embriones de 20 DDA provenientes de plantas cultivadas en condiciones normales (Pi+, A) y de deficiencia de fósforo (Pi-, B).	58
Tabla 5. Parámetros cinéticos calculados con el programa GraphPad Prism versión 5.03, de acuerdo al ajuste del modelo de inhibición por sustrato con la ecuación $Y = V_{m\acute{a}x} * X / (K_m + X * (1 + X / K_i))$.	58
Figura 14. Efecto del citrato de sodio pH 7.0 sobre la actividad de las enzimas ramificadoras de extractos elaborados con embriones de 20 DDA provenientes de plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+, A) y en deficiencia de fósforo (Pi-, B).	60
Figura 15. Efecto del desarrollo y de la disponibilidad de fósforo sobre la actividad ramificadora durante el desarrollo de embriones de frijol en geles nativos de actividad.	61
Figura 16. Efecto de la preincubación durante 30 minutos a 30°C en presencia de 2 mM ATP o ADP o ATP, 6 mM MgCl ₂ e inhibidores de proteasas y fosfatasas. La actividad ramificadora de extractos desalados elaborados con embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (A, B) y en deficiencia de fósforo (C, D), se midió en solución (A, C) y en geles nativos, empleando 15 µg de extracto por carril (B y D).	62
Figura 17. Efecto de la temperatura en extractos elaborados con embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+, A) y de deficiencia de fósforo (Pi-, B).	64
Figura 18. Actividad ramificadora en extractos de embriones de 20 DDA producidos en condiciones adecuadas (A, Pi+) y de deficiencia de fósforo (B, Pi-) en presencia de 6 mM de MgCl ₂ , CaCl ₂ , ATP-Mg (2 mM y 6 mM respectivamente), EDTA y EGTA después de aplicar el tratamiento de 20 minutos a 70°C.	66
Tablas 6 y 7. Purificación de las isoformas termoestables de la enzima ramificadora a partir de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+) y en deficiencia de fósforo (Pi-), respectivamente.	68
Figura 19. Electroforesis desnaturalizante de las isoformas termoestables purificadas.	69
Figura 20. Efecto de la concentración de citrato en el ensayo de tinción con yodo, sobre la actividad de la enzima ramificadora purificada a partir de extractos de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+) o en deficiencia de fósforo (Pi-).	70
Figura 21. Cinética de saturación de las enzimas ramificadoras purificadas a partir de extractos de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+) o en deficiencia de fósforo (Pi-), usando amilosa (A) y amilopectina (B) como sustratos.	72
Tabla 8. Parámetros cinéticos calculados con el programa GraphPad Prism versión 5.03, de acuerdo al ajuste del modelo de inhibición por sustrato.	72
Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas ramificadoras purificada a partir de extractos de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (A, Pi+) o en deficiencia de fósforo (B, Pi-) con amilosa y amilopectina.	74
Figura 23. Efecto de la concentración de MgCl ₂ y CaCl ₂ sobre la actividad de las enzimas ramificadoras purificadas a partir de extractos de 20 DDA Pi+.	76
Figura 24. Efecto de la concentración de MgCl ₂ y CaCl ₂ sobre la actividad de las enzimas ramificadoras purificadas a partir de extractos de 20 DDA Pi-.	78

RESUMEN

El almidón es un polímero formado por moléculas de glucosa que se unen con enlaces α -1,4 y α -1,6 para formar una estructura compleja (gránulo), en donde se pueden distinguir 2 tipos de ordenamientos: amilosa y amilopectina. El primero es esencialmente lineal, mientras que el segundo es una estructura altamente ramificada. El contenido relativo de los mismos tiene un gran impacto en las propiedades del almidón y es un parámetro que varía ampliamente entre los almidones producidos por diferentes especies.

Durante los últimos años, hemos investigado los efectos de la deficiencia de fósforo sobre el desarrollo y las características de las semillas producidas por plantas de frijol. Hemos observado que la ausencia de este nutriente tiene un efecto negativo muy importante sobre la productividad de las plantas y que el almidón que se acumula en las semillas producidas en estas condiciones, posee mayor contenido de amilosa y es más resistente a la degradación enzimática. Las enzimas ramificadoras son responsables directas del contenido relativo de amilosa y amilopectina, por lo que, en este trabajo se buscó determinar los efectos de la deficiencia de fósforo sobre la actividad y propiedades cinéticas de las enzimas ramificadoras presentes en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en desarrollo.

Se cultivaron plantas de frijol en condiciones de invernadero con riego alternado entre agua y solución Hoagland modificada con 2 y 0.2 mM de Pi para producir plantas con condiciones ideales (Pi+) y de deficiencia severa (Pi-), respectivamente. Las flores se marcaron al momento de la floración y las semillas se cosecharon 15, 20, 25, 30 y 40 días después. Se midió la actividad ramificadora durante el desarrollo y posteriormente, se determinaron algunas de sus propiedades cinéticas, la respuesta a citrato y el efecto de la temperatura. También, se investigó si el estado de fosforilación (posiblemente mediada por la cinasa SnRK1) es parte de los mecanismos que regulan su actividad.

Los resultados mostraron que, en condiciones adecuadas (Pi+), la actividad de la enzima ramificadora disminuyó conforme avanzó el desarrollo de la semilla, mientras que en deficiencia de fósforo (Pi-), la actividad resultó menor pero constante durante todo el período. En cuanto a

los parámetros cinéticos, las enzimas ramificadoras provenientes de semillas Pi+ presentaron una K_m de 0.0334 mg/ml y una $V_{m\acute{a}x}$ de 56.44 $\Delta 680/\text{min}/\text{mg}$, mientras que las enzimas ramificadoras de semillas Pi- tuvieron una K_m de 0.0354 mg/ml y una $V_{m\acute{a}x}$ de 41.51 $\Delta 680/\text{min}/\text{mg}$; lo que muestra que en respuesta a la deficiencia de fósforo se inducen cambios importantes en cuanto a la velocidad de catálisis, aunque ambas enzimas presentaron inhibición por sustrato a concentraciones mayores de 0.125 (Pi+) y 0.1 (Pi-) mg/ml de amilosa. Por otro lado, se observó que la actividad de extractos de 20 días Pi+ se incrementó después de ser preincubados por 30 minutos a 30°C en presencia de 2 mM de ATP y 6 mM de MgCl_2 , condiciones que no tuvieron efecto sobre los extractos Pi-. La isoenzima ramificadora II de frijol (PvSBE2) tiene un sitio que pudiera ser fosforilado por SnRK1, los experimentos realizados sugieren que la fosforilación por SnRK1 podría inhibir la actividad ramificadora de la isoenzima II de frijol presente en los extractos desalados proteicos, sin embargo, para evaluar la importancia de esta modificación son necesarios experimentos adicionales.

Finalmente, se descubrió que la presencia de MgCl_2 (6 mM) estabiliza la enzima y la mantiene activa después de una preincubación a 70°C durante 20 minutos. Dado que esta condición induce la precipitación de muchas de las enzimas presentes en los extractos, se diseñó un procedimiento que permitió una purificación de 90 veces. Las enzimas purificadas también fueron caracterizadas.

I. ANTECEDENTES

Algunos de los grandes problemas de las tierras cultivables a nivel mundial son la falta de lluvias, el ataque de plagas y enfermedades, la falta de insumos adecuados y suficientes, así como la producción en zonas de baja calidad, situación que afecta negativamente la productividad de los cultivos. En nuestro país, la producción de semillas de frijol representa un buen ejemplo de esta problemática: no obstante que es esencial en la dieta de la población mexicana, generalmente se le cultiva en tierras de baja proporción de fósforo asimilable, lo cual contribuye a que los rendimientos sean generalmente bajos. Ante el poco probable incremento en la superficie dedicada a su cultivo o que desplace a cultivos más rentables y ocupe tierras de mayor calidad, parece que la única alternativa real para aumentar su producción es encontrar la forma de incrementar el rendimiento por planta. En el caso particular de la deficiencia de fósforo, su origen radica en la gran facilidad con que este elemento se combina con otros, formando complejos que las plantas no pueden aprovechar, como resultado, se generan plantas con crecimiento retardado, acumulación de menos biomasa y disminución en el rendimiento (Bernal, 2005a; Bernal *et al.*, 2007); mientras que en el almidón que se acumula en estas condiciones se modifica la proporción amilosa/amilopectina hacia mayor contenido de la primera, lo cual influye probablemente en las propiedades del gránulo que constituyen un factor importante en la asociación de proteínas y en la susceptibilidad para ser degradado, por lo que se torna más resistente a la hidrólisis enzimática (Ritte *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2005b; Bernal y Martínez-Barajas, 2006; Bernal, 2009), lo que puede redundar en cambios importantes en las características de los productos elaborados.

México es centro de origen del frijol (Mesoamericano) y la diversidad genética es muy grande (Beebe *et al.*, 2000), por lo que no es sorprendente que se haya documentado la existencia de variabilidad genética en las respuestas a la deficiencia de fósforo (Lynch y Beebe, 1995). La selección de genotipos con menor susceptibilidad a condiciones adversas es una buena alternativa para incrementar la producción de frijol. Sin embargo, el aprovechamiento de esta riqueza genética depende en gran medida de que se conozcan las bases moleculares de los mecanismos de interés. La presente investigación forma parte de los esfuerzos que se están haciendo para entender las razones por las cuales el almidón que se acumula en las semillas puede modificar sus propiedades en respuesta a la deficiencia de fósforo.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Frijol.

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) pertenece al Reino *Plantae*, División *Magnoliophyta*, Clase *Eudicotyledoneae* (*Magnoliopsida*), Subclase *Rosidae*, Orden *Fabales*, Familia *Fabaceae*, Subfamilia *Faboideae* (*Papilionoideae*), Tribu *Phaseoleae*, Subtribu *Phaseolinae*. *P. vulgaris* es la especie más conocida del género *Phaseolus*, es una planta nativa de América y se le cultiva en todo el mundo, donde se consumen tanto sus vainas verdes como los granos secos (semillas), las cuales son una excelente fuente de proteína, fibra, carbohidratos complejos, vitaminas y micronutrientes, además de minerales. Su consumo proporciona 25-30% de los niveles recomendados de hierro, 25% de los de magnesio y cobre, así como 15% de potasio y zinc (CIAT, 2012). El frijol constituye la base de la alimentación de más de 400 millones de personas que viven principalmente en los trópicos, tan sólo en México la cosecha anual en 2010 fue de 1.2 millones de toneladas (FAOSTAT, 2012), lo que lo ubica en uno de los primeros lugares de la economía agrícola del país.

2.1.1. Ciclo de vida de *P. vulgaris*.

Es una planta anual de hábito de crecimiento tanto determinado (variedades de mata) como indeterminado (variedades trepadoras), que prospera en climas fríos y cálidos, soporta suelos ligeramente salinos y no requiere de lluvias abundantes. Las plantas de frijol de crecimiento determinado pueden tener de 3 a 7 hojas trifoliadas en el tallo principal antes de que en la parte terminal aparezca un racimo floral. Por su parte, las plantas de hábito de crecimiento indeterminado pueden presentar tanto crecimiento vertical con tallo erecto y sin guía, como arbustivo con tallo débil y postrado, numerosas ramas con guía y habilidad variable para trepar (Debouck e Hidalgo, 1986).

La germinación es epigea y requiere de 5 a 7 días a 29°C. El tiempo requerido para la floración (anthesis) depende del cultivar, de la temperatura y del fotoperiodo, normalmente se inicia de 28 a

42 días posteriores a la siembra; sin embargo, las variedades trepadoras pueden florecer días o semanas después. El período de floración en las plantas de crecimiento determinado está concentrado en un corto período (5-6 días), mientras que los cultivares indeterminados producen nodos adicionales después de la floración inicial, extendiéndose el tiempo a 15-30 días (Graham, 1997).

2.1.2. Estructura y desarrollo de la semilla.

Después de la fertilización se desarrollan los frutos en forma de vainas, que contienen nervaduras por donde el floema transporta agua y nutrientes desde las hojas. Dentro de las vainas se desarrolla un número variable de semillas, en cuyos cotiledones se depositan las reservas que se usarán en la germinación y establecimiento de la plántula (Tetlow, 2011). Las semillas están envueltas por una cubierta que además de brindar protección, controla el paso de nutrientes e interviene en procesos metabólicos fundamentales. Bajo la cubierta se localiza el endospermo, que en *P. vulgaris* constituye una reserva temporal de nutrientes, ya que progresivamente es reemplazado por el embrión en formación.

La formación de la semilla de leguminosas está caracterizada por la diferenciación progresiva de órganos y tejidos en tres etapas principales (Weber *et al.*, 2005):

- a) Período de división celular (prealmacenamiento). En esta etapa se establece el número de células, lo cual es determinante en el tamaño final que la semilla puede alcanzar (Altenbach *et al.*, 2003). La cubierta (de origen materno) controla el suministro de nutrientes al embrión y las invertasas unidas a la pared celular regulan la asimilación y elevan los niveles de hexosas (Weber *et al.*, 1997). A los 4-10 días posteriores a la anthesis, se inicia la deposición de almidón (Singletary *et al.*, 1997; Altenbach *et al.*, 2003).
- b) Estado de transición. Al terminar las divisiones celulares, el embrión se convierte en un órgano de almacenamiento altamente diferenciado, en un proceso controlado por una red de señalización que involucra la participación de azúcares, ácido abscísico (ABA) y la actividad de diversas enzimas, entre ellas el complejo SnRK1. El embrión se torna verde y adquiere capacidad fotosintética, sin embargo, el suministro de oxígeno disminuye y el ambiente se

torna hipóxico, se reduce la respiración y se incrementa el estado de energía. También, se modifica el metabolismo de azúcares de estar basado en hexosas y en la actividad de invertasa, se pasa a otro controlado por la sacarosa sintasa, en donde la concentración de sacarosa empieza a incrementarse (Weber *et al.*, 2005).

c) Etapa de almacenamiento (maduración y desecación). La sacarosa además de ser nutriente, actúa como molécula señal y participa en la diferenciación de la semilla (Weber *et al.*, 2005): controla la actividad mitótica de los meristemas e induce la expansión celular, estimula la replicación de DNA celular (endoploidización), actúa a nivel transcripcional promoviendo la síntesis de enzimas de la vía sacarosa-almidón (Geigenberger *et al.*, 2004) y a nivel postranscripcional, afectando así el flujo de carbono, lo que resulta en la síntesis y acumulación de los productos de reserva. Esta etapa generalmente culmina alrededor de 40 a 50 días después de la floración (Olsen *et al.*, 1999, 2001; Borisjuk *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2007; Sabelli y Larkins, 2009; Sreenivasulu *et al.*, 2010).

2.2 Deficiencia de fósforo.

El fósforo (P) está involucrado en una gran cantidad de funciones vitales: es componente clave de moléculas como ácidos nucleicos y membranas (fosfolípidos) y es necesario para la síntesis de ATP y de intermediarios fosforilados, entre muchas otras igualmente importantes (Marschner, 1995), por lo que su ausencia repercute negativamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los suelos pueden tener cantidades elevadas de fósforo, la mayor parte del cual se encuentra en compuestos orgánicos e inorgánicos no asimilables. Las plantas sólo pueden tomar la fracción que se encuentra como ortofosfato (Pi, H₂PO₄), cuya concentración en la solución del suelo es menor a 10 µM y generalmente, insuficiente para el desarrollo adecuado de los cultivos (Bieliski, 1973; Holford, 1997).

En el suelo, el ortofosfato se mueve por difusión hacia la raíz (Marschner, 1995), donde es tomado a través de las células rizodérmicas de los pelos radicales (Rausch y Bucher, 2002). Una vez asimilado, el Pi se distribuye entre las siguientes opciones: a) puede formar parte de la poza metabólica (citoplasma + organelos), donde su principal función es incorporarse en compuestos

orgánicos mediante un enlace anhídrido éster como el del grupo Pi del ATP o del pirofosfato (Bieliski y Ferguson, 1983); b) una pequeña porción se usa en la biosíntesis de lípidos fosforilados, DNA y RNA (Bieliski y Ferguson, 1983); c) cantidades variables de Pi se pierden a través del eflujo, especialmente en condiciones de alto Pi (Mimura, 1999); d) puede ser almacenado en la vacuola y contribuir a la homeostasis de Pi en la célula (Bieliski y Ferguson, 1983; Mimura, 1999) o bien; e) ser transportado simplásmicamente a las células del parénquima y subsecuentemente secretado en el xilema para su traslado a los órganos de la parte aérea, donde podría tener cualquiera de las opciones anteriormente mencionadas (Bieliski y Ferguson, 1983).

Una nutrición adecuada de fósforo es esencial para un crecimiento vigoroso. La capacidad de las plantas cultivadas para desarrollarse en suelos con bajos niveles de fósforo es variable y depende de adaptaciones metabólicas para mejorar la eficiencia en su uso, de la habilidad para incrementar la toma de Pi (absorción), lograr la mejor distribución entre órganos y mantener la capacidad para exportar fotosintatos (Vance *et al.*, 2003; Bernal *et al.*, 2007; Chiou y Lin, 2011).

Dentro de los síntomas más notorios de la deficiencia en fósforo están la reducción en el crecimiento de la parte aérea, 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 indica menor actividad del meristemo apical; mientras que la reducción en el tamaño está relacionada con cambios en la división y expansión celular. La producción de clorofila puede no ser afectada y en ese caso, al disminuir su tamaño, las hojas adquieren un color verde más oscuro (Chiera *et al.*, 2002). Generalmente, la raíz resulta menos afectada, por lo que la contribución relativa de ésta al tamaño de la planta se incrementa (Lynch y Brown, 2008).

Si la deficiencia de fósforo no es muy severa, la asimilación de CO₂ puede no verse afectada (Bernal *et al.*, 2005). Sin embargo, la acumulación de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en hojas y raíces) es una característica común de plantas que sufren deficiencia de fósforo (Ciereszko *et al.*, 1998). Este fenómeno puede ser consecuencia de los efectos negativos de la deficiencia de fósforo sobre la capacidad para sintetizar y/o exportar sacarosa (Pieters *et al.*, 2001). Por otro lado, en esta condición se reducen los niveles de ATP y con ello, el metabolismo (degradación) de azúcares (Theodorou *et al.*, 1991; 1993), lo que sin duda también contribuye a su acumulación.

Aunado a lo anterior, en deficiencia de fósforo los niveles de pirofosfato (PPi) se mantienen elevados y se ha descrito que en esas condiciones aumenta su uso como donador de energía en las reacciones de la glucólisis (Rychter y Randall 1994; Plaxton, 1996). La carencia de fósforo también promueve la degradación de compuestos fosforilados, el uso del fósforo almacenado en la vacuola y la movilización de fosfato de órganos viejos a estructuras en desarrollo (Dietz y Helios, 1990; Rao *et al.*, 1993; Jeschke *et al.*, 1997). El crecimiento de la raíz y de pelos radicales (Lynch y Brown, 2001) así como la expresión de transportadores de Pi de alta afinidad (Liu *et al.*, 1998) contribuyen a incrementar la absorción, mientras que el estímulo en la producción y secreción de ácidos orgánicos (cítrico y málico) y enzimas (fosfatasas y RNAsas) aumentan su disponibilidad (Asmar *et al.*, 1995; Coello, 2002; López-Bucio *et al.*, 2003; Parra *et al.*, 2004).

Si bien el fósforo es necesario para todas las plantas, existen especies y ecotipos que son menos afectados por esta condición. En el caso particular de frijol, algunas de las líneas tolerantes también tienen alta capacidad para fijar nitrógeno (Graham, 2002). Es muy probable que el grado de tolerancia esté relacionado con la capacidad para expresar alguna o varias de las modificaciones mencionadas. Sin embargo, los daños derivados de la falta de Pi dependerán del genotipo, la etapa del desarrollo, condiciones ambientales, así como el grado y la duración del período de deficiencia (Marschner, 1995; Chiou y Lin, 2011).

2.3 Almidón.

El almidón es la forma más comúnmente usada por las plantas para almacenar carbono, su escasa capacidad para unir agua, lo hacen ideal para acumular grandes cantidades de glucosa sin que el potencial osmótico de las células se modifique apreciablemente (Kossmann y Lloyd, 2000; Keeling y Myers, 2010). Además de ser parte esencial de muchos alimentos (su consumo aporta el 80% de la ingesta calórica mundial) el almidón tiene una gama muy amplia de aplicaciones industriales. Debido a su versatilidad, bajo costo y a la relativa facilidad con que puede ser convertido en azúcares fermentables, se le considera una materia prima muy importante en las industrias alimentaria, de edulcorantes, textil, farmacéutica y cosmética, papelera, de adhesivos y de briquetas y carbón vegetal (Guan y Preiss, 1993; Tofiño *et al.*, 2006; Zeeman *et al.*, 2010).

Durante el día, el almidón y la sacarosa se sintetizan en las hojas como productos de la asimilación fotosintética de carbono. La mayor parte de la sacarosa es exportada hacia las partes no fotosintéticas de la planta, mientras que el almidón se acumula en los cloroplastos y se degrada por la noche para proveer a la planta de carbono, energía y poder reductor (Bernal y Martínez-Barajas, 2006; Keeling y Myers, 2010). El suministro de carbono en el periodo de oscuridad es esencial para el crecimiento de las plantas, por lo que si se reduce la capacidad de degradación del almidón, también disminuye la velocidad de crecimiento (Smith *et al.*, 2005). Los meristemas y los órganos en desarrollo pueden acumular sus excedentes de carbono en forma de almidón por días o semanas, mientras que los órganos especializados en almacenamiento (embriones o semillas, tubérculos y raíces) acumulan almidón por periodos muy largos (Tetlow *et al.*, 2004b, 2011; Bernal y Martínez-Barajas, 2006; Mukerjea *et al.*, 2010).

2.3.1. Estructura de los gránulos de almidón.

El almidón es un polímero formado por moléculas de glucosa que se unen con enlaces α -1,4 y α -1,6 para formar estructuras complejas microscópicas (gránulos) con tamaños entre 0.5-100 μm de diámetro, por ejemplo los de tubérculo de papa miden alrededor de 100 μm (Smith, 2001), mientras que los de hoja de *Arabidopsis thaliana* varían entre 1-3 μm (Zeeman *et al.*, 2002). Su forma también es variable (esféricos, elípticos o poliédricos) y generalmente, característica de cada especie (Robyt, 2008). En la mayoría de los casos, del 20 a 30% del almidón está formado por un polímero escasamente ramificado denominado amilosa, mientras que el 70 a 80% restante lo constituye amilopectina, que es un polímero altamente ramificado y estructurado, responsable de la cristalinidad y propiedades físicas del almidón (Keeling y Myers, 2010; Liu *et al.*, 2012).

La amilosa (Figura 1) es un polímero formado por 100 a 10,000 moléculas de glucosa unidas por enlaces α -(1 \rightarrow 4), relativamente lineal (una ramificación cada 100 a 10,000 glucosas) y un peso molecular estimado entre 10^5 y 10^6 Daltons (Buléon *et al.*, 1998; Thitisaksakul *et al.*, 2012). Se encuentra organizada tridimensionalmente en estructuras helicoidales de 6 a 8 residuos de glucosa por vuelta, en cuyo interior se ubican los átomos de H (por lo que es un ambiente hidrofóbico), mientras que los grupos OH están situados hacia el exterior. En los órganos de almacenamiento, la amilosa constituye del 20 al 30% de los gránulos, mientras que en los de

hojas su contribución es menor (de 4 al 20%) (Tetlow, 2011). Su localización exacta 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 *et al.*, 1997; Jobling, 2004). Su naturaleza química favorece asociaciones con pequeñas moléculas hidrófobas, por lo que es común que a la fracción de amilosa se le asocie una proporción importante de lípidos (Morrison, 1995).

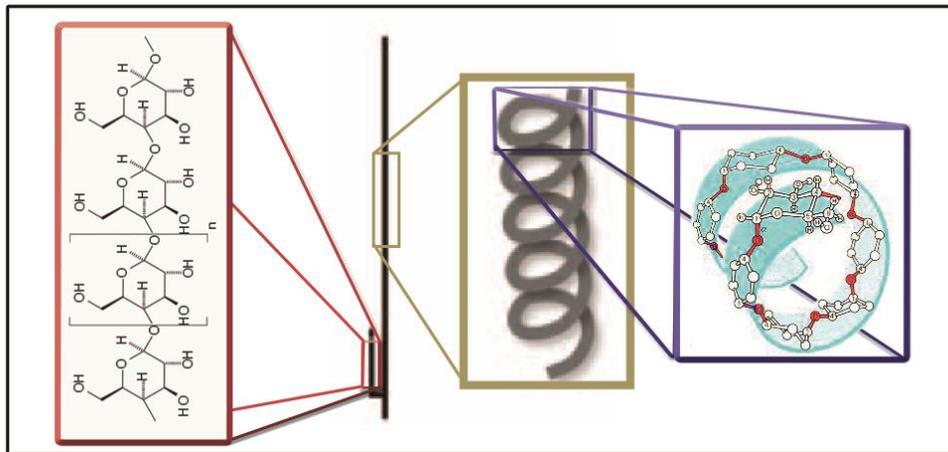


Figura 1. Estructura de la amilosa. A la izquierda se muestran los residuos de glucosa unidos mediante enlaces α -(1 \rightarrow 4), cuya conformación más estable de sillas rígidas adyacentes, determina la estructura helicoidal sencilla de la cadena de polisacárido de la derecha, con un acercamiento que muestra la disposición de los residuos de glucosa por vuelta de la hélice. Modificado de Zeeman *et al.*, (2010).

La amilopectina (Figura 2) es un polímero de glucosa semicristalino más grande que la amilosa (su longitud va de los 10,000 a 100,000 residuos de glucosa y su peso molecular se estima entre 10^7 y 10^9 Daltons) con ramificaciones regulares, que le dan semejanza con un árbol (Bulón *et al.*, 1998). En la cadena central los residuos de glucosa se unen por enlaces α -1 \rightarrow 4 y cada 20 a 30 residuos se unen a ella cadenas laterales de 6 a 100 residuos de longitud mediante enlaces α -(1 \rightarrow 6) (Blennow, 1991).

Contiene grupos fosfato 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%). 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). Se ha propuesto que la fosforilación al ayudar a solubilizar la superficie del gránulo, facilita los pasos iniciales de su degradación (Zeeman *et al.*, 2010).

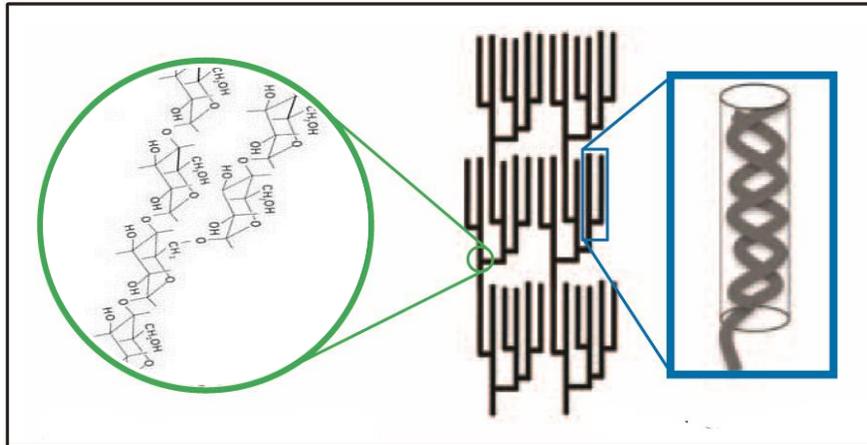


Figura 2. Estructura de la amilopectina. A la izquierda se muestra en detalle las unidades de glucosa unidas en cadenas mediante enlaces α -(1→4) y una ramificación unida mediante un enlace α -(1→6); a la derecha la estructura de doble hélice (representada como cilindros) que forman los grupos de cadenas contiguas. Modificado de Zeeman *et al.*, (2010).

Se han propuesto diversos modelos para la conformación espacial de la amilopectina, siendo el de *clúster* el más aceptado. En este, las ramificaciones de las cadenas laterales adyacentes se encuentran organizadas en grupos formando dobles hélices que giran hacia la izquierda y cuyas vueltas están formadas por seis unidades de residuos de glucosa (más pequeñas que las hélices sencillas que forma la amilosa). El empaquetamiento compacto de 9 a 17 cadenas adyacentes de amilopectina en matrices organizadas de 9 nm (clústeres), constituye el nivel primario en la estructura del gránulo (Robin *et al.*, 1974; Hizukuri, 1986; Myers *et al.*, 2000) y está determinado por la longitud de las cadenas lineales, el grado de agrupación, la frecuencia de los sitios de ramificación y algunos otros factores como la presencia de sales de alto número liotrópico (presentan mayor hidratación) y ácidos grasos libres (Hizukuri *et al.*, 1980; 1986).

Los clústeres se organizan en intervalos regulares sobre el eje de la molécula, dando lugar a anillos concéntricos de crecimiento formados por laminillas cristalinas (que contienen

mayoritariamente las dobles hélices de amilopectina) alternadas con laminillas amorfas, correspondientes a las regiones en las que se localizan la mayor parte de la amilosa, los puntos de ramificación y los espacios entre los agregados de dobles hélices (Gallant *et al.*, 1997; Vandeputte y Delcour, 2004).

Dado que la amilopectina constituye el componente principal de la mayoría de los almidones, las características mencionadas proporcionan la base de la naturaleza semi-cristalina en la matriz del gránulo y contribuyen a su insolubilidad (Jenkins *et al.*, 1993). De esta manera, la estructura interna laminar periódica y semicristalina del gránulo es una característica altamente conservada entre los almidones de plantas (Martin y Smith, 1995; Gallant *et al.*, 1997).

Por otro lado, el contenido relativo de amilosa y amilopectina es un parámetro que varía ampliamente entre los almidones (Regina *et al.*, 2004) y que al influir en la facilidad con que estos se asocian con lípidos (ácidos grasos y fosfolípidos), proteínas y componentes minerales (P^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} y Na^+), contribuye a ampliar la diversidad estructural y funcional que se observa entre almidones producidos por diferentes especies (Guan y Keeling, 1998; Vandeputte *et al.*, 2004).

2.3.2. Biosíntesis del almidón.

Dentro de las enzimas responsables se encuentran las almidón sintasas (GBSS, SSI, SSII, SSIII, SSIV, de sus siglas en inglés; EC 2.4.1.21), las enzimas ramificadoras (SBEI, SBEII, de sus siglas en inglés; EC 2.4.1.18), las enzimas desramificadoras (DBE, de sus siglas en inglés) como isoamilasas (ISA1, ISA2 ISA3; EC 3.2.1.68) y pululanasa (PU1; EC 3.2.1.41) (Smith *et al.*, 1997; James *et al.*, 2003). La amilosa se sintetiza por medio de la acción catalítica de la isoforma de almidón sintasa que está unida al granulo (GBSS), pues mutantes que carecen de GBSS sintetizan gránulos de almidón sin amilosa, aunque se ha reportado que también participa en la síntesis de amilopectina contribuyendo a la síntesis de sus cadenas largas (Tatge *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2005). Por su parte, SS's, SBE's y DBE's actúan simultáneamente sobre un precursor de glucano (Figura 3) y son responsables directas de la biosíntesis de amilopectina (Keeling y Myers, 2010). Estudios con mutantes de SS's y SBE's de plantas y algas han sido

importantes para establecer el papel de las diferentes isoformas, cuya actividad en algunos casos es redundante (Ball y Morell, 2003; Tetlow, 2011).

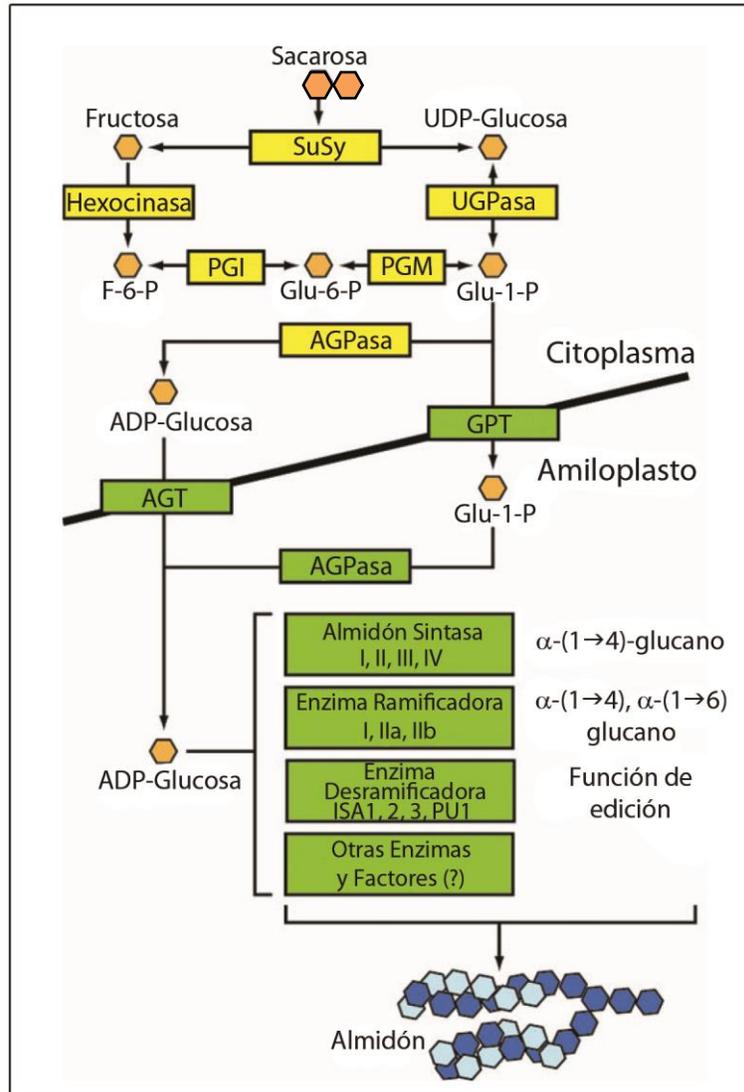


Figura 3. Modelo de la biosíntesis del almidón en los amiloplastos. A partir de la sacarosa proveniente de la actividad fotosintética y mediante una serie de interconversiones, se produce glucosa-1-fosfato o ADP-glucosa, transportados al amiloplasto mediante los translocadores de glucosa fosfato (GPT) y ADP-glucosa (AGT), respectivamente (Weber y Linka, 2011). La síntesis de ADP-glucosa puede estar localizada exclusivamente en el estroma del plástido (tejidos de almacenamiento de dicotiledóneas) o en el citoplasma (endospermo de monocotiledóneas). Dentro del amiloplasto las isoformas de las enzimas almidón sintasas, ramificadoras y desramificadoras dirigen la biosíntesis de amilopectina. Modificado de Keeling y Myers (2010).

Mientras que la GBSSI es la única enzima cuya actividad está casi totalmente asociada a los gránulos, el resto de las enzimas implicadas en el proceso se unen transitoriamente (Kossmann y Lloyd, 2000). La habilidad para asociarse temporalmente al gránulo puede estar en función de las afinidades relativas de sus sitios activos por los polímeros de glucano (Commuri y Keeling, 2001). La molécula de ADP-glucosa es el donador de las moléculas de glucosa para la síntesis de almidón. Se produce por la acción de la ADP Glucosa Pirofosforilasa (AGPP; EC 2.7.7.27) a partir de Glucosa-1-fosfato y ATP. Se considera que esta reacción es el primer paso comprometido en la síntesis de almidón, por lo que la actividad de AGPP está sujeta a diferentes mecanismos de regulación (Tetlow, 2011). Las enzimas almidón sintasas extienden cadenas de glucano α -1 \rightarrow 4 por medio de la transferencia del residuo de glucosa de la ADP-glucosa al extremo no reductor de una cadena de glucanos, catalizando la formación de enlaces glucosídicos α -1 \rightarrow 4 (Nakamura, 2002; Ball y Morell, 2003), donde SSI es primariamente responsable de la síntesis de las cadenas más cortas de malto-oligosacáridos (10 unidades de glucosa), que posteriormente se extienden entre los clústeres por acción de SSII y/o SSIII, con la posible introducción de las ramificaciones antes de que la extensión pueda continuar, debido a que cadenas de 13-22 unidades de glucosa típicamente forman dobles hélices (Commuri y Keeling, 2001; James *et al.*, 2003).

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 así como la relación del recambio e incorporación en los gránulos de almidón de los intermediarios que están entre ADP-glucosa 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 periodos 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 hidrolicen 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 glucano 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).

Las enzimas ramificadoras (Secciones 2.4 y 2.5, Figura 4) catalizan la formación de puntos de ramificación mediante un mecanismo que involucra las actividades de glucano hidrolasa y transferasa, removiendo un oligosacárido de 6 o más unidades de glucosa del extremo no reductor de una cadena α -1 \rightarrow 4 para transferirla y reinsertarla como una ramificación mediante un enlace α -1 \rightarrow 6 a un grupo hidroxilo primario de esa misma cadena o a una adyacente (Smith, 1988; Vos-Scheperkeuter *et al.*, 1989; Hamada *et al.*, 2002).

Las isoamilasas catalizan la hidrólisis de enlaces ramificados (1 \rightarrow 6)- α -D-glucosídicos (Takashima *et al.*, 2007), las isoformas ISA1 e ISA2 están fuertemente implicadas en la síntesis de amilopectina (Lloyd *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005), mientras que ISA3 y las pululanases participan primariamente en la degradación del almidón, catalizando la hidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 6)- α -D-glucosídicos (Nakamura *et al.*, 1996; Kubo *et al.*, 2010; Utsumi *et al.*, 2011). En maíz, se ha reportado el solapamiento de las funciones pululanasa (ZPU1) e isoamilasa durante la biosíntesis del almidón (Dinges *et al.*, 2003). Las enzimas desramificadoras tienen características estructurales similares a las enzimas ramificadoras, como el dominio C-terminal de α -amilasa (Figura 4B), sugiriendo que la hidrólisis y la transglicosilación en un enlace α -1 \rightarrow 6, se cataliza por ambas enzimas de una manera similar (Keeling y Myers, 2010; Noguchi *et al.*, 2011). El mecanismo mediante el cual las enzimas desramificadoras contribuyen a la formación de una estructura organizada en gránulos insolubles aún se encuentra en debate, pero se ha sugerido que, posiblemente, al recortar y remodelar las ramificaciones de las cadenas lineales, faciliten el empaquetamiento denso que es necesario para su cristalización (Myers *et al.*, 2000; Ball y Morell, 2003; Zeeman, 2008; Keeling y Myers, 2010).

La lista de enzimas que participan en la síntesis de almidón también incluye a la almidón fosforilasa (SP, PHO; EC 2.4.1.1) y la enzima D o enzima desproporcionadora (DisPE) (Keeling y Myers, 2010). La almidón fosforilasa cataliza la transferencia reversible de unidades glucosídicas de la glucosa-1-fosfato (en lugar de ADP-glucosa) al extremo no reductor de cadenas de glucano α -1 \rightarrow 4 y puede funcionar tanto en la dirección de síntesis como en la de degradación. Esta enzima se considera esencial para la acumulación normal de almidón en el endospermo, aunque su papel exacto dentro de la biosíntesis de almidón se desconoce (Jeon *et al.*, 2010; Tetlow, 2011). La enzima desproporcionadora (D) está implicada en la síntesis de almidones transitorios transfiriendo dos de las unidades glucosídicas de la malto-triosa a una cadena de glucano más larga, poniéndolos a disposición para las β -amilasas (Tetlow *et al.*, 2004b), de modo tal que el

monómero glucosídico resultante esté disponible para su exportación desde el plastidio hacia la membrana envolvente interior a través de un transportador de glucosa, pero su papel preciso en tejidos de almacenamiento aún no está claro (Weber *et al.*, 2000; Niittyta *et al.*, 2004).

2.3.3. Regulación y formación de complejos durante la biosíntesis del almidón.

Las enzimas implicadas en la síntesis de almidón están sujetas a un control que asegura que tanto su expresión como actividades se coordinen entre sí y se integren completamente al metabolismo de la planta. La observación de numerosos efectos pleiotrópicos resultantes al producir mutaciones en los genes que codifican para las enzimas SS's, SBE's y AGPP sugirió la posibilidad de que pudieran formar complejos multi-enzimáticos (Boyer y Preiss, 1981; Singletary *et al.*, 1997).

En este contexto, se ha especulado que la coordinación de las actividades de almidón sintasa, enzimas ramificadoras y desramificadoras está acompañada de una asociación física en un complejo multimérico dentro del amiloplasto (Dinges *et al.*, 2001, 2003; Nishi *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2002; Ball y Morell, 2003; Tetlow *et al.*, 2004a, 2008; Yao *et al.*, 2004; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008, 2009; Liu *et al.*, 2012). En amiloplastos aislados del endospermo de trigo, se han identificado numerosas fosfoproteínas, algunas de ellas implicadas en el metabolismo del carbono, lo cual sugiere que algún aspecto de la biosíntesis de almidón puede controlarse por la fosforilación proteínica (Ritte *et al.*, 2004). La presencia de proteínas fosforiladas asociadas a los gránulos refuerza esta idea (Tetlow *et al.*, 2004a; Grimaud *et al.*, 2008). Recientemente, se reportó que la formación de los complejos proteicos estromales resulta potenciada por la presencia de ATP, mientras que disminuye con un tratamiento con fosfatasa (Liu *et al.*, 2012).

La caracterización de fracciones de alto peso molecular aisladas de endospermo en desarrollo de maíz y trigo, revelaron la existencia de complejos enzimáticos donde SSI, SSIIa, SSIII, SBEIIa y/o SBEIIb estaban presentes (Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008; Tetlow *et al.*, 2008). En extractos de endospermo de trigo se ha identificado un complejo de aproximadamente 260 kDa, donde la asociación entre las isoformas de la almidón sintasa I y II, así como la isoforma de la enzima ramificadora II, es dependiente de fosforilación (Tetlow *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). En endospermo de maíz se han identificado otros complejos mayores (de aproximadamente 670

kDa) que involucran a las isoformas SSIII, SSIIa, SBEIIa y SBEIIb, así como proteínas adicionales (las subunidades grande y pequeña de la AGPP y la Piruvato fosfato dicinasa, PPDK), cuya formación también es dependiente de fosforilación (Hennen-Bierwagen *et al.*, 2009), mientras que la desfosforilación *in vitro* con fosfatasa alcalina causa su disociación (Tetlow *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009).

El significado funcional de la formación de los complejos no es claro, sin embargo experimentos *in vitro* muestran que cuando se encuentran formando complejos, las enzimas incrementan su afinidad por los glucanos que reconocen como sustratos, como sucede con algunas isoformas de las SS's (Commuri y Keeling, 2001; Tetlow *et al.*, 2008). Se propone que *in vivo* podría suceder algo similar (Sehnke *et al.*, 2001; Hoover, 2002; Tetlow *et al.*, 2004a, 2011) y que estas redes enzimáticas, al posibilitar la canalización de sustratos (Tetlow, 2006) contribuyen a mejorar la eficiencia del proceso.

2.3.4. Efectos de la deficiencia de fósforo.

La cantidad de almidón presente en un órgano representa un balance entre los procesos de su síntesis y degradación. En condiciones de deficiencia de fósforo, aumenta la cantidad de amilosa, lo cual se ve reflejado en las características del almidón que se produce bajo estas condiciones. Por otro lado, las plantas que sufren deficiencia de fósforo acumulan almidón y dado que en su síntesis se libera Pi que puede ser usado en otros procesos, se ha sugerido que la acumulación de almidón es una adaptación a esta condición. También, se ha propuesto que en deficiencia de fósforo se incrementa la relación triosa-P/Pi, lo cual puede activar a la ADP glucosa pirofosforilasa (Preiss y Romeo, 1994) y de manera indirecta, favorecer su síntesis (Kondracka y Rychter, 1997; Ciereszko *et al.*, 1998).

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) observaron que la deficiencia de fósforo disminuye tanto la síntesis de almidón como su movilización durante la noche y se tienen evidencias de que al disminuir el grado de fosforilación del almidón, su degradación también se reduce, acumulándose debido a la incapacidad de las plantas cultivadas en deficiencia de Pi para degradarlo eficientemente (Bernal *et al.*, 2005). Se ha sugerido que el proceso de degradación de

almidón involucra la interacción entre diferentes proteínas con la superficie de los gránulos (Ritte *et al.*, 2000), la menor degradación del almidón en plantas cultivadas en deficiencia de Pi podría ser resultado de un efecto negativo de esta condición sobre las enzimas que lo degradan y/o sobre las propiedades del mismo almidón, las cuales podrían limitar la interacción de los gránulos con las enzimas responsables de su degradación. Se ha señalado que el grado de fosforilación del almidón afecta la capacidad de hidratación de los gránulos y por lo mismo es un elemento importante para permitir la interacción con enzimas amilolíticas (Yu *et al.*, 2001; Ritte *et al.*, 2002). En este sentido se ha propuesto que la fosforilación de los gránulos de almidón que cataliza la enzima glucano agua dicinasa (GWD), modifica las características superficiales y favorece la asociación de proteínas a la superficie, algunas de las cuales pueden modificar las propiedades del almidón o favorecer su degradación (Bernal y Martínez-Barajas, 2005, Smith *et al.*, 2005; Zeeman, 2008).

2.4 Enzimas ramificadoras del almidón.

Las enzimas ramificadoras han sido clasificadas como miembros de la familia de la α -amilasa (Jespersen *et al.*, 1993). De acuerdo con estructuras tridimensionales de miembros de dicha familia, las enzimas ramificadoras están conformadas por tres dominios (Figura 4): N-terminal, un dominio central catalítico en forma de barril (β/α)₈ compuesto de 8 láminas β paralelas rodeadas por 8 hélices α y el dominio C-terminal de α -amilasa (Mikkelsen *et al.*, 2001; Abad *et al.*, 2002; Noguchi *et al.*, 2011). La similitud estructural, la conservación de residuos críticos (aspartato y glutamato en la función catalítica) y la sensibilidad a compuestos que inhiben su actividad, son compatibles con un mecanismo de acción similar entre las SBE's y α -amilasas (MacGregor *et al.*, 2001; Vu *et al.*, 2008).

La comparación de secuencias y las caracterizaciones bioquímicas y genéticas de diferentes enzimas ramificadoras de plantas, han permitido su clasificación en dos clases mayores: enzimas ramificadoras 1 (SBEI) también conocidas como Familia B (SBE B), y enzimas ramificadoras 2 (SBEII) también conocidas como Familia A (SBE A) (Tetlow, 2006; Tabla 1). Hasta ahora sólo se conoce una isoforma de SBEI, mientras que para SBEII se han reportado las isoformas SBEIIa y SBEIIb (Rahman *et al.*, 2001); las cuales son codificadas por distintos genes con diferentes

patrones de expresión, por lo que es probable que su papel fisiológico sea distinto (Nakamura *et al.*, 2002; 2010). Se ha observado que en arroz (Yamanouchi y Nakamura, 1992; Mizuno *et al.*, 1993), trigo (Rahman *et al.*, 2001) y cebada (Regina *et al.*, 2010) las isoformas SBEI y SBEIIb se expresan sólo en el endospermo, mientras que la isoforma SBEIIa se expresa en todos los tejidos (Yamanouchi y Nakamura, 1992; Mizuno *et al.*, 2001). Por otro lado, mientras que SBEI podría determinar el espacio entre los puntos de ramificación en el endospermo del maíz (Xia *et al.*, 2011), las dos isoformas de SBEII halladas en cereales, determinarían la mayoría de las ramificaciones (Tetlow, 2006). Se ha sugerido que en arroz, *Arabidopsis* y *Populus* podrían encontrarse variantes adicionales que han sido clasificadas como familia SBEIII (Han *et al.*, 2007) y una isoforma SBEIIc presente en plantas de la Familia *Poaceae*, Tribu *Triticeae* (Peng *et al.*, 2000).

Noguchi *et al.*, (2011) usando la técnica de reemplazo molecular y a la enzima ramificadora del glucógeno de *Escherichia coli* como modelo, establecieron la estructura cristalográfica de la isoforma de la enzima ramificadora BEI de arroz a una resolución de 1.9 Å. Esta enzima consta de 755 residuos organizados en tres estructuras modulares y dos dominios globulares que forman un surco prominente en donde se propone que se unen los α -poliglucanos. Se sugiere que los residuos Asp344 y Glu399 desempeñan un papel esencial en la catálisis como nucleófilo y ácido/base respectivamente, mientras que His275 e His467 están involucrados en la estabilización del estado de transición (Figura 4A). En frijol, existen 2 isoformas de la enzima ramificadora denominadas PvSBE1 y PvSBE2 (Figura 4B, Tabla 1).

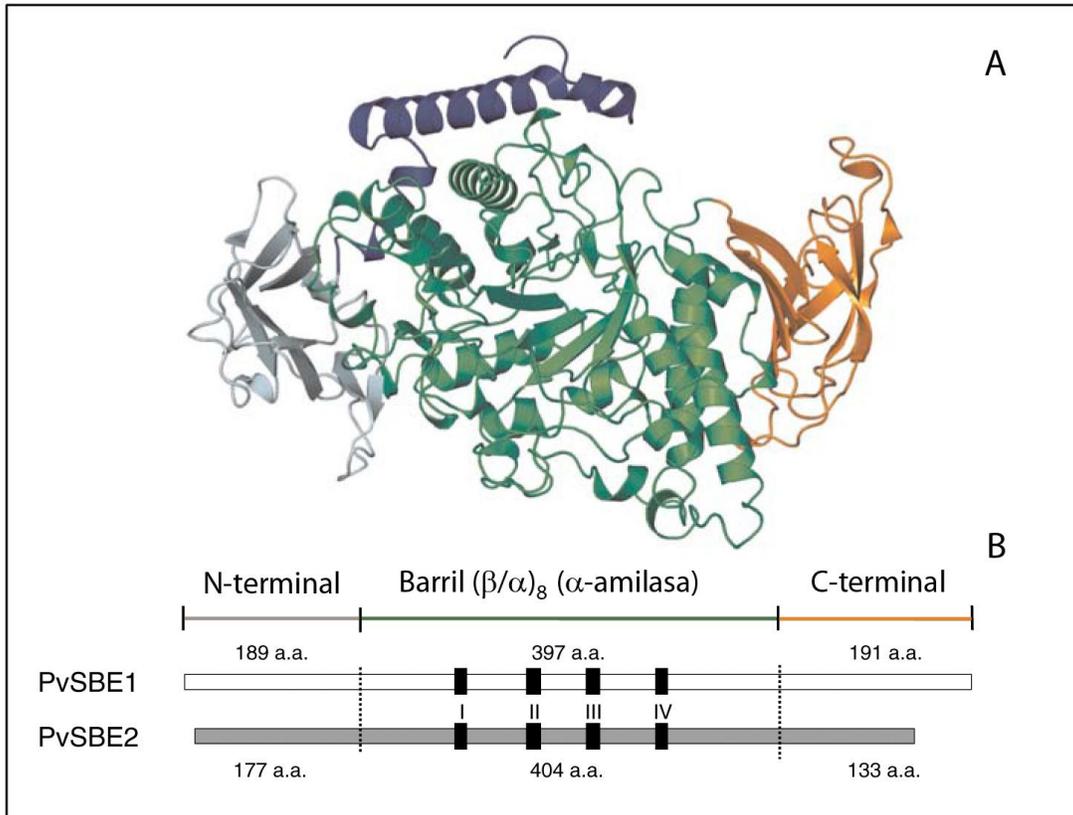


Figura 4. A. Modelo de la isoforma de la enzima ramificadora BEI de arroz cristalizada por Noguchi *et al.*, (2011) que consiste en el dominio N-terminal (residuos 1-58, en morado); módulo 48 de unión a carbohidratos (CBM48) de la clasificación Carbohydrate Active Enzymes (CAZy) descrita por Cantarel *et al.*, (2009) (residuos 59-160, en gris); módulo central catalítico $(\beta/\alpha)_8$ (residuos 161-587, en verde) y un dominio C-terminal de α -amilasa (residuos 588-702, en naranja). **B.** Diagrama de las formas maduras de PvSBE1 y PvSBE2, mostrando una estructura modular en la que el dominio central de barril $(\beta/\alpha)_8$ (que contiene los residuos activos y los 4 sitios característicos conservados en los miembros de la familia de la α -amilasa) está flanqueado por los dominios N-terminal y C-terminal. Modificado de Hamada *et al.*, (2007).

Las isoenzimas ramificadoras en frijol muestran una alta homología (55% identidad) en su secuencia total, que se reduce en la región C-terminal (identidad 34%), lo que sugiere que realizan funciones diferentes (Ito *et al.*, 2004). Se ha establecido que PvSBE1 pertenece a la familia B y PvSBE2 a la familia A (Tabla 1, Hamada *et al.*, 2001). En ambas, el dominio N-terminal se ha asociado con la especificidad de la longitud de la cadena transferida y la velocidad máxima de catálisis y se propone que determina un papel fundamental en la estabilidad estructural (incluyendo termoestabilidad) (Hamada *et al.*, 2007); mientras que el dominio C-terminal podría ser responsable de la unión a amilosa y de la ubicación del sitio a donde las cadenas cortas serán transferidas (Ito *et al.*, 2004).

Tabla 1. Características generales de las enzimas ramificadoras recombinantes de semillas de frijol. Modificado de Hamada *et al.*, (2001). Las enzimas de la Familia A (SBEII) son más activas sobre la amilopectina y su dominio N-terminal es menor que el de los miembros de la Familia B (SBEI), los cuales catalizan preferencialmente la transferencia de cadenas cortas con una alta tasa de ramificación sobre la amilosa (Guan y Preiss, 1993; Takeda *et al.*, 1993; MacGregor *et al.*, 2001).

Característica	SBEI (PvSBE1)	SBEII (PvSBE2)
Familia	B	A
K_m Amilosa	0.44 mg/ml	1.27 mg/ml
Longitud de las cadenas transferidas (residuos de glucosa) al sitio de ramificación (<i>in vitro</i>)	Preferentemente largas y menos ramificadas (De 7 a 12 ó de 27 a 37)	Generalmente más cortas y más ramificadas (De 3 a 9)
Efecto del Citrato (0.3 M)	Sin efecto observado	Estimula velocidad de catálisis sin afectar la afinidad
Localización en el gránulo	Asociada a la superficie	Fracción soluble, por lo que puede formar complejos
Masa molecular¹	Estimada 100 kDa Predicha 88.59 kDa	Estimada 82-88 kDa Predicha 81.9 kDa
Expresión máxima en semillas	Últimos estadios de maduración	Estado medio del desarrollo
Longitud Dominios		
N-terminal	189 aa.	177 aa.
Barril (β/α)₈	397 aa.	404 aa.
C-terminal	191 aa.	133 aa.

¹ Las masas moleculares estimadas se obtuvieron mediante electroforesis desnaturizante mientras que las predichas se establecieron a partir de las secuencias de aminoácidos deducidas.

Las propiedades bioquímicas de enzimas ramificadoras de una gran variedad de organismos han sido analizadas, lo que ha permitido inducir mutaciones que afectan la morfología y el comportamiento físico de los gránulos de almidón. De igual forma, se han usado enzimas ramificadoras bacterianas que al actuar en regiones del gránulo donde las ramificadoras de plantas no lo hacen, generan un material ramificado con características intermedias entre la amilosa y la amilopectina (Morell *et al.*, 1997; Libessart y Preiss, 1998).

El análisis de la amilopectina en mutantes de SBEI revela deficiencias en el número de las cadenas medianas y grandes transferidas. Además de la función, este resultado también sugiere que la ausencia de SBEI no es compensada por las actividades de SBEIIa y SBEIIb (Blauth *et al.*, 2002; Nakamura, 2002). Por su parte, el almidón que producen los mutantes que carecen de SBEIIb se caracteriza por un incremento en la proporción relativa de amilosa a amilopectina en el endospermo (Nishi *et al.*, 2001), razón por la que estos mutantes también se denominan “*amilose-extender*” (*ae*). El análisis en mutantes de SBEIIa en maíz y arroz, muestra que la pérdida de esta isoforma no afecta ni la composición del almidón del endospermo ni la estructura de la amilopectina, lo que sugiere que SBEIIa no tiene un papel crítico, o bien que su actividad puede ser compensada por otras SBE's (Nakamura, 2002; Blauth *et al.*, 2001).

2.5 Regulación de la actividad de las enzimas ramificadoras.

El órgano y el estado de desarrollo de la planta son factores que regulan la expresión de las enzimas ramificadoras del almidón y que contribuyen a que las características de los gránulos se modifiquen con el transcurso del tiempo (Baguma, 2003).

Se ha reportado que la actividad de las enzimas ramificadoras en endospermo de trigo es modulada por fosforilación (Tetlow *et al.*, 2004b). Posteriormente, se demostró que la fosforilación facilita la formación de complejos entre SBE's y SS's y la interacción de los mismos con glucanos (Grimaud *et al.*, 2008; Tetlow *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012). Un análisis más detallado demostró que en el endospermo del maíz la fosforilación de la isoforma SBEIIb ocurre en uno o más residuos de serina (Tetlow *et al.*, 2004a; Liu *et al.*, 2009). La estabilidad de los complejos también es dependiente de fosforilación, pues el tratamiento con fosfatasa alcalina favorece su disociación (Tetlow *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; 2012).

Las cinasas responsables de la fosforilación de las enzimas que participan en la biosíntesis del almidón no se conocen con certeza (Schliebner *et al.*, 2008; Reiland *et al.*, 2009), sin embargo, hay varios candidatos. Uno de ellos es la cinasa plastidial MsK4 de *Medicago sativa*, parecida a la cinasa de la glucógeno sintetasa 3 (GSK-3) de mamíferos. Su sobreexpresión en *Arabidopsis* incrementa la tolerancia a estrés salino y provoca la acumulación de almidón y carbohidratos. *In*

vivo, la actividad de Msk4 se induce rápidamente en respuesta a estrés salino, por lo que parece probable que los cambios en el metabolismo del almidón formen parte de una estrategia metabólica para enfrentar esta condición (Kempa *et al.*, 2007).

El complejo SnRK1 (Sucrose nonfermenting-1-related protein kinase) es otro candidato que podría participar en la fosforilación de las enzimas ramificadoras. Nuestra suposición se basa en que la secuencia de la isoforma II de frijol (PvSBE2) tiene una región que podría ser reconocida por esta cinasa (Figura 5) y en que la actividad de SnRK1 participa en regular muchos procesos metabólicos en función del estado energético, dentro de los cuales está la activación rédox de la ADP-glucosa pirofosforilasa en tubérculos de papa (enzima clave en la biosíntesis del almidón), en respuesta a altas concentraciones de sacarosa (Halford *et al.*, 2003; Tiessen *et al.*, 2003).

El complejo SnRK1 está formado por las subunidades α , β , γ , las cuales presentan gran similitud funcional y estructural con las subunidades homólogas SNF1, SNF4 y Sip1/Sip2/Gal83 de la cinasa SNF1 (sucrose non-fermenting-1) de levadura y AMPK α , AMPK β y AMPK γ de la cinasa AMPK (AMP-activated protein kinase) de mamíferos (Hardie *et al.*, 2006; Polge y Thomas, 2007). Todas ellas se activan por la fosforilación de la subunidad catalítica en un residuo de treonina. Sin embargo, una diferencia notable es que la actividad de SnRK1 no se estimula por AMP, aunque sí responde a sacarosa (Tiessen *et al.*, 2003) y la glucosa-6-P *in vitro* funciona como inhibidor (Toroser *et al.*, 2000). La evolución ha dotado a las plantas y a los animales de más de una subunidad catalítica, lo que combinado con la expresión diferencial de las mismas, resulta en la formación de diferentes complejos de SnRK1 que podrían ser regulados en función de la necesidad del organismo, según el tejido y las condiciones fisiológicas y/o ambientales (Halford *et al.*, 2003).

Se propone que SnRK1 es un componente muy importante del mecanismo sensor de la disponibilidad de carbono y energía, capaz de modular diferentes vías biosintéticas mediante la fosforilación e inactivación de enzimas clave como la HMG-CoA reductasa (Dale *et al.*, 1995), la sacarosa fosfato sintasa, la nitrato reductasa (Sudgen *et al.*, 1999) y la trehalosa fosfato sintasa; modulando la transcripción de los genes de la sacarosa sintasa y α -amilasa en respuesta a condiciones altas de sacarosa (Laurie *et al.*, 2003), o bien contribuyendo a la activación rédox de la ADP-glucosa pirofosforilasa (Halford *et al.*, 2003; Tiessen *et al.*, 2003). Diversos autores han puesto de manifiesto la importancia de la actividad de SnRK1 en procesos de desarrollo,

fertilidad, organogénesis y senescencia, así como en la defensa contra patógenos o en la tolerancia a estrés salino (Rolland *et al.*, 2006).

La secuencia consenso de los sitios fosforilados por SnRK1 (Figura 5) se limita a una región de 10 aminoácidos. Si a la serina que habrá de fosforilarse se le asigna la posición 1, para el reconocimiento se requieren residuos hidrofóbicos en las posiciones +4 y -5 (L, F, I, M y V) y residuos básicos en las posiciones -3 (R, K y H) y -4 (R). El análisis de la estructura primaria de las enzimas ramificadoras de frijol, mostró que la isoforma PvSBE2 posee una región comprendida entre los residuos 225-235 (EWAPAKSAALI) que al cumplir con algunos de estos requerimientos, podría ser blanco de fosforilación por el complejo SnRK1.

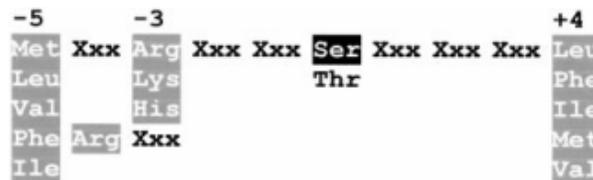


Figura 5. Secuencia consenso de fosforilación por SnRK1. Los residuos requeridos para el reconocimiento se remarcan de la siguiente forma: (1) serina fosforilada (resaltada en negro); (2) residuos hidrofóbicos en las posiciones -5 y +4 en gris; (3) residuos básicos en las posiciones -3 o -4 en gris.

III. JUSTIFICACION

La deficiencia de fósforo afecta a la mayor parte de las tierras de cultivo del país, las plantas que la sufren además de reducir su rendimiento, producción de biomasa de raíces y parte aérea (Bernal, 2005a, Bernal *et al.*, 2007), pueden modificar las características de las sustancias de reserva que se acumulan en sus semillas. Se ha reportado que la deficiencia de Pi también influye sobre el almidón producido bajo estas condiciones: mayor contenido de amilosa, gránulos más pequeños y mayor resistencia a la degradación enzimática (Bernal *et al.*, 2005b; Bernal y Martínez-Barajas, 2006; Bernal, 2009). Ante la importancia de estas variables en las características del almidón y su repercusión en los productos que con él se elaboran, consideramos que es necesario encontrar una explicación bioquímica del fenómeno. En la literatura hay reportes que sugieren la participación de las enzimas ramificadoras en los cambios mencionados (Hamada *et al.*, 2001; 2002; 2007; Liu *et al.*, 2009; 2012; Morell *et al.*, 1997; Takeda, 1993; Tetlow *et al.*, 2004a; 2004b; 2008; 2011), por lo que en este trabajo analizamos el efecto de la deficiencia de fósforo sobre la actividad de las enzimas mencionadas.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis.

El almidón que producen las plantas de frijol cultivadas en deficiencia de fósforo se caracteriza por tener una proporción mayor de amilosa y gránulos más pequeños. Por la importancia de la actividad de las enzimas ramificadoras en la definición de esas características, proponemos que la deficiencia de fósforo induce cambios en las propiedades y/o en la regulación de las enzimas ramificadoras que participan en la acumulación de almidón durante el desarrollo de semillas de frijol.

4.2 Objetivo general.

Establecer el efecto de la deficiencia de fósforo sobre la actividad, las propiedades cinéticas y la regulación de la actividad de las enzimas ramificadoras presentes en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en desarrollo.

4.3 Objetivos particulares.

1. Establecer las condiciones experimentales necesarias para la medición confiable de la actividad de las enzimas ramificadoras.
2. Analizar el efecto del desarrollo y de la deficiencia de fósforo sobre la actividad de las enzimas ramificadoras.
3. Caracterizar cinéticamente y analizar las propiedades de las enzimas ramificadoras presentes en extractos proteicos desalados (semipurificados).
4. Estudiar la regulación de la actividad de las enzimas ramificadoras por SnRK1.
5. Purificar proteínas con actividad ramificadora.
6. Caracterizar bioquímicamente las isoformas purificadas.

V. METODOLOGIA

5.1 Material biológico.

Cultivo: Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de la variedad Canario 60 se pusieron a germinar en papel filtro humedecido en una incubadora a 37°C durante tres días, al brotar la radícula se trasplantaron 3 plántulas por maceta con 350 cm³ de agrolita, las cuales se mantuvieron en condiciones de invernadero iluminado con luz natural con temperaturas promedio de 30°C y 15°C (día/noche, respectivamente) y con inspecciones frecuentes para mantenerlas libres de plagas. El riego fue alternado cada 24 horas usando 100 ml de agua desionizada o solución nutritiva Hoagland (Jones, 1982) modificada con 2 y 0.2 mM de Pi (Tabla 2), para obtener plantas cultivadas en condiciones ideales (Pi+) y con deficiencia severa de fósforo (Pi-), respectivamente.

Tabla 2. Modo de preparación de las soluciones de riego Hoagland modificadas. Los macronutrientes se adicionaron en el orden que aparecen, disolviendo completamente el primero para adicionar el siguiente. El pH se ajustó a 5.2-5.4. La solución Pi- se complementó con 0.5 mM de Sulfato de amonio.

SOLUCION HOAGLAND Pi+ (Pi 2 mM)			
Macronutrientes			
Compuesto	g/L	mM	10 L (5x)
KNO ₃	0.6066	6	30.33 g
Ca(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	0.9448	4	47.24 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.493	2	24.65 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.345	0.5	17.25 g
EDTAFe	0.01	1.4	0.5 g
Micronutrientes			
Compuesto	mg/L	µM	2 L (100 x)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.78	9	0.356 g
H ₃ BO ₃	2.84	46	0.568 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.23	0.8	0.046 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.749	3	0.1498 g
H ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0.0179	0.015	0.0035 g

SOLUCION HOAGLAND Pi- (Pi 0.2 mM)			
Macronutrientes			
Compuesto	g/L	mM	10 L (5x)
KNO ₃	0.6066	6	30.33 g
Ca(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	0.9448	4	47.24 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.493	2	24.65 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.029	0.042	1.44 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05	0.5	2.5 g
EDTAFe	0.01	1.4	0.5 g
Micronutrientes			
Compuesto	mg/L	µM	2 L (100 x)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.78	9	0.356 g
H ₃ BO ₃	2.84	46	0.568 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.23	0.8	0.046 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.749	3	0.1498 g
H ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0.0179	0.015	0.0035 g

Marcaje de flores: Una vez iniciado el periodo de floración, éstas se etiquetaron con la fecha correspondiente a su apertura completa. La edad de los frutos se midió en días después de la floración o antesis (DDA).

Toma de muestras: Se cosecharon frutos de 15, 20, 25, 30 y 40 DDA, se desecharon las cubiertas de las semillas y los embriones fueron congelados con N₂ líquido y almacenados a -70°C.

5.2 Extracción y cuantificación de las enzimas ramificadoras.

Se homogenizaron embriones de plantas cultivadas en condiciones ideales (Pi+) y con severa deficiencia de fósforo (Pi-) de 15, 20, 25, 30 y 40 DDA en un mortero a 4°C en una relación 4 ml/g con el amortiguador de extracción 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM DTT, 10 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 50 mM NaCl y 2 mM PMSF. Los extractos se centrifugaron a 11000 x g durante 5 minutos, del sobrenadante obtenido se tomó 1 ml para desalarlo en una columna con 3 ml de Sephadex G-25 previamente equilibrada con 15 ml del amortiguador Tris 20 mM pH 7.0, EDTA 10 mM, DTT 5 mM y Glicerol al 20%. La muestra se eluyó con 1.5 ml del mismo amortiguador.

Los amortiguadores de extracción y equilibrio se prepararon de acuerdo con los reportados para las enzimas ramificadoras (Keeling *et al.*, 1988; Hamada *et al.*, 2001; Vu *et al.*, 2008) y previa estandarización de las concentraciones y condiciones adecuadas para las enzimas de embriones de frijol. Se observó que en las condiciones del extracto crudo, se mantuvo e incluso incrementó la actividad de las enzimas ramificadoras conforme el paso de los días, mientras que en los extractos proteicos desalados ocurrió lo contrario. La actividad se logró mantener exitosamente con la adición de glicerol al 20% en el amortiguador de equilibrio que contuvo a los extractos proteicos desalados y su posterior almacenamiento a -70°C. La concentración de proteína fue determinada con el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina como estándar para realizar la curva patrón.

5.3 Establecimiento de las condiciones adecuadas para medir la actividad ramificadora (Ensayo de Tinción con yodo).

La actividad de la enzima ramificadora se ensayó de acuerdo con el método reportado por Boyer y Preiss, (1978) y Vos-Scheperkeuter *et al.*, (1989). El medio de reacción contuvo citrato de sodio 100 mM (pH 7.0) como amortiguador y amilosa de papa 0.1 mg/ml disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) como sustrato, en un volumen final de 50 μ l.

Este método se fundamentó en la formación del complejo yodo-poliglucano, cuya concentración determina la intensidad del color azul-violeta observado. Debido a la hidrólisis y transferencia de cadenas sobre glucanos lineales principalmente, éstos se transforman en moléculas cuya estructura ramificada reduce la accesibilidad y deslizamiento de iones triyoduro solubles $[I_3^-]$ al interior hidrofóbico de las hélices de los poliglucanos (Sección 2.3.1) y con ello la formación de complejos yodo-poliglucano, lo que resulta en una disminución en la absorbancia a 660-680 nm en presencia de amilosa y 540-560 nm en presencia de amilopectina (Boyer y Preiss, 1978; Vos-Scheperkeuter *et al.*, 1989). Este método también es utilizado en la determinación del contenido de almidón de diversas fuentes botánicas (Banks *et al.*, 1971; Morrison y Laignelet, 1983) y para observar los efectos de calentamiento y enfriamiento en dispersiones y geles de almidón (Svegmark y Hermansson, 1991; Singh *et al.*, 2009). Si bien la actividad de α -amilasa pudiera interferir con esta técnica, no se ha detectado una actividad significativa en extractos provenientes de endospermo de arroz ni de semillas en desarrollo (Smyth, 1998).

La reacción se llevó a cabo a 25°C agregando diferentes cantidades de extracto desalado de 20 DDA Pi+ (0, 5, 10, 20 y 30 μ l, en un rango aproximado de 0 a 110 μ g de proteína), se emplearon embriones de 20 DDA debido a la facilidad de obtención del extracto respecto a otras edades y suficiente contenido enzimático previamente detectado. En otro ensayo se usó una cantidad constante de proteína pero la reacción se detuvo a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15 y 20 minutos) con 1 ml de solución de yodo (0.2% I_2 / 2% KI). Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 13,148 x g durante 2 minutos y se midió la absorbancia a 680 nm; este valor se restó de la absorbancia de un blanco que no tenía enzima y la actividad ramificadora se expresó como la diferencia entre ambas lecturas ($\Delta 680$ /min/mg). La cantidad de proteína se ajustó para que las lecturas permanecieran dentro de un rango donde la disminución en la absorbancia fuera lineal pero no mayor al 60% del valor original.

5.4 Efecto del desarrollo y de la deficiencia de fósforo sobre la actividad ramificadora en semillas de frijol.

Para determinar el efecto del desarrollo y de la deficiencia de fósforo sobre la actividad ramificadora, se midió ésta en extractos proteicos desalados de embriones de 10, 15, 20, 25, 30 y 40 DDA provenientes de plantas cultivadas en condiciones ideales (P_i^+) y con deficiencia severa de fósforo (P_i^-).

5.5 Regulación de la actividad de las enzimas ramificadoras. Caracterización en extractos proteicos desalados.

5.5.1. Efecto del estado de fosforilación sobre la actividad de la enzima ramificadora.

Considerando la importancia descrita de la fosforilación como mecanismo regulatorio en la actividad de las enzimas ramificadoras (Sección 2.5), se investigó el efecto del estado de fosforilación sobre la actividad ramificadora, diseñando un experimento en donde la actividad ramificadora de extractos desalados de 20 DDA provenientes de plantas cultivadas en condiciones ideales (P_i^+) se midió después de preincubarlos durante 1 hora a 4 y 30°C tanto en condiciones estándar (Control), favoreciendo la fosforilación con 5 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, inhibidores de fosfatasa y de proteasas (se incluyó $MgCl_2$ debido a que los nucleótidos como el ATP se unen a iones metálicos divalentes tales como magnesio y manganeso, en donde el complejo nucleótido-ion metálico es el auténtico sustrato para las cinasas) o eliminando el efecto de ésta, adicionando 8.264 U/mL de fosfatasa alcalina e inhibidores de proteasas.

5.5.1.1. Efecto de la concentración de ATP, ADP y AMP.

Para establecer el efecto de los nucleótidos sobre la actividad ramificadora, extractos proteicos desalados de embriones de 20 DDA provenientes de plantas control (P_i^+) y cultivadas en deficiencia de fósforo (P_i^-), se preincubaron durante 30 minutos a 30°C en presencia de ATP ó ADP ó AMP en concentraciones de 0, 1, 2 y 3 mM (incluyendo $MgCl_2$ a una concentración al

triple de la del nucleótido) e inhibidores de proteasas y fosfatasa, posteriormente se determinó la actividad ramificadora en cada condición.

Para evaluar únicamente el efecto de la estructura del nucleótido, se determinó la actividad ramificadora de extractos desalados provenientes de embriones de 20 DDA Pi⁺ y de 20 DDA Pi⁻, después de ser preincubados durante 30 minutos a 30°C en condiciones Control; en presencia de 2 mM ATP ó ADP ó AMP, 6 mM MgCl₂, inhibidores de proteasas y de fosfatasa; así como en presencia de 2 mM ATP_γ (análogo estructural del ATP no metabolizable) e inhibidores de proteasas y fosfatasa.

5.5.1.2. Efecto del tiempo de incubación a 30°C.

Para analizar el efecto de la temperatura, extractos desalados preparados con embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi⁺) y de deficiencia de fósforo (Pi⁻), se preincubaron por 0, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos a 30°C en condiciones control y en presencia de 2 mM ATP, 6 mM MgCl₂, inhibidores de proteasas y fosfatasa, después de lo cual se midió la actividad ramificadora.

5.5.1.3. Efecto del desarrollo, de la deficiencia de fósforo y del grado de fosforilación sobre la actividad y regulación de la enzima ramificadora.

Para esto, la actividad de la enzima ramificadora en extractos desalados de embriones de 15, 20, 25 y 30 DDA producidos por plantas cultivadas tanto en condiciones adecuadas (Pi⁺) como de deficiencia de fósforo (Pi⁻), se midió después de haber sido preincubados 30 minutos a 30°C en las condiciones que se indican a continuación:

- a) Control: se agregaron inhibidores de proteasas y de fosfatasa.
- b) ATP: Además de 2 mM ATP, se agregó 6 mM MgCl₂, inhibidores de proteasas y de fosfatasa.
- c) Fosfatasa alcalina (FA): Se agregaron 8.264 U/mL de fosfatasa e inhibidores de proteasas.

5.5.2. Papel de la cinasa SnRK1 en la fosforilación de las enzimas ramificadoras.

Para determinar si el complejo SnRK1 desempeña un papel fundamental durante la fosforilación de las enzimas ramificadoras de frijol, dada la presencia en la isoforma PvSBE2 de la secuencia EWAPGAKSAALI, similar a la de reconocimiento de SnRK1 (Sección 2.5, Figura 5); se trabajó con las siguientes condiciones experimentales:

- a) Extractos proteicos desalados de embriones de 20 DDA, producidos tanto por plantas cultivadas en condiciones adecuadas como cultivadas en deficiencia de fósforo (designados E+ y E-, respectivamente),
- b) Una fracción enriquecida de SnRK1 parcialmente purificada de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas y de deficiencia de fósforo (designadas C+ y C- respectivamente), correspondiente al pico de actividad de SnRK1 y subunidad catalítica que se obtuvo después de aplicar 3 ml del sobrenadante filtrado del homogenizado de 5 g de cotiledones, a una columna de filtración HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (0.5 mL/min).
- c) En la mezcla de los extractos anteriores provenientes de plantas cultivadas en condiciones ideales (C+E+) y en deficiencia de fosforo (C-E-).

En cada condición, se realizó una preincubación durante 30 minutos a 30°C en presencia de 2 mM ATP, 6 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas y fosfatasa. Posteriormente se analizó el efecto sobre las enzimas ensayando la actividad en ausencia y presencia de 100 mM de citrato de sodio pH 7.0, debido a que se ha reportado que estimula la actividad ramificadora, por lo que es un componente habitual de los medios usados para su análisis (Walker y Builder, 1971). En las muestras sin citrato se empleó HEPES 100 mM pH 7.0.

5.5.3. Estudio de las propiedades cinéticas de las enzimas ramificadoras.

Se analizó si el grado de fosforilación modifica los parámetros cinéticos (K_m y $V_{m\acute{a}x}$) de la enzima ramificadora, para lo cual se midió la actividad en extractos desalados preparados con embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+) y de deficiencia de fósforo (Pi-) en presencia de 0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15 y 0.175 mg/ml de amilosa en

el ensayo de tinción con yodo, teniendo el cuidado de incluir los blancos respectivos. Debido a que la cinética de saturación de las enzimas ramificadoras no se ajusta al modelo de Michaelis-Menten (Smyth, 1988), se realizó el ajuste de la cinética de saturación al modelo de inhibición por sustrato con el programa GraphPad Prism versión 5.03, empleando la ecuación $Y = V_{\text{máx}} * X / (K_m + X * (1 + X / K_i))$.

5.5.4 Análisis del efecto de citrato sobre la actividad de la enzima ramificadora.

Como se mencionó previamente, además de fungir como amortiguador en el ensayo de tinción con yodo, el citrato modula la actividad ramificadora positivamente (Walker y Builder, 1971), por lo que el efecto de la fosforilación sobre la respuesta a citrato también fue analizado. La actividad de extractos desalados preparados con embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+) y de deficiencia de fósforo (Pi-), se determinó en ensayos hechos en presencia de 0, 50, 100, 200, 300 y 400 mM de citrato de sodio pH 7.0 en el ensayo de tinción con yodo. En las muestras sin citrato se empleó HEPES 100 mM pH 7.0.

5.6. Análisis en geles nativos de los efectos del desarrollo, deficiencia de fósforo y grado de fosforilación sobre la actividad de las enzimas ramificadoras.

La actividad de las enzimas del metabolismo del almidón y en particular de las enzimas ramificadoras, también puede ser determinada en geles nativos añadiendo a la matriz de acrilamida amilosa, amilopectina o almidón como sustratos (Yao *et al.*, 2004; Delvallé *et al.*, 2005; Szydowski *et al.*, 2011). Para eso es necesario elaborar geles con 7% de acrilamida y 0.3% de amilosa (Tabla 3), la cual antes de mezclar con la acrilamida se disolvió calentando a ebullición en 400 µl de DMSO. Después de cargar 15 µg de extractos de embriones de 15, 20, 25, 30 y 40 DDA Pi+ y Pi- por carril, el gel se corrió a 4°C a 60 V durante 5 horas. Posteriormente se lavó dos veces durante 5 minutos con 20 ml del amortiguador 50 mM Citrato de sodio pH 7.0 y 50 mM 2-mercaptoetanol, se incubó toda la noche a temperatura ambiente con el mismo amortiguador y al día siguiente fue teñido con 20 ml de solución de yodo (0.2% I₂ / 2% KI).

Tabla 3. Composición de geles nativos con amilosa de papa 0.3% como sustrato para determinar actividad ramificadora.

Gel separador (7%)	5 ml
30% Acrilamida, 0.8% Bis-Acrilamida	1.17 ml
2.5 M Tris-HCl pH 8.8	0.45 ml
H ₂ O	2.94 ml
0.3 % Amilosa de papa	0.015 g disueltos en 400 µl de DMSO
10% Persulfato de amonio	37.5 µl
TEMED	5 µl
Gel concentrador (4%)	2.5 ml
30% Acrilamida, 0.8% Bis-Acrilamida	0.5 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.5 ml
H ₂ O	1.48 ml
10% Persulfato de amonio	18.75 µl
TEMED	2.5 µl

Con la misma técnica y el ensayo de tinción con yodo, se determinó la actividad ramificadora en extractos proteicos desalados de 20 DDA Pi+ y Pi- en condiciones Control sin temperatura (sólo el extracto proteico), Control (extractos con sólo preincubación a 30°C durante 30 minutos) y 2 mM de ATP o ADP o AMP, con la preincubación descrita previamente (30°C durante 30 minutos en presencia de 2 mM de nucleótido, 6 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas y fosfatasa). El comportamiento de los patrones de bandas observados se analizó mediante densitometría con el programa Scion Image versión Beta 4.0.2.

5.7 Papel de la Temperatura.

El efecto de la temperatura sobre la actividad ramificadora fue analizado en extractos de 20 DDA producidos tanto por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+) como de deficiencia de fósforo (Pi-), los cuales se preincubaron por 20 minutos a temperaturas desde 5 hasta 70°C. La exposición se realizó en condiciones Control (sólo extracto proteico desalado) y ATP (2 mM ATP, 6 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas y fosfatasa), para determinar finalmente la actividad ramificadora con el ensayo de tinción con yodo.

5.8 Purificación de las isoformas termoestables con actividad ramificadora.

5.8.1. Efecto de la presencia de iones sobre la actividad de las enzimas ramificadoras.

Para investigar las bases de la estabilidad en la actividad de la enzima ramificadora al calentamiento a 70°C, se determinó la actividad en extractos elaborados con embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+) y de deficiencia de fósforo (Pi-) después de ser preincubados a 70°C por 20 minutos en presencia de 6 mM Mg²⁺, 6 mM Ca²⁺, 2 mM ATP-6 mM MgCl₂, 6 mM EDTA y 6 mM EGTA.

5.8.2. Purificación de la enzima ramificadora termoestable.

La aplicación del tratamiento con ATP permitió que algunas isoformas se mantengan en solución y activas después de calentarlas a 70°C por 20 minutos (Figura 17) y dado que este tratamiento provoca la inestabilidad y desnaturalización de la mayoría de las proteínas, las cuales usualmente precipitan a pH neutro, se decidió aprovechar esta circunstancia para realizar su purificación, caracterizando inicialmente los fundamentos del procedimiento.

El pH óptimo de la enzima ramificadora se encuentra dentro del rango de 7 a 9, en el que la actividad se mantiene estable en temperaturas de 25 hasta 40°C (Libessart y Jack Preiss, 1998). La purificación de las isoformas termoestables con actividad ramificadora de extractos de 20 DDA Pi+ y Pi- se realizó de acuerdo a la estrategia y condiciones descritas para las enzimas ramificadoras de semillas de frijol (Hamada *et al.*, 2001; Nozaki *et al.*, 2001), endospermos de maíz (Vos-Scheperkeuter *et al.*, 1989; Kuriki *et al.*, 1997; Libessart y Preiss, 1998), trigo (Morell *et al.*, 1997; Regina *et al.*, 2004) y arroz (Smyth, 1988) así como de tubérculos de papa (Blennow, 1991); adecuando el procedimiento para las enzimas ramificadoras de las semillas de frijol de 20 DDA, en una serie de pasos que resultó ser la más eficiente para obtener un mayor grado de pureza en menor tiempo, conservando y estimulando la actividad ramificadora original.

Para la purificación de la enzima ramificadora se usaron embriones de 20 DDA tanto producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+) o sometidas a deficiencia de fósforo (Pi-). Los embriones (10.5 g) se homogenizaron en mortero con 20 ml del amortiguador de extracción

20 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM DTT, 10 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 50 mM NaCl y 2 mM PMSF. Después de centrifugar 25 minutos a 5000 x g, el sobrenadante (23 ml) se complementó con 6 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas y fosfatasa para calentarse a 70°C durante 20 minutos, posteriormente se centrifugó a 5000 x g con el rotor Sorvall Type SS-34 durante 25 minutos. El sobrenadante (23 ml) se pasó por un filtro de PVDF hidrofílico de 0.45 µm Millipore Millex-HV para resolver su contenido proteico a través de una columna de intercambio aniónico (Q-Sefarosa HR 16/10 Pharmacia) previamente equilibrada con 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM DTT, 10 mM EDTA y Glicerol al 20%, ya que la mayor fracción de enzimas ramificadoras se eluye y mantiene estable en bajas condiciones de sales (Smyth, 1988). Se recuperaron fracciones de 3 ml, se midió la actividad ramificadora y se reunieron las fracciones más activas (22-31).

A las fracciones de mayor actividad (30 ml) se les agregó sulfato de amonio hasta alcanzar 1 M y se pasaron por una columna de interacción hidrofóbica (Fenil-Sefarosa de 16 x 45 mm Pharmacia) equilibrada con 20 ml de amortiguador de equilibrio con 1 M de sulfato de amonio. Para eluir la proteína se empleó un gradiente negativo de sulfato de amonio empezando por 1 M (10 fracciones de 1 ml), 0.5 M (10 fracciones de 1 ml), 0.25 M (10 fracciones de 1 ml) y 0 M (12 fracciones de 1 ml). Al determinar la actividad ramificadora, las 12 fracciones más altas se reunieron (correspondientes a las eluidas en ausencia de sulfato de amonio) y se precipitaron con 2 volúmenes de acetona al 99.60% durante 1 hora a -20°C, posteriormente se centrifugó a 7500 x g con el rotor Sorvall Type SS-34 durante 25 minutos.

La pastilla obtenida se resuspendió en 500 µl del amortiguador usado para equilibrar la columna de Q-Sefarosa, la muestra se centrifugó a 11000 x g durante 5 minutos, se filtró mediante centrifugación a 11000 x g durante 2 minutos con una unidad de Ultrafree-MC Centrifugal Filter Millipore y se cargó finalmente a una columna de exclusión molecular (Superdex-200 Increase 10 x 300-310 mm GL) previamente equilibrada con el mismo amortiguador en que se resuspendió la muestra. El rango de la columna estuvo conformado por tiroglobulina (670 kDa), g-globulina (158 kDa), ovoalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) y Vit B12 (1.3 kDa), obtenidas en volúmenes de flujo de 10.5, 13.5, 16, 18 y 21 ml, respectivamente. Se colectaron 50 fracciones de 1 ml y se reunieron las más activas al determinar la actividad ramificadora (14-22 de la muestra Pi⁺ y 14-23 de la muestra Pi⁻). Finalmente se estimó la concentración de la cantidad de proteína presente.

5.9 Caracterización de las isoformas termoestables purificadas.

5.9.1. Efecto del Citrato.

Se probaron concentraciones desde 0 hasta 400 mM de citrato de sodio pH 7.0 en el ensayo de tinción con yodo para determinar la actividad ramificadora de las isoformas purificadas. En las muestras sin citrato se empleó HEPES 100 mM pH 7.0.

5.9.2. Propiedades cinéticas.

Se determinaron los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de las isoformas purificadas usando como sustratos amilosa y amilopectina en un rango de concentraciones de 0 a 0.2 mg/ml en el ensayo de tinción con yodo. La actividad ramificadora con amilopectina se evaluó de acuerdo al ensayo de tinción con yodo descrito en la sección 5.3 cuando se utiliza este sustrato. Como se mencionó previamente, la cinética de saturación de las enzimas ramificadoras no se ajusta al modelo de Michaelis-Menten (Smyth, 1988), por lo que se realizó el ajuste de la actividad ramificadora al modelo de inhibición por sustrato con el programa GraphPad Prism versión 5.03, empleando la ecuación $Y = V_{m\acute{a}x} * X / (K_m + X * (1 + X / K_i))$.

5.9.3. Determinación de la temperatura óptima.

Para determinar la estabilidad de la enzima y la temperatura óptima de reacción de las isoformas purificadas, la enzima sola o con la mezcla de reacción (con 100 mM de citrato de sodio y, 0.1 mg/ml de amilosa o amilopectina como sustratos), se preincubaron por 10 minutos a temperaturas de 25 a 70°C, evaluando la actividad ramificadora posteriormente.

5.9.4. Efecto de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Considerando el papel del magnesio durante el tratamiento a 70°C, la activación descrita de la mayoría de las α -amilasas con calcio (Nozaki *et al.*, 2001) y que las enzimas ramificadoras

pertenecen a la súper familia de las endo-amilasas (α -amilasa, Figura 4B); se analizó la capacidad de ambos iones para estabilizar la actividad de las enzimas purificadas Pi^+ y Pi^- . El experimento se realizó con $MgCl_2$ ó $CaCl_2$ en concentraciones de 0, 1, 2, 4, 5 y 10 mM, agregando posteriormente citrato de sodio 100 mM y 0.1 mg/ml del sustrato (amilosa o amilopectina), seguido de una preincubación a 30 ó 70°C durante 10 minutos. Finalmente, se determinó la actividad ramificadora en cada condición.

5.10 Análisis estadísticos.

Se utilizó el programa IBM SPSS Statistics Versión 19 para hacer los análisis estadísticos. Se utilizó la desviación estándar (SD) para la discriminación de promedios y cuando procedió, las diferencias entre tratamientos se determinaron mediante análisis de varianza con el Modelo Lineal General mediante uno o dos criterios (factores) de clasificación y las pruebas Post hoc de Tukey y Bonferroni.

VI. RESULTADOS

6.1 Establecimiento de las condiciones ideales para medir la actividad ramificadora.

El ensayo de tinción con yodo mostró un comportamiento lineal, en el que la absorbancia a 680 nm disminuyó de manera inversamente proporcional a la cantidad de extracto usada (Figura 6A) y al tiempo de incubación de la reacción (Figura 6B).

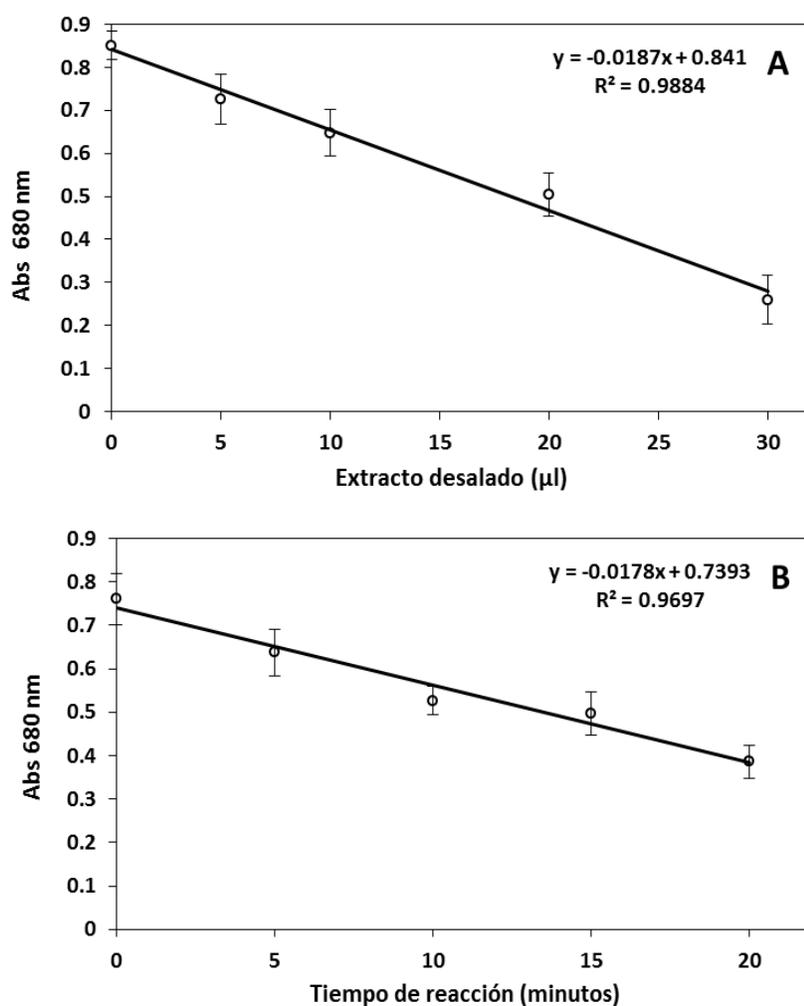


Figura 6. Relación de la actividad ramificadora con la cantidad de proteína (A) y el tiempo de reacción (B) a 25°C. En ambos casos los valores de absorbancia a 680 nm se ajustaron linealmente. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones \pm desviación estándar (SD).

En los ensayos posteriores, la determinación de la actividad ramificadora se realizó con 20 μ l de extracto (conteniendo 80-100 μ g de proteína) y un periodo de incubación de 10 minutos a 25°C.

6.2 Perfil de Actividad Ramificadora durante el desarrollo de la semilla de frijol.

De acuerdo con el perfil durante el desarrollo de la semilla (Figura 7), el comportamiento de la actividad ramificadora en condiciones control (Pi+) es distinto para cada estadio (DDA) analizado, siguiendo una tendencia a disminuir conforme se alcanza la madurez, lo cual resulta consistente con los procesos de síntesis y acumulación de almidón que se llevan a cabo durante el desarrollo de la semilla (Sección 2.1.2), en los que las enzimas implicadas están sujetas a regulación en su expresión y coordinación entre sus actividades, ya que su balance determina la estructura del almidón, que varía de acuerdo al estado de desarrollo, edad y órgano de la planta (Sección 2.3.3), por lo cual se pueden observar gránulos de almidón con características diferentes con el transcurso del tiempo (Sección 2.5).

Si bien el desarrollo modificó la actividad ramificadora, la deficiencia de fósforo a la que fueron sometidas las plantas de frijol provocó efectos claros en estas condiciones (Pi-), incluyendo el incremento en el tamaño de la raíz, reducción en la parte área, disminución en el número y dimensión de las hojas (Sección 2.2); así como una modificación sobre la actividad ramificadora, reduciéndola del 40 a 60% de los valores originales en las edades de 15, 20 y 25 DDA (característica que se presentó en todos los experimentos de este trabajo), pero manteniéndola en niveles similares durante todo el desarrollo de la semilla (Figura 7), lo cual podría estar relacionado con la alteración en el metabolismo de carbono (acumulación de azúcares en hojas y raíces) que se ha reportado se presenta en las plantas cultivadas con deficiencia de fósforo (Sección 2.2), lo que conlleva a la modificación de la proporción amilosa/amilopectina y por lo tanto de las características del almidón producido bajo estas condiciones (Sección 2.3.4). Estos resultados sugieren que las isoenzimas con actividad ramificadora presentes y las asociaciones que se producen entre ellas, son distintas entre los extractos Pi+ y Pi- y por lo tanto, es muy probable que difieran en las respuestas a los mecanismos de regulación estudiados.

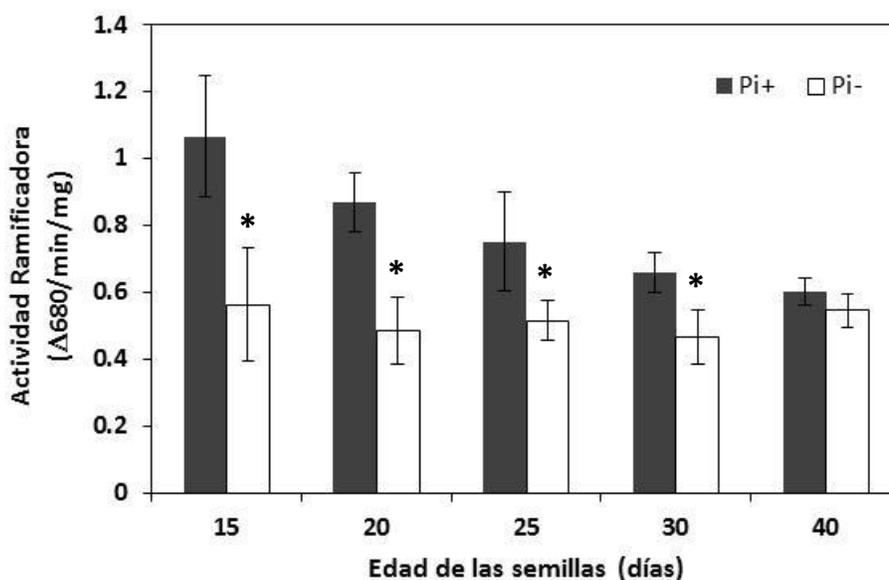


Figura 7. Efecto de la disponibilidad de fósforo (Pi+ y Pi-) sobre la actividad ramificadora durante el desarrollo de embriones de frijol. La actividad se determinó con el ensayo de tinción con yodo empleando 20 μg de extracto proteico desalado con 10 minutos de incubación a 25°C. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 12 repeticiones \pm desviación estándar (SD).

* Diferencia significativa respecto al control (Bonferroni, $p \leq 0.05$; Tukey, $p \leq 0.05$).

6.3 Caracterización de la actividad ramificadora en extractos desalados.

6.3.1. Efecto del estado de fosforilación.

Ante la posibilidad de que la actividad de las enzimas ramificadoras se regule por fosforilación con los antecedentes de la literatura (Sección 2.5), se realizó un experimento para explorar la importancia de este mecanismo. En la Tabla 4, se muestran las lecturas a 680 nm del ensayo de tinción con yodo y los valores de $\Delta 680$ (obtenidos de la lectura del blanco menos la absorbancia) en cada condición. Como puede observarse, a 4°C el tratamiento con fosfatasa alcalina reduce escasamente la actividad (de 0.365 a 0.322) y no hay cambios derivados de la presencia de ATP. A 30°C, la actividad con fosfatasa alcalina se reduce aún más (de 0.367 a 0.259), mientras que la presencia de ATP produce un incremento (de 0.367 a 0.456), por lo que el paso a seguir fue optimizar las condiciones experimentales del estado de fosforilación, determinando la concentración adecuada en el tratamiento con ATP para producir el efecto observado.

Tabla 4. Efecto del ATP y fosfatasa alcalina sobre la actividad ramificadora de extractos de embriones de frijol de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones ideales (Pi+). Después de 1 hora de preincubación a 4 ó 30°C en condiciones Control ó en presencia de 5 mM de ATP ó en presencia de 8.264 U/mL de fosfatasa alcalina; se determinó la actividad ramificadora con el ensayo de tinción con yodo empleando 20 µg de extracto proteico desalado con 10 minutos de incubación a 25°C. Los resultados que se muestran corresponden al promedio de 6 repeticiones ± desviación estándar (SD).

Incubación a 4°C	Absorbancia 680 nm	Δ680	Incubación a 30°C	Absorbancia 680 nm	Δ680
Blanco	0.808 ±0.049	-	Blanco	0.823 ±0.038	-
Control	0.443 ±0.037	0.365 ±0.065	Control	0.456 ±0.074	0.367 ±0.055
ATP	0.448 ±0.051	0.360 ±0.034	ATP	0.367 ±0.025	0.456 ±0.036
Fosfatasa	0.486 ±0.022	0.322 ±0.069	Fosfatasa	0.564 ±0.047	0.259 ±0.028

6.3.1.1. Efecto de la concentración de ATP, ADP y AMP.

Con los resultados previos y con los antecedentes de que la formación de complejos proteicos estromales resulta fuertemente potenciado por ATP, y se produce su ruptura con un tratamiento con fosfatasa alcalina (Sección 2.3.3), se determinó la cantidad adecuada de ATP en el tratamiento de fosforilación para modular la actividad ramificadora y conocer si la respuesta o parte de ésta se debía a un mecanismo regulatorio dependiente de la estructura del ATP o en general de los compuestos que contienen grupos fosfato, es decir ADP y AMP, considerando que se ha reportado un incremento en la actividad ramificadora *in vitro* en papa al emplear amortiguador de fosfato 50 mM pH 7.5 (Blennow, 1991) y en trigo en presencia de compuestos fosforilados probados en concentraciones de 10 mM (Morell *et al.*, 1997).

Los resultados mostraron que en los extractos de los embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones normales (Figura 8A), la actividad de la enzima ramificadora se incrementa después de la preincubación a 30°C en presencia del tratamiento con ATP, en donde el efecto más claro se produce con 2 mM, puesto que concentraciones mayores a 5 mM no produjeron un efecto sobre la actividad o incluso propiciaron inhibición de la misma (datos no mostrados). Por otro lado, la deficiencia de fósforo además de reducir la actividad (Figura 8B), modificó la respuesta de las enzimas, observándose un efecto positivo de igual magnitud con ATP y ADP a partir de concentraciones mayores a 2 mM, mientras que el efecto del AMP fue menor. Los resultados sugieren que el ATP funge como sustrato para las cinasas presentes en los extractos proteicos desalados para fosforilar a las enzimas ramificadoras, sin embargo el incremento en la actividad que se observa en presencia de ADP y AMP sugiere además, un

posible efecto modulador por nucleótidos en concentraciones de hasta 2 mM o de los componentes del tratamiento de fosforilación, en el que el ATP interacciona de manera más eficiente con las enzimas solubles o en complejos que los nucleótidos ADP y AMP.

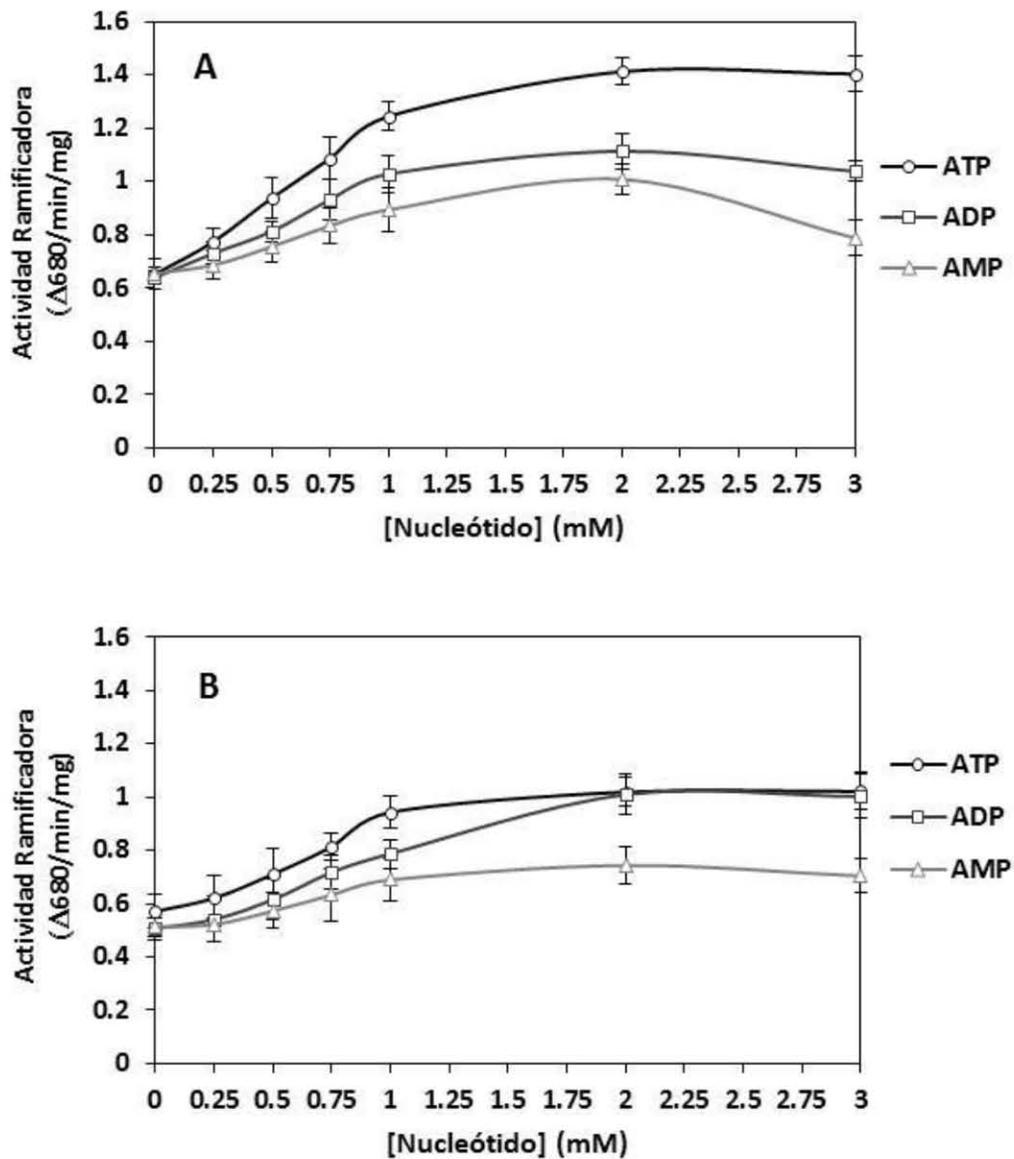


Figura 8. Efecto de la preincubación durante 30 minutos a 30°C en presencia de diferentes concentraciones de ATP, ADP y AMP, sobre la actividad ramificadora en extractos de embriones de 20 DDA provenientes de plantas control (Pi+, A) y cultivadas en deficiencia de fósforo (Pi-, B). La actividad se determinó con el ensayo de tinción con yodo empleando 20 µg de extracto proteico desalado con 10 minutos de incubación a 25°C. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones ± desviación estándar (SD).

De acuerdo con este resultado, se determinó si el efecto observado podría deberse únicamente a la presencia del ATP sin los componentes del tratamiento de fosforilación, por lo que se determinó la actividad ramificadora en presencia de sólo 2 mM ATP γ (análogo estructural de ATP no metabolizable). El resultado mostró que la estructura del ATP por sí misma no es suficiente para producir un efecto significativo en la actividad sobre los extractos elaborados a partir de embriones de 20 DDA Pi+ (Figura 9A) y 20 DDA Pi- (Figura 9B).

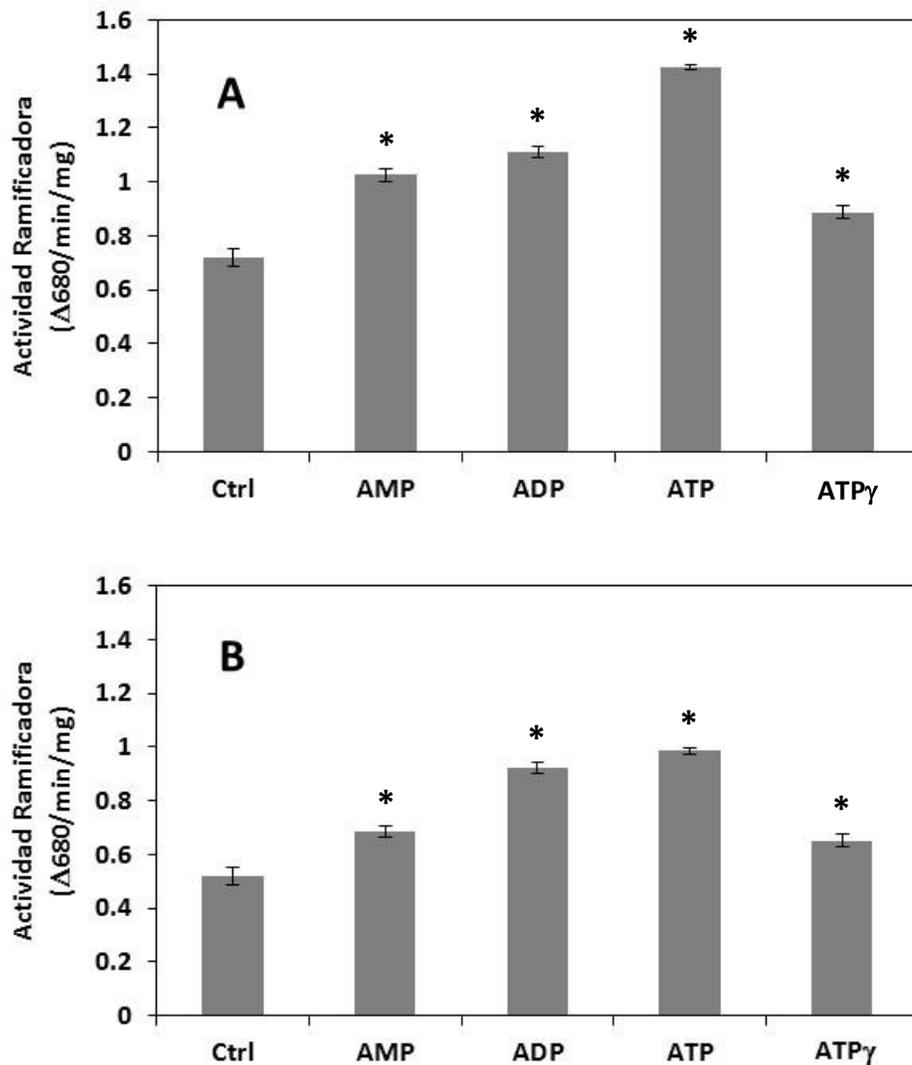


Figura 9. Efecto de la preincubación durante 30 minutos a 30°C en presencia de 2 mM ATP ó ADP ó AMP (con el tratamiento de fosforilación descrito) y 2 mM ATP γ , sobre la actividad ramificadora en extractos de embriones de 20 DDA provenientes de plantas control (Pi+, A) y cultivadas en deficiencia de fósforo (Pi-, B). Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 6 repeticiones \pm desviación estándar (SD). * Diferencia significativa respecto al control (Bonferroni, $p \leq 0.05$; Tukey, $p \leq 0.05$).

6.3.1.2. Efecto del tiempo de incubación a 30°C.

Como previamente se observó (Tabla 4, Figuras 8 y 9), para producir un efecto positivo en presencia del tratamiento de fosforilación sobre la actividad ramificadora, es necesario aplicar una preincubación a 30°C, que de acuerdo a la Figura 10, para alcanzar su límite requiere una duración de 30 minutos, a partir de los cuales el efecto se vuelve constante. En los extractos cultivados en condiciones ideales (Pi+), la actividad además de resultar más alta, mostró un aumento transitorio aun sin presencia de nucleótido hasta los 10 minutos de incubación (Figura 10A), efecto que apenas se percibe en el correspondiente de los extractos Pi- (Figura 10B).

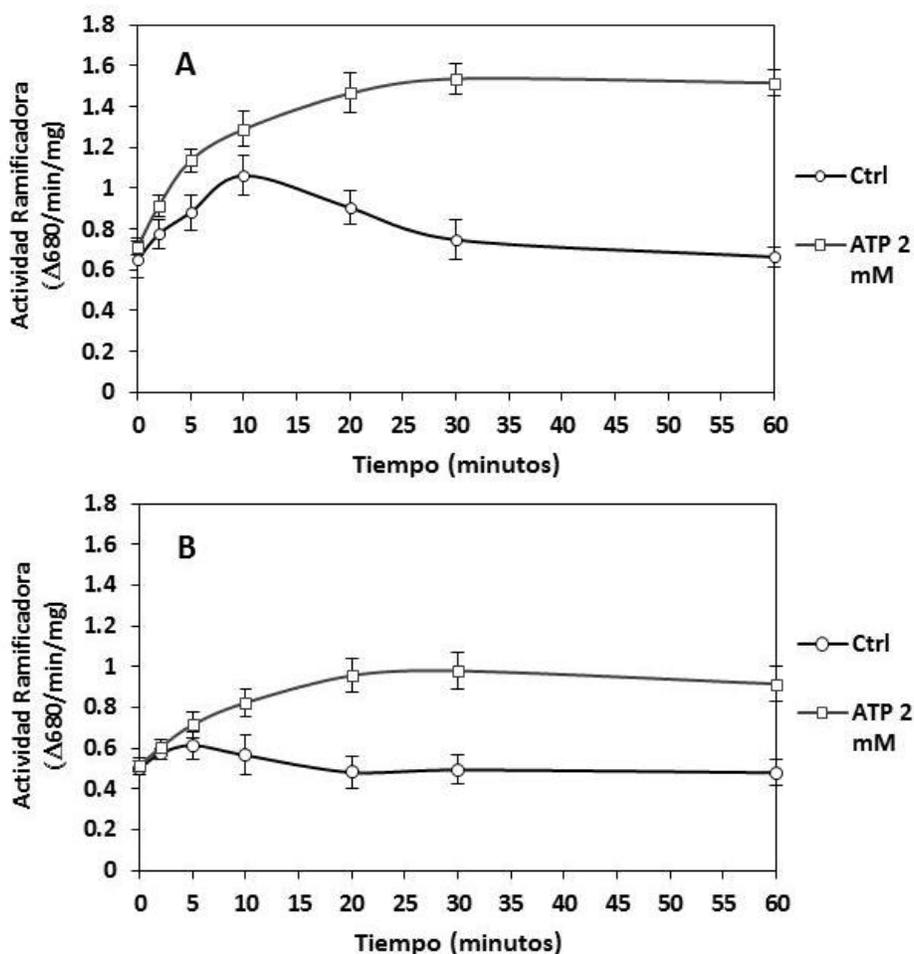


Figura 10. Curva temporal de actividad de las enzimas ramificadoras después de la preincubación a 30°C de extractos de embriones de 20 DDA provenientes de plantas cultivadas en condiciones adecuadas (A, Pi+) y de deficiencia de fósforo (B, Pi-) en ausencia (Ctrl) y en presencia de 2 mM ATP-6 mM MgCl₂. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones ± desviación estándar (SD).

Los resultados sugieren que las enzimas ramificadoras presentan cierto grado de termoestabilidad (hasta 10 minutos a 30°C), la cual se incrementa considerablemente junto con la actividad en presencia del tratamiento de fosforilación con ATP, en un proceso dependiente de la temperatura que mantuvo estable la actividad de las enzimas ramificadoras incluso hasta después de 1 hora de preincubación a 30°C. La deficiencia de fósforo influyó disminuyendo los valores de actividad ramificadora como ya se había observado (Figuras 7, 8 y 9) pero no afectó el efecto estabilizador en presencia del tratamiento de fosforilación. A partir de este resultado, los análisis del estado de fosforilación se realizaron determinando la actividad ramificadora después de una preincubación durante 30 minutos a 30°C en presencia de 2 mM ATP, 6 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas y fosfatasas.

6.3.1.3. Efecto del desarrollo, de la deficiencia de fósforo y del grado de fosforilación sobre la actividad y regulación de la enzima ramificadora.

Al medir la actividad ramificadora durante el desarrollo a 25°C con el ensayo de tinción con yodo, después de la preincubación durante 30 minutos a 30°C en condiciones control, en presencia del tratamiento de fosforilación con 2 mM de ATP o del tratamiento de desfosforilación con 8.264 U/mL de fosfatasa alcalina; se observó que estas condiciones tienen un efecto mínimo en la actividad (Figura 11).

Las únicas excepciones son el extracto de 20 DDA preparado con embriones de plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi⁺), donde la presencia de ATP produce un pequeño incremento significativo sobre la actividad (Figura 11A), mientras que en las plantas cultivadas en deficiencia de fósforo (Pi⁻), los extractos de 25 y 30 DDA son un poco más susceptibles al tratamiento con fosfatasa alcalina (Figura 11B). La distinta respuesta entre los extractos Pi⁺ y Pi⁻, corroboró el hecho de que las isoformas presentes y las asociaciones que se producen entre ellas son diferentes, por lo tanto mostraron características y mecanismos de regulación diferentes (Sección 2.5), lo que sustentaría las bases de las diferencias de la actividad ramificadora durante el desarrollo de las semillas de frijol (Figuras 7 y 11).

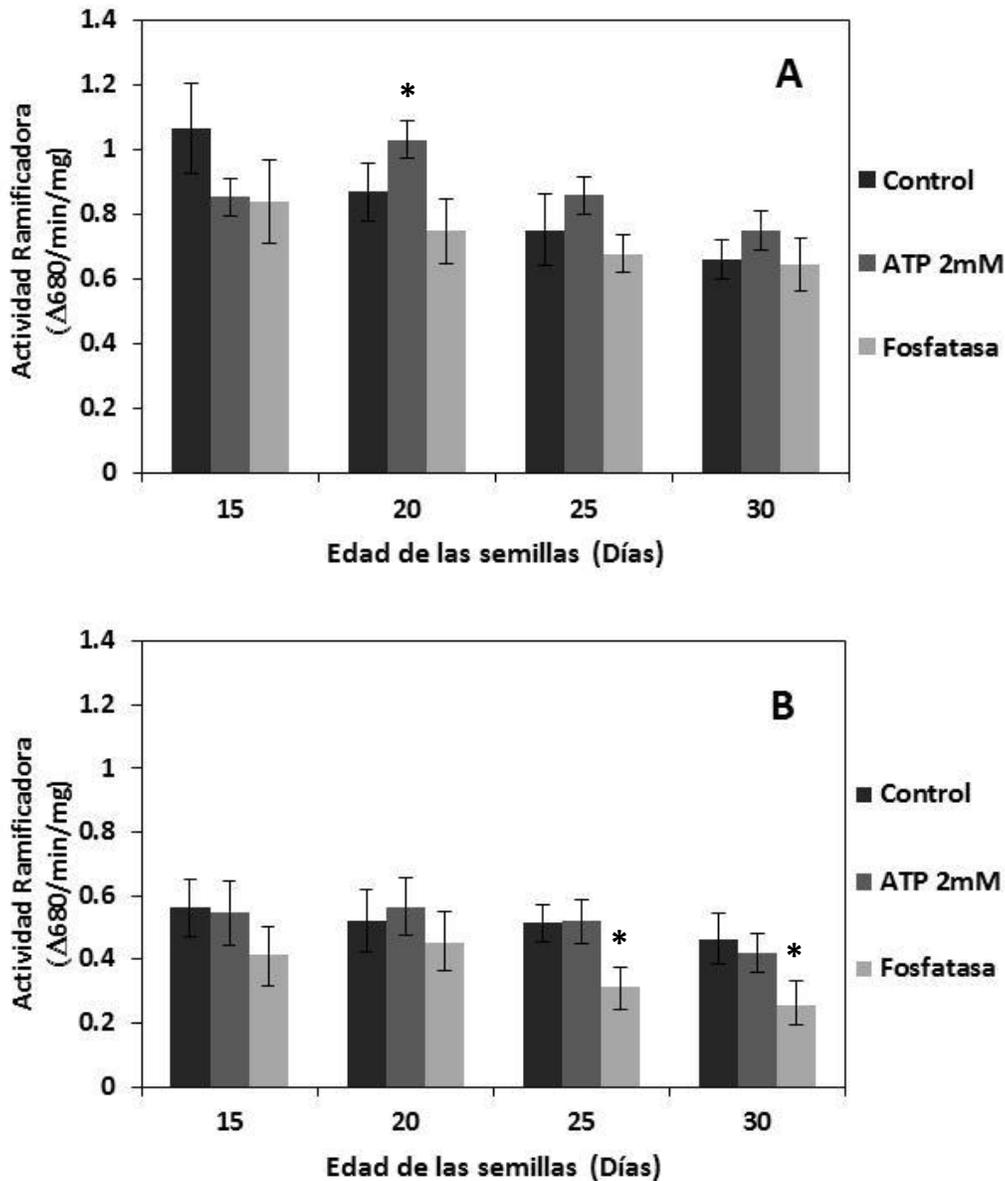


Figura 11. Efecto de la disponibilidad de fósforo y el estado de fosforilación sobre la actividad ramificadora durante el desarrollo de embriones de frijol de plantas cultivadas en condiciones adecuadas (A, Pi+) y de deficiencia de fósforo (B, Pi-). Después de 30 minutos de preincubación a 30°C en condiciones Control ó en presencia de 2 mM de ATP ó en presencia de 8.264 U/mL de fosfatasa alcalina; se determinó la actividad ramificadora con el ensayo de tinción con yodo empleando 20 µg de extracto proteico desalado con 10 minutos de incubación a 25°C. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 12 repeticiones ± desviación estándar (SD).

* Diferencia significativa respecto al control (Bonferroni, $p \leq 0.05$; Tukey, $p \leq 0.05$).

A partir de este resultado, los siguientes experimentos se realizaron con extractos provenientes de embriones de 20 DDA, considerando además la alta actividad ramificadora que presentan puesto que la máxima acumulación de almidón se alcanza entre los 12 y 24 DDA durante el “llenado del grano” (Sección 2.1.2) y la facilidad para obtener los extractos proteicos desalados de esta edad, puesto que embriones de 15 DDA requieren mayor cantidad de tejido debido a su tamaño y embriones de 25 DDA presentan menor actividad ramificadora (Figuras 7 y 11A).

6.3.2. Papel de la cinasa SnRK1 en la fosforilación de las enzimas ramificadoras.

Dado el efecto positivo del ATP sobre la actividad de la enzima ramificadora (Figuras 8, 9, 10 y 11A, Tabla 4) y la presencia de un sitio en la isoenzima II de frijol (PvSBE2), que por similitud con la secuencia consenso de reconocimiento de SnRK1 podría ser fosforilado por ésta (Figura 5, Sección 2.5), se investigó la fosforilación de las enzimas ramificadoras P_i^+ y P_i^- por la cinasa SnRK1. En la Figura 12, se muestra la actividad ramificadora de extractos de 20 DDA, una fracción enriquecida con alta actividad de SnRK1 y la mezcla de ambos después de ser preincubados por 30 minutos a 30°C con y 2 mM de ATP. La actividad resultante de mezclar los extractos con la fracción enriquecida en SnRK1 (C+E), es menor a la suma de las actividades presentes en las fracciones separadas (C) y (E) en ambas condiciones de cultivo.

Los resultados muestran la probabilidad de que si SnRK1 fuese capaz de fosforilar a las enzimas ramificadoras, dicha modificación tendría un efecto negativo sobre su actividad. Será necesario hacer experimentos más detallados para caracterizar este efecto, que es modesto pero reproducible. Sin embargo con esto no puede descartarse a SnRK1 como la cinasa determinante en la actividad de las enzimas ramificadoras, ya que este resultado sólo es aplicable en las condiciones del experimento (origen y edad de los extractos parcialmente purificados), de manera que pudieran existir asociaciones entre las enzimas que pudieran interferir con la fosforilación aunado a la determinación de la cantidad del extracto de cinasa necesario para producir un efecto positivo sobre la actividad (para este experimento se emplearon 37.61 y 43.65 μg de cinasa P_i^+ y P_i^- respectivamente); además es posible que las enzimas ramificadoras sean fosforiladas por más de una cinasa. Por su parte el efecto del citrato es evidente, al producir un aumento hasta del 50% sobre la actividad ramificadora, por lo que se diseñó un experimento posterior con el fin de establecer los límites del efecto observado.

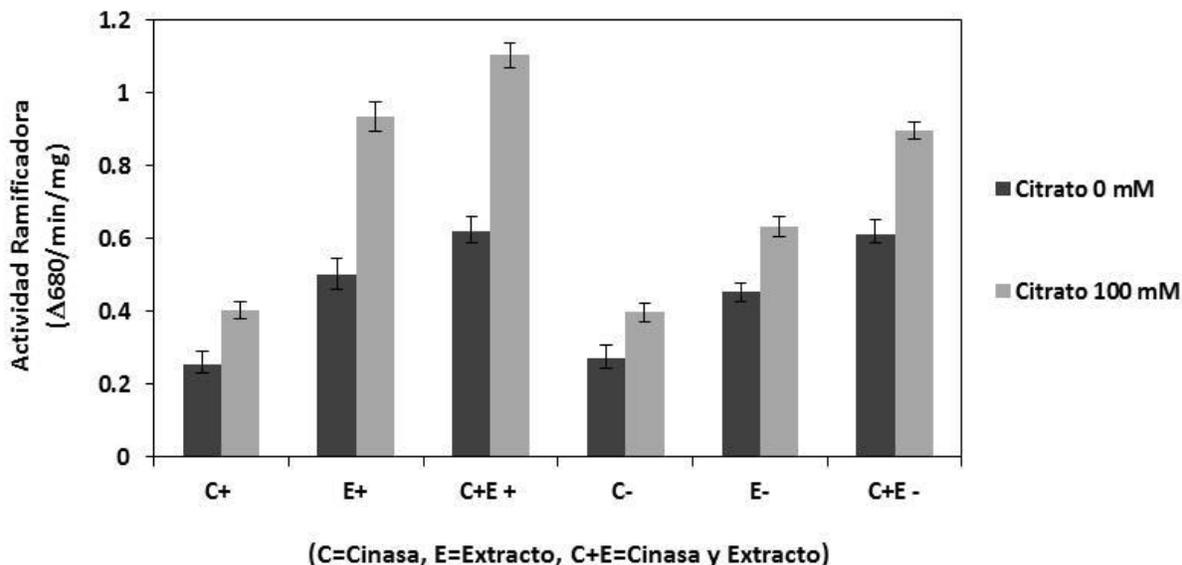


Figura 12. Efecto de la cinasa SnRK1 parcialmente purificada a partir de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (C+) y de deficiencia de Pi (C-), sobre la actividad ramificadora presente en extractos elaborados con los mismos materiales (E+ y E-) en presencia de 0 y 100 mM de citrato de sodio pH 7.0 después de preincubar a 30°C durante 30 minutos. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones \pm desviación estándar (SD).

6.3.3. Estudio de las propiedades cinéticas de las enzimas ramificadoras.

Los resultados de las cinéticas de saturación con amilosa de extractos provenientes de plantas cultivadas en condiciones ideales (Figura 13A) y de extractos provenientes de plantas cultivadas en condiciones de deficiencia severa (Figura 13B), muestran que las enzimas ramificadoras se inhiben por el sustrato a concentraciones mayores de 0.125 y 0.1 mg/ml de amilosa respectivamente, por lo que su cinética de saturación no se ajustó al modelo de Michaelis-Menten (Smyth, 1988), hecho que podría estar dado por la unión del sustrato a un sitio diferente del catalítico. Blennow (1991) excluyó la presencia de compuestos inhibidores de bajo peso molecular de la amilosa, realizando ensayos con 0.8 mg/ml de amilosa purificada, en los que se no afectó el grado de inhibición, lo que podría deberse a que la amilosa no es el único sustrato de la enzima, reportando que la inhibición por el sustrato se presenta cuando la concentración de amilosa sobrepasa los 0.25 mg/ml.

Una vez establecido el comportamiento cinético, se buscó determinar sobre éste el efecto del estado de fosforilación, realizando la cinética de saturación en las condiciones de fosforilación determinadas previamente y en condiciones de fosfatasa alcalina. En extractos proteicos desalados provenientes de plantas cultivadas en condiciones ideales (Figura 13A, Tabla 5), se observó un incremento en la actividad en presencia del tratamiento con ATP y una disminución con el tratamiento de fosfatasa alcalina. En condiciones control, la actividad ramificadora tuvo K_m de 0.0245 mg/ml y $V_{m\acute{a}x}$ de 0.5834 $\Delta 680/\text{min}/\text{mg}$. En presencia de 2 mM de ATP, $V_{m\acute{a}x}$ aumentó a 0.7096 $\Delta 680/\text{min}/\text{mg}$. Por su parte, el tratamiento con fosfatasa alcalina redujo el valor de $V_{m\acute{a}x}$ a 0.4050 $\Delta 680/\text{min}/\text{mg}$ e incrementó el de K_m a 0.0446 mg/ml. En los extractos proteicos desalados de embriones provenientes de plantas cultivadas en deficiencia de Pi^- (Figura 13B, Tabla 5), la presencia del tratamiento con ATP así como la inclusión de fosfatasa alcalina no tuvieron un efecto significativo sobre los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_m .

El incremento y disminución en la actividad observados en condiciones Pi^+ por el tratamiento con ATP y fosfatasa alcalina respectivamente, se atribuyeron predominantemente al aumento y disminución en $V_{m\acute{a}x}$ y no sobre K_m , por lo que la respuestas positiva y negativas están dadas por el aumento y disminución en la velocidad de catálisis, debido a una modificación en la actividad específica (Smyth, 1998), por lo que el efecto positivo del tratamiento con ATP podría deberse a una estabilización de la enzima en una forma activa de una manera análoga a la activación con cloruro de algunas α -amilasas, en donde se altera la velocidad máxima de reacción pero no la afinidad por el sustrato (Morell *et al.*, 1997). Sin embargo en los extractos provenientes de embriones de plantas cultivadas en condiciones de deficiencia severa, el estado de fosforilación no influyó sobre la cinética de saturación con amilosa, las diferencias entre las respuestas en cada condición de cultivo puede atribuirse a las distintas isoformas y asociaciones presentes en cada caso, en donde la formación y disociación de complejos podría alterar directamente las propiedades cinéticas de los componentes individuales del complejo a través de la inducción de cambios conformacionales y por lo tanto de la biosíntesis del almidón en general (Sehnke *et al.*, 2001; Hoover, 2002; Tetlow *et al.*, 2004b, 2010).

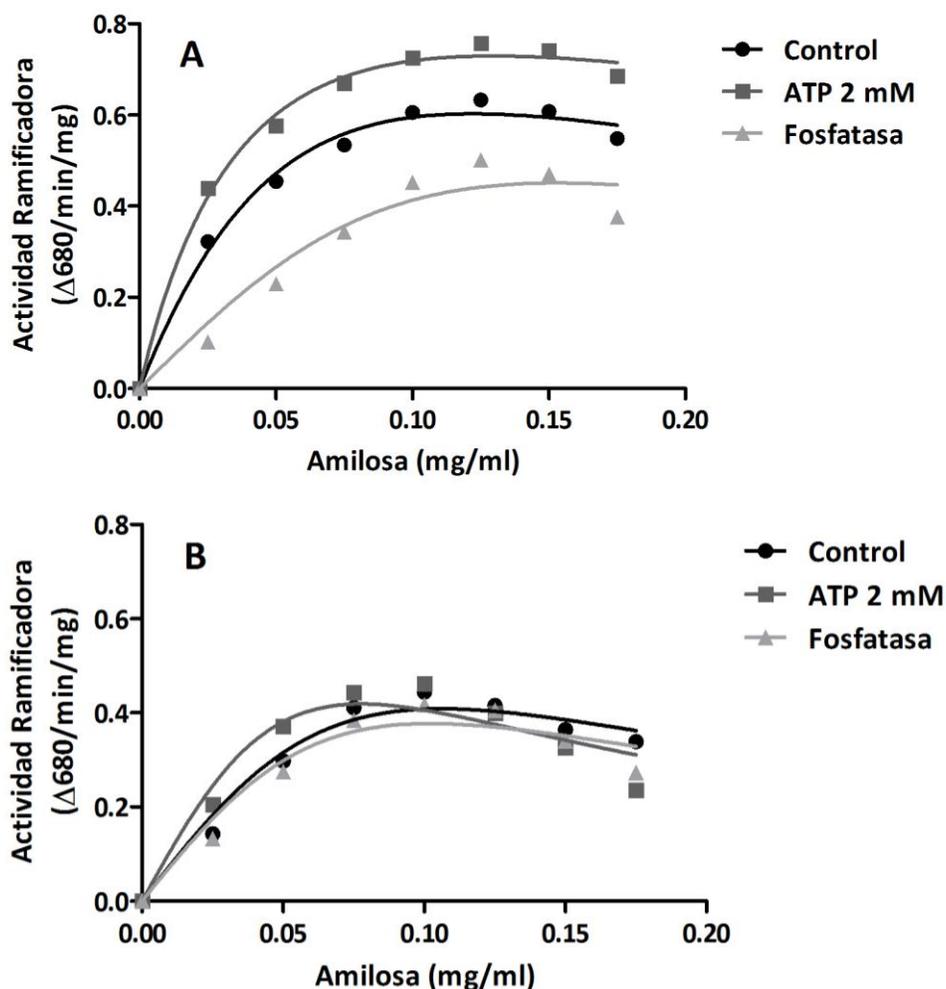


Figura 13. Cinética de saturación de actividad ramificadora de extractos provenientes de embriones de 20 DDA provenientes de plantas cultivadas en condiciones normales (Pi+, A) y de deficiencia de fósforo (Pi-, B). Las mediciones se hicieron después de preincubar durante 30 minutos a 30°C en condiciones estándar (Control) o agregando 2 mM ATP y 6 mM MgCl₂ para favorecer la fosforilación, así como incluyendo 8.264 U/mL de fosfatasa alcalina para eliminar el efecto de la misma. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones ± desviación estándar (SD).

Tabla 5. Parámetros cinéticos ± desviación estándar (SD) de las enzimas ramificadoras de los extractos proteicos desalados. Los cálculos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5.03, de acuerdo al ajuste del modelo de inhibición por sustrato con la ecuación $Y = V_{m\acute{a}x} * X / (K_m + X * (1 + X / K_i))$, donde Y corresponde a la actividad ramificadora en Δ680/min/mg y X a la cantidad de amilosa en mg/ml.

	Control (Pi+)	ATP 2 mM	Fosfatasa	Control (Pi-)	ATP 2 mM	Fosfatasa
K_m (mg/ml)	0.0245±0.01	0.0215±0.012	0.0446±0.018	0.0378±0.012	0.0288±0.009	0.0383±0.01
$V_{m\acute{a}x}$ (Δ680/min/mg)	0.5834±0.09	0.7096±0.062	0.4050±0.081	0.4067±0.073	0.3724±0.094	0.3843±0.05

6.3.4. Análisis del efecto de citrato sobre la actividad de la enzima ramificadora.

Previamente el estímulo en la actividad observado en presencia del citrato (Figura 12), se determinó el efecto de éste empleando concentraciones hasta de 400 mM en el ensayo de tinción con yodo puesto, probando además el efecto del estado de fosforilación a partir de los resultados previos (Figuras 8-11 y 13, Tablas 4 y 5). El efecto del citrato de sobre extractos preparados con embriones de 20 DDA provenientes de plantas cultivadas en condiciones donde el fósforo no fue limitante y donde sí lo fue se muestra en las Figura 14, en ambos casos la presencia de citrato estimuló la actividad.

En los extractos provenientes de plantas cultivadas en condiciones ideales (Figura 14A), se observó un efecto positivo inmediato del citrato (50 mM) que se extendió hasta los 400 mM, al aplicar el tratamiento con ATP, se alcanzó el mayor efecto sobre la actividad con sólo 100 mM mientras que en condiciones de fosfatasa el incremento resultó menor; por su parte los extractos provenientes de plantas cultivadas en condiciones de deficiencia severa (Figura 13B) mostraron un efecto menor del citrato hasta los 200 mM, mientras que los tratamientos con ATP y fosfatasa alcalina sólo produjeron un efecto positivo y negativo respectivamente, los cuales no se modificaron más allá de los 100 mM, por lo que no resultaron significativos para la actividad ramificadora. En condiciones control, el efecto de citrato parece estar mediado por la participación de 2 componentes: uno que se satura con 100 mM y otro responsable del aumento gradual de la actividad a concentraciones de hasta 400 mM. Tanto la presencia de los tratamientos con ATP como el de fosfatasa alcalina, eliminan el segundo componente y ambos alcanzan el valor máximo con 100 mM de citrato, el cual es significativamente superior en los extractos a los que se agregó ATP que en aquellos que se trataron con fosfatasa alcalina.

En este caso las respuestas obtenidas también reflejan las distintas isoformas y asociaciones que deben estar presentes en cada condición de cultivo puesto que no todas las isoformas responden de la misma manera, ya que se ha observado una máxima activación en concentraciones de 300 mM en la isoforma rPvSBE2 pero ningún efecto sobre la isoforma rPvSBE1 (Tabla 1), sin embargo la concentración mínima de citrato para producir un efecto positivo (100 mM) no parece ser una concentración fisiológica del interior de amiloplastos o cloroplastos en donde se lleva a cabo la síntesis de almidón, por lo que es probable que el papel de esta activación solo sea *in vitro*.

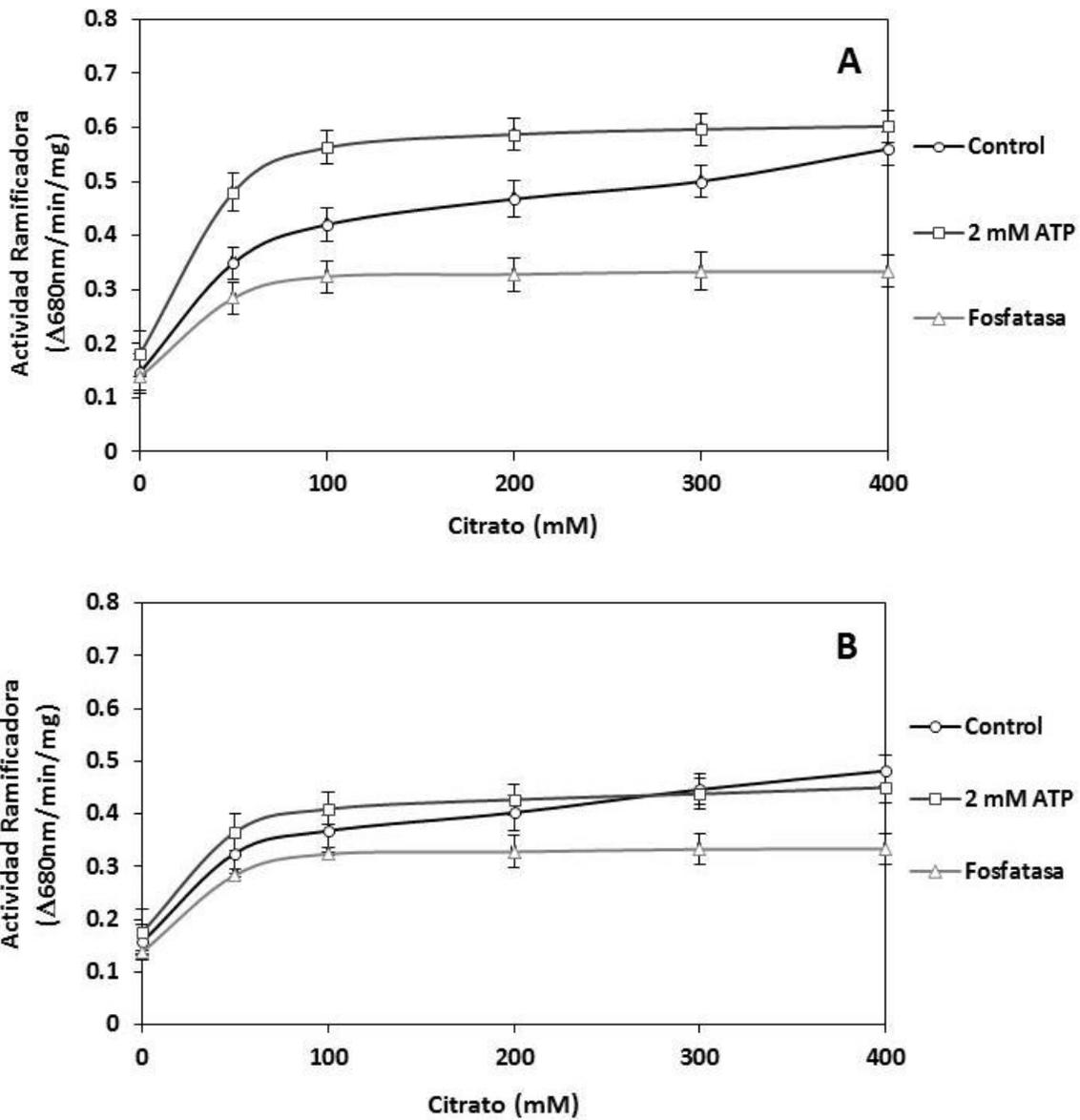


Figura 14. Efecto del citrato de sodio pH 7.0 sobre la actividad de las enzimas ramificadoras de extractos elaborados con embriones de 20 DDA provenientes de plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+, A) y en deficiencia de fósforo (Pi-, B). Las mediciones se hicieron después de preincubar a 30°C durante 30 minutos en condiciones Control, así como en presencia de 2 mM de ATP y 8.264 U/mL de fosfatasa alcalina (FA). Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones ± desviación estándar (SD).

6.4 Análisis de la actividad de las enzimas ramificadoras en geles nativos.

La actividad de la enzima ramificadora también puede ser analizada en geles nativos (Nozaki *et al.*, 2001). Como puede apreciarse en la Figura 15, usando amilosa como sustrato, el método usado permite visualizar 2 bandas, las cuales se vuelven más intensas conforme avanza el desarrollo de los embriones. En comparación, el efecto de la disponibilidad de fósforo muestra un patrón similar conformado por dos bandas principales que se mantienen durante el desarrollo salvo a los 25 DDA Pi-, en que se observa una modificación relevante en la actividad.

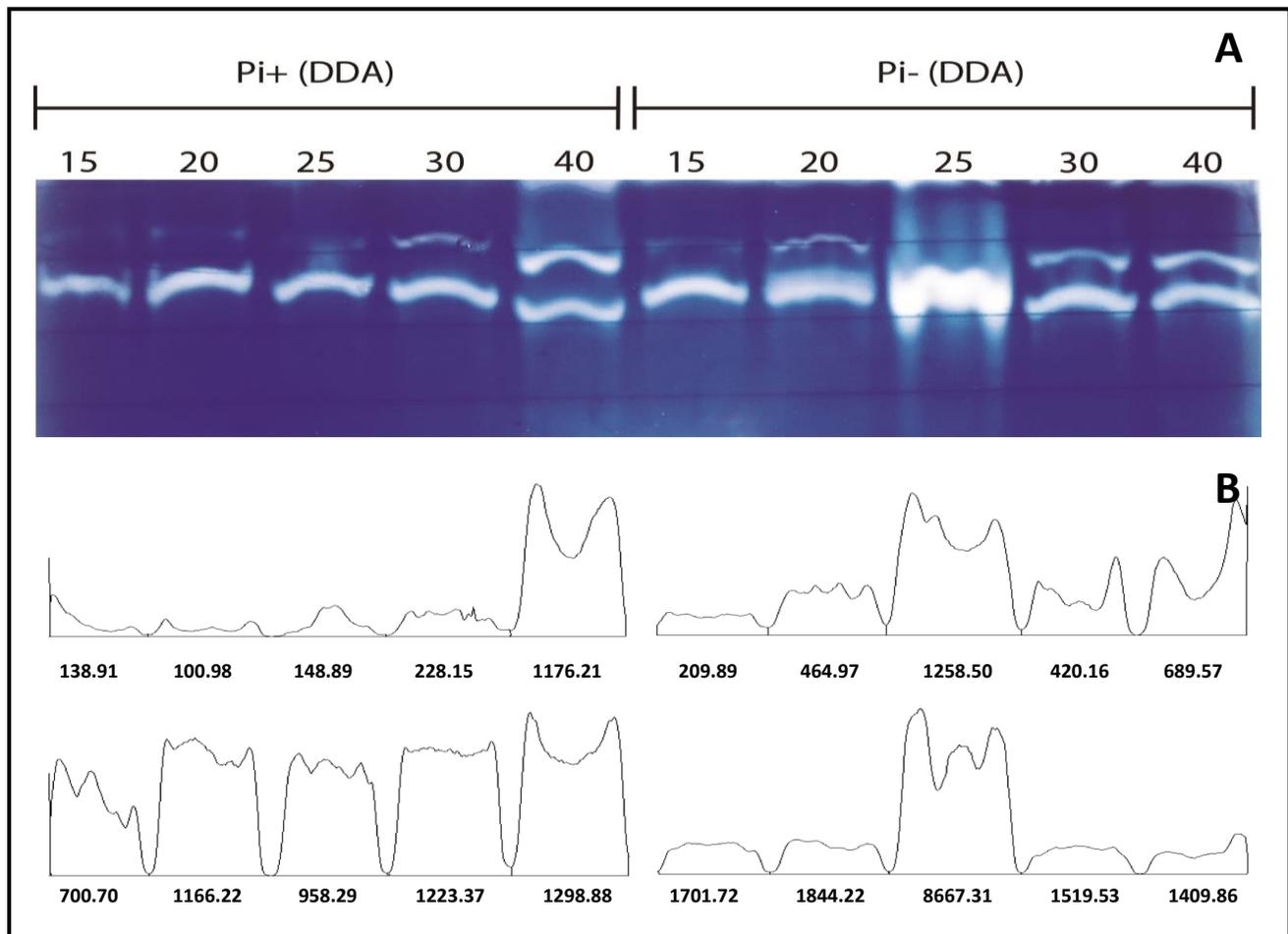


Figura 15. A. Efecto del desarrollo y de la disponibilidad de fósforo sobre la actividad ramificadora durante el desarrollo de embriones de frijol en geles nativos de actividad. En cada carril se cargaron 15 μ g de extracto proteico desalado de la edad correspondiente. B. Análisis de densitometría en las posiciones correspondientes a las bandas observadas en el gel. Los valores debajo de los gráficos indican el área bajo las curvas de cada pico, correspondientes a la intensidad de las bandas.

El efecto de la preincubación durante 30 minutos a 30°C en presencia de 2 mM ATP o ADP o AMP, 6 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas y fosfatasa, sobre las enzimas ramificadoras presentes en extractos de 20 DDA Pi⁺ y Pi⁻, también se analizó en geles nativos. En la parte A de la Figura 16, como previamente se observó (Figuras 8 y 9), se aprecia el efecto positivo en presencia de los nucleótidos cuando la actividad se ensaya en solución. Sin embargo, en el gel (panel B) el resultado es completamente diferente, ya que la intensidad de las bandas de actividad disminuye de manera importante. Algo similar sucede con los extractos de embriones producidos por plantas cultivadas en deficiencia de fósforo (Figura 16C y 16D).

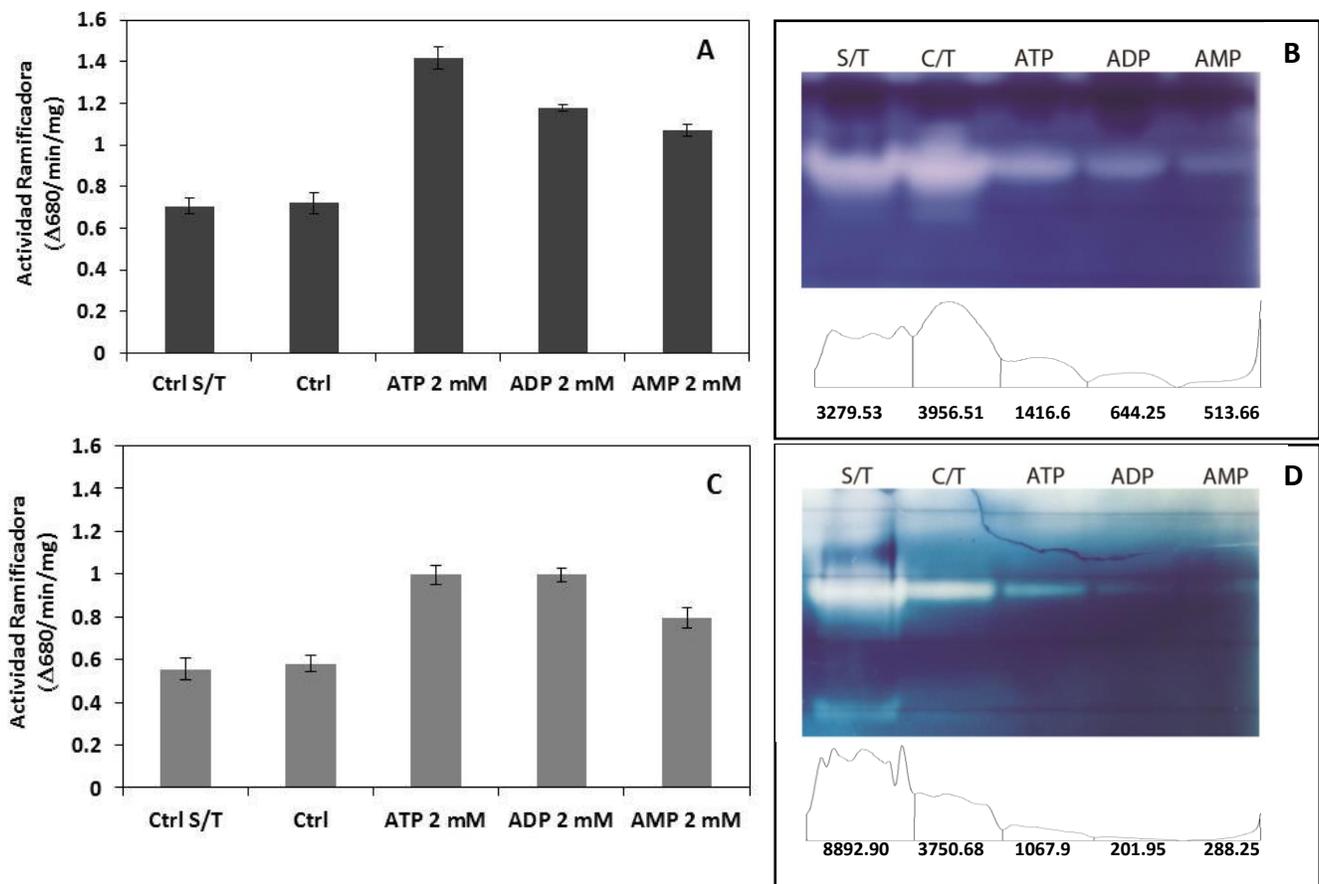


Figura 16. Efecto de la preincubación durante 30 minutos a 30°C en presencia de 2 mM ATP o ADP o AMP, 6 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas y fosfatasa. La actividad ramificadora de extractos desalados elaborados con embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (A, B) y en deficiencia de fósforo (C, D), se midió en solución (A, C) y en geles nativos, empleando 15 μg de extracto por carril (B y D), con los análisis de densitometría correspondientes con los valores del área bajo la curva. Ctrl (S/T) corresponde al extracto proteico desalado sin preincubación y Ctrl (C/T) al extracto con sólo la preincubación durante 30 minutos a 30°C. Los resultados graficados corresponden al promedio de 6 repeticiones ± desviación estándar (SD).

6.5 Purificación de las enzimas con actividad ramificadora.

6.5.1. Efecto de la temperatura.

Se ha reportado que la temperatura óptima para la actividad de las enzimas ramificadoras se encuentra en el rango de 25 a 30°C, sin embargo se ha observado que la actividad puede mantenerse hasta los 40°C (Nozaki *et al.*, 2001), por lo que demostrado el efecto positivo sobre la actividad ramificadora previamente después de la preincubación a 30°C en presencia del tratamiento de fosforilación con ATP (Figuras 8-14, 16A y 16C, Tablas 4 y 5), se investigó hasta que temperatura resultaba posible alcanzar el límite de temperatura del efecto observado en la Figura 10. En la Figura 16 se observó que en condiciones control, la actividad comenzó a inhibirse después de la preincubación a partir de los 30°C, mientras que en presencia del tratamiento con 2 mM ATP-6 mM MgCl₂, se presentó efecto positivo sobre la actividad ramificadora, la cual se mantuvo estable incluso hasta después de preincubar durante 20 minutos a 70°C, un proceso que aunque resultó independiente de la condición de cultivo, resultó más eficiente sobre extractos provenientes de plantas cultivadas en condiciones ideales (Figura 16A) que en aquellos provenientes de plantas cultivadas en condiciones de deficiencia severa (Figura 16B); sugiriendo un efecto protector y de modulación importante sobre la actividad ramificadora, sobre algunas de las isoenzimas presentes en los extractos proteicos desalados.

De acuerdo con este resultado, el calentamiento (preincubación) a 70°C durante 20 minutos en presencia del tratamiento con ATP que produjo la precipitación de muchas de las proteínas presentes en el extracto original, se decidió emplear como estrategia para intentar la purificación de las enzimas con actividad ramificadora, aunado al hecho de que se ha reportado que la isoforma II de frijol (PvSBE2) retiene más del 80% de la actividad original después de calentarla durante 15 minutos a 50°C (Hamada *et al.*, 2007).

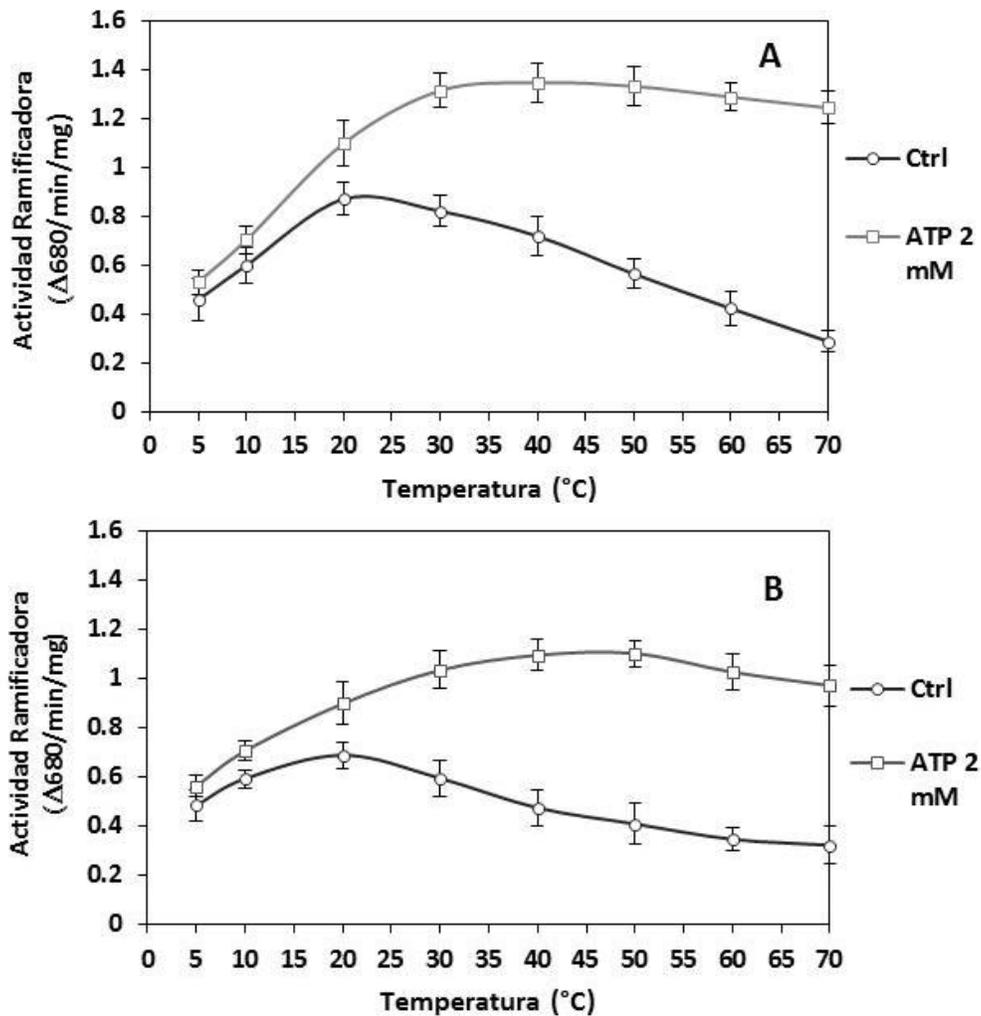


Figura 17. Efecto de la temperatura. Extractos elaborados con embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+, A) y de deficiencia de fósforo (Pi-, B) se calentaron 20 minutos a las temperaturas indicadas en ausencia de ATP (Ctrl) y en presencia de 2 mM-6 mM MgCl₂. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones ± desviación estándar (SD).

6.5.2. Efecto de la presencia de iones sobre la termoestabilidad de la enzima ramificadora.

Si bien la propiedad que permitió estabilizar de la inactivación por calor a las isoformas con actividad ramificadora de los extractos de embriones de 20 DDA parece depender del tratamiento de fosforilación con ATP como previamente se observó (Figura 17), el uso del mismo va acompañado de una concentración de MgCl₂ 1.5 veces superior, se diseñó un experimento para analizar si la presencia o ausencia de cationes divalentes podrían influir sobre este

comportamiento, con el fin de determinar si el efecto estabilizador se debe a la presencia de ATP, $MgCl_2$ o $CaCl_2$, evaluando su efecto por separado así como EDTA y EGTA que remueven los iones metálicos.

Los resultados (Figura 18) mostraron que independientemente de la condición de cultivo, 6 mM $MgCl_2$ son suficientes para estabilizar la actividad de las enzimas ramificadoras cuando el extracto crudo se preincuba a $70^\circ C$ durante 20 minutos, descartando la necesidad de la presencia del ATP para el efecto observado de la Figura 17. $CaCl_2$ fue menos efectivo, ya que en su presencia la actividad resultó menor a la del extracto crudo después de la preincubación, desapareciendo el efecto estabilizador (protector), de la misma manera que cuando se realizó la preincubación en presencia de EDTA o EGTA.

En el caso de los extractos provenientes de plantas cultivadas en condiciones ideales (Figura 18A), la presencia del magnesio (EC + $MgCl_2$) permite retener hasta un 80% de la actividad original después de preincubar 20 minutos a $70^\circ C$, lo que sugiere que el efecto de activación observado en presencia del complejo ATP-Mg (Tabla 4, Figuras 8-10, 11A, 13A, 14A, 16A, 16C y 17) se debe principalmente a este último; lo cual puede confirmarse al medir la actividad en presencia del complejo ATP-Mg (EC + ATP), en donde se observa que la actividad se mantiene incluso hasta un 90% de la inicial, mostrando el menor pero constante efecto positivo en la actividad ramificadora en presencia de nucleótidos, mismo al que resultaron más susceptibles las enzimas de los extractos Pi^+ (Figura 8A) y que puede confirmarse en la Figura 18B, en donde se observa que los extractos provenientes de plantas cultivadas en condiciones de deficiencia severa (Pi^-), además de presentar menores niveles de actividad, muestran protección total después del tratamiento con calor a $70^\circ C$ durante 20 minutos con sólo la presencia del Mg (EC + $MgCl_2$), ya que en presencia del complejo ATP-Mg (EC + ATP) el resultado es similar, descartando cualquier efecto del ATP sobre los extractos Pi^- .

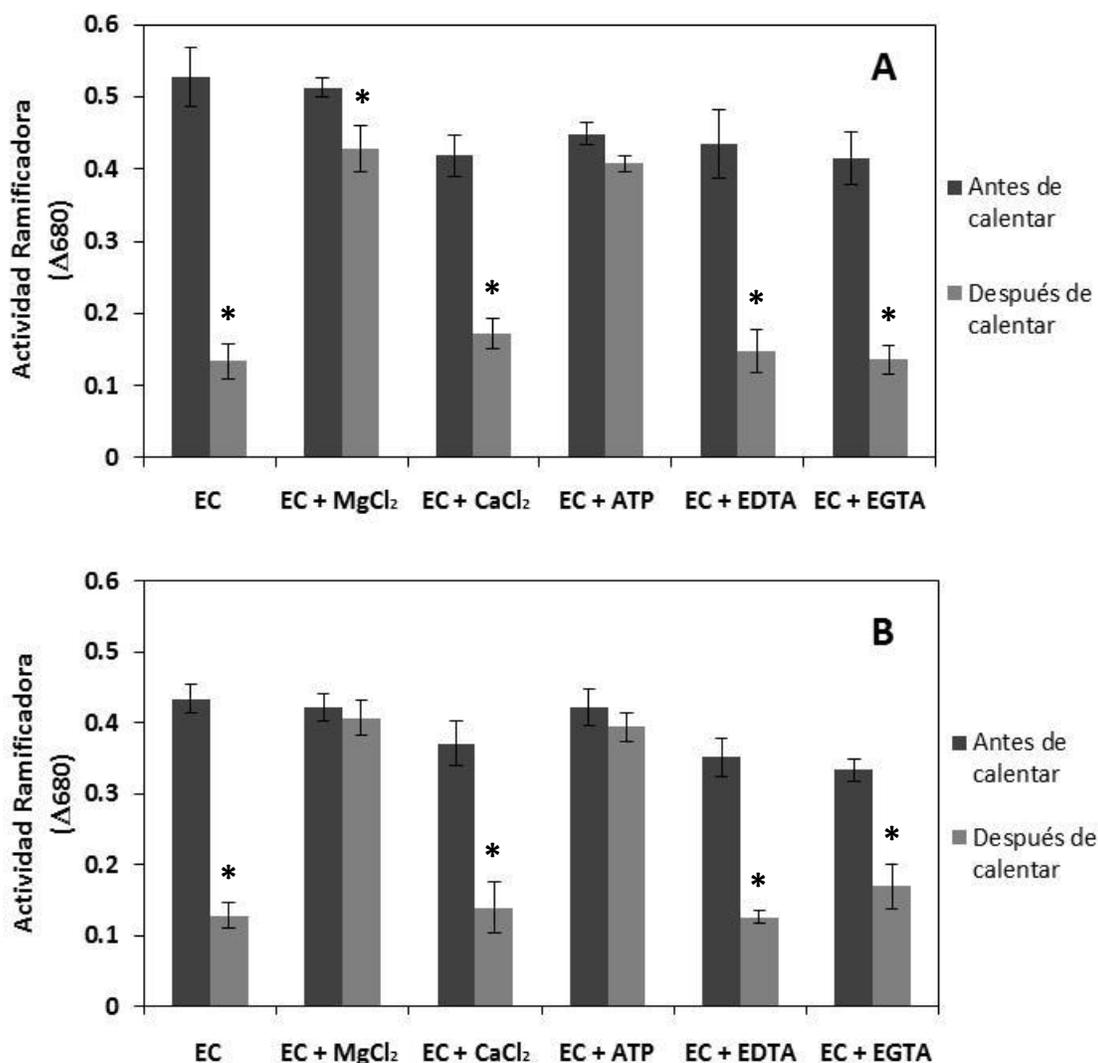


Figura 18. Actividad ramificadora en extractos de embriones de 20 DDA producidos en condiciones adecuadas (A, Pi+) y de deficiencia de fósforo (B, Pi-) en presencia de 6 mM de MgCl₂, CaCl₂, ATP-Mg (2 mM y 6 mM respectivamente), EDTA y EGTA, después de aplicar el tratamiento de 20 minutos a 70°C. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones ± desviación estándar (SD). * Diferencia significativa respecto al control (Bonferroni, p≤0.05; Tukey, p≤0.05).

6.5.3. Purificación de la enzima ramificadora.

El esquema inicial de purificación (datos no mostrados) aprovechó el efecto estabilizador de la actividad ramificadora previamente demostrado (Figura 18) en presencia de 6 mM MgCl₂ durante la preincubación a 70°C durante 20 minutos. El extracto con las isoformas termoestables se pasó por cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sefarosa, anión fuerte), hallándose en el perfil de

elusión una región de concentración de la actividad en los extractos Pi+ y dos regiones (picos) de actividad mayor en los extractos Pi- eluidos entre los 50-100 mM de NaCl. Posteriormente se decidió resolver las fracciones reunidas por cromatografía de filtración molecular (Sephacryl S-300), sin embargo dado el pequeño volumen necesario para lograr una separación eficiente con este método, se concentró la proteína probando Polyethylene glycol por desecación, Sulfato de amonio y Acetona. La proteína concentrada se recuperó en el rango de fracciones correspondientes a proteínas mayores a los 350 kDa, lo que sugería que las isoformas termoestables purificadas se encontraban asociadas en un complejo; sin embargo este método no resultó adecuado, puesto que durante la precipitación se perdía proteína y actividad sin lograr una concentración adecuada, mientras que las fracciones de actividad de Sephacryl-S300 contuvieron muy poca proteína de manera que no resultó posible visualizarlas en un gel.

La estandarización en la purificación se alcanzó con el calentamiento del extracto crudo por 20 minutos a 70°C en presencia de 6 mM MgCl₂. Las proteínas del sobrenadante se fraccionaron por intercambio aniónico (Q-Sefarosa) y las fracciones de mayor actividad reunidas (22-31) se concentraron con 1 M de Sulfato de amonio y se resolvieron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (Fenil Sefarosa), eluyendo la proteína con un gradiente negativo 1 a 0 M de Sulfato de amonio para desalar la mayor cantidad de proteína posible, de modo que pudiera cuantificarse y medirse la actividad en las fracciones eluidas sin sal. Posteriormente las fracciones de mayor actividad colectadas en 12 ml, se precipitaron con 1.5 volúmenes de acetona para su concentración, de modo que fuera posible su carga a una columna de cromatografía de exclusión por tamaño más precisa (Superdex 200), permitiendo obtener varias fracciones con actividad ramificadora con la cantidad suficiente de proteína para su visualización en el gel de la Figura 19. Las fracciones de mayor actividad correspondieron a un peso molecular de 113, 579 Da y 63, 860 Da para las enzimas purificadas de embriones Pi+ y Pi-, respectivamente.

Las Tablas 6 y 7 muestran los resultados del proceso de purificación de las isoformas termoestables provenientes de extractos de embriones de semillas de 20 DDA producidas por plantas cultivadas en condiciones normales (Pi+) y en deficiencia de fósforo (Pi-), respectivamente. En ambos casos, este procedimiento permitió una purificación de 90 veces.

Tabla 6. Purificación de las isoformas termoestables de la enzima ramificadora a partir de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+). EC = extracto crudo, 70°C = calentamiento a 70°C durante 20 minutos.

Procedim.	Volumen (ml)	Proteína $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$	Activ. Ramificadora $\Delta 680/\text{min}/\text{mg}^1$	Proteína Total (mg) ²	Actividad Total $\Delta 680/\text{min}^3$	Actividad Específica ⁴	Veces de Purificación ⁵
EC	23	10.14	12.25	23.23	284.74	0.52	1
70°C	23	5.44	17.34	12.51	217.12	1.38	2.62
Q-Sefarosa	30	2.33	39.56	7.0	277.2	5.64	10.70
Fenil-Sefarosa	12	0.74	42.54	0.89	37.74	46.85	88.80
Superdex-200	18	0.56	48.12	1.01	48.73	47.51	90.05

Tabla 7. Purificación de las isoformas termoestables de la enzima ramificadora a partir de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en deficiencia de fósforo (Pi-). EC = extracto crudo, 70°C = calentamiento a 70°C durante 20 minutos.

Procedim.	Volumen (ml)	Proteína $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$	Activ. Ramificadora $\Delta 680/\text{min}/\text{mg}^1$	Proteína Total (mg) ²	Actividad Total $\Delta 680/\text{min}^3$	Actividad Específica ⁴	Veces de Purificación ⁵
EC	20	12.31	7.6	24.62	187.2	0.30	1
70°C	20	5.0	9.14	10.0	91.6	0.91	2.95
Q-Sefarosa	33	2.81	24.15	9.29	224.4	2.60	8.42
Fenil-Sefarosa	14	0.75	27.95	1.05	29.47	26.51	85.89
Superdex-200	20	0.63	38.23	1.26	48.5	30.14	97.62

1 = En este caso, la actividad se calculó con sólo 5 μg de extracto para no sobrestimar los valores.

2 = Volumen (ml) x Proteína ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$)

3 = Actividad ramificadora ($\Delta 680/\text{min}/\text{mg}$) x Proteína Total (mg)

4 = Actividad ramificadora ($\Delta 680/\text{min}/\text{mg}$) / Proteína Total (mg)

5 = 0.52 / Actividad Específica (Pi+); 0.30 / Actividad Específica (Pi-)

En el gel de la Figura 19 se puede apreciar que el grado de purificación de las enzimas Pi+ resultó mas eficiente que el de las provenientes de extractos Pi-, ya que se observó que en las fracciones con mayor actividad ramificadora de Superdex-200 (Pi+ Sd) están presentes dos bandas, una principal de 78.08 kDa y una de menor intensidad de 66.14 kDa; mientras que en las fracciones de Superdex-200 Pi- (Pi- Sd) se observa la presencia de cuatro bandas, distribuidas en dos principales de 60.87 y 64.71 kDa y dos de menor intensidad de 86.62 y 145.51 kDa.

La presencia de varias bandas en los extractos puros muestran que las enzimas purificadas refuerza la idea de que las isoformas purificadas se encuentran asociadas en complejos de dos o más proteínas cuyos posibles componentes se muestran en el gel, los cuales son distintos de

acuerdo a la condición de cultivo de los extractos, lo cual sugiere la presencia de varias isoenzimas con actividad ramificadora; aunque también cabe la posibilidad de que algunas de las bandas correspondan a enzimas que pudieran no estar relacionadas con el metabolismo del almidón, pero cuyas características similares a aquellas con actividad ramificadora les permitió llegar hasta este punto del proceso de purificación.

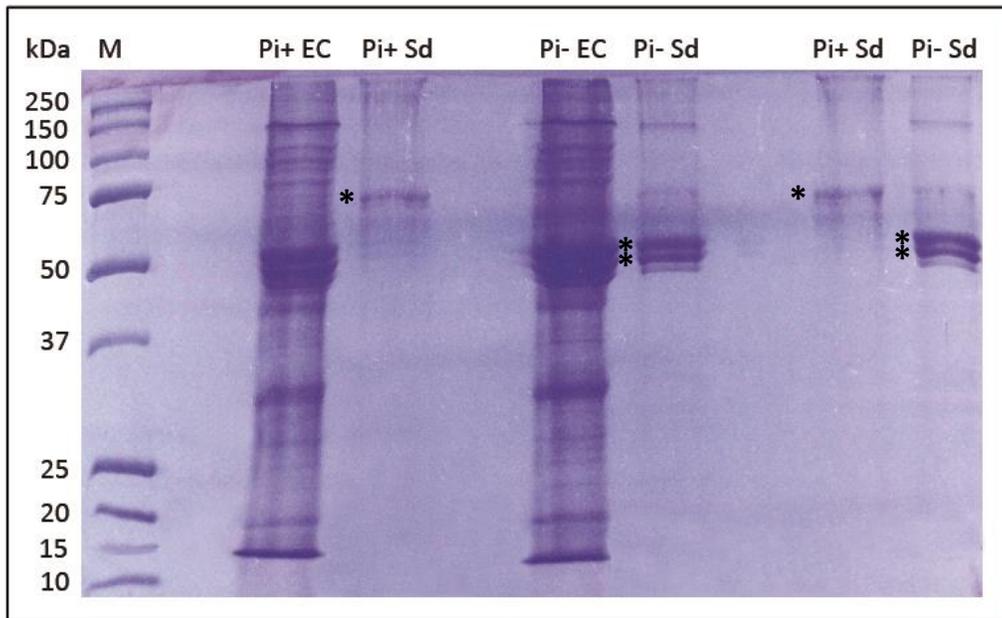


Figura 19. Electroforesis desnaturalizante de las isoformas termoestables purificadas. M = marcadores de peso molecular; Pi+ EC y Pi- EC = extracto crudo de embriones de 20 DDA (20 μ g); Pi+ Sd y Pi- Sd = isoenzimas purificadas obtenidas de Superdex-200 (20 μ g).

* Bandas denominadas principales de 78.08 kDa y 60.87-64.71 kDa en las enzimas purificadas Pi+ y Pi-, respectivamente.

6.6 Caracterización de las isoformas termoestables purificadas.

Se analizó el comportamiento de las enzimas con actividad ramificadora purificadas mediante su caracterización, probando el efecto de los mecanismos de regulación como se realizó previamente en los extractos proteicos desalados.

6.6.1. Efecto del Citrato.

La Figura 20 muestra que la respuesta de las isoformas purificadas al agregar diferentes concentraciones de citrato en el ensayo de tinción con yodo, sigue el mismo patrón que el de los extractos desalados (Figura 14). Los resultados muestran que el citrato es un activador importante de la actividad ramificadora. En ambas condiciones de cultivo, la actividad se incrementa linealmente hasta 100 mM, en las isoformas purificadas de plantas cultivadas en condiciones ideales se presentó un incremento adicional aunque pequeño hasta 0.3 M; por su parte las isoformas purificadas de plantas cultivadas en condiciones de deficiencia mostraron un efecto menor del citrato hasta los 100 mM con un incremento posterior menor; concentraciones a partir de las cuales el efecto se volvió constante, reflejando las características de las isoformas de cada condición que se observan en el gel de la Figura 19.

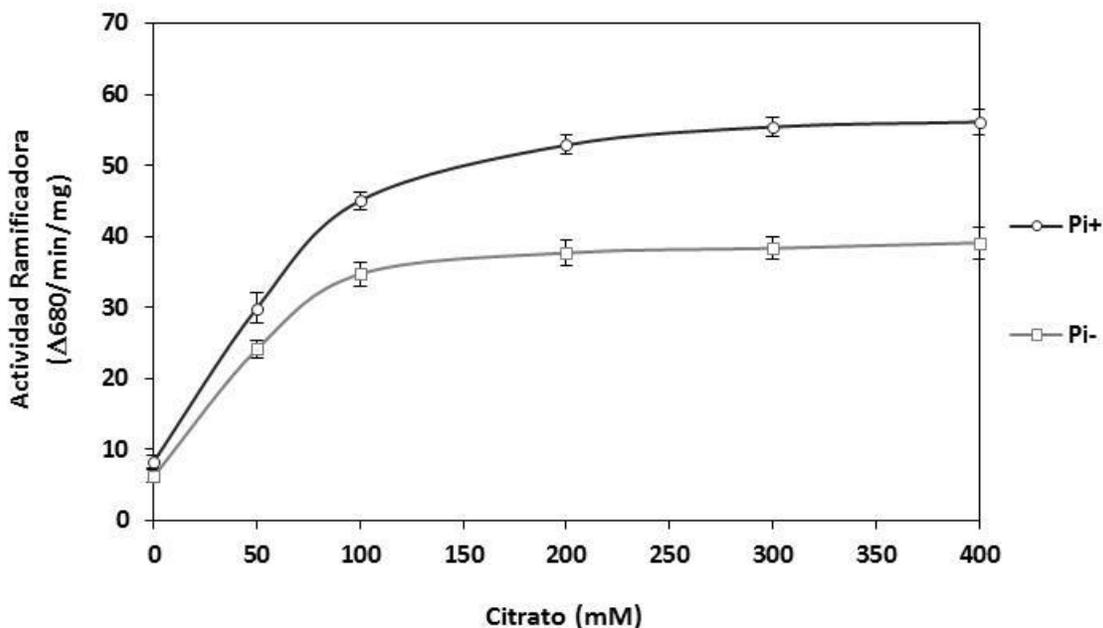


Figura 20. Efecto de la concentración de citrato en el ensayo de tinción con yodo, sobre la actividad de la enzima ramificadora purificada a partir de extractos de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+) o en deficiencia de fósforo (Pi-). Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones \pm desviación estándar (SD).

6.6.2. Propiedades cinéticas.

El comportamiento cinético de las isoformas purificadas también fue analizado. En la figura 21A y Tabla 8 se presentan los resultados con amilosa, mientras que los obtenidos con amilopectina, que también actúa como sustrato de las enzimas ramificadoras (Hamada *et al.*, 2002; 2007) se presentan en la figura 21B y Tabla 8. Independientemente de la condición de cultivo, las enzimas purificadas presentan el doble de afinidad hacia la amilosa respecto de la amilopectina, sin embargo en presencia de ambos sustratos se aprecia la inhibición por sustrato que previamente se había observado en los extractos proteicos desalados (Figura 13), por lo que en las enzimas purificadas, la cinética de saturación tampoco se ajustó al modelo cinético de Michaelis-Menten.

El cálculo de los parámetros cinéticos mostró altos valores de K_m con amilopectina como sustrato y bajos valores cuando se utilizó amilosa, lo que puede reflejar la necesidad de los órganos de almacenamiento como las semillas de formar amilopectina (Blennow, 1991). La diferencia entre la actividad de cada condición de cultivo está dada por la modificación en la velocidad de catálisis ($V_{máx}$), en donde la reducción de los valores de $V_{máx}$ hasta un 30% en el caso de amilosa como sustrato (Figura 21A) y hasta un 20% en el caso de amilopectina como sustrato (Figura 21B), muestra que la deficiencia de fósforo modifica la velocidad de catálisis sin influir sobre la afinidad sobre el sustrato de las enzimas purificadas (de manera similar a lo observado en extractos desalados, Figura 13, Tabla 5).

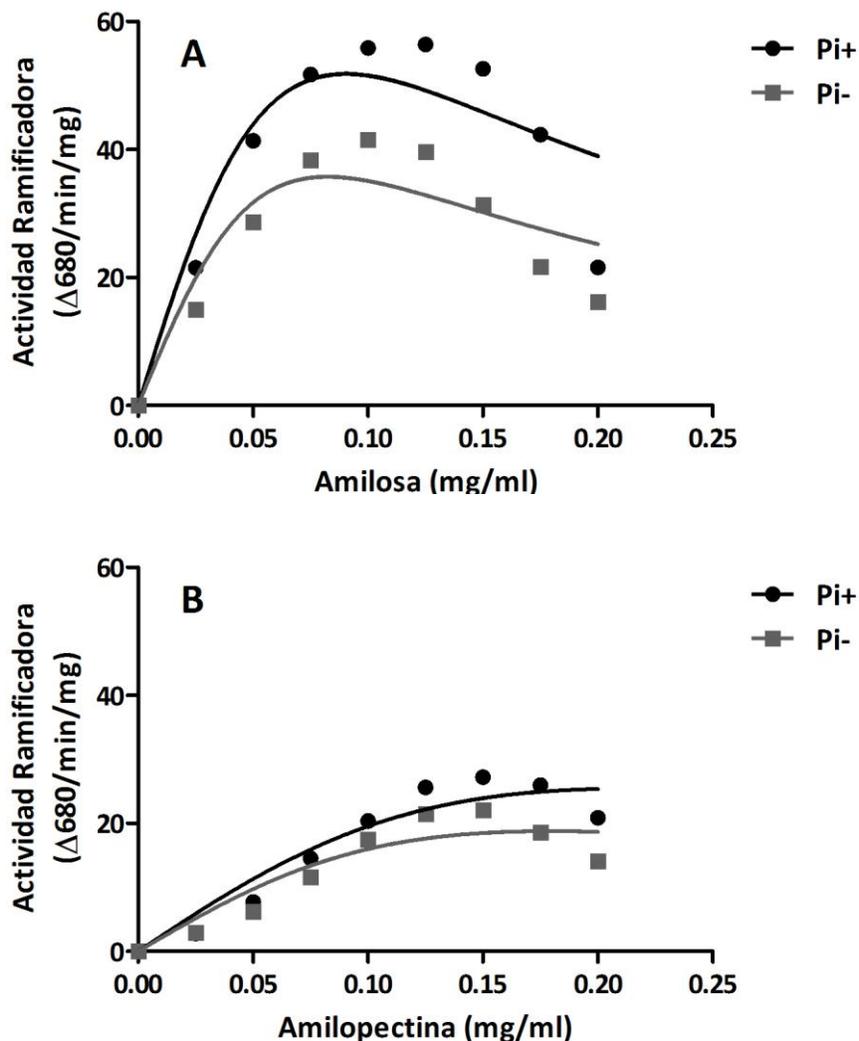


Figura 21. Cinética de saturación de las enzimas ramificadoras purificadas a partir de extractos de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+) o en deficiencia de fósforo (Pi-), usando amilosa (A) y amilopectina (B) como sustratos. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones ± desviación estándar (SD).

Tabla 8. Parámetros cinéticos ± desviación estándar (SD) de las enzimas ramificadoras purificadas. Los cálculos se obtuvieron con el programa GraphPad Prism versión 5.03, de acuerdo al ajuste del modelo de inhibición por sustrato con la ecuación $Y = V_{m\acute{a}x} * X / (K_m + X * (1 + X / K_i))$, donde Y corresponde a la actividad ramificadora en Δ680/min/mg y X a la cantidad de amilosa o amilopectina en mg/ml.

	Amilosa Pi+	Pi-	Amilopectina Pi+	Pi-
K_m (mg/ml)	0.0334±0.029	0.0354±0.012	0.0716±0.044	0.0726±0.015
$V_{m\acute{a}x}$ (Δ680/min/mg)	50.17±5.728	35.71±4.094	24.30±6.069	18.34±3.547

6.6.3. Determinación de la temperatura óptima.

El efecto de la preincubación durante 10 minutos a temperaturas de 25, 30, 40, 50, 60 y 70°C sobre la enzima sola o en presencia del medio de reacción completo (amilosa o amilopectina 0.1 mg/ml y citrato 100 mM) fue investigado con el fin de determinar si la presencia del sustrato (inhibición en la actividad a concentraciones mayores de 0.125 mg/ml, Figuras 13 y 21) y el citrato (efecto positivo observado en las Figuras 14 y 20), podrían influir sobre el efecto estabilizador observado en presencia de 6 mM $MgCl_2$ (Figura 18), que permitió el paso inicial en la purificación de las enzimas con actividad ramificadora. En la figura 22A se observa que cuando la enzima purificada de embriones Pi+ se preincuba sola, empieza a perder su capacidad para actuar sobre amilosa a partir de los 30°C. Cuando se midió la actividad sobre amilopectina de la enzima que se incubó sola se observó que sólo después de los 60°C se presentó una disminución relevante. En todos los casos, la temperatura óptima de reacción resultó los 30°C, ya que a partir de este valor la actividad disminuye, aunque la presencia del medio de reacción completo parece estabilizar e incrementar la actividad a los 50 y 60°C al utilizar amilosa, mientras que en el caso de amilopectina la presencia del medio de reacción disminuyó de manera significativa la actividad.

En la figura 22B se presentan los resultados de la enzimas purificadas de embriones Pi-: al emplear amilosa como sustrato, empiezan a perder su capacidad para actuar sobre ésta a partir de los 30°C independientemente de la preincubación con la enzima sola o el medio de reacción completo; mientras que al determinar la actividad sobre amilopectina, tanto la enzima que se preincubó sola como la que se preincubó con el medio de reacción completo no mostraron cambios importantes en la actividad ramificadora determinados por la temperatura. La temperatura óptima de reacción correspondió a 30°C. Los resultados de ambas enzimas muestran que la presencia del sustrato y el citrato no parecen tener un efecto estabilizador importante de la actividad después de preincubar durante 10 minutos a temperaturas mayores a los 30°C.

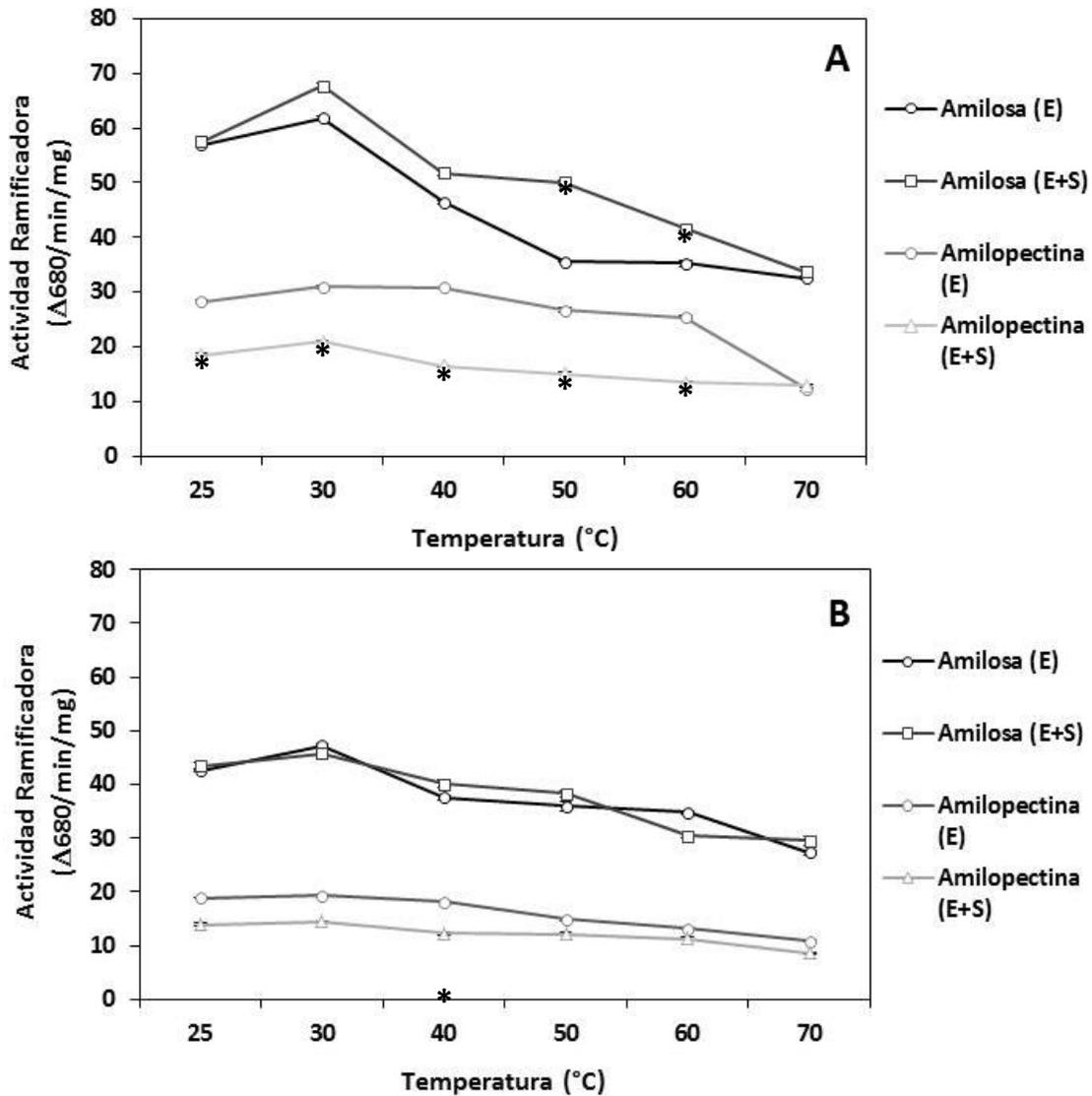


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas ramificadoras purificada a partir de extractos de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (A, Pi+) o en deficiencia de fósforo (B, Pi-) con amilosa y amilopectina como sustratos. En un caso la enzima sola (E), se preincubó por 10 minutos a las temperaturas indicadas y después se midió la actividad sobre amilosa y amilopectina. En otro, la preincubación se hizo en presencia del medio de reacción completo (E+S) y al término del periodo señalado, se determinó la actividad ramificadora. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 9 repeticiones \pm desviación estándar (SD).

* Diferencia significativa respecto al control con la enzima sola (Bonferroni, $p \leq 0.05$; Tukey, $p \leq 0.05$).

6.6.4. Efecto de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Se investigó el efecto de la preincubación a 30 ó 70°C durante 10 minutos en presencia de concentraciones de 0 a 10 mM de $MgCl_2$ y $CaCl_2$ sobre la actividad de las enzimas purificadas Pi^+ . En la Figura 23A, se observa que al utilizar amilosa como sustrato y $MgCl_2$, la presencia de este último permite que la enzima alcance su mayor actividad hasta los 5 mM después de preincubar a 30°C; si este procedimiento se realiza a 70°C, la actividad disminuye significativamente, sin embargo en concentraciones superiores a 4 mM se hace evidente que la presencia de $MgCl_2$ influye positivamente en la actividad con un efecto protector importante, el cual comienza a disminuir después de los 10 mM, lo que sugiere que a concentraciones mayores el efecto estabilizador de la actividad en presencia de $MgCl_2$ se torna ineficiente. En presencia de amilosa como sustrato y $CaCl_2$ (Figura 23B), se observó el mismo patrón de activación hasta los 5 mM después de la preincubación a 30°C, pero un efecto estabilizador menor al del $MgCl_2$, ya que la actividad disminuyó significativamente después de la preincubación a 70°C.

Por otra parte, al emplear amilopectina como sustrato en presencia de $MgCl_2$ (Figura 23C), la actividad resultó considerablemente menor (hasta un 50% respecto de los valores con amilosa), sin embargo la presencia del ion (5 mM) también permitió que la enzima alcanzara su mayor actividad después de la preincubación a 30°C; al realizar el mismo procedimiento a 70°C, la actividad disminuyó de manera significativa hasta que después de los 4 mM, aumentó significativamente, alcanzando su máximo a los 5 mM, lo cual muestra que al determinar la actividad ramificadora con amilopectina en presencia de magnesio, el efecto positivo y estabilizador sobre la actividad resulta más eficiente que cuando se utilizó amilosa (Figura 23A). Cuando se midió la actividad ramificadora utilizando amilopectina después de preincubar a 30 ó 70°C en presencia de $CaCl_2$ (Figura 23D), se observó que la presencia de este ion no produjo ningún efecto protector ni influyó sobre la actividad ramificadora bajo estas condiciones.

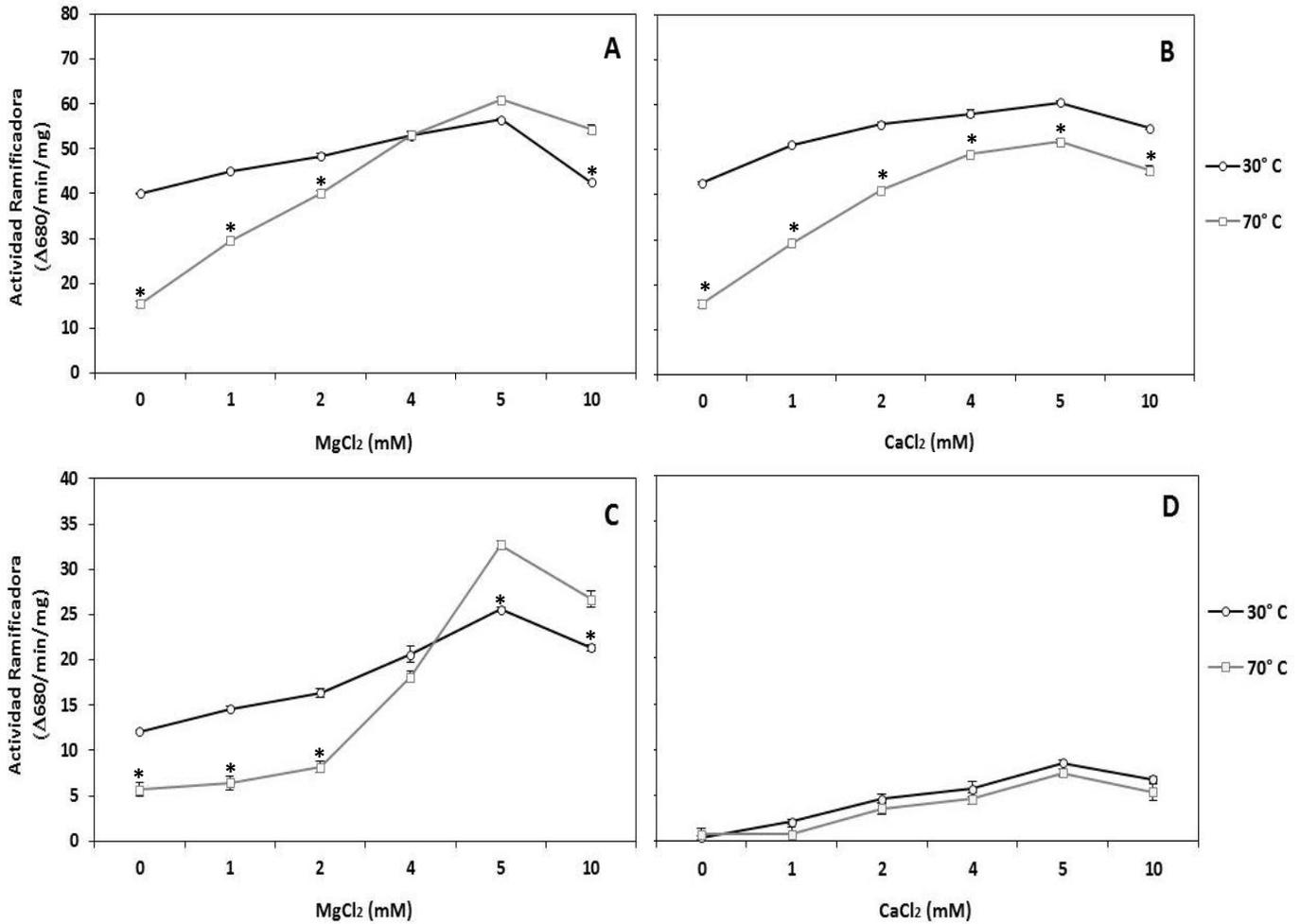


Figura 23. Efecto del MgCl₂ y CaCl₂ sobre la actividad de las enzimas ramificadoras purificadas a partir de extractos de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones adecuadas (Pi+). A. Actividad ramificadora con amilosa después de preincubar durante 10 minutos a 30 ó 70°C en presencia de MgCl₂ y el medio de reacción completo. B. Actividad ramificadora con amilosa después de preincubar durante 10 minutos a 30 ó 70°C en presencia de CaCl₂ y el medio de reacción completo. C. Actividad ramificadora con amilopectina después de preincubar durante 10 minutos a 30 ó 70°C en presencia de MgCl₂ y el medio de reacción completo. D. Actividad ramificadora con amilopectina después de preincubar durante 10 minutos a 30 ó 70°C en presencia de CaCl₂ y el medio de reacción completo. La escala del eje X en C y D se redujo a la mitad dada la menor actividad. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 6 repeticiones ± desviación estándar (SD).
 * Diferencia significativa respecto al control a 30°C (Bonferroni, p≤0.05; Tukey, p≤0.05).

El efecto de la preincubación a 30 ó 70°C durante 10 minutos en presencia de concentraciones de 0 a 10 mM de $MgCl_2$ y $CaCl_2$ sobre las enzimas purificadas Pi^- fue investigado. En la Figura 24A, se observa que al utilizar amilosa como sustrato y $MgCl_2$, la presencia de este último permite que la enzima alcance su mayor actividad hasta los 4 mM después de preincubar a 30°C; si este procedimiento se realiza a 70°C, la actividad disminuye significativamente, sin embargo en concentraciones superiores a 5 mM se hace evidente que la presencia de $MgCl_2$ también tiene un efecto protector en las enzimas Pi^- (aunque menor), el cual a concentraciones superiores también se vuelve ineficiente, además cabe destacar que bajo estas condiciones no se produce el efecto positivo sobre la actividad con 5 mM del ion que se observa en las enzimas Pi^+ (Figuras 23A). En presencia de amilosa como sustrato y $CaCl_2$ (Figura 24B), las enzimas alcanzaron niveles máximos de actividad en el rango de 2 a 5 mM después de la preincubación a 30°C; sin embargo después de la preincubación a 70°C, la actividad disminuyó significativamente mostrando un menor efecto estabilizador respecto al magnesio, lo que sugiere el calcio no representa un elemento estabilizador importante en la actividad de las enzimas purificadas.

Por otro lado, cuando se utilizó amilopectina como sustrato en presencia de $MgCl_2$ (Figura 24C), la actividad resultó también considerablemente menor, sin embargo la presencia del ion (5 mM) también permitió que la enzima alcanzara su mayor actividad después de la preincubación a 30°C; al realizar el mismo procedimiento a 70°C, la actividad disminuyó de manera significativa alcanzando su máximo nivel en el rango de los 2 a 5 mM; mostrando que al determinar la actividad de las enzimas Pi^- con amilopectina, el efecto estabilizador por parte del magnesio resulta menos eficiente y no se produce el efecto positivo sobre la actividad con 5 mM del ion que se observa en las enzimas Pi^+ (Figuras 23C). Finalmente, al determinar la actividad ramificadora con amilopectina en presencia de $CaCl_2$ (Figura 24D), se observó que también aquí la presencia del $MgCl_2$ (5 mM) también resulto necesaria para alcanzar la máxima actividad que resultó hasta un 50% mayor que la observada en las enzimas Pi^+ (Figura 23D) después de preincubar a 30°C; sin embargo después de preincubar a 70°C, la presencia de este ion no produjo ningún efecto protector puesto que la actividad ramificadora disminuyó de manera significativa. Estos resultados sugieren la posible existencia de un sitio específico de unión a las enzimas para el magnesio y calcio, en donde la unión del magnesio resultaría más eficiente, lo que le permitiría influir sobre la actividad de manera más efectiva respecto del calcio (Figuras 17, 23B, 23D, 24B, 24D).

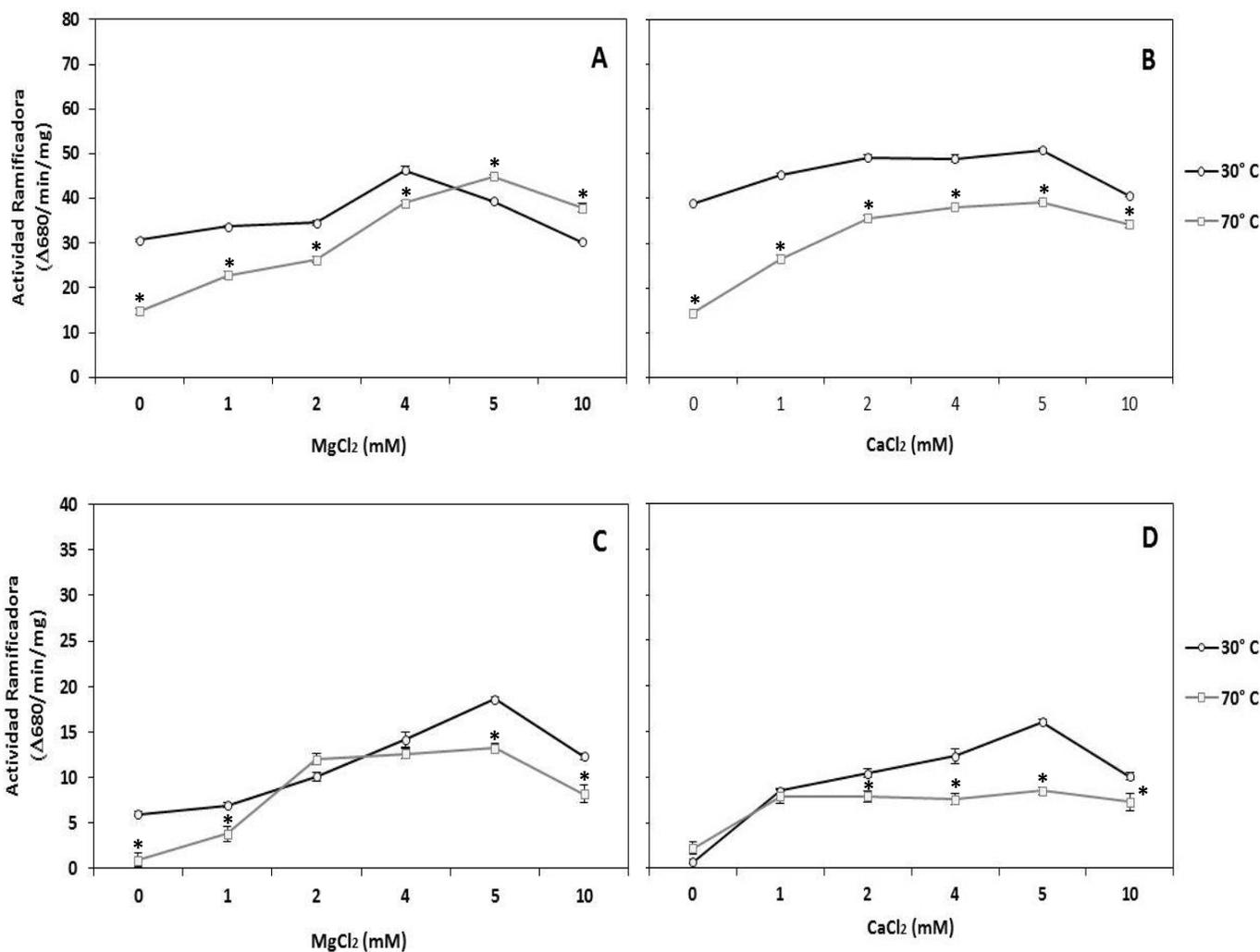


Figura 24. Efecto del MgCl₂ y CaCl₂ sobre la actividad de las enzimas ramificadoras purificadas a partir de extractos de embriones de 20 DDA producidos por plantas cultivadas en condiciones de deficiencia de fósforo (Pi⁻). A. Actividad ramificadora con amilosa después de preincubar durante 10 minutos a 30 ó 70°C en presencia de MgCl₂ y el medio de reacción completo. B. Actividad ramificadora con amilosa después de preincubar durante 10 minutos a 30 ó 70°C en presencia de CaCl₂ y el medio de reacción completo. C. Actividad ramificadora con amilopectina después de preincubar durante 10 minutos a 30 ó 70°C en presencia de MgCl₂ y el medio de reacción completo. D. Actividad ramificadora con amilopectina después de preincubar durante 10 minutos a 30 ó 70°C en presencia de CaCl₂ y el medio de reacción completo. La escala del eje X en C y D se redujo a la mitad dada la menor actividad. Los resultados que se grafican corresponden al promedio de 6 repeticiones ± desviación estándar (SD).

* Diferencia significativa respecto al control a 30°C (Bonferroni, $p \leq 0.05$; Tukey, $p \leq 0.05$).

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Efecto de la deficiencia de fósforo y el desarrollo sobre la actividad de las enzimas ramificadoras de semillas de frijol.

La deficiencia de fósforo afecta a la mayor parte de las tierras de cultivo del país, las plantas que la sufren, además de reducir su rendimiento, pueden modificar las características de las sustancias de reserva que se acumulan en sus semillas. Los efectos de la falta de Pi son dependientes de la etapa de desarrollo de las plantas (Sección 2.2), en etapas avanzadas la formación de órganos reproductivos se retarda, el número de flores se disminuye y se ve restringida la formación de semillas debido a la senescencia prematura de las hojas (Marschner, 1995). El resultado final es que las plantas crecen más lentamente y acumulan menos biomasa (Bates y Lynch, 2000). En *P. vulgaris* se ha reportado la existencia de variabilidad genética asociada a la respuesta a la deficiencia de Pi (Lynch y Beebe, 1995), sin embargo se conoce poco acerca de las bases moleculares y bioquímicas de esas diferencias. Algunos de los cambios observados en respuesta a la deficiencia de fósforo se ubican a nivel de las células corticales de la raíz, las cuales, después de estar sometidas a tratamientos deficientes en Pi, presentaron alteraciones en sus organelos como grandes vacuolas, invaginaciones del plasmalema y mitocondrias amorfas. Al estudiar la estructura de la zona meristemática, se observó que la limitación de Pi en el medio inhibe la división celular (Wanke *et al.*, 1998).

Una de las respuestas más evidentes a la deficiencia de Pi es la acumulación de azúcares (Sección 2.3.4). Se ha reportado que algunas plantas responden con incrementos en los niveles de almidón (Rao *et al.*, 1993), mientras que otras acumulan sacarosa y almidón (Dietz y Helios, 1990; Cierezko *et al.*, 2000). Se ha sugerido que tales cambios podrían constituir temporalmente una fuente adicional de Pi; sin embargo algunos reportes muestran que esto no es una respuesta general a la deficiencia de Pi, sino que depende de la especie (Foyer y Spencer, 1986; Rao *et al.*, 1993). Debido a que la acumulación de almidón podría deberse a un incremento en su síntesis puesto que la actividad de la AGPP se ve incrementada durante la deficiencia de Pi (Preiss y Romeo, 1994) y los reportes de la actividad determinante de las enzimas ramificadoras durante la biosíntesis del almidón (Hamada *et al.*, 2001; 2002; 2007; Liu *et al.*, 2009; 2012; Morell *et al.*,

1997; Takeda, 1993; Tetlow *et al.*, 2004a; 2004b; 2008; 2011), el objetivo inicial de este trabajo fue analizar el efecto de la falta de Pi sobre la actividad de las enzimas ramificadoras del almidón, hallándose que en condiciones normales (Pi+), la actividad ramificadora tiende a disminuir conforme avanza el desarrollo (Figura 7). Si bien la acumulación de almidón es más activa durante las etapas tardías de desarrollo, la alta actividad ramificadora en etapas previas podría favorecer el proceso. En las semillas producidas por plantas cultivadas en deficiencia de fósforo (Pi-), la actividad ramificadora se mantuvo en niveles similares durante todo el desarrollo de la semilla (Figura 7), pero menor en 40 a 60% a los valores que entre los días 15, 20 y 25 DDA se observaron en las semillas control; lo cual se podría reflejar en las modificaciones en algunas características de los gránulos de almidón que se producen durante la deficiencia de fósforo: disminución en su tamaño, reducción en la fosforilación, modificación de la proporción amilosa/amilopectina y del patrón de proteínas asociadas, que provoca la disminución en la capacidad para unir enzimas cuya presencia favorecen la degradación del almidón (Bernal *et al.*, 2005b; Bernal y Martínez-Barajas, 2006; Bernal, 2009).

7.2 Efecto de la deficiencia de fósforo sobre la regulación de la actividad de las enzimas ramificadoras.

La regulación de la actividad de las enzimas ramificadoras es un mecanismo complejo. Mucha de la información disponible proviene de experimentos hechos con mutantes o con plantas transgénicas que carecen de las SS's, las SBE's y las DBE's, 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 (Morrell *et al.*, 2003); (3) cambios en la actividad en enzimas que participan en procesos complejos y mutaciones en los genes que codifican para las enzimas SS's, SBE's y AGPP pueden producir efectos pleiotrópicos (Nishi *et al.*, 2001; Singletary *et al.*, 1997), y (4) se ha especulado que la coordinación de las actividades de almidón sintasa, enzimas ramificadoras y desramificadoras está acompañada de una asociación física en un complejo multimérico dentro del amiloplasto (Dinges *et al.*, 2001, 2003; Nishi *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2002; Ball y Morell, 2003; Tetlow *et al.*, 2004a, 2008; Yao *et al.*, 2004; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008, 2009; Liu *et al.*, 2012).

Recientemente, se reportó que la formación de complejos proteicos estromales resulta potenciada por la presencia de ATP, mientras que el tratamiento con fosfatasa alcalina favorece su disociación (Tetlow *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; 2012). En este sentido se propuso que la formación y estabilidad de los complejos es dependiente de la fosforilación, al facilitar la asociación entre isoformas de las SBE's y SS's así como la interacción con glucanos en endospermos de maíz (Grimaud *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012) y trigo (Tetlow *et al.*, 2008). Posteriormente se demostró que la enzima que se fosforila es la isoenzima SBEIIb en los endospermos de trigo (Tetlow *et al.*, 2004b) y maíz (Hennen-Bierwagen *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009) durante la formación de complejos con isoformas de las SS's y que ello favorece la biosíntesis del almidón (Tetlow *et al.*, 2004a; Liu *et al.*, 2009).

Con estos antecedentes, se buscó determinar el efecto de la fosforilación en la regulación de las enzimas ramificadoras de semillas de frijol. Los resultados mostraron que tanto la presencia del tratamiento de fosforilación (ATP-MgCl₂, inhibidores de fosfatasas y proteasas así como una preincubación a 30°C durante 30 minutos) como la desfosforilación con fosfatasa alcalina (Figuras 8 y 9, Tabla 4), resultaron efectivos para aumentar y disminuir, respectivamente, la actividad de los extractos, lo que sugiere que probablemente los componentes de dichos tratamientos pudieran interactuar más eficientemente con las enzimas y asociaciones de éstas al inducir posibles cambios conformacionales favorecidos por la aplicación del calor, modificando por lo tanto las asociaciones que pudieran estar presentes, considerando su naturaleza parcialmente purificada. Esta idea parece consistente con la curva temporal de actividad de la Figura 10, en donde se observa que aun sin la presencia del tratamiento de fosforilación (Control), se produce un efecto positivo en la actividad ramificadora hasta los 10 y 5 minutos de preincubación a 30°C en extractos proteicos desalados Pi+ y Pi- respectivamente.

En un experimento posterior, se observó que la presencia de ATP sólo incrementó la actividad de extractos de 20 DDA Pi+ (Figura 11A). Por su parte, sólo los extractos de 25 y 30 DDA Pi- (Figura 11B) mostraron una disminución significativa con el tratamiento con fosfatasa alcalina. El incremento en la actividad puede atribuirse también a una mayor coordinación de las actividades sintasa y ramificadora, resultante de una asociación física entre las enzimas favorecida por la fosforilación (Ball y Morell, 2003) y por la incubación a 30°C durante 30 minutos (Tabla 4, Figuras 8, 9 y 10); mientras que el tratamiento con fosfatasa alcalina produce el efecto contrario (Tetlow *et al.*, 2004a, 2008; Liu *et al.*, 2009). La búsqueda de sitios posibles de fosforilación mostró que la

isoforma II de frijol (PvSBE2) tiene una región que se parece bastante a la secuencia consenso de los sitios fosforilados por SnRK1 (Figura 5). Estas cinasas pueden funcionar como sensores energéticos, que al fosforilar proteínas importantes para la regulación de diferentes procesos metabólicos pueden contribuir a mejorar el uso de la energía (Weber *et al.*, 2005; Polge y Thomas, 2006). Dentro de los muchos procesos afectados por la actividad de SnRK1 está la biosíntesis de almidón en tubérculos de papa (Halford *et al.*, 2003; Tiessen *et al.*, 2003). La actividad de SnRK1 durante el desarrollo de la semilla es máxima a 20 DDA, coincidiendo con el inicio de la acumulación masiva de almidón y proteínas de reserva en los embriones de frijol (Com. Pers., Martínez-Barajas, 2012). Los experimentos que se realizaron para estudiar la posible participación de SnRK1 (Figura 12) en la regulación de la actividad ramificadora, sugieren que esta cinasa podría fosforilar e inhibir por lo menos parcialmente la actividad de estas enzimas. Aunque dicha inhibición resultó pequeña fue muy reproducible, por lo que puede ser muy interesante desarrollar herramientas que permitan investigar su posible relevancia en el contexto de las condiciones creadas por la deficiencia de fósforo. Si bien la idea de un posible efecto inhibitorio en presencia de SnRK1 resulta contradictoria con los resultados de activación por fosforilación observados y reportados en la literatura, aun se conoce poco sobre el papel de SnRK1 en este proceso, además resulta necesario considerar varios factores: las enzimas ramificadoras podrían ser fosforiladas por más de una cinasa, las enzimas presentes en los extractos proteicos desalados podrían inhibir la función de SnRK1 o bien pueden no encontrarse en las condiciones adecuadas para ser fosforiladas por ésta, aunado a que al juntar los extractos de embriones de 20 DDA con las fracciones de alta actividad de SnRK1 de 20 DDA, se estaría diluyendo la cantidad de proteína y por lo tanto no se podría esperar un resultado meramente aditivo de la actividad ramificadora de ambos extractos; por lo que en el futuro será necesario hacer más investigaciones para resolver las discrepancias. Por otro lado, el hecho de que ADP y AMP también estimulen la actividad (Figuras 8 y 9), sugiere la importancia de una regulación alostérica mediada por nucleótidos.

El siguiente objetivo involucró la caracterización de las propiedades cinéticas. En experimentos iniciales con diferentes cantidades de amilosa en el ensayo de tinción con yodo (datos no mostrados) se corroboró que la cinética de saturación de las enzimas ramificadoras de semillas de frijol, al igual que las de endospermo de arroz, no se ajustó al modelo de Michaelis-Menten (Smyth, 1988) ya que se presentó inhibición por el sustrato a concentraciones mayores de 0.125 mg/ml de amilosa (Figuras 13 y 21A) y 0.15 mg/ml de amilopectina (Figura 21B)

independientemente de la condición de cultivo, lo que podría sugerir la presencia de un sitio de unión del sustrato (ya sea amilosa ó amilopectina) diferente del catalítico. En los extractos tratados para promover la fosforilación y desfosforilación de las enzimas ramificadoras, se observó que la activación y disminución que provocan tales tratamientos respectivamente (Figuras 13 y 21, Tablas 4, 5 y 8), se deben a la modificación del parámetro $V_{m\acute{a}x}$ sin que haya cambios importantes en la afinidad por el sustrato (K_m), algo similar con lo que sucede con el efecto del citrato en la isoforma rPvSBE2 (Tabla 1), cuya activación se debe al aumento en la velocidad de catálisis sin modificar la afinidad por el sustrato (Hamada *et al.*, 2001). De acuerdo con la Tabla 1, las enzimas de semillas de frijol rPvSBE1 y rPvSBE2 mostraron una K_m de 0.44 y 1.27 mg/ml hacia la amilosa respectivamente, sin embargo los resultados de los extractos proteicos desalados (Tabla 5) mostraron valores de K_m entre los 0.2-0.3 mg/ml y las enzimas purificadas (Tabla 8) de 0.3 mg/ml; de acuerdo con estos resultados, en los extractos predominarían las isoformas PvSBE1, sin embargo los valores de la Tabla 1 corresponden a enzimas recombinantes completamente purificadas y sin tratamiento de fosforilación o preincubación con temperatura. Si bien los bajos valores de K_m hallados para las enzimas ramificadoras, pueden reflejarse en la necesidad de órganos de almacenamiento como las semillas de formar amilopectina (Blennow, 1991), también resulta necesario considerar el papel del dominio N-terminal de las PvSBE's, ya que se ha sugerido que interactúa con el dominio catalítico central, el cual tiene gran influencia tanto sobre la especificidad de la longitud de la cadena transferida como con la velocidad máxima de catálisis (Hamada *et al.*, 2007), por lo que sería muy interesante investigar si la posible fosforilación es un elemento que incide sobre posibles arreglos estructurales.

Otro elemento importante que se buscó determinar fue el efecto del citrato, ya que se ha reportado un papel importante en la regulación de la actividad de las enzimas ramificadoras de manera positiva *in vitro* (Walker y Builder, 1971) y en el caso particular de frijol, se reportó un efecto activador en presencia de 300 mM sobre la isoenzima recombinante de frijol rPvSBE2 (Hamada *et al.*, 2001). Los resultados mostraron que la presencia del citrato de sodio (100 mM) estimuló la actividad para el caso de las enzimas ramificadoras de semillas de frijol y moduló de manera positiva la actividad ramificadora independientemente de la condición de cultivo (Figuras 14 y 20), lo que sugiere que además de fungir como amortiguador del medio de reacción en el ensayo de tinción con yodo, es posible que exista un sitio alostérico para este compuesto que le permita modular la actividad en determinadas condiciones. El mecanismo de activación por

citrato no está claro, pero se ha mencionado que el efecto podría deberse a una interacción entre la enzima y el citrato sin afectar la unión de la enzima con el sustrato, lo que conllevaría una influencia significativa sobre la actividad catalítica pero ningún efecto sobre la afinidad por el sustrato (Edwards *et al.*, 1999; Hamada *et al.*, 2001; Nozaki *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2004). Debido a la alta concentración requerida para estimular la actividad de las enzimas ramificadoras, es probable que su papel no sea fisiológicamente relevante, sin embargo Edwards *et al.*, (1999) sugirieron que la presencia del citrato en el medio de reacción podría de alguna manera imitar interacciones con otras enzimas (como la almidón sintasa) al momento de sintetizar la amilopectina. Es posible además, que en el contexto del metabolismo general en el endospermo, amiloplastos y cloroplastos desempeñen un papel central en donde la interacción de los efectos genéticos y ambientales sobre el almidón y la síntesis de proteínas pudiera ser mediado en parte por mecanismos regulatorios en el amiloplasto; y en particular el citrato o sus precursores pudieran ser generados y/o transportados hacia el estroma, ya que en amiloplastos de endospermo de trigo se han identificado mediante proteómica a las enzimas málica (dependiente de NADP) y aconitato hidratasa (Dupont, 2008). Otra posibilidad involucra la alta capacidad para extraer el Pi del suelo a través de exudados radicales que poseen las leguminosas, ya que en determinadas condiciones ambientales como la deficiencia de fósforo, se desarrollan raíces proteoides, órganos altamente especializados para la síntesis y secreción de ácidos cítrico y málico (Gardner *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1996). El incremento en la secreción de ácidos orgánicos está correlacionado con un aumento en la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de estos compuestos, incluyendo a la fosfoenol piruvato carboxilasa, la citrato sintasa y la malato deshidrogenasa (Raghothama, 1999), a lo que podría asociarse de manera de manera parcial la presencia y regulación por parte del citrato observada en el sentido de la disponibilidad de carbono en la planta, ya que se ha propuesto que una de las funciones de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCasa) de raíces de lupino blanco (*Lupinus albus*) consiste en proveer del carbono requerido para soportar la significativa cantidad de citrato que es exudado por plantas cuando son sometidas a deficiencias de Pi (Peñaloza *et al.*, 2000).

La Figura 15 muestra el perfil de actividad ramificadora durante el desarrollo en geles nativos, en donde al igual que en el perfil de actividad en solución (Figura 7), se observan diferentes comportamientos en la actividad, en este caso mediante dos bandas (isoenzimas) capaces de actuar sobre la amilosa, lo que corrobora que las isoformas y las asociaciones que se producen entre ellas son diferentes, característica que se pronuncia más a los 25 DDA Pi-, en donde se

observa una zona intensa de actividad, por lo que las isoenzimas de esta edad parecen ser muy activas sobre la amilosa en las condiciones del gel, sin embargo la determinación del efecto del tratamiento con nucleótido y calor previamente estandarizado (Figuras 8-11) sobre las isoformas detectadas en extractos desalados de 20 DDA Pi+ y Pi- en la Figura 16, mostró que mientras se estimuló la actividad ramificadora determinada en solución, al analizar las mismas muestras en geles nativos se produjo una reducción importante de la actividad, determinada por la disminución en la intensidad de las bandas. Si bien ambos métodos se emplean para evaluar la actividad ramificadora, muestran aspectos distintos de la respuesta enzimática ya que se basan en fundamentos y procedimientos diferentes, por lo que la interacción con el sustrato y la regulación enzimática en cada caso es distinta, aunado a lo anterior, los extractos se encuentran parcialmente purificados, lo que podría explicar las diferentes respuestas obtenidas en solución y en gel, por lo que se decidió determinar la actividad ramificadora sólo con el ensayo en solución, dada la caracterización del método previamente realizada (Figuras 6A y 6B, Sección 5.3).

7.3 Purificación y caracterización de las enzimas ramificadoras.

La purificación de las enzimas con actividad ramificadora se desarrolló a partir de los resultados del efecto del tratamiento de fosforilación (Figuras 8-14, 16A y 16C, Tablas 4 y 5). Posteriormente, se descubrió que la presencia del Mg^{2+} era suficiente para lograr dicho efecto (Figura 18). El esquema usado permitió un enriquecimiento de 90 veces (Tablas 6 y 7, Figura 19) y las enzimas purificadas presentaron propiedades muy similares a las observadas en los extractos proteicos desalados, siendo el valor del parámetro $V_{m\acute{a}x}$ la diferencia más importante entre la actividad de las enzimas Pi+ y Pi- (Figuras 21A y 21B, Tabla 8). Si se considera que las enzimas ramificadoras pertenecen a la familia de la α -amilasa (Sección 2.4, Figura 4), que se caracteriza por tres dominios principales, actuar sobre enlaces α -glucosídicos ya sea hidrolizando o formándolos por transglicosilación, y compartir algunas propiedades estructurales, como algunas α -amilasas de trigo y cebada, que requieren la presencia de Ca^{2+} para alcanzar su estabilidad y actividad máxima, la cual se mantiene en altas temperaturas (Jenner, 1994; Nozaki *et al.*, 2001); la termotolerancia de las enzimas ramificadoras purificadas de semillas de frijol en desarrollo parece una característica hasta cierto punto normal (Figuras 10 y 17), sin embargo las enzimas con actividad ramificadora de extractos crudos no se protegieron de manera significativa

con Ca^{2+} (Figura 18), pero cuando se hicieron experimentos similares usando enzimas purificadas, los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} fueron efectivos para que la enzima alcanzara su mayor actividad después de preincubarla a 30°C , pero sólo Mg^{2+} resultó más efectivo para que las enzimas se establezcan y mantengan su actividad después de la preincubación a 70°C (Figuras 23A, 23C, 24A y 24C), consistente con el efecto protector que se produce en su presencia durante el tratamiento con calor (Figuras 17 y 18), sugiriendo la existencia de un sitio específico de unión al magnesio en las enzimas con actividad ramificadora de semillas de frijol; mientras que el menor efecto estabilizador en presencia de Ca^{2+} (Figuras 23B y 24B) pudiera atribuirse principalmente a los efectos de la presencia del sustrato (amilosa) y del citrato durante la preincubación a 30 ó 70°C . En este sentido, de acuerdo al efecto estimulador del citrato (Figura 20) e inhibición por sustrato observados (Figura 21, Tabla 8), se determinó si la presencia de ambos factores (en una preincubación con el medio de reacción completo) podrían desarrollar un efecto similar o complementario al del Mg^{2+} , sin embargo su presencia no fue suficiente para estimular y/o mantener la actividad ramificadora después de preincubar a temperaturas superiores a los 30°C (Figura 22). Los resultados sugieren que de acuerdo con el parecido estructural de las enzimas ramificadoras con las α -amilasas, es posible que éstas hayan conservado la capacidad para interactuar con Mg^{2+} y Ca^{2+} en menor grado a través de sitios específicos de unión a las enzimas ramificadoras de semillas de frijol de 20 DDA. Por la importancia que ello puede tener para la regulación de la actividad ramificadora, será necesario hacer una investigación más detallada.

Estudios realizados con mutantes indican que la acción de las isoformas de la enzima ramificadora se interrelaciona y que actúan de forma secuencial durante la formación de la amilopectina (Nakamura, 2002). Los diferentes comportamientos de las isoformas purificadas hasta este punto, en particular de aquellas provenientes de extractos de plantas cultivadas en condiciones ideales, muestran características y propiedades consistentes con lo reportado para la isoforma II de la enzima ramificadora: el efecto positivo del citrato en concentraciones de 0.3 M y su expresión máxima durante los estadios medios del desarrollo (Hamada *et al.*, 2001), su localización en la fracción soluble por lo que puede formar complejos al ser fosforilada (Tetlow *et al.*, 2004a; Liu *et al.*, 2009), una región en su secuencia peptídica muy similar a la reconocida por SnRK1 y que en frijol, retiene más del 80% de la actividad original después de calentarla durante 15 minutos a 50°C (Hamada *et al.*, 2007), por lo que es probable que en las condiciones en que se realizó la caracterización de los extractos proteicos desalados y purificados, los resultados

observados pudieran ser atribuibles principalmente a isoformas SBEII principalmente. Los cambios observados en las isoformas purificadas provenientes de extractos de plantas cultivadas en condiciones de deficiencia severa (enzimas presentes, asociaciones y mecanismos de regulación) proporcionan las bases que sugieren algunos de los cambios que esta condición provoca sobre las enzimas con actividad ramificadora de semillas de frijol.

Finalmente, los resultados obtenidos muestran que la actividad de la enzima ramificadora está sometida a una regulación compleja, donde el desarrollo (en donde las isoformas y asociaciones presentes son diferentes en cada estadio), la interacción con iones y nucleótidos, así como con enzimas (cinasas y fosfatasas) que modulan su estado de fosforilación, son elementos muy importantes. Los efectos del ambiente también deben ser considerados, en este caso, la deficiencia de fósforo además de modificar el patrón que sigue la actividad durante el desarrollo, indujo cambios importantes en las características de la enzima. Estas modificaciones pueden ayudar a explicar las características del almidón que se produce cuando las plantas se cultivan en ambientes donde el fósforo resulta insuficiente.

VIII. CONCLUSIONES

1. El estado de desarrollo (DDA) y la deficiencia de fósforo provocan cambios en la actividad de las enzimas ramificadoras, cuyas diferencias sugieren que las diversas isoenzimas que se expresan en cada condición, presentan características diferentes.
2. La actividad de las enzimas ramificadoras que se expresan durante el desarrollo de las semillas de frijol están sometidas a una regulación compleja:
 - El tratamiento de fosforilación con 2 mM ATP y 6 mM MgCl₂ parece influir sobre el parámetro $V_{m\acute{a}x}$, ya que aumenta en condiciones en donde se favorece la fosforilación y disminuye con el tratamiento con fosfatasa alcalina.
 - Es posible que SnRK1 fosforile a la isoenzima SBEII, sin embargo ésta podría ser fosforilada por más de una cinasa, por lo que resulta necesario realizar mayores investigaciones al respecto.
 - Los iones Ca²⁺ y Mg²⁺ parecen necesarios para que la actividad ramificadora se mantenga más estable, por lo que es posible que exista un sitio de unión a las enzimas ramificadoras para estos iones.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abad, M, Binderup, K, Rios-Steiner, K, Arni, R, Preiss J and Geiger J. (2002). The X-ray crystallographic structure of Escherichia coli branching enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 42164-42170.
- Altenbach, SB, Dupont, FM, Kothari, KM, Chan, R, Johnson, EL and Lieu, D. (2003). Temperature, water and fertilizer influence the timing of key events during grain development in a US spring wheat. *Journal of Cereal Science*, 37:9-20.
- Asmar, F, Agonía, T and Nielsen, N. (1995). Barley genotypes differ in activity of soluble extracellular phosphatase and depletion of organic phosphorus in the rhizosphere soil. *Plant Soil*, 172:117-122.
- Baguma, Y. (2003). Expression patterns of the gene encoding starch branching enzyme II in the storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Science*, 164(5), 833–839.
- Ball, SG and Morell, MK. (2003). From Bacterial Glycogen to Starch: Understanding the Biogenesis of the Plant Starch Granule. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 207–233.
- Ball, S, Guan, HP, James, M, Myers, A, Keeling, P, Mouille, G, Buléon, A, Colonna, P and Preiss, J. (1996). From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell*, 86(3), 349–352. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756717>
- Balmer, Y, Vensel, WH, Cai, N, Manieri, W, Schurmann, P, Hurkman, WJ and Buchanan, BB. (2006). A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:298-2993.
- Banks, W, Greenwood, CT and Khan, KM. (1971). The interaction of linear, amylose oligomers with iodine. *Carbohydrate Research*, 17(1):25-33.
- Beebe, S, Skroch, PW, Tohme, J, Duque, MC, Pedraza, F and Nienhuis, J. (2000). Structure of Genetic Diversity among Common Bean Landraces of Middle American Origin Based on Correspondence Analysis of RAPD. *Crop Science*, 40(1), 264.
- Bernal, L. (2009). Factores involucrados en la degradación de almidón en hojas de plantas de frijol sometidas a estrés por deficiencia de fosfato. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM.
- Bernal, L, Coello, P, Acosta, J and Martínez-Barajas, E. (2007). Efecto de la deficiencia de fósforo en el metabolismo de carbono de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia*, 41, 417–423.
- Bernal, L and Martínez-Barajas, E. (2006). Una nueva visión de la degradación del almidón. *Revista del Centro de Investigación*. Universidad La Salle, 7, 77–90.

- Bernal, L, Coello, P and Martínez-Barajas, E. (2005b). Possible role played by R1 protein on starch accumulation in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris*) under phosphate deficiency. *Journal of Plant Physiology*, 162, 970-976.
- Bernal, L. (2005a). Metabolismo de carbono en genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) contrastantes en adaptación a la deficiencia de fosfato. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Bieliski, RL and Ferguson, IB. (1983). Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: Rausch C & Bucher M (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, 216:23-37.
- Bieliski, RL. (1973). Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annual Review of Plant Physiology*, 24: 225-252.
- Blauth, SL, Kim, KN, Klucinec, J, Shannon, JC, Thompson, D and Gultinan, M. (2002). Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (sbe1) in *Zea mays* L. *Plant Molecular Biology*, 48(3), 287–297.
- Blauth, SL, Yao, Y, Klucinec, JD, Shannon, JC, Thompson, DB and Gultinan, MJ. (2001). Identification of Mutator Insertional Mutants of Starch-Branching Enzyme 2a in Corn. *Plant Physiology*, 125(3), 1396–1405. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/125/3/1396>
- Blennow, A. (1991). Isolation of a Q-Enzyme with Mr 103 000 from potato tubers. *Phytochemistry*, 30(2), 437–444.
- Borisjuk, L, Rolletschek, H., Wobus, U and Weber, H. (2003). Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *Metabolism Clinical And Experimental*, 54(382), 503–512.
- Boyer, C and Preiss, J. (1981). Evidence for independent genetic control of the multiple forms of maize endosperm branching enzymes and starch synthases. *Plant Physiology*, 67(6):1141-1145.
- Boyer, C and Preiss, J. (1979). Properties of Citrate-stimulated Starch Synthesis Catalyzed by Starch Synthase I of Developing Maize Kernels. *Plant Physiology*, 64(6), 1039–1042. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC543187/>
- Boyer, C and Preiss, J. (1978). Multiple forms of (1 → 4)- α -d-glucan, (1 → 4)- α -d-glucan-6-glycosyl transferase from developing *zea mays* L. Kernels. *Carbohydrate Research*, 61(1), 321–334. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84492-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84492-4)
- Buléon, A, Colonna, P, Planchot, V and Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(2), 85–112. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730163>
- Cantarel, BL, Coutinho, PM, Rancurel, C, Bernard, T, Lombard, V and Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl 1), D233–D238.
- Chiera, J, Thomas J and Rutty, T. (2002). Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. *Journal of Experimental Botany*, 53:473481 .

- Chiou, TJ and Lin, SI. (2011). Signaling Network in Sensing Phosphate Availability in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 185–206.
- CIAT. (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (2001). Common bean: The nearly perfect food. En CIAT in Focus <http://www.ciat.cgiar.org/ciatinfocus/pdf/beanfocus.pdf>. Consultado en Diciembre de 2012.
- Ciereszko, I, Zambrzycka, A and Rychter, A. (1998). Sucrose hydrolysis in bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.) under phosphate deficiency. *Plant Science*, 133(2), 139–144.
- Coello, P. (2002). Purification and characterization of secreted acid phosphatases in phosphorus-deficient *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 116:293-298.
- Commuri, PD and Keeling, PL. (2001). Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. *The Plant Journal*, 25:475-486.
- Dale, S, Arro, M, Becerra, B, Morrice, NG, Boronat, A, Hardie, DG and Ferrer, A. (1995). Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its activation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *European Journal of Biochemistry*, 233: 506-513.
- Debouck, DG and Hidalgo, R. (1986). Morphology of the common bean plant. Study guide. CIAT, Cali, Colombia: 16–25.
- Delvallé, D, Dumez, S, Wattebled, F, Roldán, I, Planchot, V, Berbezy, P and Colonna, P. (2005). Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *The Plant Journal*, 43(3), 398–412.
- Dietz, K and Heilos, L. (1990). Carbon metabolism in spinach leaves as affected by leaf age and phosphorus and sulfur metabolism. *Plant Physiology*, 93:1219-1225.
- Dinges, JR, Colleoni, C, James, MG and Myers, AM. (2003). Mutational Analysis of the Pullulanase-Type Debranching Enzyme of Maize Indicates Multiple Functions in Starch Metabolism. *The Plant Cell*, 15(3), 666–680.
- Dinges, JR, Colleoni, C, Myers, AM and James, MG. (2001). Molecular Structure of Three Mutations at the Maize sugary1 Locus and Their Allele-Specific Phenotypic Effects. *Plant Physiology*, 125(3), 1406–1418.
- Dupont, FM. (2008). Metabolic pathways of the wheat (*Triticum aestivum*) endosperm amyloplast revealed by proteomics. *BMC Plant Biology*, 8(39), 1–19.
- Edwards, A, Fulton, DC, Hylton, C. M, Jobling, S. A, Gidley, M, Rossner, U and Martin, C. (1999). A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *The Plant Journal*, 17(3), 251–261.
- FAOSTAT. (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2012). FAO. En http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es#VISUALIZE_BY_DOMAIN. Consultado en Diciembre de 2012.
- Gallant, DJ, Bouchet, B and Baldwin, PM. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, 32(3-4), 177–191.

- Gardner, WK, Parberry, DG and Barber, DA. (1983). The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root intherphase. *Plant Soil* 68:19-32.
- Geigenberger, P, Stitt, M and Fernie, AR. (2004). Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. *Plant, Cell and Environment*, 27(6), 655–673.
- Graham, PH. (2002). Variation in di-nitrogen fixation among Andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown at low and high levels of phosphorous supply. *Field Crops Research*, 73:133-142.
- Graham, PH and Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Field Crops Research*, 53:131-146.
- Grimaud, F, Rogniaux, H, James, MG, Myers, AM and Planchot, V. (2008). Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 59(12), 3395–3406.
- Guan, HP and Keeling, PL. (1998). Starch Biosynthesis: Understanding the functions and interactions of multiple isozymes of starch synthase and branching enzyme. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 10:307-319.
- Guan, HP and Preiss, J. (1993). Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (*Zea mays*). *Plant Physiology*, 102(4), 1269–1273.
- Halford, NG, Hey, S, Jhurreea, D, Laurie, S, McKibbin, RS and Paul, MZ. (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of Experimental Botany*, 54:467-75.
- Hamada, S, Ito, H, Ueno, H, Takeda, Y and Matsui, H. (2007). The N-terminal region of the starch-branching enzyme from *Phaseolus vulgaris* L. is essential for optimal catalysis and structural stability. *Phytochemistry*, 68(10), 1367–1375.
- Hamada, S, Ito, H, Hiraga, S, Inagaki, K, Nozaki, K, Isono, N, Yoshimoto, Y, Takeda, Y and Matsui, H. (2002). Differential Characteristics and Subcellular Localization of Two Starch-branching Enzyme Isoforms Encoded by a Single Gene in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16538–16546.
- Hamada, S, Nozaki, K., Ito, H, Yoshimoto, Y, Yoshida, H, Hiraga, S and Onodera, S. (2001). Two starch-branching-enzyme isoforms occur in different fractions of developing seeds of kidney bean. *The Biochemical Journal*, 359(Pt 1), 23–34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1222118&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Han, Y, Sun, FJ, Rosales-Mendoza, S and Korban, SS. (2007). Three orthologs in rice, *Arabidopsis*, and *Populus* encoding starch branching enzymes (SBEs) are different from other SBE gene families in plants. *Gene*, 401(1-2):123-130.
- Hardie, DG, Hawley, SA and Scott, JW. (2006) AMP-activated protein kinase- development of the energy sensor concept. *The Journal of Physiology*, 1:5747-15.
- Hennen-Bierwagen, TA, Lin, Q, Grimaud, F, Planchot, V, Keeling, PL, James, MG and Myers, AM. (2009). Proteins from Multiple Metabolic Pathways Associate with Starch Biosynthetic

Enzymes in High Molecular Weight Complexes: A Model for Regulation of Carbon Allocation in Maize Amyloplasts. *Plant Physiology*, 149(3), 1541–1559.

Hennen-Bierwagen, TA, Liu, F, Marsh, RS, Kim, S, Gan, Q, Tetlow, IJ, Emes, MJ, James, MG, and Myers, AM. (2008). Starch Biosynthetic Enzymes from Developing Maize Endosperm Associate in Multisubunit Complexes. *Plant Physiology*, 146(4), 1892–1908.

Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research*, 147:342-347.

Hizukuri S, Takeda Y, Usami S and Takase, Y. (1980). Effect of aliphatic hydrocarbon groups on the crystallization of amyloextrin: model experiments for starch crystallization. *Carbohydrate Research*, 83:193-199.

Holford, ICR. (1997). Soil phosphorus: its measurement and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research*, 35:227-239.

Hoover, R. (2002). Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. *Food Chemistry*, 78(4), 489–498.

Ito, H, Hamada, S, Isono, N and Yoshizaki, T. (2004). Functional characteristics of C-terminal regions of starch-branching enzymes from developing seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 166(5), 1149–1158.

James, MG, Denyer, K and Myers, AM. (2003). Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 215–222.

Jenkins, PJ, Cameron, RE and Donald, AM. (1993). A Universal Feature in the Structure of Starch Granules from Different Botanical Sources. *Starch/Stärke*, 45(12), 417–420.

Jenner, CF. (1994). Starch Synthesis in the Kernel of Wheat Under High Temperature Conditions. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21(6):791-806.

Jeon, JS, Ryoo, N, Hahn, TR, Walia, H and Nakamura, Y. (2010). Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(6), 383–392.

Jeschke, W, Kirkby, E, Peuke, A, Pate, J and Hartung, W. (1997). Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Journal of Experimental Botany*, 48:75-91.

Jespersen, HM, Ann MacGregor, E, Henrissat, B, Sierks, MR and Svensson, B. (1993). Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: Prediction of structural features of the catalytic (β/α)-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *Journal of Protein Chemistry*, 12(6), 791–805.

Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:210-218.

Johnson, JF, Vance, CP and Allan DL. (1996). Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. *Plant Physiology*, 112:31-41.

Keeling, PL and Myers, AM. (2010). Biochemistry and Genetics of Starch Synthesis. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 271–303.

- Kempa, S, Rozhon, W, Samaj, J, Erban, A, Baluska, F, Becker, T, Haselmayer, J, Schleiff, E, Kopka, J, Hirt, H and Jonak, C. (2007) A plastid-localized glycogen synthase kinase 3 modulates stress tolerance and carbohydrate metabolism. *The Plant Journal*, 49: 1076–1090.
- Kondracka, A and Rychter, AM. (1997). The role of Pi recycling processes during photosynthesis in phosphate deficient bean plants. *Journal of Experimental Botany*, 48:1461-1468.
- Kossmann, J and Lloyd, J. (2000). Understanding and Influencing Starch Biochemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(3), 171–226.
- Kubo, A, Colleoni, C, Dinges, JR, Lin, Q, Lappe, RR, Rivenbark, JG, Meyer, AJ, Ball, SG, James, MG, Hennen-Bierwagen, TA and Myers, AM. (2010). Functions of heteromeric and homomeric isoamylase-type starch-debranching enzymes in developing maize endosperm. *Plant Physiology*, 153(3), 956–969.
- Kuriki, T, Stewart, DC and Preiss, J. (1997). Construction of chimeric enzymes out of maize endosperm branching enzymes I and II: activity and properties. *The Journal of biological chemistry*, 272(46), 28999–9004. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9360973>
- Laurie, S, McKibbin, RS and Haldford, NG. (2003). Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *Journal of Experimental Botany*, 54:739-747.
- Libessart, N and Preiss, J. (1998). Arginine Residue 384 at the Catalytic Center Is Important for Branching Enzyme II from Maize Endosperm 1 its possible role in BE . Previous chemical modification. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 360(1), 135–141.
- Liu, F, Ahmed, Z, Lee, EA, Donner, E, Liu, Q, Ahmed, R, Morell, MK, Emes, MJ and Tetlow, IJ. (2012). Allelic variants of the amylose extender mutation of maize demonstrate phenotypic variation in starch structure resulting from modified protein-protein interactions. *Journal of Experimental Botany*, 63(3), 1167–83.
- Liu, F, Makhmoudova, A, Lee, EA, Wait, R, Emes, MJ and Tetlow, IJ. (2009). The amylose extender mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *Journal of Experimental Botany*, 60(15), 4423–40.
- Liu, C, Muchhal, US, Uthappa, M, Kononowicz, AK and Raghothama, KG. (1998). Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiology*, 116:91-99.
- Lloyd, JR, Kossmann, J and Ritte, G. (2005). Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science*, 10:130-137.
- Lynch, JP and Brown, KM. (2008). Root strategies for phosphorus acquisition. *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*, (pp. 83–116). Springer Link.
- Lynch, JP and Brown, KM. (2001). Topsoil foraging-an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil*, 237:225-237.
- Lynch, JP and Beebe, SE. (1995). Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. *Hort Science*, 30:1165-1171.

- Lynch, JP, Lauchli, A and Epstein, E. (1991). Vegetative growth of tile common bean in response to phosphorus nutrition. *Crop Science*, 31:380-387.
- López-Bucio, J, Cruz-Ramirez, A and Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 280–287. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)
- MacGregor, EA, Janecek, S and Svensson, B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1546, 1–20.
- Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants (2nd ed.). San Diego CA (USA): Academic.
- Martin, C and Smith, AM. (1995). Starch Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(July), 971–985.
- Mikkelsen, R, Binderup, K and Preiss, J. (2001). Tyrosine residue 300 is important for activity and stability of branching enzyme from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(2), 372–7.
- Mimura, T. (1999). Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology*, 191:149-200.
- Mizuno, K, Kobayashi, E, Tachibana, M, Kawasaki, T, Fujimura, T, Funane, K and Kobayashi, M. (2001). Characterization of an isoform of rice starch branching enzyme, RBE4, in developing seeds. *Plant & Cell Physiology*, 42(4), 349–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11333304>
- Mizuno, K, Kawasaki, T, Shimada, H, Satoh, H, Kobayashi, E, Okumura, S and Arai, Y. (1993). Alteration of the structural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 19084–19091. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/268/25/19084.abstract>
- Morell, MK, Blennow, A, Kosar-Hashemi, B and Samuel, MS. (1997). Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. *Plant Physiology*, 113(1), 201–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=158131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Morrison, W. (1995). Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Food World*, 40:437-446.
- Morrison, WR and Laignelet, B. (1983). An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *Journal of Cereal Science*, 1(1):9-20.
- Mukerjea, R., Falconer, DJ, Yoon, SH and Robyt, JF. (2010). Large-scale isolation, fractionation, and purification of soluble starch-synthesizing enzymes: starch synthase and branching enzyme from potato tubers. *Carbohydrate Research*, 345(11), 1555–63.
- Myers, AM, Morell, MK, James, MG and Ball, SG. (2000). Recent Progress toward Understanding the Amylopectin Crystal. *Plant Physiology*, 122(4), 989–998.

- Nakamura, Y, Utsumi, Y, Sawada, T, Aihara, S, Utsumi, C, Yoshida, M and Kitamura, S. (2010). Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. *Plant & Cell Physiology*, 51(5), 776–94.
- Nakamura, Y. (2002). Towards a Better Understanding of the Metabolic System for Amylopectin Biosynthesis in Plants: Rice Endosperm as a Model Tissue. *Plant and Cell Physiology*, 43(7), 718–725.
- Nakamura, Y, Umemoto, T, Ogata, N, Kuboki, Y, Yano, M and Sasaki, T. (1996). Starch debranching enzyme (R-enzyme or pullulanase) from developing rice endosperm: purification, cDNA and chromosomal localization of the gene. *Planta*, 199(2), 209–218.
- Nielsen, TH., Wischmann B, Enevoldsen, K. and Moller, BL. (1994). Starch phosphorylation in potato tubers proceeds concurrently with de novo biosynthesis of starch. *Plant Physiology*, 105:111-117.
- Nishi, A, Nakamura, Y, Tanaka, N and Satoh, H. (2001). Biochemical and Genetic Analysis of the Effects of Amylose-Extender Mutation in Rice Endosperm. *Plant Physiology*, 127(October):, 459–472.
- Niittylä, T, Messerli, G, Trevisan, M, Chen, J, Smith, AM and Zeeman, SC. (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*, 303:87-89.
- Noguchi, J, Chaen, K, Vu, NT, Akasaka, T, Shimada, H, Nakashima, T and Nishi, A. (2011). Crystal structure of the branching enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L with implications for catalysis and substrate binding. *Glycobiology*, 21(8), 1108–1116.
- Nozaki, K, Hamada, S, Nakamori, T, Ito, H, Sagisaka, S, Yoshida, H and Takeda, Y. (2001). Major Isoforms of Starch Branching Enzymes in Premature Seeds of Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(5), 1141–1148.
- Olsen, OA. (2001). Endosperm development: cellularization and cell fate specification. *Annual Review of Plant Biology*, 52, 233–267.
- Olsen, OA, Linnestad, C and Nichols, S. (1999). Developmental biology of the cereal endosperm. *Trends in Plant Science*, 4, 253–257.
- Parra, C, Martínez-Barajas, E, Acosta, J and Coello, P. (2004). Respuesta a la deficiencia de fosfato de genotipos de frijol contrastantes en su capacidad de crecer en suelos con bajo contenido de fósforo. *Agrociencia*, 38, 131–139.
- Peñaloza, H, Carvajal, N, Corcuera and Martinez, J. (2000). Exudación de citrato y actividad de la enzima Fosfoenolpiruvato carboxilasa en raíces de lupino blanco, en respuesta a variaciones en la disponibilidad de fósforo. *Agricultura Técnica*, 60(2):89-98.
- Peng, M, Gao, M, Baga, M, Hucl, P and Chibbar, RN. (2000). Starch-Branching Enzymes Preferentially Associated with A-Type Starch Granules in Wheat Endosperm. *Plant Physiology*, 124(1):265-272.
- Pieters, AJ, Paul, MJ and Lawlor, DW. (2001). Low sink demand limits photosynthesis under Pi deficiency. *Journal of Experimental Botany*, 52:1083-1091.

- Plaxton, WC. (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Biology*, 47:185-214.
- Polge, C and Thomas, M. (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends in Plant Science*, 12:20-28.
- Preiss, J and 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, 112-138.
- Rahman, S, Regina, A, Li, Z, Mukai, Y, Yamamoto, M, Kosar-Hashemi, B, Abrahams, S and 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 Physiology*, 125(3), 1314–1324.
- Rao, IM, Freeden, AL and Terry, N. (1993). Influence of phosphorus limitation on photosynthesis, carbon allocation and partitioning in sugar beet and soybean grown with a short photoperiod. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31:223-231.
- Rausch, C and Bucher, M. (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, 216:23-37 .
- Regina, A, Kosar-Hashemi, B, Ling, S, Li, Z, Rahman, S and Morell, M. (2010). Control of starch branching in barley defined through differential RNAi suppression of starch branching enzyme IIa and IIb. *Journal of Experimental Botany*, 61(5), 1469–82.
- Regina, A, Kosar-Hashemi, B, Li, Z, Rampling, L, Cmiel, M, Gianibelli, MC and Konik-Rose, C. (2004). Multiple isoforms of starch branching enzyme-I in wheat: lack of the major SBE-I isoform does not alter starch phenotype. *Functional Plant Biology*, 31(6), 591.
- Reiland, S, Messerli, G, Baerenfaller, K, Gerrits, B, Ender, A, Grossmann, J, Gruissem, W and Baginsky, S. (2009). Large-Scale *Arabidopsis* Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. *Plant Physiology*, 150(2):889-903.
- Ritte, G, Scharf, A, Eckermann, N, Habel, S and Steup, M. (2004). Phosphorylation of transitory starch is increased during degradation. *Plant Physiology*, 135:2068-2077.
- Robin, JP, Mercier, C, Charbonnière, R and Guilbot, A. (1974). Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry*, 51:389-406.
- Robyt, JF. (2008). Starch: Structure, Properties, Chemistry, and Enzymology. *Glycoscience*, (pp. 1437–1472).
- Rolland, F, Gonzalez, EB and Sheen, J. (2006). Sugar Sensing And Signaling In Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 675–709.
- Rychter, AM and Randall, DO. (1994). The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiologia Plantarum*, 91:383-388.
- Sabelli, PA and Larkins, BA. (2009). The development of endosperm in grasses. *Plant Physiology*, 149(1), 14–26.

- Schliebner, I, Pribil, M, Zuhlke, J, Dietzmann, A and Leister, D. (2008). A survey of chloroplast protein kinases and phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Current Genomics*, 9: 184–190
- Sehnke, PC, Chung, HJ, Wu, K and Ferl, RJ. (2001). Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:765-770.
- Seo, B, Kim, S, Scott, MP, Singletary, GW, Wong, K, James, MG and Myers, AM. (2002). Functional Interactions between Heterologously Expressed Starch-Branching Enzymes of Maize and the Glycogen Synthases of Brewer's Yeast. *Plant Physiology*, 128(4), 1189–1199.
- Singh, N, Belton, PS and Georget, DMR. (2009). The effects of iodine on kidney bean starch: Films and pasting properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(2), 116–119.
- Singletary, GW, Banisadr, R and Keeling, PL. (1997). Influence of gene dosage on carbohydrate synthesis and enzymatic activities in endosperm of starch-deficient mutants of maize. *Plant Physiology*, 113:293-304.
- Smith, AM, Zeeman, SC and Smith, SM. (2005). Starch degradation. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 73–98.
- Smith, AM. (2001). The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*, 2(2), 335–341.
- Smith, AM, Denyer, K and Martin, C. (1997). The synthesis of the starch granule. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 67–87.
- Smyth, DA. (1988). Some properties of starch branching enzyme from indica rice endosperm (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 57, 1 – 8.
- Sreenivasulu, N, Borisjuk, L, Junker, BH, Mock, HP, Rolletschek, H, Seiffert, U and Weschke, W. (2010). Barley grain development toward an integrative view. *International review of cell and molecular biology*, 281(null), 49–89.
- Svegmark, K and Hermansson, AM. (1991). Distribution of amylose and amylopectin in potato starch pastes: effects of heating and shearing. *Food Structure*, 10(2), 117-129.
- Sudgen, C, Donaghy, PG, Halford, NG and Hardie, DG. (1999). Two SNF-1 related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiology*, 120:257-274.
- Szydowski, N, Ragel, P, Hennen-Bierwagen, TA, Planchot, V, Myers, AM, Mérida, Á and D'Hulst, C. (2011). Integrated functions among multiple starch synthases determine both amylopectin chain length and branch linkage location in *Arabidopsis* leaf starch. *Journal of Experimental Botany*, 1–13.
- Takashima, Y, Senoura, T, Yoshizaki, T, Hamada, S, Ito, H and Matsui, H. (2007). Differential Chain-Length Specificities of Two Isoamylase-Type Starch-Debranching Enzymes from Developing Seeds of Kidney Bean. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(9), 2308–2312.

- Takeda, Y, Guan, HP and Preiss, J. (1993). Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydrate Research*, 240, 253–263.
- Tatge, H, Marshall, J, Martin, C, Edwards, EA and Smith, AM. (1999). Evidence that amylose synthesis occurs within the matrix of the starch granule in potato tubers. *Plant, Cell & Environment*, 22(5), 543–550.
- Tetlow, IJ. (2011). Starch biosynthesis in developing seeds. *Seed Science Research*, 21(01), 5–32.
- Tetlow, IJ, Beisel, KG, Cameron, S, Makhmoudova, A, Liu, F, Bresolin, NS, Wait, R, Morell, MK and Emes, MJ. (2008). Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiology*, 146(4), 1878–91.
- Tetlow, IJ. (2006). Understanding storage starch biosynthesis in plants: a means to quality improvement. *Canadian Journal of Botany*, 84, 1167–1185.
- Tetlow, IJ, Wait, R, Lu, Z, Akkasaeng, R, Bowsher, CG, Esposito, S, Kosar-Hashemi, B, Morell, MK and Emes, MJ. (2004a). Protein Phosphorylation in Amyloplasts Regulates Starch Branching Enzyme Activity and Protein – Protein Interactions. *The Plant Cell*, 16(3), 694–708.
- Tetlow, IJ, Morell, MK. and Emes, MJ. (2004b, October). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), 2131-2145.
- Theodorou, ME and Plaxton, WC. (1993). Metabolic Adaptations of Plant Respiration to Nutritional Phosphate Deprivation. *Plant Physiology*, 101, 339–344. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/101/2/339.full.pdf>
- Theodorou, ME, Elrifi, IR, Turpin, DH and Plaxton, WC. (1991). Effects of Phosphorus Limitation on Respiratory Metabolism in the Green Alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology*, 95, 1089–1095. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/95/4/1089.full.pdf>
- Thitisaksakul, M, Jiménez, RC, Arias, MC and Beckles, DM. (2012). Effects of environmental factors on cereal starch biosynthesis and composition. *Journal of Cereal Science*, 56(1), 67–80.
- Tiessen, A, Prescha, K, Branscheid, A, Palacios, N, McKibbin, R, Halford, NG and Geigenberger, P. (2003). Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separated sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal*, 35:490-500.
- Tofiño, A, Fregene, M, Ceballos, H and Cabal, D. (2006). Regulación de la biosíntesis del almidón en plantas terrestres: perspectivas de modificación. *Acta Agronómica*, 55(1), 1-18.
- Toroser, D, Plaut, Z and Huber, SC. (2000). Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiology*, 123:403-412.
- Usuda, H and Shimogawara, K. (1991). Phosphate deficiency in Maize. 1. Leaf phosphate status, growth, photosynthesis and carbon partitioning. *Plant Cell Physiology*, 32:497-504.

- Utsumi, Y, Utsumi, C, Sawada, T, Fujita, N and Nakamura, Y. (2011). Functional Diversity of Isoamylase Oligomers: The ISA1 Homo-Oligomer Is Essential for Amylopectin Biosynthesis in Rice Endosperm. *Plant Physiology*, 156(1), 61–77.
- Van der Maarel, MJE, Van der Veen, B, Uitdehaag, JC, Leemhuis, H and Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137–155.
- Vance, CP, Uhde-Stone, C and Allan, DL. (2003). Phosphorus Acquisition and Use: Critical Adaptations by Plants for Securing a Nonrenewable Resource. *New Phytologist*, 157(3), 423–447. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/pdfplus/1514050.pdf?acceptTC=true>
- Vandeputte, G and Delcour, J. (2004). From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 58(3), 245–266.
- Vargas, WA., Pontis, HG and Salerno, GL. (2007). New insights on sucrose metabolism: evidence for an active A/N-Inv in chloroplasts uncovers a novel component of the intracellular carbon trafficking. *Planta*, 227(4), 795–807.
- Vos-Scheperkeuter, GH, De Wit, JG, Ponstein, AS, Feenstra, WJ and Witholt, B. (1989). Immunological Comparison of the Starch Branching Enzymes from Potato Tubers and Maize Kernels. *Plant Physiology*, 90(1), 75–84. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1061680&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vu, NT, Shimada, H, Kakuta, Y, Nakashima, T, Ida, H, Omori, T and Nishi, A. (2008). Biochemical and Crystallographic Characterization of the Starch Branching Enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(11), 2858–2866.
- Walker, GJ and Builder, JE. (1971). Metabolism of the Reserve Polysaccharide of *Streptococcus mitis*. Properties of Branching Enzyme, and its Effect on the Activity of Glycogen Synthetase. *European Journal of Biochemistry*, 20(1), 14–21.
- Weber, H, Borisjuk, L and Wobus, U. (2005). Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 253–279.
- Weber, H, Golombek, S, Heim, U, Rolletschek H, Gubatz, S and Wobus, U. (2000). Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds of *Vicia narbonensis* moderately decreases starch but increases protein content and affects seed maturation. *The Plant Journal*, 24:33-43.
- Weber, H, Borisjuk, L and Wobus, U. (1997). Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science*, 2(5), 69–74.
- Xia, H, Nelson, MY, Thompson, D and Guiltinan, M. (2011). Deficiency of maize starch-branching enzyme i results in altered starch fine structure, decreased digestibility and reduced coleoptile growth during germination. *BMC Plant Biology*, 11(1).
- Yamanouchi, H and Nakamura, Y. (1992). Organ Specificity of Isoforms of Starch Branching Enzyme (Q-Enzyme) in Rice. *Plant and Cell Physiology*, 33(7), 985–991. Retrieved from <http://pcp.oxfordjournals.org/content/33/7/985.abstract>

- Yao, Y, Thompson, DB and Gultinan, MJ. (2004). Maize Starch-Branching Enzyme Isoforms and Amylopectin Structure. In the Absence of Starch-Branching Enzyme IIb, the Further Absence of Starch-Branching Enzyme Ia Leads to Increased Branching. *Plant Physiology*, 136(3), 3515–3523.
- Zeeman, SC, Kossmann, J and Smith, AM. (2010). Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 209–234.
- Zeeman, SC. (2008). Starch Granule Biosynthesis in Arabidopsis Is Abolished by Removal of All Debranching Enzymes but Restored by the Subsequent Removal of an Endoamylase. *Society*, 20(December), 3448–3466.
- Zeeman, SC, Tiessen, A, Pilling, E, Kato, KL, Donald, AM and Smith, AM. (2002). Starch Synthesis in Arabidopsis. Granule Synthesis, Composition, and Structure. *Plant Physiology*, 129(June), 516–529.