



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL

ZAIDÍN (CSIC)



**Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólica:
importancia en la síntesis y distribución
de carbohidratos en plantas**



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR (B16.56.1)**

TESIS DOCTORAL
José Antonio Rojas González
Granada, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José Antonio Rojas González
ISBN: 978-84-1306-374-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/58142>

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) de Granada, perteneciente a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, gracias a la concesión de los contratos.

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes Congresos Científicos:

XVIII CONGRESS OF THE FEDERATION OF EUROPEAN SOCIETIES OF PLANT BIOLOGY: Celebrado del 4 al 9 de julio de 2010 en Valencia (España). Participación con poster titulado: “PLANT DEFICIENTS IN FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE (FBPASA) ISOFORMS INDUCE CHANGES IN CARBOHYDRATE BIOSYNTHESIS AND DRISTRIBUTION”. P05-044.

15th International Congress of Photosynthesis: Celebrado del 22 al 27 de agosto de 2010 en Beijing (China). Participación con poster titulado: “Plants deficient in fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) isoforms undergo changes in photosynthesis, carbohydrate distribution and gene expression”. PS10.10

XXXIV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR: Celebrado del 5 al 8 de septiembre de 2011 en Barcelona (España). Participación con poster titulado: “LAS ISOFORMAS CLOROPLASTÍDICA Y CITOSÓLICA DE FRUCTOSA-1-6-BIFOSFATASA (FBPASA) SON CLAVE EN LA FORMACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS”. P08-6

XXXIV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR: Celebrado del 5 al 8 de septiembre de 2011 en Barcelona (España). Participación con poster titulado: “Análisis transcriptómico y proteómico en plantas deficientes en isoformas de la fructosa-1,6-bisfosfatasa”. P08-1

XI Reunión de Biología Molecular de Plantas: Celebrado del 14 al 16 de junio de 2012 en Segovia (España). Participación con poster titulado: “CFBP2 una de las dos isoformas de FBPassa plastidial, es importante para la organogénesis de la raíz y necesaria en el desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana*”. COM-07-02

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular: Celebrado del 9 al 12 de septiembre de 2014 en Granada (España). Participación con poster titulado: “Análisis proteómico en plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes en las tiorredoxinas f y m plastidiales”. P08-3

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular: Celebrado del 9 al 12 de septiembre de 2014 en Granada (España). Participación con poster

titulado: “Efecto sobre la fotosíntesis y la acumulación de azúcares en frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) de la reducción de los niveles de las isoformas *cFBP1* y *cyFBP* de FBPassa. P08-24

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular: Celebrado del 9 al 12 de septiembre de 2014 en Granada (España). Participación con comunicación y poster titulados: “La interrupción de la función de las fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólica induce cambios metabólicos que afecta todos los procesos en plantas de *Arabidopsis thaliana*”. P08-26

Así mismo, parte de los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos:

José A. Rojas-González, Mauricio Soto-Suárez, Ángel García-Díaz¹, María C. Romero-Puertas, Luisa M. Sandalio, Ángel Mérida, Ina Thormählen, Peter Geigenberger, Antonio J. Serrato and Mariam Sahrawy. 2015. Disruption of both chloroplastic and cytosolic FBPassa genes results in a dwarf phenotype and important starch and metabolite changes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*.

Mauricio Soto-Suárez, Antonio J. Serrato, **José A. Rojas-González**, Rocío Bautista and Mariam Sahrawy. 2016. Transcriptomic and proteomic approach to identify differentially expressed genes and proteins in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking chloroplastic 1 and cytosolic FBPasses reveals several levels of metabolic regulation. *BMC Plant Biology*.

Igualmente los resultados obtenidos en esta Tesis han sido la base para la solicitud de la patente que tiene por título: Método para la determinación *in situ* de actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del carbono en plantas. Con número de solicitud: P201630594

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólíca: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

ABREVIATURAS

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólíca: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

ABREVIATURAS

2-Cys PRX: 2-Cys peroxirredoxina

A: Absorbancia (densidad óptica)

ADP: Adenosín difosfato

AMP: Adenosín monofosfato

A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*

A. tumefaciens: *Agrobacterium tumefaciens*

ATP: Adenosín trifosfato

β ME: β -mercapto etanol

ADNc: ADN complementario

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADN-T: ADN de transferencia

AGP: ADP-glucosa pirofosforilasa

ARN: Ácido ribonucleico

cFBPasa1: Fructosa-1,6-bifosfatasa cloroplastídica 1

cyFBPasa: Fructosa-1,6-bifosfatasa citosólica

DAB: 3,3'-diaminobencidina

dNTPs: Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato

D.O.: Densidad óptica

Dpg: Días post-germinación

Dpi: Días post-imbibición

DTT: Ditioneitol

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilén diamina tetraacético

FBP: Fructosa-1,6-bisfosfato

FBPasa: Fructosa-1,6-bisfosfatasa

Fd : Ferredoxina

FNR: Ferredoxina NADP reductasa

FPLC: Cromatografía rápida de proteínas

Fv/Fm: Eficiencia fotosintética

FTR: Ferredoxina tiorredoxina reductasa

G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GFP: Proteína verde fluorescente (siglas del inglés)

g: gramos

GUS: _-Glucuronidasa

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GRX: Glutarredoxina

h: horas

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxyetil) piperacina-1-etanosulfónico

HXK: Hexoquinasa

INV: Invertasa

IPTG: Isopropil tiogalactósido

kDa: kilodalton

KO: *Knock-out*

l: litro

LB (medio)/LBA: Medio Luria-Bertani líquido/sólido

LHC: Complejo recolector de luz (siglas del inglés)

M: molar

MDAR: Monodehidroascorbato reductasa

MES: Ácido o 4-morfolinoetanosulfónico

mg: miligramos

ng: nanogramos

µg: microgramos

min: minutos

mM: milimolar

mm: milímetros

ml: mililitros

MS (medio): Medio Murashige and Skoog

NADPH/NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, formas reducida y oxidada

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotido difosfato, forma reducida

NADP⁺-MDH: Malato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺

NBT: Nitroazul de tetrazolio (Siglas del inglés)

nm: nanómetro

NTR: NADPH-tiorredoxina reductasa

NTRC: NADPH-tiorredoxina reductasa C

OPP: Vía oxidativa de las pentosas fosfato (siglas del inglés)

PAR: Radiación fotosintéticamente activa (siglas del inglés)

pb : Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (siglas del inglés)

PDI: Proteína disulfuro isomerasa

PGI: Fosfoglucoisomerasa

PK: Piruvato kinasa

PRK: Fosforribulokinasa

p/v: peso/volumen

PS: Fotosistema

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR: Reacción de retrotranscripción seguida de PCR

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

SBPasa: Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa

SDS: Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con SDS (siglas del inglés)

-SH: Grupo tiol

SOD: Superóxido dismutasa

SRX: Sulfirredoxina

TBE: Tampón Tris-Borato-EDTA

tBHP: Terc-butilo hidroperóxido

TCA: Ácido tricloroacético

T_m: Temperatura media de hibridación (siglas del inglés)

Tris: Tris-hidroximetil-aminometano

TRX: Tiorredoxina. Para las TRXs de Arabidopsis se utilizará indistintamente AtTRX o TRX.

U: Unidad enzimática

v/v: volumen/volumen

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-_β-D-galactopiranosido

ÍNDICE

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólíca: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	3
1. FOTOSÍNTESIS	3
2. PIGMENTOS	3
3. CICLO DE CALVIN	4
4. FRUCTOSAS-1,6-BISFOSFATASA	5
4.1 Características generales	5
4.2 Estructura de las FBPasas	6
4.3 Isoformas de fructosa-1,6-bisfosfatasa en plantas	7
4.4 Funciones generales de las FBPasas	8
4.5 Mecanismos de regulación de las FBPasas	10
5. PRODUCCIÓN DE SACAROSA Y ALMIDÓN EN PLANTAS	18
5.1 Carbono, dióxido de carbono	20
5.2 Sacarosa	20
5.3 Almidón	21
6. IMPORTANCIA DE <i>Arabidopsis thaliana</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL	23
7. CLOROPLASTOS	25
7.1 Caracterización de los estomas	25
II. OBJETIVOS	29
1. Objetivo general	29
2. Objetivos específicos	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS	33

1. MATERIAL VEGETAL.	33
2. OBTENCIÓNM DE LÍNEAS MUTANTES	34
3. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA.	37
4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.	48
5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	50
6. ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	51
7. ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS.	54
8. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN ARABIDOPSIS.	55
9. SOFTWARE.	59
IV. RESULTADOS	63
1. Aislamiento de los mutantes de inserción de ADN-T y análisis de la pérdida de función	63
2. Caracterización fisiológica.	64
3. Caracterización del sistema antioxidante en Arabidopsis	101
4. Análisis metabólico	106
V. DISCUSIÓN	127
VI. CONCLUSIONES	135
VII. BIBLIOGRAFÍA	139

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólíca: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

I. INTRODUCCIÓN

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólíca: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

I. INTRODUCCIÓN

1. FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis es el proceso de almacenaje de energía solar más relevante en la tierra y es la fuente de toda nuestra alimentación y de la mayoría de nuestros recursos energéticos. Las plantas al realizar la fotosíntesis, sostienen virtualmente toda la vida en el planeta tierra, proporcionando el oxígeno que respiramos y la comida que comemos; al formar la base de las cadenas alimenticias globales y proporcionarla mayoría de la energía actual que la humanidad necesita a través de las fuentes de energía fósiles. Es previsible que la población incremente en los próximos años, convirtiendo la fotosíntesis en uno de las áreas más estudiadas. El proceso de la fotosíntesis en plantas está basado en una serie de reacciones que ocurren en el cloroplasto y comprende el cambio de agua a oxígeno (O_2), protones y electrones y dióxido de carbono (CO_2) a azúcares. El mecanismo completo de la fotosíntesis se compone de dos partes diferenciadas aunque conectadas entre sí. Comienza la fase luminosa, en la que se produce la síntesis de ATP o fosforilación (adenosíntrifosfato) a la vez que se genera poder reductor NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Durante esta fase luminosa tiene lugar la fotólisis del agua generándose O_2 , protones (H^+) y electrones (e^-).

2. PIGMENTOS

La fotosíntesis comienza con la absorción de la luz por pigmentos moleculares localizados en la membrana tilacoidal. El más conocido de todos ellos es la clorofila, pero hay también carotenoides. Estos pigmentos tienen en común en sus estructuras químicas unas series alternantes de carbono aislado y dobles enlaces, que forman un sistema conjugado, el sistema electrón. La variedad de pigmentos que se presentan en cada tipo de organismo fotosintético refleja la luz ambiental en el cual el organismo dado vive; las plantas de tierra como Arabidopsis, contienen clorofilas a y b y carotenoides como beta-caroteno, luteína, zeaxantina, violaxantina, anteraxantina y neoxantina. La clorofila absorbe la luz roja y azul y por ello es de color verde, mientras que los carotenoides absorben luz sólo en el espectro azul y de ahí que aparezcan en tonalidades amarillas o rojas, los colores más obvios en el otoño ya que la clorofila es el primer pigmento en ser degradado en las hojas caducas (Johnson, 2016).

3. CICLO DE CALVIN

El NADPH y el ATP, proporcionan el poder reductor y la energía necesaria para fijar el CO₂ atmosférico para la biosíntesis de carbohidratos. De entre ellos, la sacarosa y el almidón son los principales productos finales, y sus funciones son esenciales para el desarrollo de la planta (Geigenberger, 2011a). La tasa de fijación neta de CO₂ determina la tasa de síntesis de almidón y sacarosa. El ciclo de reducción de carbono fotosintético (el ciclo de Calvin-Benson) es responsable de la formación de estos carbohidratos después de la fijación y reducción del CO₂ atmosférico, siendo los primeros metabolitos intermedios importantes los triosa-fosfatos (TP).

En las plantas C₃ el CO₂ es fijado en el cloroplasto durante el ciclo reductor de las pentosas fosfato o ciclo de Benson-Calvin (CC), que consiste en trece reacciones catalizadas por once enzimas, conduciendo a la producción de las triosas fosfato (TP). Una fracción de estas triosas fosfato es usada para producir ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) para la regeneración del CC y el resto puede ser exportada al citosol para la síntesis de sacarosa, o almacenada transitoriamente dentro del cloroplasto de las hojas en forma de almidón, siendo crucial mantener un equilibrio entre la exportación y la regeneración de TP de modo que el ciclo no se agote en los pasos intermedios (Woodrow y col, 1988).

En las plantas terrestres, los principales órganos de fotosíntesis son las hojas, éstas han evolucionado hasta exponer el área más grande de tejido verde para la luz y entrada de CO₂ a la hoja a través de los estomas, el tamaño de la apertura de los estomas es variable y está regulado por un par de células guarda, que responden a la presión turgente (contenido de agua) de la hoja, de ahí que cuando la hoja se hidrata, el estoma puede abrirse para permitir el paso de CO₂. Por el contrario, cuando el agua resulta escasa, las células guarda pierden la presión turgente y se cierran, evitando pérdida de agua a través de la transpiración de la hoja (Johnson, 2016).

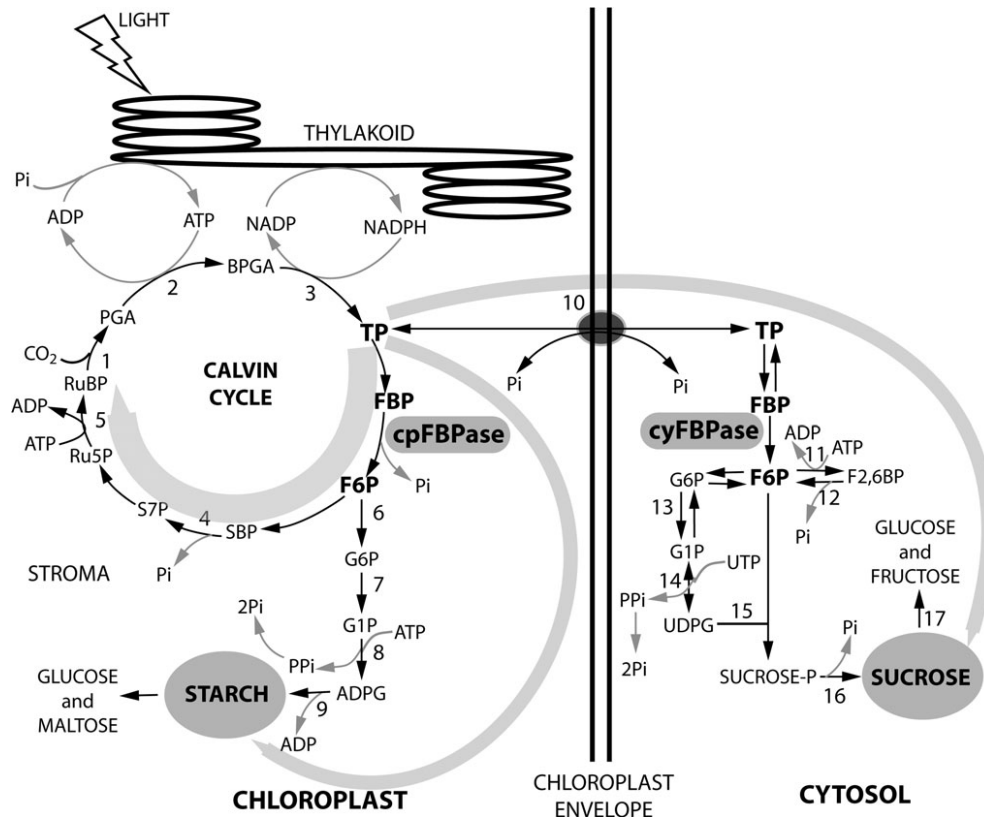


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de Calvin y la ruta de biosíntesis de sacarosa de plantas. Fosfato inorgánico (Pi), adenosín difosfato (ADP), adenosín trifosfato (ATP), nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADP), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), 1,3-bisfosfato-glicerato (BPGA), triosa fosfato (TP), fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), fructosa-6-fosfato (F6P), glucosa-6-fosfato (G6P), glucosa-1-fosfato (G1P), glucosa adenosina difosfato (ADPG), pirofosfato (PPi), sedoheptulosa-1,7-bisfosfato (SBP), sedoheptulosa-7-fosfato (S7P), ribulosa-5-fosfato (Ru5P), ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), fosfoglicerato (PGA), uridina trifosfato (UTP), uridina difosfato glucosa (UDPG), fructosa 2,6-bisfosfato (F2,6BP).

4. FRUCTOSAS-1,6-BISFOSFATASA

4.1 Características generales

Por condensación, las TPs forman fructosa-1, 6-bisfosfato (F1,6BP) que se utiliza para sintetizar almidón en el cloroplasto y sacarosa en el citosol. La fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) cataliza la descomposición de F1,6BP en fructosa-6-fosfato (F6P) y fosfato inorgánico (Pi) (Zimmermann et al., 1976). Esta reacción conlleva una liberación de energía elevada que la hace irreversible. Hasta el momento, se han descrito tres FBPasas en la célula vegetal, la enzima citosólica (cyFBP) que está implicada en la síntesis de sacarosa y la gluconeogénesis (Cséke y Buchanan, 1986) y otras dos isoformas cloroplastídicas (cFBP1 y cFBP2) (Serrato et al. 2009b; Serrato et al., 2009a). La FBPasa cloroplastídica (cFBP1; EC 3.1.3.11) es una enzima clave de la vía de Calvin-Benson y participa en la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) y la vía de síntesis del

almidón, mientras la isoforma citosólica (cyFBPasa) ocupa un lugar limitante en la síntesis de sacarosa, y está regulada por fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) y adenosín monofosfato (AMP). En el cloroplasto, la isoforma cFBP1 está involucrada en la formación de almidón y es activada por luz debido a un aumento del pH y concentración de Mg^{2+} y por reducción de puentes disulfuro de su dominio redox vía tiorredoxinas (TRX) (Jacquot y col, 1995, 1997; Hermoso y col, 1996; Chen y Xu, 1996; Jaramillo y col, 1997; Chiadmi y col, 1999; Wangensteen y col, 2001; Cazalis y col, 2004). La segunda isoforma del cloroplasto, cFBP2 (Serrato y col, 2009), no contiene en su secuencia el dominio redox y es resistente a la inactivación por H_2O_2 .

Aún no está descrita de forma específica la función de cFBP2. El árbol filogenético ordena la FBPasa cloroplastídica y FBPasa citosólica en grupos separados (Lee y Hahn, 2003) guardando una identidad del 50% aunque ambas comparten el mismo centro catalítico.

4.2 Estructura de las FBPasas

La FBPasa es una enzima homotetrámera de alrededor de 160 kDa (Ke, Zhang y Lipscomb, 1990). Desde el punto de vista de la estructura primaria, las FBPasas citosólicas muestran sobre un 80% de identidad entre ellas. Este valor aumenta hasta el 80-90 % en las FBPasas cloroplastídicas (Lloyd y col, 1991). La enzima citosólica y cloroplastídica muestran estructuras terciarias muy similares. Ambas isoformas, cyFBP y cFBP1, son homotetrámeros de 340-360 aminoácidos y tienen una masa molecular de aproximadamente 40 kDa por subunidad (Ke y col, 1989; Chiadmi y col, 1999). El extremo terminal de cada subunidad (150-200 aminoácidos) soporta cinco α -hélices y ocho β -hojas, siendo el sitio de unión del adenosín monofosfato (AMP) de la enzima citosólica. El extremo carboxilo, los 130-200 residuos restantes, contiene cuatro α -hélices y cinco β -hojas. La cyFBP comparte aproximadamente el 50% de identidad con la cFBP1 y presenta una estructura terciaria similar, con excepción de una secuencia adicional de 20-30 aminoácidos en el dominio regulador de la enzima plastídica cFBP1 (llamado lazo "170"), que contiene tres cisteínas, dos de ellas pueden formar enlaces disulfuro que pueden ser reducido por las tiorredoxinas plastidiales *f* (TRX *f*) durante la activación de la luz (Chiadmi y col, 1999).

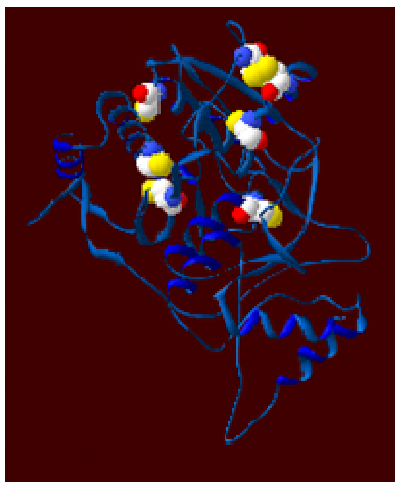


Figura --. Estructura terciaria de la cFBP1.

Dejando a un lado las diferentes localizaciones de ambas isoformas, las actividades enzimáticas de estas FBPasas son inhibidas de manera diferencial por AMP y fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP), un fosfato azucarado similar a la FBP produciendo competitividad (cFBP1) o inhibición alostérica (cyFBP) (Cadet y col, 1987). La nueva isoforma cFBP2 carece del bucle 170 en su secuencia, no está regulada redox por TRX f y la afinidad por el sustrato FBP es 6.6 veces menor que la de cFBP1 (Serrato et al., 2009b; Serrato et al., 2009a). La actividad isoforma citosólica es inhibida por un exceso de sustrato y muestra inhibición alostérica por adenosín monofosfato (AMP) y fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP). La cFBP y la sacarosa fosfato sintasa (SPS) se consideran sitios principales para controlar la síntesis de sacarosa (MacRae y Lunn, 2006). Además, el pirofosfato: fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa (PFP), que cataliza la interconversión reversible de F6P y F1,6BP también se considera un importante punto regulador del metabolismo primario del carbono hacia la glucólisis o la gluconeogénesis en el citosol (Nielsen y Stitt, 2001).

4.3 Isoformas de fructosa-1,6-bisfosfatasa en plantas

Como se ha referido anteriormente, existen dos isoformas de FBPasa en las células fotosintéticas. La isoforma citosólica (cyFBPasa), clave en la ruta de biosíntesis de sacarosa, cataliza la primera reacción irreversible en la conversión de triosa fosfato a sacarosa (Daie, 1993). Esta es inhibida por exceso de sustrato y muestra una inhibición alostérica por AMP y fructosa-2,6-bisfosfato (Stitty col, 1984). La segunda isoforma de FBPasa está limitada al cloroplasto cFBP1, donde juega un papel clave en la regulación de la asimilación del CO₂. Asimismo, además de en plantas, está presente en otros

organismos fotosintéticos como cianobacterias (Crawford y col, 1984), algas verdes (Grotjohann, 1993) y líquenes (Brown y Kershaw, 1986). A diferencia de la cyFBP, esta isoforma no es inhibida por los metabolitos que inhiben a cyFBP y es saturada a mayores concentraciones de sustrato (Baier y Latzko 1975). Existen algunas revisiones donde puede encontrarse información detallada sobre su regulación y mecanismo enzimático como: Ruelland y Miginac-Maslow (1999), Mestres-Ortega y Meyer (1999), Dai y col. (2000) y Schürmann y Jacquot (2000).

En el año 2009, Serrato y col. describieron una tercera isoforma cloroplastídica de FBPassa en fresa (*Fragaria x ananassa*), que denominaron como cFBPassa2. Esta nueva isoforma carece del lazo regulador redox presente en la otra enzima del cloroplasto y no es activada por la reducción de ningún puente disulfuro adicional presente en su estructura, y es, a diferencia de cFBP1, más resistente a la inactivación por H₂O₂. Se han realizado experimentos de inmunolocalización en cortes transversales de hojas de fresa y de *Arabidopsis* que han confirmado la localización de la nueva enzima en el estroma de cloroplastos. Varios estudios han mostrado que los respectivos mecanismos de regulación de las distintas isoformas y su influencia en el metabolismo y la fotosíntesis de la planta es una consecuencia de la compartimentalización subcelular de los organismos fotosintéticos eucariotas.

4.4 Funciones generales de las FBPassas

La enzima citosólica (cyFBP) está involucrada en la síntesis de sacarosa y gluconeogénesis (Stitt y col, 1986) y las otras dos isoformas cloroplastídicas (cFBP1 y cFBP2) fueron encontradas en eucariotas fotosintéticos (Serrato y col, 2009a; Serrato y col, 2009b). En *Fragaria x ananassa*, las dos enzimas plastidiales guardan un 40% de identidad, mientras que cyFBP mantiene un 50% y un 37% aproximadamente de identidad con cFBP1 y cFBP2 respectivamente (Serrato y col, 2009a). En el cloroplasto, cFBP1 está directamente involucrada en la regeneración de la ribulobisfosfato y en la síntesis de almidón. Tras lo cual es sintetizada y degradada por una kinasa-fosfatasa, que a su vez está regulada alostéricamente por la fosforilación de proteínas (Haztfel y col, 1990; Jang y col, 2003). La fructosa-1,6-bisfosfatasa citosólica y la sacarosa fosfato sintasa (SPS) están consideradas las más importantes para el control de la síntesis de sacarosa (Lunn y col, 2006).

Se han llevado a cabo un considerable número de investigaciones para demostrar el papel clave de estas enzimas en el control de la biosíntesis y distribución de los carbohidratos en células vegetales. En los últimos años, mediante el uso de diversos enfoques transgénicos en diferentes especies de plantas, se han analizado las funciones del cloroplasto y las FBPasas citosólicas en este contexto, para entender el papel de cada una de las enzimas en el equilibrio del ratio almidón/sacarosa en plantas. Se ha demostrado que las plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan cFBP1 de guisantes en antisentido disminuyen el nivel de transcripción endógena sin afectar al fenotipo pero provocando un aumento en el área de la hoja y el contenido en sacarosa y por tanto en el desarrollo de la planta (Sahrawy col, 2004). Anteriormente plantas de patata (*Solanum tuberosum*) y de tomate (*Solanum lycopersicum*) fueron genéticamente manipuladas para disminuir la expresión de cFBP1. Las plantas de patata que presentaban una disminución del 15% de la actividad de cFBP1 inducían una importante disminución de la fotosíntesis provocando una disminución en el contenido de almidón, y por tanto, de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa (Kobmann col, 1994). La misma inhibición de cFBP1 en plantas de tomate mostraba cambios insignificantes en el contenido de carbohidratos, pero un menor tamaño en plantas de tomate. Lo cual sugiere un papel específico de la isoforma cloroplastídica en tejidos fotosintéticos (Obiadalla-Aliy col, 2004).

Una inhibición del 80% de la cFBP1 de patata en plantas de tabaco dio lugar a una fuerte inhibición de la fotosíntesis sin afectar el contenido en sacarosa ni el crecimiento de la planta (Zrennery col, 1996). Otros estudios revelaron que las plantas de *Arabidopsis* con la expresión de cyFBP disminuida provocaban una reducción de la fotosíntesis y la síntesis de sacarosa y a mayores índices de contenido de almidón (Sharkey col, 1992; Zrennery col, 1996; Strandy col, 2000). Analizando las tres isoformas de FBPasas en frutos desarrollados de fresa, donde la síntesis y acumulación de azúcar son particularmente importantes, Serrato y col. (2009) detectaron un aumento notable en la expresión de cyFBP al final de la maduración del fruto. Esta situación es compatible con el incremento del contenido de azúcares solubles mayoritarios en frutas. Por el contrario, la cFBP1 fotosintética estuvo presente en los pasos previos a la maduración de la planta, conectando su función con el proceso fotosintético. Cho y Yoo (2011) han observado que el gen FINS1 de *Arabidopsis* similar a cyFBP puede formar parte de las rutas de señalización por fructosa. Sin embargo, la investigación que usa la

estrategia del antisentido ha dado lugar a una mayor confusión en relación a como los cambios en la expresión de la FBPa afectan a la síntesis y distribución de la sacarosa y el almidón debido a que estos resultados dependieron de las especies de plantas genéticamente manipuladas, el nivel de represión o sobreexpresión del gen seleccionado (FBPa cloroplastídica y citosólica) (Sharkey et al., 1992; Strand et al., 2000; Zrenner et al., 1996) y el tejido (hoja) u órgano analizado (fruta o tubérculo) (Obiadalla-Ali et al., 2004). Además los estudios sobre los papeles individuales sobre las isoformas de la FBPa en la fotosíntesis de la planta son escasos. La mayoría de los datos informaron sobre la tasa de fotosíntesis, el contenido de almidón y sacarosa y fenotipos generales.

4.5 Mecanismos de regulación de las FBPasas

- Activación redox mediada por TRX *f* de la isoforma cloroplastídica cFBP1

A principios de los años 80 Leegood y Walker (1980) hallaron que la actividad cFBP1 era varias veces superior tras estar sometida a iluminación, sobre todo en presencia de sustrato (Laingy col, 1981). A partir de esta observación y sobre la base de algunos resultados previos se sugirió que la actividad de cFBP1 era regulada por la disponibilidad de electrones que le proporcionaba un mecanismo de modulación como el sistema ferredoxina-tiorredoxina descubierto por el grupo de Buchanan en el año 1977 (Holmgreny col, 1977).

Las TRXs son unas proteínas de 14 kDa que se encuentran en todos los organismos vivos y están implicadas en multitud de procesos de oxidorreducción que tienen lugar en plantas, localizándose en el citosol, las mitocondrias, el núcleo y los cloroplastos. Una clasificación general de éstas se realiza precisamente en base a su localización subcelular, existiendo en el cloroplasto TRXs del tipo *f*, *m*, *x* e *y*. Todas ellas tienen un sitio activo constituido por dos cisteínas separadas por dos aminoácidos conservados y encargadas de reducir los puentes disulfuro en proteínas diana. Se sabe que las TRXs cloroplastídicas regulan directamente además de a la cFBP1, a otras enzimas que participan en el metabolismo carbonado e indirectamente otros procesos relacionados, como son el metabolismo del nitrógeno y la síntesis de lípidos.

Por todo ello, se puede deducir que estas oxidoreductasas participan en casi todas las etapas del desarrollo de las plantas. Las TRXs *f* y *m* son conocidas por regular enzimas

del CC (Lemaire y col, 2007). La cFBP1 es activada por la TRX *f*, mientras que la TRX *m* activa la malato deshidrogenasa (MDH), dos enzimas clave del metabolismo carbonado (Chueca y col, 2002). En este sentido, Hodges y col. (1994) mostraron que la TRX *f* muestra una capacidad de activación más alta que TRX *m* en la activación de la cFBP1.

Además de la cFBP1, varias enzimas del ciclo de Calvin (CC) han sido descritas como dianas de las TRXs, como son la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (SBPasa), NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP-G3P deshidrogenasa), ribulosa-5-fosfato kinasa (Ru5P kinasa), y Rubiscoactivasa (Lemaire y col, 2007). Aunque el mecanismo de la regulación redox por TRX es común para las enzimas del CC, los cambios conformacionales que provoca son específicos para cada diana. La FBPasa cloroplastídica, probablemente, se originó por duplicación de una antigua isoforma citosólica (Martin y col, 1996) y por la posterior inserción de aproximadamente 20 amino ácidos (aa), del lazo “170” rico en cargas negativas (Villerety col, 1995). Este dominio regulador contiene tres cisteínas (en posiciones 153, 173 y 178 para la enzima de guisante) implicadas en la modulación redox de su actividad enzimática (Jacquot y col. 1997).

La oxidación del lazo por formación de puentes disulfuro entre Cys153 y Cys173 tiene un efecto alostérico, dificultando la unión catalítica del Mg^{2+} y, en consecuencia, la inactivación de la enzima in vivo a las concentraciones estromáticas a las que se encuentra este catión (Chiadmiy col, 1999; Dai y col, 2000). Este mecanismo regulador parece conservado en las FBPasas de cianobacterias, que exponen dos cisteínas residuales conservadas (Kanekey col, 1996) potencialmente asociadas en la regulación disulfuro vía TRXs. Sin embargo, la base estructural de la modulación redox ha sido objeto de discusión en varias ocasiones. Por la cercanía en la estructura primaria de Cys178 y Cys173 se ha propuesto que pudieran estar unidas por un puente regulador disulfuro (Banasy col, 1988; Jacquot y col, 1995). Sin embargo, los datos de cristalografía han mostrado que las cisteínas están demasiado lejos en las cuatro subunidades (entre 5 y 16 Å) para formar este enlace (Villeret y col, 1995). El residuo Cys178 permanece como grupo sulfidriilo libre, sin embargo, está lo suficientemente próximo a Cys153 para formar un puente disulfuro cuando Cys173 es eliminado por mutagénesis dirigida (Schürmann y Jacquot, 2000). Otros organismos fotosintéticos, tales como el alga roja, tienen una inserción similar (en posición y tamaño) con dos Cys

conservadas pero que confiere una pobre regulación redox (Reichert y col, 2000, 2003). Esta FBPassa podría ser una forma de transición a las enzimas con mayor regulación redox de los cloroplastos. Por lo tanto, y a pesar de los datos cristalográficos, el alto grado de conservación en la presencia y posición de estas 3 Cys en el lazo regulador redox de las cFBP1 de plantas sugieren un papel fundamental de Cys178 todavía no concluyente.

El lazo “170” también muestra un alto contenido de aminoácidos cargados negativamente (Hermoso y col, 1996) que, junto a los residuos hidrófobos, son responsables del complejo transitorio no covalente intermediario de la enzima con la TRX *f* (Plá y López Gorgé 1981; Wangensteen y col, 2001).

Experimentos in vitro muestran un pH óptimo de alrededor de 8,5 para cFBP1, que coincide con el pH fisiológico del estroma cloroplastídico durante el día. El destacado papel desempeñado por el Mg^{2+} en la modulación FBPassa es corroborado por la curva sigmoide de la actividad FBPassa frente a la concentración de Mg^{2+} (Charles y Halliwell, 1980). Hace años, Charles y Halliwell (1981) propusieron que el Ca^{2+} podría funcionar como un modulador adicional de la cFBP1. El papel destacado de Ca^{2+} en la modulación de la actividad FBPassa ha sido reforzada por los experimentos in vitro en el que el Ca^{2+} , junto a la fructosa-1,6-bisfosfato y DTT-TRX *f*, fortalece enormemente la fase de activación FBPassa (Hertig y Wolosiuk, 1980; Chardoty col, 1991). Sin embargo, este Ca^{2+} se debe eliminar antes de la fase catalítica, donde actúa como un inhibidor.

En 2007 se describió que la 2-Cys peroxirredoxina (2-Cys PRX) también puede modular a cFBP1 de forma no reductora en presencia de Ca^{2+} y FBPassa (Caporaletti y col, 2007). Dicha activación requiere de la presencia de las tres cisteínas conservadas (Cys153, 173 y 178) del lazo de regulación redox.

La FBPassa cloroplastídica (cFBP1) cataliza la conversión de fructosa-1,6-bisfosfato (FBPassa) a fructosa-6-fosfato (F6P) y es una enzima clave en el metabolismo del carbono, esta actividad está modulada tanto por la reducción de enlaces disulfuro vía TRX como por cambios en el pH y la concentración de Mg^{2+} que resultan de la iluminación (Anderson y col, 1979; Buchanan y col, 1980).

La dependencia redox de la cFBP1 (y otras enzimas del CC) es imperativa a la coordinación de la división de C en plantas para evitar un ciclo fútil. En organismos

fotosintéticos, la luz es tanto fuente de energía como señal directamente reguladora del núcleo del metabolismo carbónico. Debido a la estrecha relación entre la captación de luz y la fijación de carbono, la naturaleza ha elegido la señalización como una manera de detectar la calidad y cantidad de la luz de las cuales depende la actividad fotosintética.

Con respecto a otras especies vegetales, la patata (*Solanum tuberosum*) y el tomate (*Solanum lycopersicum*) han sido los únicos sometidos a la manipulación genética para reprimir los niveles de cpFBPasa (Kossmann col, 1994; Obiadalla-Ali y col, 2004).

Las plantas de patata antisentido expresan niveles reducidos de cFBP1 y sirven para responder algunas cuestiones referentes a la fotosíntesis, el desarrollo de la planta, la división de azúcares y la cosecha de biomasa (Kossmann y col, 1994).

Solo en plantas con niveles de inhibición muy altos de la actividad se producía una interrupción de la fotosíntesis (15% actividad). El análisis de metabolitos del Ciclo de Calvin reveló una acumulación de triosas fosfato y un descenso en el producto primario de la fijación de CO₂ (PGA), el cual activa la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), clave en la síntesis de almidón (Cross y col, 2004). La F6P al ser escasa, es preferentemente empleada para la regeneración del Ciclo de Calvin más que como un precursor para la síntesis de almidón y, consecuentemente, menores acumulaciones en F6P que lleven a un descenso dramático en el contenido de almidón y en menor extensión, a una menor acumulación de azúcar soluble (fructosa, glucosa y sacarosa).

Se ha visto como las hojas con una actividad de cFBP1 disminuida tienen una extraordinaria habilidad para suplementar de manera directa y exógena carbono en almidón en un ambiente oscuro. Cross y col. (2004) tenían la hipótesis de que estas plantas podrían tener una sobre-expresión del transportador de hexosas. Sin embargo se ha descubierto que un mutante de Arabidopsis en la isoenzima plastídica defosfoglucoisomerasa contiene cantidades importantes de almidón en tejidos no verdes, mientras que los tejidos fotosintéticamente activos están libres de almidón (Yu y col, 2000). Hay que destacar que la reducción de cFBP1 en plantas de patata no afecta la expresión de otros genes implicados en la asimilación de carbono y su distribución (Kossmann col, 1994).

Algunos años después en nuestro grupo hemos desarrollado una aproximación experimental similar. En este caso, las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* fueron obtenidas mediante transformación con una construcción de cFBP1 de guisante (Sahrawy y col, 2004). Sorprendentemente después de analizar el contenido de azúcar y almidón de las plantas transgénicas, se encontró un descenso moderado en la actividad foliar de cFBP (71–80% del tipo silvestre) induciendo una subida inesperada tanto en el contenido de almidón como en el de azúcar mejorando así el crecimiento y la fotosíntesis. Una actividad cFBP1 de alrededor de 60% en plantas silvestres produjo un descenso suave de la concentración de hexosa (glucosa y fructosa) mientras que el contenido en almidón y sacarosa permanecía en valores normales. Esta discrepancia en resultados puede deberse al grado de represión de cpFBPasa alcanzada en cada especie. Por todo ello puede afirmarse que un bajo contenido en cpFBPasa (20%) mejoraría la fotosíntesis y la asimilación de carbono, mientras que una alta represión de cpFBPasa reduciría ambos.

En frutas del tomate Obiadalla-Aliy col. (2004) concluyeron una reducción específica de la actividad de cpFBPasa mientras que Kobmann y col, 1992, crearon plantas de tomate antisentido usando genes de patata, lo hicieron bajo el control de un promotor (Frommer y col, 1994).

Se ha visto como el papel de esta enzima es fundamental en órganos como las hojas, sin embargo, es trivial en órganos de sumidero. La FBPasa no está presente en varios tejidos de almacenamiento de almidón (Entwistle y apRees, 1990). Thorbjørnsen y col. (2002) activaron una ruta alternativa para la biosíntesis en patata mediante la restricción de la expresión de cpFBPasa.

Cuando los amiloplastos intactos son provistos de [U-14C] DHAP, se nota una mayor actividad de cpFBPasa, un incremento de triosas fosfato, y una buena correlación con el nivel de actividad de cpFBPasa. Por otra parte, la expresión de (FBP/SBPasa) procedente de una cianobacteria mejoró la producción de biomasa en *Nicotiana tabacum* (Miyagawa y col, 2001).

Esta isoforma plastídica ocupa una posición estratégica dentro de las enzimas del CC, el producto de esta reacción, F6P, es el punto de comienzo de la síntesis de almidón y otras rutas metabólicas mientras que el sustrato específico, FBP, es sintetizado desde las triosas fosfato que pueden ser transportadas hacia el citosol para participar en la síntesis

de sacarosa. Para datar esta información se han identificado tanto para la forma cloroplastídica como para la forma citosólica de quince a dieciocho genes respectivamente, en plantas. Al menos 11 posiciones introductorias se han visto localizadas en los genes que codifican las formas citosólicas de *Arabidopsis thaliana*, mientras que sólo tres fueron conservadas en el caso de las isoformas de guisante (*Pisum sativum*), trigo (*Triticum aestivum*) y *Arabidopsis* (Chueca y col. 2002). Los alineamientos secuenciales suponen aproximadamente el 80% de identidad entre ambas isoformas. El CC ha sido estudiado en términos de origen genético, y existe lo que parece una amplia variación debido a los duplicados, pérdidas y transferencias de genes durante la evolución. La forma plastídica FBPasa se originó probablemente a partir de la duplicación de la isoforma citosólica (Martin y col, 1996), tal y como ocurre con otras enzimas del núcleo del metabolismo carbonado. Esta redundancia genética deriva de hechos simbióticos acaecidos durante la historia de la evolución temprana de los eucariotas fotosintéticos (Rogers y Keeling 2004).

La FBPasa que se encuentra en el cloroplasto de la planta se ve reducida con el aumento de la intensidad de la luz, seguido de una reoxidación gradual después de descender el nivel de intensidad de la luz, esta enzima alcanzó un nivel de reducción en saturación de más del 80% (Yoshida y col, 2014).

En el caso de las reacciones redox, la regulación redox juega un papel central en la adaptación del metabolismo plastídico a la luz. Las dos enzimas redox reguladoras del Ciclo de Calvin-Benson, FBPasa y Rubiscoactivasa, mostraron en este estudio reducción retardada e incompleta en el doble mutante cuando se encontraba bajo los efectos de la luz, comparando con el tipo silvestre (Naranjo y col, 2016).

El peróxido de hidrógeno, que es especialmente tóxico en el cloroplasto y un potente inhibidor del CC (Takeda, Yokota & Shigeoka 1995), inactiva completamente la actividad de la cFBP1, mientras que tan sólo una pequeña disminución tiene lugar con la nueva isoforma, cFBP2. Tamoi y col. (1996) mostraron en su investigación que en la cianobacteria *Synechocystis* PCC 7942 se encontraban ambas isoformas y que eran resistentes a H₂O₂.

Estas dos enzimas disminuyeron ligeramente sus respectivas actividades con el incremento de las cantidades de H₂O₂ (hasta 1 mM), mientras que la forma cloroplastídica de la espinaca fue completamente inactivada a concentraciones menores

(0,1 mm H₂O₂). De una manera parecida, los resultados aportados por nuestro grupo (Serrato y col, 2009a), muestran como la segunda isoforma fue también resistente a la inactivación oxidativa por H₂O₂ en nuestros ensayos *in vitro*. De acuerdo con el resto de autores, es razonable pensar que la falta de activación redox en el dominio en ambas formas podría ser responsable de esta carencia de susceptibilidad. En este trabajo, quedó constancia de que la nueva isoforma cloroplastídica es independiente de la activación redox y altamente resistente a la inactivación oxidativa. Sin embargo de acuerdo a nuestros datos de expresión, parece probable que esta enzima no sea cuantitativamente tan importante para la asimilación de carbono como lo es la cpFBPasa. La presencia de familias multigénicas en plantas es algo habitual, y la adquisición de otra FBPasa para el CC podría ser importante en tejidos específicos o situaciones como procesos de desarrollo, condiciones estresantes o regulación metabólica.

- Regulación de la FBPasa-citosólica

Además de las FBPasas cloroplastídicas descritas anteriormente, existe otra isoforma citosólica (cyFBP) que también es clave en la ruta metabólica de la biosíntesis de sacarosa, catalizando la primera reacción irreversible en la conversión de triosas fosfato a sacarosa (Daie, 1993). Fuera del cloroplasto, la reacción redox mediada por estas TRXs se vuelve menos fuerte y favorece otras formas de control, como ocurre con ciertas isoformas metabólicas de carbono como las Glucosa-6-fosfato deshidrogenasas (Fickenscher y Scheibe, 1986) y FBPasas.

Aparte de la ya conocida inhibición alostérica de cyFBPasa por F2,6BP y AMP (Daie, 1993), no existe otro mecanismo de activación/desactivación que haya sido descrito tan exhaustivamente. Diversos análisis realizados mediante Western blot comprobaron que no existía proteína en líneas transgénicas de tomate basadas en genes de patata, atribuyendo la actividad residual de la fruta a cyFBPasa. Los contenidos de almidón no diferían significativamente en comparación con el control. Las concentraciones de glucosa y fructosa aumentaron significativamente, al igual que el contenido en PGA al contrario que lo visionado en hojas de patata (Kosmann y col, 1994).

Es de sobra conocido que las dos enzimas claves para la síntesis de sacarosa son cyFBPasa y SPS. Sharkey y col. (1992) sugieren que las plantas mutantes de cyFBPasa podrían sobrevivir gracias al hecho de emplear más carbono para almidón que para sacarosa durante el día y movilizar el exceso por la noche. En el caso de plantas de

Flaverialinear se ha visto como la actividad de cyFBPasa está controlada por un gen nuclear y muestra la existencia de coodominancia entre los dos alelos de las líneas correspondientes (Micallef y Sharkey, 1996). La determinación de la biomasa total y la asimilación de CO₂ apuntaban a una reducción de la actividad de esta enzima sobre el índice de crecimiento y la fotosíntesis (Micallef y col, 1996).

Una década más tarde, Leonardos y col. (2006) llevaron a cabo un estudio en el que se cuantificó por primera vez de manera específica el carbono fijado durante el ciclo diurno y nocturno en las hojas de una planta con una reducción en la actividad de cyFBPasa.

Existe otro estudio que indica los efectos de la reducción de la forma citosólica de la enzima (del 9 al 55% de plantas silvestres) por encima de la biosíntesis de sacarosa en patata (Zrennery col, 1996).

En las plantas antisentido, el contenido de FBP, PGA, y triosas fosfato era mayor que en plantas silvestres, sin embargo, los niveles de F6P, G6P, y UDPG permanecieron constantes. La determinación del índice de fijación de CO₂ mostraba ciertas limitaciones en intensidades de saturación de la luz, de acuerdo con los resultados de Micallef y col. (1996) en *F. linearis*. Esta limitación fotosintética concuerda con conjunto de metabolitos del Ciclo de Calvin. A pesar de la actividad reducida de cyFBPasa en la línea más fuertemente inhibida (9% actividad), los azúcares solubles (hexosas y sacarosa) no fueron significativamente alterados, como había sido demostrado anteriormente por Leonardos y col. (2006). En la línea mutante de cyFBPasa de *Flaveria*, sin embargo, el contenido en almidón aumentó después de catorce horas de iluminación comparando con plantas silvestres.

La importancia de cyFBPasa y SPS en la biosíntesis de sacarosa llevó a Strandly col. (2000) a generar plantas antisentido de *A. thaliana* con la expresión reprimida de cada proteína. Varias líneas seleccionadas antisentido contenían 12–60% de cyFBPasa y 23–42% de SPS con respecto a plantas silvestres. Como era de esperar ambos transformantes mostraron un crecimiento reducido (37–57%) y un menor peso fresco (10–17%) y seco (15–20%) comparado con las plantas silvestres. Además de esto, la fotosíntesis fue menoscabada en ambos transformantes cyFBPasa y SPS. Una de las consecuencias del descenso de la actividad cyFBPasa fue un menor contenido de sacarosa, acumulación de intermediarios fosforilados como PGA (que activa AGPasa),

reducción del contenido en triosas fosfato, limitación de Pi de la fotosíntesis y una mayor síntesis de almidón. Las plantas con una actividad de SPS disminuida también mostraron una inhibición de la síntesis de sacarosa pero no de la acumulación de intermediarios fosforilados, mutantes cyFBPasa revisados hasta ahora y división de carbono que no se direcciona de nuevo a almidón. Otros fosfatos azucarados como G6P, G1P, y FBP, incrementaron en plantas cyFBPasa antisentido, mientras que los azúcares reductores, glucosa y fructosa, disminuyeron de manera alarmante. Estas diferencias sugieren otro mecanismo compensatorio de los mutantes SPS.

En el trabajo desarrollado por Serrato y col. (2009a) el aumento en la expresión de cyFBPasa al final del cultivo de fresa se relacionó con la subida de los principales azúcares solubles contenidos en la fruta (glucosa, fructosa y sacarosa). Mientras tanto, la acumulación de mRNA procedente de cyFBPasa disminuyó en los receptores donde la acumulación de azúcar tuvo lugar. Las determinaciones del contenido en cyFBPasa en frutas en desarrollo encajaba mejor con la acumulación de mRNA mostrando niveles más altos en estadios tempranos, mientras que el menor contenido fue observado en estadios más tardíos. Teniendo en cuenta estos resultados, es lógico pensar que en las fresas la isoforma citosólica juega el papel principal en la síntesis de azúcar entre otras isoformas de FBPasa, incluida la nueva isoforma cloroplastídica.

5. PRODUCCIÓN DE SACAROSA Y ALMIDÓN EN PLANTAS

El índice de la fijación de CO₂ neto y la partición de los fotoasimilados determina el índice de la síntesis de almidón y sacarosa. De acuerdo con la regulación de la retroalimentación el almidón es sintetizado cuando el índice de fotosíntesis supera la capacidad de la hoja para exportar sacarosa (Cséke y col, 1984; Stitt y col, 2010). Sin embargo en estudios recientes han aparecido varios mecanismos reguladores nuevos que están involucrados en el control del ciclo diurno de la sacarosa y en el balance de almidón en plantas. La regulación redox (Ballicora y col, 1998; Ballicora y col, 2000; Tiessen y col, 2002; Michalska y col, 2009; De Dios Barajas-López y col, 2012), la ruta de señalización T6P (Schluepmann y col, 2003; Kolbe y col, 2005; Wingler y col, 2012), o el control del reloj circadiano (Lu y col, 2005; Graf y col, 2010; Graf y Smith 2011; Yazdanbakhsh y col, 2011; Stitt y Zeeman 2012) son algunos de los mecanismos empleados por plantas para controlar el flujo de metabolitos procedentes del azúcar

durante el desarrollo normal. Más aun, la fotosíntesis que proporciona el NADPH y el ATP necesario para la fijación de CO₂ y la síntesis de carbohidratos ocurre de manera inevitable con la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) (Mittler, 2002), que pueden convertirse en intermediarios metabólicos tóxicos. La fotorespiración es una ruta metabólica primaria, cuya principal función es eliminarlos, recuperando parte del carbono (Anderson y col, 1971).

Tanto la cantidad como la calidad de los azúcares de plantas, en sus distintas formas, representan unas propiedades importantes en la producción agrícola destinada al consumo humano y al uso industrial. El contenido de sacarosa en los frutos de plantas de interés agroalimentario como las zanahorias y fresas, influirá en el sabor de los mismos. Por otra parte, el almidón es el principal componente de cereales y tubérculos, de los cuales el trigo, maíz, arroz, patata, batata y mandioca suministran las 4/5 partes del alimento en el mundo en términos de calorías. Además el uso del almidón en la industria no alimentaria ha experimentado un notable incremento y en la actualidad, aproximadamente 1/3 de la producción mundial de almidón se emplea para la obtención de diversos productos que van desde plásticos biodegradables hasta pegamentos, detergentes, pinturas o cartones de embalaje.

Los carbonos fotoasimilados son convertidos en sacarosa en las hojas verdes de plantas y distribuidos a los tejidos no fototróficos para proporcionar carbono y energía. Durante el día, el carbono fotosintético fijado es retenido en el cloroplasto de las células mesofilicas de las hojas para proporcionar la energía para la síntesis del carbono transitorio o bien exportado al citosol en forma de TP (Bahaji y col., 2015). El translocador triosa fosfato que se encuentra en el cloroplasto y la FBPasa citosólica son componentes clave en la biosíntesis de sacarosa en la fotosíntesis. La simultaneidad en la sobreexpresión del translocador de la TP y la FBPasa citosólica han sido utilizados para aumentar la capacidad energética de Arabidopsis. Estas líneas de sobreexpresión mostraban un aumento del crecimiento con tamaño de roseta más grande y peso en fresco aumentado comparado con las plantas de tipo silvestre (WT). La sobreexpresión simultánea de TPT y cyFBPasa dio como resultado unos índices de asimilación de CO₂ fotosintético mejorados en condiciones moderadas y elevadas de luz. Durante el período fototrófico, los niveles de azúcar soluble (sacarosa, glucosa y fructosa) en las hojas de esas líneas transgénicas fueron también mayores que en aquellas de las plantas de tipo silvestre. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión simultánea de TPT y

cyFBPasa mejora la capacidad de producción y consecuentemente lleva a un aumento del crecimiento en plantas transgénicas (Choy col, 2012)

El balance entre la asimilación, almacenamiento y utilización de carbono durante la fotosíntesis es dependiente de la división de la fotoasimilación entre el almidón y la sacarosa, y varía en respuesta a cambios en el ambiente. *Arabidopsis thaliana* es capaz de ajustarse al índice nocturno de la utilización de almidón en respuesta a la variación en el nivel de las reservas de carbono para asegurar la continua provisión de sustrato respiratorio durante toda la noche, de ahí que se evite una reducción en el índice de crecimiento (Mc Cormicky col, 2015)

5.1 Carbono, dióxido de carbono

Como *Arabidopsis* retiene sólo pequeñas cantidades de reserva de carbono al anochecer, se convierte en deficitaria en este sentido a las 2 horas cuando la fotosíntesis está temporalmente inhibida al principio del día. Cuando la planta está creciendo en fotoperiodos cortos, se exhibe un aborto de flores y semillas que se asocia con niveles bajos de C. El estrés abiótico que impacta sobre la fotosíntesis puede llevar a la carencia absoluta de C, especialmente, cuando por ejemplo existe una alta temperatura, que también está acompañada de un aumento de la respiración (Cookson y col, 2016).

5.2 Sacarosa

Es el producto más abundante de la fotosíntesis y la forma mayoritaria de transporte del azúcar en plantas (Lunn y col, 2014). Además juega un papel crucial durante el crecimiento, el desarrollo, el almacenamiento (de??), la transducción de señales y la aclimatación al estrés del medioambiente que afecta a las plantas. La ruta metabólica general de la sacarosa es la que sigue: las triosas fosfato que se producen en el cloroplasto a través del ciclo de Calvin son transportadas al citosol, a partir de las cuales la fructosa-6fosfato es sintetizada. Los productos se usan para producir glucosa-6P y glucosa-1P mediante la fosfoglucoisomerasa y la fosfoglucomutasa respectivamente. La UDP-glucosa pirofosforilasa es usada para catalizar transformación de glucosa-1P en UDP glucosa, a partir de la cual la sacarosa-6P es producida por la sacarosa fosfato sintetasa (SPS). Finalmente, la sacarosa es sintetizada a partir de sacarosa-6P mediante la acción de la sacarosa fosfato fosfatasa (SPP). Por otro lado, la sacarosa también es degradada tanto por sacarosa sintetasa como por invertasa. En el primer caso se degrada

a UDP-glucosa que es una reacción reversible. En el segundo caso la sacarosa se transforma en fructosa y glucosa. La primera se emplea para sintetizar F6P por fructoquinasa y la última es fosforilada para dar lugar aG6P mediante la acción de la hexoquinasa (HK), una importante molécula señal. Como se puede comprobar, al menos 9 enzimas están involucradas en el metabolismo de la sacarosa (Jiang y col, 2015).

5.3 Almidón

El almidón es el principal almacén de carbohidratos en plantas. Es sintetizado por sintetasas de almidón (SS) usando ADP-glucosa como la molécula donante de azúcar y enzimas de unión, este poliglucano se acumula en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos. En células mesofílicas de plantas, más del 50% del fotosintetizado se retiene en los cloroplastos durante el día en forma de almidón, el cual es movilizado de nuevo durante la noche para el apoyo del metabolismo y crecimiento no fotosintético. El almidón está hecho de dos fracciones de polisacáridos distintas que están ensambladas juntas para formar un gránulo de almidón semi-cristalino: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de más de miles de residuos de glucosa, mientras que la amilopectina es un polímero aún mayor unido regularmente con α -1-6- puntos de enlace exhibiendo niveles jerárquicos de estructura arquitectónica específica cuya síntesis requiere las acciones altamente coordinadas de las enzimas que sintetizan el almidón, enzimas que se encargan de unir y separar (Baslam y col; 2017).

Es un carbohidrato insoluble, no estructural, compuesto por polímeros de alfa glucosa. Es sintetizado por plantas y algas para almacenar energía en una forma densa e inerte, desde el punto de vista osmótico. Basándonos en sus funciones biológicas, el almidón se clasifica en dos tipos: almidón transitorio y almidón de almacenamiento. El almidón que es sintetizado en las hojas directamente desde productos sintetizados procedentes de la fotosíntesis durante el día, está típicamente definido como almidón transitorio, que es degradado durante la noche para sostener el metabolismo, la producción de energía y la biosíntesis en la ausencia de fotosíntesis, si el aporte de carbohidratos durante la noche se reduce, las plantas crecerán de manera más lenta y experimentarán desnutrición aguda.

El almidón en tejidos no fotosintéticos como raíces, semillas, tallos y tubérculos se almacena generalmente para largos períodos y se conoce como almidón de

almacenamiento. La movilización tiene de nuevo lugar durante la germinación, brote o recrecimiento, cuando la fotosíntesis no puede cubrir la demanda de energía y de los esqueletos de carbono para la biosíntesis de otros componentes estructurales de la planta (Pfister y Zeeman, 2016).

Como ya se ha indicado anteriormente, generalmente las plantas almacenan parte de sus productos sintetizados procedentes de la fotosíntesis como almidón durante el día y lo movilizan como soporte para el metabolismo y el crecimiento durante la noche. Los mutantes que no son capaces de sintetizar o degradar almidón muestran un crecimiento disminuido exceptuando aquellos que se encuentran en condiciones ambientales en las que el día es más largo. En plantas de crecimiento rápido, el recambio de almidón está regulado como tal en su mayoría, pero, no completamente y se agota al anochecer. Hay una evidencia creciente de que la extinción prematura o incompleta del recambio de almidón da como consecuencia índices menores del crecimiento de la planta.

En este estudio se observa como el recambio de almidón y el uso del carbono para el crecimiento se regula durante los ciclos diurnos, haciendo hincapié en el papel del reloj biológico. Muchas de las investigaciones moleculares y genéticas sobre el recambio de almidón han sido desarrolladas en el sistema de referencia y se considera que puede aplicarse tanto a especies perennes como a especies anuales. La luz es la única fuente de energía para la asimilación del dióxido de carbono fotosintético, y la fuente directa o indirecta de energía para todos los demás procesos. Por la noche las plantas son totalmente dependientes del almacenamiento de los metabolitos que acumulan durante el día. Y el almidón constituye el principal metabolito de almacenamiento en la mayoría de las plantas. Durante el crecimiento rápido, el almidón se acumula en las hojas de una manera casi lineal durante el día y es degradado de la misma manera durante la noche para que no se produzca su total extinción al atardecer. Este patrón se mantiene en un amplio rango de condiciones, incluyendo diferentes radiaciones, extensión del día, concentraciones de dióxido de carbono, nutrientes y aprovisionamiento de agua. El almidón es esencial para el normal crecimiento en días neutrales o días cortos. Ahora está claro que incluso leves problemas en el recambio de almidón de las hojas afectan al metabolismo y al crecimiento. La extinción prematura del almidón lleva a una falta total de CO₂ durante la noche. Esto se acompaña por cambios veloces y masivos en el metabolismo y en la expresión génica. Se ha visto también como pequeños cambios en

el índice de crecimiento podrían en dos o tres semanas llevar a cambios más importantes en la biomasa.

Se ha investigado como la regulación de la síntesis de almidón está integrada en el ciclo de Calvin-Benson y en la síntesis de la sacarosa. El almidón se observa como un producto de flujo sintetizado cuando el índice de fijación del CO₂ excede del índice de la síntesis de sacarosa. Una inhibición en la retroalimentación de la síntesis de sacarosa mediante el metabolito señal F-2,6-BP lleva a la acumulación de intermediarios fosforilados y un descenso del Pi del cloroplasto, resultando en la activación alostérica de AGPasa la cual se ha visto como ejerce un control sobre las rutas metabólicas para la síntesis de almidón(Stitty Zeeman, 2012).

Como la longitud del día cambia durante las estaciones que se suceden durante el año, las plantas tienen que conseguir no solo realizar el recambio de almidón de manera correcta durante el ciclo diurno sino también controlar los numerosos cambios de localización de recursos del crecimiento vegetativo de soporte al desarrollo de material reproductivo que tiene lugar durante el cambio en el desarrollo y en la floración que puede considerarse responsable de las alteraciones fotoperiódicas lo cual debe tenerse en cuenta para el estudio de la dinámica transitoria del almidón(Webby Satake, 2015).

6. IMPORTANCIA DE *Arabidopsis thaliana* COMO MODELO EXPERIMENTAL

El año 2015 marcó el 50 aniversario de la primera conferencia en investigación sobre *Arabidopsis* en Alemania, en 1965. Aunque Friedrich Laibach (1885–1967) propuso usar *Arabidopsis* como un organismo modelo genético casi 75 años antes, no fue hasta la década de los 80 cuando fue ampliamente adoptada como tal (Laibach, 1943;Meyerowitz, 2001).

Factores como un tamaño pequeño de genoma, un corto período de generación, facilidad de cruzamiento, fertilidad y la habilidad para hacer búsquedas mutacionales han llevado a un gran incremento en el volumen de investigaciones en *Arabidopsis*.

El hecho de emplear *Arabidopsis* como un modelo de experimentación vegetal ha revolucionado el entendimiento general de plantas y de hecho en toda la biología (Jones y col, 2008).

De sobra son conocidos los factores estresantes abióticos que generan ambientes no óptimos de luz, temperaturas demasiado altas o demasiado bajas, sequía y condiciones no ideales de suelo causadas por la limitación de nutrientes, salinidad, o contenido en metales pesados. Otros parámetros abióticos que afectan al crecimiento de la planta son aquellos relacionados con los constituyentes atmosféricos, incluyendo los perfiles de suelo de oxígeno, la humedad del ambiente y las concentraciones de CO₂, y contaminantes atmosféricos como el ozono. Aunque los impactos de estos factores estresantes sobre los atributos fisiológicos han sido estudiados durante muchas décadas no fue hasta el desarrollo de *Arabidopsis* como sistema modelo que se descubrieron ciertos mecanismos ocultos de este tipo de condicionantes y como influían en las rutas metabólicas de respuesta.

Es imposible hacer justicia a los incontables descubrimientos hechos en esta área basados en el estudio de esta pequeña mala hierba. Queda de nuevo demostrada la esencialidad de las herramientas de investigación que vienen acompañadas de *Arabidopsis* (Provart y col, 2016).

Esta planta ha sido y continuará siendo un vehículo vital para la investigación básica, el conocimiento que se genera en esta planta de referencia y el aumento en la disponibilidad de herramientas y recursos para trabajar en especies tanto de cultivo como de no cultivo nos permitirá en un futuro entender como el uso de las fuentes de carbono está regulado en plantas que difieren en su fenotipo y su historia vital (Stitt y Zeeman, 2012).

Esta especie se desarrolla naturalmente en gran parte del continente Euroasiático y el Norte de América. Está expuesta a una amplia variedad de factores medioambientales y ha sido objeto de selección natural bajo condiciones muy distintas (Seren y col, 2016).

Desde hace unas décadas, ha sido usado como modelo para la investigación biológica y genética de plantas. La habilidad de ocupar un área extensa de terreno por *Arabidopsis thaliana* es posible debido a su alta tolerancia al estrés y facilidad de adaptación. Esta planta exhibe variaciones fenotípicas y genotípicas, las cuales son el resultado de la adaptación a las condiciones ambientales locales. Durante el desarrollo, las plantas están sujetas a varios factores estresantes. Las plantas muestran un amplio espectro de reacciones, procesos y fenómenos que determinan su supervivencia en condiciones adversas. La respuesta de las plantas al estrés conlleva una detección y transmisión de

señales. Estas reacciones son diferentes y dependen del factor de estrés, su intensidad, las especies de planta de la que se trate y la estrategia de vida de la misma. Se asume que las poblaciones de las mismas especies de diferentes regiones geográficas se aclimatan a las condiciones de estrés desarrollando un conjunto de alelos, que les permiten crecer y reproducirse (Szymańska y col, 2015).

7. CLOROPLASTOS

Los cloroplastos son esenciales para la vida de las plantas porque estos orgánulos desempeñan la fotosíntesis, el proceso que permite la conversión de energía procedente de la luz en biomasa con la producción concomitante del oxígeno molecular. En adición, los cloroplastos actúan como sensores de las condiciones medioambientales, particularmente cantidad y calidad de luz, de ahí que jueguen un importante papel en la armonización del crecimiento de los tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de las plantas tanto como en la adaptación de las plantas a diferentes ambientes. Para cumplir estos requerimientos, el metabolismo cloroplastídico necesita responder velozmente a señales internas y externas, la regulación redox constituye un importante aspecto en esta adaptación. La regulación redox es una modificación post-translacional consistente en el intercambio de ditiol-disulfamida de cisteínas residuales de proteínas seleccionadas y bien conservadas aquí es donde entran a formar parte las tiorreductasas (Naranjo y col, 2016).

7.1 Caracterización de los estomas

Los estomas de las plantas son microporos especializados que se encuentran en la epidermis de la mayoría de las partes aéreas de las plantas y que controlan el intercambio esencial de dióxido de carbono y agua con el medioambiente que las rodea. El mantenimiento de un balance de agua adecuado a través del control por el estoma es crucial para las plantas ya que la expansión celular y el crecimiento de las mismas requiere tejidos que permanezcan hidratados, mientras que menores reducciones en el volumen de agua de las células y presión en las mismas podría comprometer ambos procesos.

Además de las señales redox que se producen como consecuencia de cambios en la luz, el transporte de iones inorgánicos y de metabolitos como el ácido abscísico (ABA), succinico y malato tienen un papel importante controlando los movimientos de los

estomas. En este contexto, aunque los ácidos orgánicos de plantas se encargan de realizar numerosas y diversas funciones tanto dentro de la célula como más allá del metabolismo celular, se ha descubierto recientemente como las concentraciones celulares de malato y fumarato pueden influir de manera considerable en los movimientos del estoma, el malato, en particular, se ha considerado como un metabolito clave y uno de los más importantes responsables de los movimientos celulares. Durante la apertura del estoma, el flujo de malato en las células guarda que producido por la rotura del almidón lleva a disminuirlo en el potencial acuático y como consecuencia, la entrada de agua en las células guarda que de manera final abre el estoma. Por otro lado, durante el cierre del estoma, se cree que el malato se convierte en almidón, sin actividad osmótica o de manera alternativa, se libera de las células guarda al espacio que las rodea (Medeiros y col, 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólíca: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL.

En este trabajo se ha utilizado la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, perteneciente a la familia de las *Brassicaceas*. El ecotipo usado ha sido Columbia (Col-0). Además de las plantas silvestres, se han usado mutantes simples y doble de las diferentes isoformas de FPBasa. *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*.

1.1 Condiciones de cultivo del material vegetal.

1.1.1 Cultivo de *Arabidopsis* en tierra.

Las semillas se sembraron en semilleros con turba vegetal, de la marca Compo Sana Universal, previamente humedecida y se estratificaron durante 48 horas a 4 °C para sincronizar la germinación. Las plantas se crecieron en una cámara FitoClima S600 (Aralab) bajo un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, siendo estas las condiciones de día largo (DL) y la temperatura en la cámara de cultivo era de 22 °C durante el día y 20 °C durante la noche, con una humedad relativa del 65 %. La intensidad lumínica al nivel de las plantas era entre 100 y 120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas se regaban solo con agua cada 2 días y según necesidades.

1.1.2 Cultivo de *Arabidopsis in vitro*.

a) Esterilización de semillas.

Las semillas se esterilizaron incubándolas durante 3 minutos en una solución de etanol al 50% (v/v) y tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,5% (v/v) y lavándolas con etanol 96%, tras lo cual fueron depositadas sobre un papel de filtro estéril situado en una campana de flujo laminar.

b) Medio de cultivo.

Los cultivos *in vitro* se realizaron en medio $\frac{1}{2}$ x Murashige & Skoog, 1962 (Duchefa Biochemie) solidificado con 0,6 % (ó 0,9 % para crecimiento en placas en posición vertical) de *phytoagar* (Duchefa Biochemie) y con 0,05% de MES (Sigma-Aldrich), tamponado a pH 5,7 con KOH.

Una vez sembradas se dejaron en estratificación durante 48 h. Posteriormente se pasaron a una cámara de crecimiento MLR-350 (Sanyo) bajo las mismas condiciones de crecimiento mencionadas anteriormente para el cultivo en tierra.

1.1.3 Cultivo de *Fragaria*.

Las plantas de fresa se cultivaron en invernaderos climatizados con un rango de temperatura entre 15-24 °C y humedad relativa próxima al 60 %. Las plantas procedían de multiplicación por estolones que se plantaban en maceteros con una mezcla de turba

Compo Sana Universal-arena-vermiculita en proporción 2-1-1 (v/v/v). El riego se aplicaba según necesidad.

2. OBTENCIÓN DE LÍNEAS MUTANTES.

2.1 Líneas simples de Arabidopsis.

Las líneas mutantes simples se obtuvieron de las colecciones de mutantes de inserción de T-DNA.

Tabla 1. Líneas simples mutadas de Arabidopsis.

Mutante	Ecotipo	Deficiencia
<i>cyfbp</i>	Col-0	Ausencia de la cyFBPasa
<i>cfbp1</i>	Col-0	Ausencia de la cFBP1asa

2.2 Obtención del mutante doble de Arabidopsis.

La línea del mutante doble se obtuvo mediante cruzamiento de las simples.

Tabla 2. Doble mutantes de Arabidopsis.

Mutante	Ecotipo	Deficiencia
<i>cyfbp cfbp1</i>	Col-0	Ausencia de las cyFBPasa y cFBP1asa

Para la obtención del mutante doble se seleccionó la planta receptora que serían fecundadas con polen del otro parental. A la planta receptora se le cortaron las flores que no iban a ser utilizadas, para facilitar el trabajo. *A.thaliana* es hermafrodita y sus flores se autofecundan antes de abrirse. Por ello, las flores que iban a ser utilizadas como receptoras debían estar en un estadio temprano de su desarrollo. Dichas flores eran desprovistas de sépalos, pétalos y estambres con ayuda de pinzas y lupa. Se comprobaba que las anteras aún no estuviesen amarillas, lo cual aseguraba que la autofecundación no había tenido lugar. Del parental se cortaba un estambre de una flor a punto de abrir y se empleaba para fecundar las flores “desnudas”, para ello, bastaba con dar unos ligeros toques con la antera sobre el estigma.

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

2.3 Líneas de Fragaria.

Tabla 3. Líneas simples mutadas de Fragaria.

Mutante	Ecotipo	Deficiencia
<i>cyfbp</i>	Fragaria	Ausencia de la cyFBPasa
<i>cfbp1</i>	Fragaria	Ausencia de la cFBP1asa

2.3.1 Selección de la progenie.

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

2.4 Obtención de los mutantes simples complementados.

Las líneas mutantes complementadas se obtuvieron mediante transformación de las líneas de mutantes simples.

Tabla 4. Líneas simples complementadas de Arabidopsis.

Mutante	Ecotipo	Deficiencia
<i>cyfbp</i> cyFBP:GFP	Col-0	-
<i>cfbp1</i> cFBP1:GFP	Col-0	-

2.4.1 *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa utilizada en las transformaciones de *A. thaliana* ha sido *Agrobacterium tumefaciens* GV3101: pMP90 (pTiC58T-DNA). Los cultivos de ésta bacteria se crecieron en cámara de cultivo a 28 °C durante toda la noche, en agitación y en medio líquido.

a) Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Las células de *Agrobacterium tumefaciens* se han transformado mediante el método de choque térmico modificado mediante el cual se pusieron en contacto las células con la construcción que se iba a introducir en la bacteria y se han mantuvieron durante 15 min en un baño de nieve carbónica/etanol (≈ -20 °C), para luego ponerlas en un bloque a 37 °C durante 20 min. A continuación se añadió 1 ml de medio líquido MYA y se mantuvo en agitación durante dos horas a 28 °C. Finalmente, las colonias que han incorporado el material genético a sus células se han seleccionado en placa de Petri como se indica en el apartado siguiente. (Tepfer, M. y Casse-Delbart, F. 1987).

b) Selección de colonias transformadas.

Para la selección de bacterias que contenían las construcciones de interés se preparó medio de cultivo suplementado con determinadas concentraciones de los siguientes antibióticos ampicilina 100 mg/ml, kanamicina 50 mg/ml, rifampicina 100 mg/ml en DMSO, gentamicina 40 mg/ml. Las concentraciones finales en medio de cultivo han sido de 100 μ g/ml de ampicilina, 30 μ g/ml de kanamicina, 100 μ g/ml de rifampicina, 20 μ g/ml de gentamicina y 2 μ g/ml de X-Gal.

La selección de las colonias que han contenido construcciones en p-GEMT® easy se realizaba en medio LBA con ampicilina y X-Gal. Mientras que las colonias con construcciones en el vector pBI101 se han seleccionado en placas de medio LBA con

kanamicina. Las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* con construcciones con el vector pBI101 se han seleccionado en medio MYA con rifampicina, gentamicina y kanamicina. Las colonias seleccionadas en medios con antibiótico específicos se analizaron mediante PCR de colonias. Las colonias seleccionadas se conservaron en glicerol 15 % a -80 °C.

2.4.2 Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Se preparó un precultivo de 20 ml de medio Yebs, de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción de interés. Al medio de cultivo se le añadió Gentamicina (20 µg/ml) y Kanamicina (50 µg/ml). Se dejó durante toda la noche en agitación (250 rpm) a 28 °C. A la mañana siguiente se añadieron 250 ml de medio de cultivo Yebs con los correspondientes antibióticos y se mantuvo 8 h en las mismas condiciones de crecimiento. Transcurrido este tiempo se añadieron entre 75-125 µl de Silwett L77 justo antes de sumergir las plantas.

Antes de llevar a cabo la transformación de las plantas de *Arabidopsis thaliana*, se eliminaron las inflorescencias que ya estaban abiertas en ese momento con ayuda de unas tijeras y las silicuas con el fin de eliminar semillas a las cuales no se les iba a modificar su contenido genético y evitar la proporción de semillas no transformadas. Se sumergieron las inflorescencias de las plantas en la solución de infiltración durante 10-30". Al terminar, las plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas se enjuagaron con un poco de agua para eliminar el exceso de cultivo bacteriano y se dejaron secar. Finalmente se introdujeron en una caja de poliestireno expandido con un poco de agua en el fondo. Se transfirieron en la cámara de cultivo permaneciendo ahí 24 h en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se sacaron de la caja para que la planta siguiera su desarrollo normal de crecimiento. Cuando la planta desarrolló las silicuas y se secaron, estas se recolectaron para continuar con la selección.

a) Selección de la progenie.

La selección de líneas se hizo en primer lugar germinando las semillas en placa de de Petri con medio de cultivo estándar para *Arabidopsis* mas antibiótico, Hygromicina 25 µg/ml, y posterior comprobación por PCR.

b) Medios de cultivo.

Los medios de cultivo que se han utilizado durante el desarrollo de esta tesis han sido, en placa, el medio MYA (Tepfer, M. y Casse-Delbart, F. 1987) que para la cepa de *A. tumefaciens*. Medio Yebs para *Agrobacterium*, en medio líquido.

Tabla 5. Medio de cultivo para *Arabidopsis*.

Medio MS	
Murashige & Skoog	0,1 %
<i>Phytoagar</i>	0,6-0,9 %
MES	0,05 %
pH (KOH)	5,7

Tabla 6. Medio de cultivo celular.

Medio MYA	
Extracto de levadura	5 g
Caseína	500 mg
Manitol	8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
NaCl	5g
Agar (MYA-A)	16 g
c.s.p 1000 ml Ajustar pH 6,6	

Tabla 7. Medio de cultivo celular

Medio líquido Yebs	
Extracto de levadura	1 g/l
Extracto de ternera	5 g/l
Sacarosa	5 g/l
Bactopeptona	5 g/l
Sulfato de magnesio	0,5 g/l
Gentamicina	20 µg/ml
Kanamicina	50 µg/ml
pH	7,0

3. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA.

3.1 Curvas de crecimiento.

Para las curvas de crecimiento, las plantas de *A.thaliana*, fueron crecidas en tierra como se describe en el punto 1.1.1. Cada 5 días, después de la estratificación, se cortaba la parte aérea de la planta y se determinaban parámetros como el peso de la roseta, número de hojas y área foliar.

Para ello se utilizaba una balanza de precisión, el área se calculaba mediante escaneo de las rosetas y la utilización del programa de análisis de imagen “*Photoshop CS5*” (Adobe). El último punto de medida de los parámetros se tomaba a los 30 días después de la germinación. En cada intervalo de 5 días se utilizaban un mínimo de 5 plantas y con los valores obtenidos se calculó la media y su desviación estándar.

3.2 Análisis de germinación.

Para el estudio de la germinación de *A. thaliana* bajo condiciones normales de crecimiento se sembraron 100 semillas (3 réplicas) en cajas de Petri cuadradas (12 x 12 cm) que contenían medio MS. Se observó el desarrollo de la germinación de las semillas en los primeros días en la cámara de cultivo. El porcentaje de germinación se determinó calculando el ratio de semillas germinadas con respecto al número total de semillas sembradas.

3.3 Análisis del crecimiento de raíz.

Para los estudios de crecimiento de la raíz se sembraron semillas esterilizadas en el primer tercio de placas de Petri cuadradas que contenían medio MS. Estas placas fueron colocadas en posición vertical dentro de la cámara de cultivo. Cada 24 horas y durante 5-7 días después de la germinación, se midió la longitud de las raíces y con estos datos se hicieron los cálculos de velocidad de crecimiento.

3.4 Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos.

3.4.1 Clorofilas y carotenoides en Arabidopsis.

Para la cuantificación del contenido en clorofilas y carotenoides en Arabidopsis se siguió un protocolo adaptado de Lichtenthaler and Wellburn (1983). Wellburn y col. (1994). El protocolo consistió en tomar 50 mg de hojas de roseta en fresco. Posteriormente se adicionó 1 ml de acetona fría al 80 % (v/v) y se transvasó el extracto a un tubo de 1,5 ml. Los tubos se sometieron a agitación toda la noche, a 4 °C y en oscuridad. Los extractos se centrifugaron durante 10 min a 13000 rpm, recuperando el sobrenadante. Los pigmentos se cuantificaron en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 663,2 (clorofila *a*), 646,8 (clorofila *b*) y 470 nm (carotenos) y 750 nm. La concentración de clorofilas y carotenoides, representada en µg por mg de peso fresco, se determinó en base a las fórmulas que se muestran en la tabla 8

Tabla 8. Fórmulas empleadas para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos, habiendo utilizado para su extracción acetona 80 %.

Pigmento	Fórmula
Clorofila a	$C_a = 12,25A_{663,2} - 2,79A_{646,8}$
Clorofila b	$C_b = 21,5A_{646,8} - 5,1A_{663,2}$
Clorofilas totales	$C_{a+b} = 7,15A_{663,2} + 18,71A_{646,8}$
Carotenos	$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1,82C_a - 85,02C_b}{198}$

3.4.2 Clorofilas y carotenoides en Fragaria.

Para la determinación del contenido de clorofilas y carotenoides en fresa se siguió el método descrito en el apartado anterior con la diferencia de que el disolvente utilizado fue metanol al 100%. Las fórmulas correspondientes para el cálculo de las concentraciones, utilizando este disolvente, fueron las siguientes:

Tabla 9. Fórmulas empleadas para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos, habiendo utilizado para su extracción metanol 100 %.

Pigmento	Fórmulas
Clorofila a	$C_a = 16,72A_{665,2} - 9,16A_{652,4}$
Clorofila b	$C_b = 34,09A_{652,4} - 15,28A_{665,2}$
Clorofilas totales	$C_{a+b} = 1,44A_{665,2} + 24,93A_{652,4}$
Carotenos	$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1,91C_a - 95,15C_b}{225}$

3.5 Determinación de fluorescencia.

La energía de la luz que es absorbida por los complejos colectores del PSII es rápidamente transferida a la clorofila *a*, la cual puede relajarse de tres maneras diferentes: mediante los procesos fotoquímicos (reducción de quinonas mediante transferencia electrónica procedente de la clorofila P680), los procesos no fotoquímicos (principalmente la emisión de calor) y/o la emisión de fluorescencia (Figura 1). Este último tipo de emisión se empleó para el estudio de las reacciones lumínicas y del estado del PSII de las plantas en estudio mediante el uso de un fluorímetro *PEA* (Hansatech).

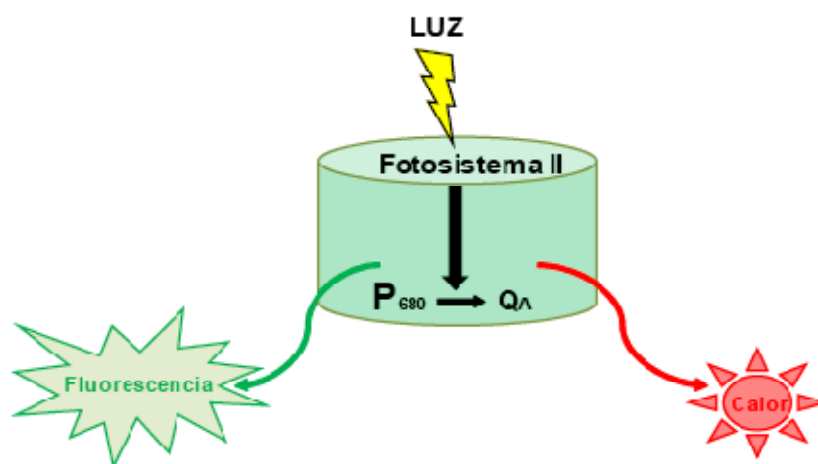


Figura 1. Esquema de los posibles destinos de la energía lumínica absorbida por el PSII.

Las plantas fueron adaptadas a oscuridad durante 20 min. La medida de la fluorescencia de la clorofila se realizó en hojas de varias plantas de *A. thaliana* con el objeto de obtener los niveles basales de fluorescencia (F_0) mediante excitación con luz roja azul modulada a 800 Hz durante 2 sg de iluminación y los niveles máximos de fluorescencia (F_m) inducidos por un pulso intenso de luz blanca de 800 ms. La eficiencia de la energía de excitación capturada por el PSII fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m.$$

3.6 Determinación de parámetros fotosintéticos.

La tasa de fotosíntesis neta (A) y la transpiración (E) en respuesta a intensidades crecientes de luz (Q) y a concentraciones crecientes de CO_2 en el interior de la hoja (C_i), se determinaron usando un analizador de gases por infra-rojo (IRGA): el modelo portátil LICOR-6400 (LI-COR Biosciences, Inc., Lincoln, NE, USA).

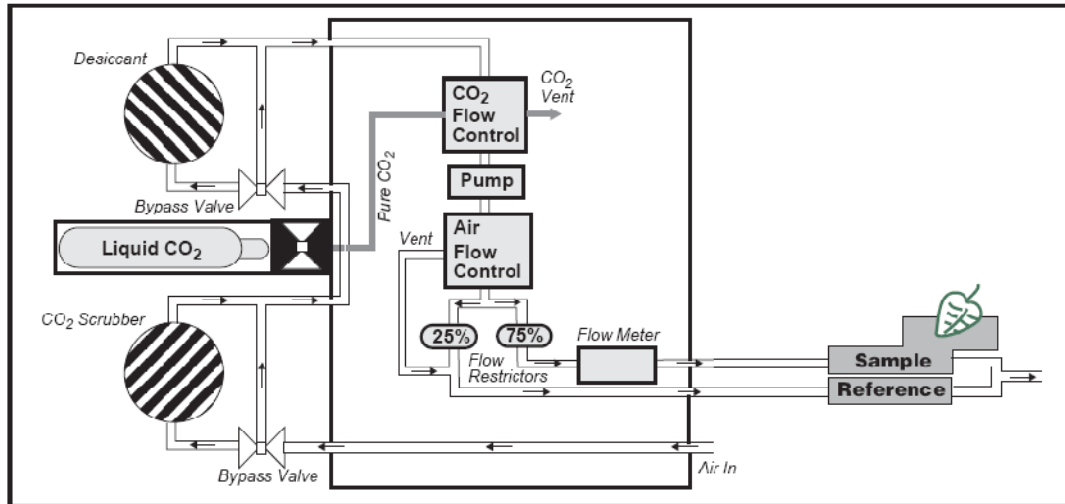


Figura 2. Esquema de flujo del modelo LI-6400, con y sin la inyección de CO₂.

$$\text{Fotosíntesis} = \text{Flow} \times \Delta\text{CO}_2 \times \text{Área}^{-1}$$

$$\text{Transpiración} = \text{Flox} \times \Delta\text{H}_2\text{O} \times \text{Área}^{-1}$$

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

Antes de su uso, el IRGA fue calibrado y se fijaron parámetros como el área de la hoja, el flujo de la corriente y la temperatura. La temperatura dentro de la cámara del IRGA se ajustó a la temperatura a la que crecieron las plantas (22 °C).

Para la medida se introdujo dentro de la pinza del equipo una hoja unida a la roseta de una planta de *A. thaliana* de 25 días después de la germinación (dpg). Se midieron al menos 3-4 plantas por cada línea de *A. thaliana*. Las áreas foliares fueron determinadas mediante escaneo de las mismas y empleo del programa Adobe Photoshop CS5 y los resultados de cada uno de los parámetros fotosintéticos obtenidos fueron normalizados al área real de la hoja, gracias al software de cálculo de LICOR.

Para las curvas de respuesta a luz se fijó una concentración de CO₂ de 400 μmol m⁻² s⁻¹ (próxima a la que se encuentra en el aire), con un flujo de 350 μmol s⁻¹. Tras la adaptación de las hojas a la oscuridad, se determinó la tasa fotosintética a distintas intensidades de luz: 0, 25, 50, 80, 140, 190, 240, 290, 480, 800, 1300, 1700 y 2000 μmol m⁻² s⁻¹. Para las curvas A/C_i se fijó una intensidad lumínica de 1000 μmol m⁻² s⁻¹, siendo esta intensidad a la que se obtiene la tasa fotosintética máxima en las curvas de respuesta a luz. Las medidas empezaron a 400 μmol mol⁻¹ de CO₂ y ésta se fue disminuyendo progresivamente hasta 50 μmol mol⁻¹ de CO₂ para luego ir aumentándose: 100, 200, 400, 600, 800, 1100 y 1500 μmol mol⁻¹ de CO₂. La disminución inicial de la concentración de CO₂ permite la adaptación de las plantas a bajo C_i, de modo que las medidas iniciales (a baja concentración) sean fiables.

El programa de análisis de datos del LI-6400 de LI-COR calcula todos los parámetros obtenidos directamente (A y E) y estimados (gs y Ci) a partir de las concentraciones de CO₂ y H₂O en la cámara. Las tasas de fotosíntesis (A) y transpiración (E), así como, la conductancia estomática (gs) al vapor de agua fueron recalculados mediante un simulador del programa, para ajustarlos a las áreas foliares reales de cada caso. Las áreas foliares fueron determinadas mediante escaneo de las mismas y empleo del programa Adobe Photoshop CS5.

3.6.1 Análisis de las curvas AQ.

Las curvas de fotosíntesis neta ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en función de la variación del nivel de luz (PAR) se denominan curvas de respuesta a luz (“curvas AQ”). En todos los casos, a muy baja intensidad de luz aparecen valores de A negativos, que corresponden a una mayor liberación de CO₂ por los procesos respiratorios (incluyendo la fotorrespiración) que la fijación fotosintética bruta de CO₂ (resultando en un incremento del CO₂ en la cámara del IRGA). A mayores intensidades se alcanza un punto de compensación por luz (Γ_i , punto de corte de la curva con el eje x), este es la intensidad de luz a la cual la velocidad de fotosíntesis y la de respiración/fotorrespiración se igualan. Por encima de este punto de compensación, A incrementa linealmente con respecto a PAR y el factor limitante es la velocidad de las reacciones luminosas. La A está limitada en esta fase por la concentración de CO₂ y la velocidad de las reacciones enzimáticas de la fijación del carbono. Se denomina punto de saturación por luz a la intensidad de luz a partir de la cual no hay incremento de la tasa de fotosíntesis neta.

Para intensidades lumínicas superiores al punto de compensación por luz, como se dijo anteriormente, el incremento de A es proporcional al incremento de PAR. La pendiente de esta recta nos indica la eficiencia cuántica aparente (AQE o ϕ) (Tcherkez *et al.*, 2008).

Debe usarse también aquí el término ‘aparente’, ya que la estimación se hace en base a la luz incidente y no a la realmente absorbida por la hoja.

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

Formula de la fotosíntesis:

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

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

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

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

3.6.2 Análisis de las curvas A/Ci.

Las curvas de fotosíntesis neta ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en función de la variación de la concentración de CO_2 intercelular de la hoja (C_i) se denominan “curvas A/Ci”. Aunque conceptualmente similares a las curvas de AQ, las curvas A/Ci tienen algunas peculiaridades a destacar. En primer lugar, los datos de la variable independiente (en abscisas) son expresados no como la concentración ambiental de CO_2 (la variable realmente controlada en el equipo) sino como la concentración intercelular de CO_2 (C_i). C_i es una variable calculada (no directamente medida) a partir de la relación: $A = g_s (C_a - C_i)$, donde A es la tasa fotosintética neta, g_s es la conductancia estomática y C_a y C_i son la concentración ambiental e intercelular de CO_2 respectivamente (McMurtrie & Wang, 1993).

Al igual que en las curvas AQ, en las curvas A/Ci aparece una primera fase de valores negativos de A , para valores muy bajos de C_i , seguida de una segunda fase de incremento lineal de A con respecto a C_i y una tercera, en la cual el incremento de A con respecto al C_i disminuye, hasta alcanzarse un valor de A máximo, A_{max} , a concentraciones de C_i saturantes. Los valores negativos de A se corresponden con aquellas concentraciones de C_i que no son suficientes para permitir que la fijación fotosintética de CO_2 supere la liberación por los procesos de respiración mitocondrial y fotorrespiración. En este caso, el punto de corte con el eje y ($C_i = 0$), nos indica la tasa de liberación de CO_2 cuando la tasa de fotosíntesis y la de fotorrespiración se igualan, de modo que corresponde a la tasa respiratoria mitocondrial (R_d).

La A_{max} alcanzada en las curvas A/Ci es el valor máximo de fotosíntesis neta que puede alcanzar la planta, puesto que estamos en condiciones de saturación por luz y por CO_2 , su valor va a depender de la tasa de uso de las triosas fosfato (TPU) y la respiración mitocondrial (R_d) a esta intensidad de luz ($A_{max} = 3 \text{ TPU} - R_d$) (Sharkey *et al.*, 2007). La estimación de A_{max} se llevó a cabo con el programa Photosyn Assistant, de la Universidad de Dundee (UK).

Photosyn Assistant fija los datos obtenidos a una curva modelo descrita por la hipérbola rectangular: $A = (CE \cdot C_i \cdot A_{max}) / (CE \cdot C_i + A_{max}) - R_d$; donde A es la asimilación de CO_2 o fotosíntesis neta, CE la eficiencia de carboxilación, C_i la concentración interna de CO_2 , A_{max} la asimilación a concentración saturante de CO_2 y R_d es la respiración mitocondrial. Los datos experimentales son fijados y lo primero que hace el programa, igual que en el caso de las curvas de respuesta a luz, es obtener estimaciones iniciales de los valores de CE , R_d y A_{max} . A medida que la fotosíntesis neta se aproxima a cero, el CO_2 se convierte en el factor limitante de la fotosíntesis, de modo

que la relación entre A y C_i es lineal para los valores más bajos de C_i . Mediante una regresión lineal de los primeros datos obtenemos CE , como la pendiente de la recta, y R_d , como la intersección con el eje y . A_{max} es estimada a partir de los valores de A para concentración de C_i saturante. Posteriormente, el programa fija los valores de los tres parámetros mediante mínimos cuadrados (Olsson & Leverenz, 1994) y estima el punto de compensación por CO_2 (nivel de CO_2 subestomático necesario para que haya asimilación neta de CO_2), como el punto de intersección con el eje x .

Cómo se explica en Olsson & Leverenz, 1994, las curvas de respuesta a CO_2 pueden entenderse como el resultado de tres factores diferentes que limitan la respuesta de A al CO_2 (Figura 3): la tasa de carboxilación permitida por la Rubisco (V_c), la tasa de transporte de electrones (J) y el uso de las triosas fosfato (TPU), cada uno de los cuales puede ser estimado a partir de la parte de la curva donde los otros dos factores no son limitantes.

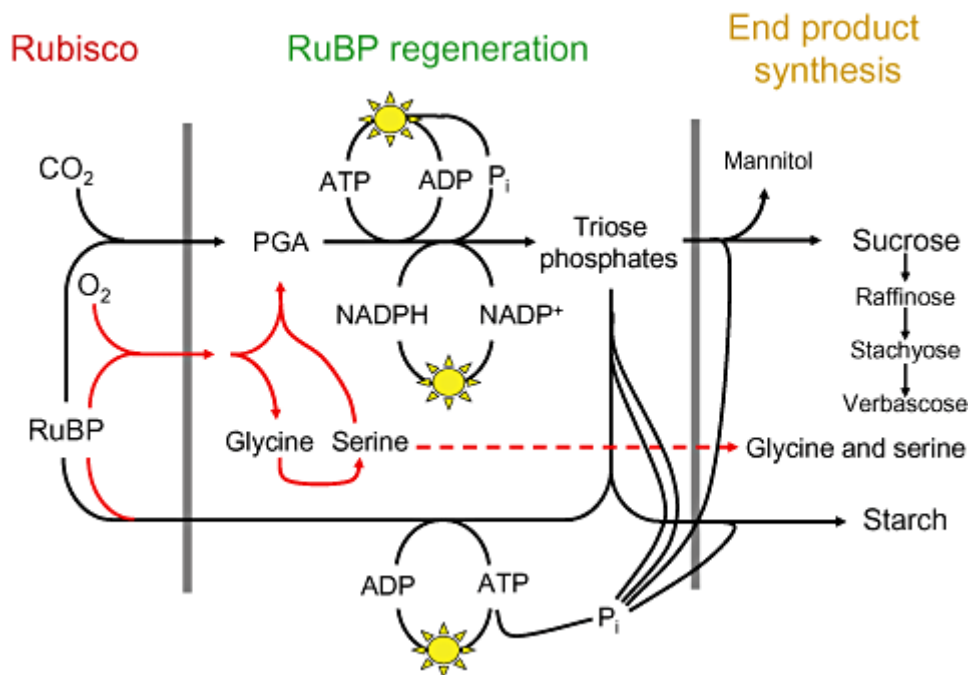


Figura 3. Esquema de los procesos que afectan a la tasa de fotosíntesis en respuesta CO_2 (adaptado de Sharkey *et al.*, 2007). RuBP = Ribulosa bifosfato; Rubisco = ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa.

A bajas concentraciones de CO_2 , la tasa de fotosíntesis neta puede ser predicha por las propiedades de la Rubisco (ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) asumiendo un suministro saturante de ribulosa bifosfato (RuBP). La limitación por la Rubisco en esta fase de la curva está asociada a la baja concentración de CO_2 más que a la V_{max} de la enzima. La tasa de carboxilación máxima permitida por la Rubisco (V_{cmax}) puede ser estimada a partir de los valores de esta fase de la curva (Caemmerer & Farquhar, 1981; Sharkey *et al.*, 2007). A concentraciones más altas de CO_2 , la tasa de fotosíntesis neta puede ser predicha asumiendo que la RuBP es limitante (Caemmerer & Farquhar, 1981). En esta fase, el incremento de A con la concentración de CO_2 es debido a que el incremento de la concentración de CO_2 provoca la disminución del CO_2 liberado por la fotorrespiración y el incremento de la eficiencia del uso de luz. La tasa de transporte de electrones (J) puede ser estimada a partir de los valores de la curva limitados por la regeneración de la RuBP. Por último, una tercera fase aparece cuando los cloroplastos

tienen una capacidad de síntesis de triosas fosfato más alta que la capacidad de la hoja para usarlas. En esta fase no se observa incremento de A al incrementar la concentración de CO_2 . La limitación de la fotosíntesis por la tasa de uso de las triosas fosfato (TPU) frecuentemente determina la A_{max} . La estimación de los parámetros V_{cmax} , J y TPU, requiere del conocimiento de la tasa de respiración mitocondrial (R_d) y la conductancia del mesófilo (g_m), parámetros que pueden ser estimados a partir de las ecuaciones que definen la fase de la curva limitada por la Rubisco y la fase limitada por la regeneración de la RuBP (Farquhar & Sharkey, 1982).

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

3.7 Localización y visualización del almidón en hoja mediante tinción con lugol.

Paso previo a la tinción con lugol fue la eliminación de toda la clorofila y pigmentos de la hoja. Para ello varias hojas de distintas plantas y de la misma línea se introdujeron en un frasco estéril de 40 ml con etanol al 70 % y se incubaron a 37 °C durante las horas suficientes, mínimo 24, hasta que las hojas estaban completamente despigmentadas. Posteriormente se eliminó el etanol y se lavaron con agua destilada.

Para la visualización del almidón en hojas, se introdujeron estas en una solución de lugol (Sigma-Aldrich). El lugol es un compuesto yodado que se une a las hélices formadas por las cadenas de glucosa. Las hojas se incubaron a temperatura ambiente hasta observar una coloración marrón oscura (5-10 min). Posteriormente se retiró el lugol y se lavaron varias veces con agua destilada hasta obtener el característico azul violáceo.

Seguidamente se fotografiaron extendiéndolas sobre una transparencia y se puso sobre un transiluminador.

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

3.8 Determinación del contenido de almidón en hoja.

El contenido de almidón fue determinado en plantas crecidas en condiciones de DL, a los 25 dpv y las muestras fueron recogidas en intervalos de 4 h en un periodo de 24 h.

3.8.1 Extracción de almidón.

La extracción y degradación del almidón en hojas, se realizaba siguiendo el protocolo descrito por Lin y cols. (Lin *et al.*, 1988b), con algunas modificaciones. Para aislar los gránulos de almidón se trituró con nitrógeno líquido una mezcla de rosetas de la misma

línea. Seguidamente sin que se descongelase el material se pesaron 100 mg del pulverizado. Después se añadían 500 µl de tampón de extracción (Hepes 50 mM pH 7,6 y Tritón X-100 1 % (p/v)). El extracto crudo se filtraba a través de un filtro de Miracloth (Millipore, MA, USA) cuyo tamaño de poro era de 100 µm, y se centrifugaba en frío a 4000 rpm durante 15 min. Se descartaba el sobrenadante y el pellet (almidón) se resuspendía entonces en 1ml Percoll 90 % y se centrifugaba en frío durante 45 min a 14000 rpm. El sobrenadante se descartaba y el precipitado se lavaba dos veces con etanol absoluto y se dejaba secar para continuar con el siguiente paso de degradación de las muestras.

3.8.2 Degradación de almidón.

Una vez que la muestra está libre de etanol, el almidón se resuspendía en 1 ml de KOH 0,2 N. En este punto se preparaba un patrón con cantidades conocidas de almidón de maíz en 1 ml de KOH 0,2 N, con los siguientes puntos: 0, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 mg almidón / ml.

El almidón, el contenido en las muestras y curva patrón, se hervía entonces a 100 °C durante 30 min y se centrifugaba 10 min a 13000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se pasaba a un tubo nuevo. Se ajustaba el pH a 5,0 añadiendo 300 µl de ácido acético 1 N. A continuación, se procedía a la degradación del almidón en glucosa, cuya concentración se determinaba enzimáticamente.

Se tomaban 200 µl de la preparación anterior y se añadían 7,4 U de α -amilasa (en 35 µl de acetato sódico 0,1 M pH 4,5). Se incubaba a 37 °C durante 30 min y se añadían 5 U de amiloglucosidasa (en 165 µl de acetato sódico 0,1 M pH 4,5). Se incubaba a 55 °C durante 1 h y se detenía la reacción hirviendo durante 2 min, posteriormente se centrifugaba a velocidad máxima durante 10 min y el sobrenadante se pasaba a un eppendorf limpio. Llegado este punto ya tenemos el almidón de la muestra degradado a glucosa.

3.8.3 Cuantificación de glucosa proveniente de la degradación de almidón.

La glucosa obtenida de la hidrólisis del almidón fue determinada mediante ensayo enzimático. Usando una placa microtiter, se depositaron por pocillo 5 µl del extracto obtenido de la hidrólisis del almidón y 200 µl de tampón de reacción (para la cuantificación de 100 muestras se preparaba un volumen de 20 ml: 100 mM HEPES-KOH a pH = 7,0, 3 mM MgCl₂, 24 mg de NADP⁺, 40 mg de ATP y 40 µl de G6PDH). A los 5 min de la mezcla en el pocillo de la muestra y el tampón de reacción se añadieron 0,4 µl (0,6 U) de hexokinasa (HK, Roche) a cada pocillo.

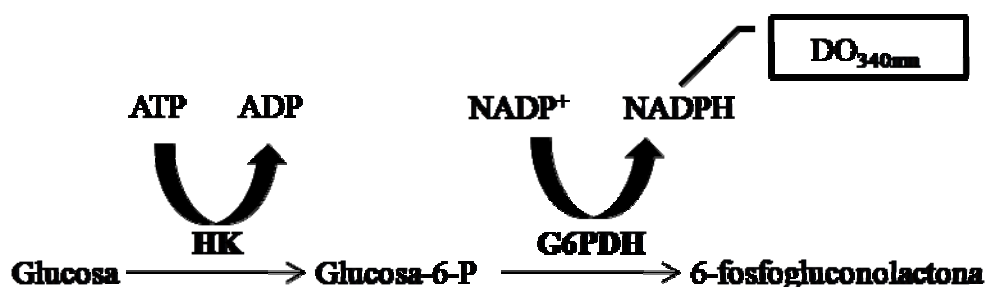


Figura 4: Esquema del ensayo enzimático para la determinación de la glucosa procedente del almidón.

El NADPH generado de la conversión de glucosa a 6-fosfogluconolactona fue determinado mediante el incremento de la absorbancia a 340 nm medido en un lector de placas, tomando como longitud de onda de referencia de 405 nm. Haciendo uso de la recta patrón podemos saber el contenido de almidón en la muestra. El contenido de almidón se presenta como mg de almidón por gramo de peso fresco.

3.9 Determinación del contenido en azúcares solubles.

El contenido en glucosa, fructosa y sacarosa fue determinado en plantas crecidas en condiciones de DL, a los 25 dpv y las muestras fueron recogidas en intervalos de 4 h en un periodo de 24 h.

3.9.1 Extracción de azúcares solubles.

Para extraer los azúcares solubles se trituró con nitrógeno líquido una mezcla de rosetas de la misma línea. Seguidamente sin que se descongelase el material se pesaron 100 mg del pulverizado y se añadió 500 µl de etanol 80 % diluido con tampón HEPES KOH 10 mM pH 7,5, y se incubó a 80 °C durante 30 minutos. Trascorrido ese periodo de tiempo, se centrifugó la suspensión 5 min a 13000 rpm y se tomó el sobrenadante que se pasó a un tubo eppendorf limpio. Después se procedió de igual modo, y se añadió 500 µl de etanol 80 % diluido con tampón HEPES y se incubó otros 30 minutos a 80 °C. A continuación se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores y se volvió a tomar el sobrenadante. Acto seguido, se añadieron 500 µl etanol 50 % diluido con tampón HEPES y se incubó otros 30 min a 80 °C. Se centrifugó a continuación en las condiciones descritas anteriormente y se volvió a tomar el sobrenadante. Finalmente, se incubaron las muestras 30 minutos a 80 °C con 500 µl de agua destilada y se volvió a centrifugar y tomar el sobrenadante, al igual que en las situaciones anteriores. El sobrenadante recolectado fue utilizado para las mediciones.

3.9.2 Análisis del contenido de azúcares.

El análisis de los azúcares se basa en una reacción enzimática múltiple en la que participa la hexoquinasa acoplada a la enzima glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G6PDH – ROCHE) que da lugar a la producción de NADPH y se puede medir a 340 nm de longitud de onda.

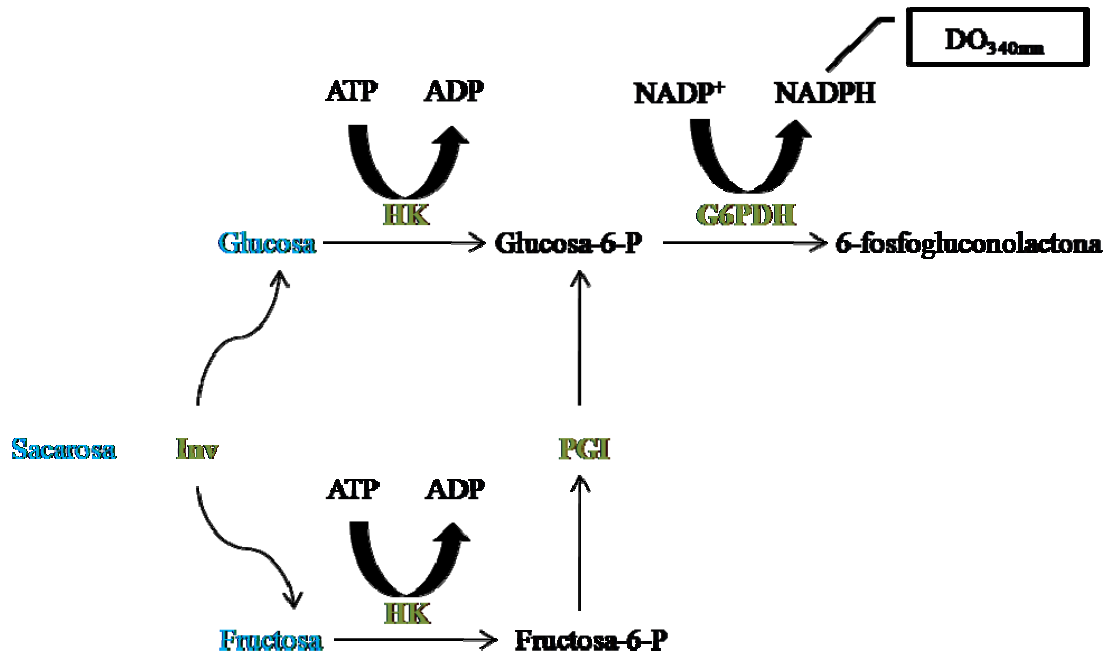


Figura 5. Esquema del ensayo enzimático en la medida de azúcares solubles.

Para el análisis de azúcares solubles en los tejidos de hojas se utilizaron 5 μ l del extracto que se fueron depositando en los pocillos de una placa microtiter. Se preparó la mezcla de reacción con 20 ml tampón 100 mM HEPES-KOH pH 7,0 y 3 mM $MgCl_2$ y 12 mg de NADP (SIGMA), 20 mg ATP (ROCHE) y 20 μ l G6PDH (ROCHE) (100 μ g de enzima) y se añadieron 200 μ l del tampón de reacción. La placa con las muestras y mezcla de reacción se colocó en un lector de placas *Sunrise* (Tecan) y se midió la variación en la absorbancia a 340 nm, utilizando la longitud de onda de referencia a 405 nm. A los cinco minutos de iniciada la medida se añadieron 0,6 U de hexoquinasa (ROCHE) a cada celda y se esperó a que la reacción se estabilizara durante 20-25 min para añadir 0,8 μ g de fosfoglucoisomerasa (ROCHE). Tras otros 30-35 min de medición, la señal se estabilizó y se añadió, finalmente, 400 μ g por celda de invertasa (FLUKA) y se dejó medir durante otros 30 minutos. Al final obtuvimos una gráfica en la que se diferenciaban tres incrementos de absorbancia, cada uno de ellos con final en fase plató. La diferencia entre una fase plató y la anterior es la contribución equimolecular de cada uno de los azúcares en estudio a la producción de NADPH relacionando esta producción con la concentración de azúcar en el extracto.

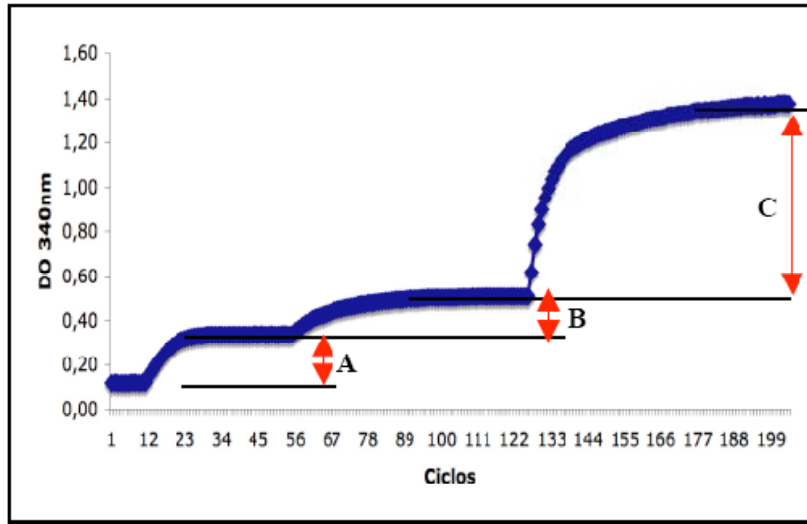


Figura 6. Esquema de la medición de azúcares. Cada una de las variaciones en la DO corresponde a las contribuciones de cada una de las enzimas A) hexoquinasa, B) fosfoglucoisomerasa y C) invertasa.

4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

4.1 Determinación de la actividad enzimática en extractos de Arabidopsis.

La determinación de la actividad se realizó según un protocolo modificado del descrito por Lázaro y col. (1974), basado en la reducción del NADP^+ (Figura 7) y en presencia de las enzimas auxiliares PGI y G6PDH.

La cantidad de NADPH que se determina es equivalente a la de fructosa-6-fosfato producido por la desfosforilación de la FBP por la FBPasa. La mezcla de reacción contenía los componentes descritos en la tabla 10.

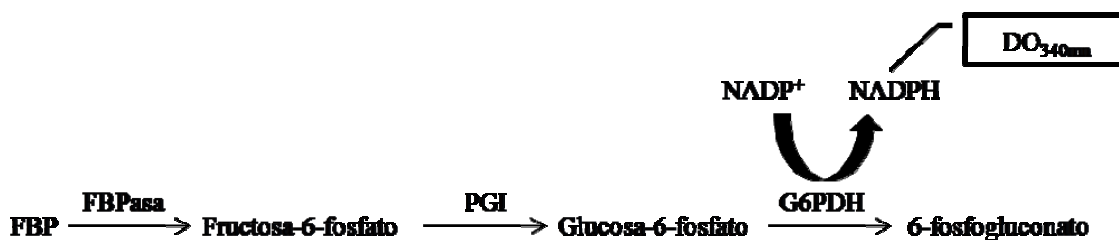


Figura 7 Representación de las reacciones llevadas a cabo durante los ensayos para la determinación de la actividad FBPasa.

En la tabla nº 10 se muestran las concentraciones de la reacción estándar empleada para la medida de actividad.

Tabla 10 Reacción estándar empleada para la medida de actividad FBPasaI

Reactivo	Cantidad
Tris HCl pH 8,8	100 mM
MgCl ₂	0,25-15 mM
NADP	0,3 mM
G6PDH	0,14U
PGI	0,28 U
FBP	0,1-6,0 mM
Proteína	1 µg
H ₂ O	hasta 200 µl
Volumen final	200 µl

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un lector de placas *Sunrise* (Tecan), utilizando la aplicación informática XFLUOR4 Versión 4.50. La formación de NADPH se monitorizó midiendo el incremento de la absorbancia a 340 nm y longitud de onda de referencia 405 nm.

4.2 Caracterización de la isoforma cpFBPasa1.

4.2.1 Activación/inactivación rédox de cpFBP1.

Para determinar el efecto de estado rédox de las FBPasas sobre la actividad enzimática, éstas fueron incubadas durante 20 min a temperatura ambiente, previamente a los ensayos de actividad, con el agente reductor DTT (1,4-Ditiotreitol) a una concentración de 5 mM o con los oxidantes H₂O₂ o diamida a una concentración de 1 mM en presencia de tampón Tris-HCl pH 8,8 20 mM.

4.2.2 Resistencia a la desnaturalización térmica de cpFBPasa1.

Para ello, incubamos la enzima durante 20 minutos en un termociclador aplicando un gradiente de temperatura para posteriormente medir su actividad.

4.2.3 Modulación rédox de cpFBPasa1: afinidad por su cofactor y su sustrato.

Para ello se realizaron medidas de actividad con concentraciones crecientes de Mg²⁺, con concentraciones crecientes de sustrato, en condiciones oxidantes y reductoras.

4.2.4 Caracterización de los mutantes en el lazo de regulación rédox de cpFBPasa1.

En el grupo “Regulación Redox, Señalización por Azúcares y Respuesta a Estrés Biótico y Abiótico del Proceso Fotosintético” se dispone de la isoforma cpFBPasa1 de guisante y de una serie de proteínas mutadas, obtenidas a partir de la misma mediante

mutagénesis dirigida, las cuales fueron expresadas en *Escherichia coli* y finalmente purificadas por cromatografía de afinidad por níquel.

Los cambios efectuados en estas proteínas consistieron en sustituciones de Cys por Ser en las tres Cys presentes en el lazo regulador rédox “170” de la cpFBPasa1, obteniendo mutaciones simples (C153S, C173S, C178S), dobles (C153S C173S, C153S C178S, C173S C178S) y triple (C153S C173S C178S), representado por C3xS en el que se eliminaron por completo las Cys de dicho lazo regulador. Este conjunto de proteínas se encontraban ya disponibles en el laboratorio y ha sido utilizadas para todos los ensayos *in vitro* realizados.

4.2.5 Efecto de la tiorredoxina *f* en la actividad de la cpFBPasa1 y el triple mutante en el lazo regulador.

Se determinó la actividad de estas proteínas combinando los estados de oxidación/reducción de cada una de ellas con la presencia de tiorredoxina *f*, también en combinación de su estado rédox.

4.2.6 Efecto de diversos metabolitos en la actividad de cpFBPasa1.

Se determinó la actividad enzimática añadiendo al medio de reacción, además de los reactivos indicados en la tabla 10, metabolitos secundarios que pueden aparecer en el metabolismo celular de la planta.

4.2.7 Influencia de monosacáridos y disacáridos en la actividad de cpFBPasa1 reducida.

Se determinó la actividad enzimática añadiendo al medio de reacción, además de los reactivos indicados en la tabla 10, monosacáridos y disacáridos que pueden aparecer en el metabolismo celular de la planta.

5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.

5.1 Microscopía óptica.

Para la observación de las estructuras celulares de hojas y raíces de *Arabidopsis*, las muestras incluidas en la resina epón fueron cortadas en láminas con microtomos en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada (UGR) en los laboratorios del servicio de microscopia y depositadas en portaobjetos (Barajas-Lopez et al., 2007).

Los cortes semi-finos (1mm) fueron teñidos con azul de toluidina y dejados secar. Para la observación y captura de imágenes se utilizó un microscopio óptico OLYMPUS BX51 del CIC-UGR.

5.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La visualización de las estructuras subcelulares de las hojas de roseta se realizó mediante el uso de un microscopio electrónico de transmisión. Para ello las muestras de hojas en trozos pequeños fueron previamente sometidas a un protocolo de inclusión en resina epón, llevado a cabo por el Servicio de Microscopía de la Estación Experimental del Zaidín. Tras este paso se realizaron cortes ultra-finos en el Servicio de Microscopía del CIC-UGR con un microtomo modelo “*Ultracut R*” (Leica). Los cortes ultra-finos fueron teñidos y depositados en rejillas para su posterior observación en un Microscopio de transmisión electrónica TEM modelo “*Libra 120 Plus*” (Carl Zeiss) del CIC.

5.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

6. ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

6.1 Preparación de muestras de tejidos vegetales para análisis genotípicos por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la preparación de muestras de tejidos vegetales para análisis genotípicos mediante PCR se utilizó un protocolo adaptado de Kasajima y col., (2004) (Kasajima et al., 2004). Un cotiledón de plántulas de 3-4 días después de la germinación se trituró en tubos tipo *Eppendorf* de 1,5ml con ayuda de una varilla de vidrio esterilizada (*pestle*) después de añadir 50 µl de tampón compuesto por Tris-HCl 20 mM a pH 7,5, NaCl 25 mM, EDTA 2,5 mM y SDS al 0,05 % (p/v).

6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la “Reacción en Cadena de la polimerasa” se realizó en un termociclador modelo “*T-Gradient*” (Biometra). Las condiciones de PCR programadas dependieron de cada experimento, pero siguieron el esquema general detallado en la figura 8. La temperatura de hibridación se fijó en 5 °C por debajo de la temperatura media de hibridación de los oligonucleótidos utilizados para cada experimento. El tiempo de hibridación varió entre 15 y 30 s, mientras que la extensión en la reacción de PCR se fijó en función del tamaño del fragmento de ADN a amplificar. El número de ciclos se estableció en función del objetivo buscado en cada experimento, oscilando entre los 30 y 40 ciclos.

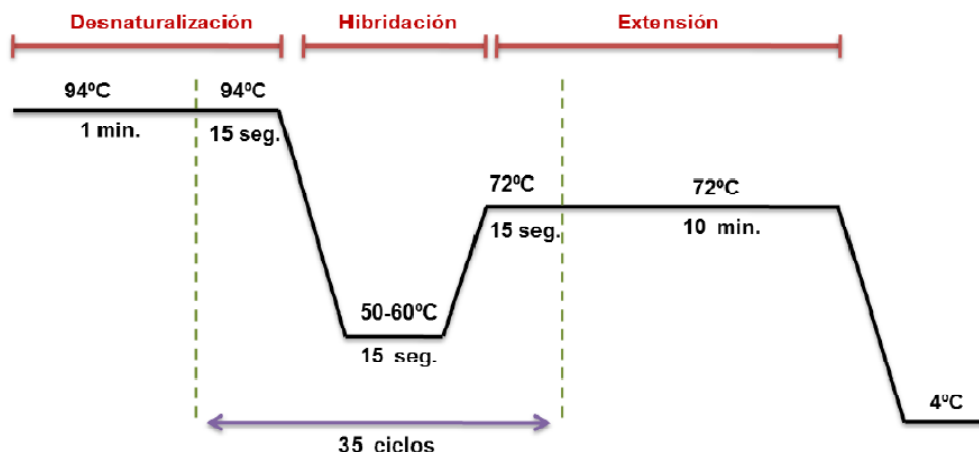


Figura 8. Esquema general de las condiciones de PCR utilizadas.

De manera rutinaria se usó la polimerasa *MyTaq* (Bioline), mientras que para la clonación de ADNc se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *iProof* (Bio-Rad).

6.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de ADN por tamaño se realizaba mediante electroforesis en geles de agarosa. El porcentaje (p/v) de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos de ADN que se querían separar. La electroforesis se realizaba en cubetas horizontales “*Mupid One*” y “*Mupid 2I*” (Advance), donde los geles de agarosa eran sumergidos en tampón TBE 0,5x compuesto por Tris 40 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1mM. Para cargar las muestras en el gel se les añadía tampón de carga 5x, compuesto por glicerol al 50 % (v/v), EDTA 0,1 M y azul de bromofenol al 0,1 % (p/v).

Como marcadores de tamaño molecular se utilizó el preparado comercial “*HyperLadder IV*” (Bioline). Para la detección del ADN una vez migrado, los geles eran sumergidos durante 10 min en una solución de “*GelRed*” (Biotium) en H₂O destilada a una dilución 1:10000. Transcurrido este tiempo, los geles eran visualizados mediante el uso de un equipo “*ChemiDoc Molecular Imager XRS System*” (Bio-Rad) y analizados mediante el software “*Quantity One*” (Bio-Rad).

6.4 Aislamiento de ARN total de tejidos vegetales.

Para la extracción del ARN procedente de las muestras de *A.thaliana* se usó el sistema “*Aurum total RNA mini kit*” (Bio-Rad), partiendo de 60 mg de tejido fresco y siguiendo las instrucciones del fabricante. Como paso previo a la síntesis por retrotranscripción de los ADNc correspondientes a partir de los ARN extraídos, se realizó una reacción de PCR para comprobar que en las muestras no existía contaminación de ADN genómico. Se usaron las parejas de oligonucleótidos At18s-F/At18s-R.

6.5 Síntesis de ADNc.

Para probar la expresión de los transgenes en las plantas transgénicas, así como para las reacciones de Q-PCR (ver página 9, el RNA total aislado, fue retrotranscrito usando el kit “*QuantiTect Reverse Transcription*” de QIAGEN).

En primer lugar, el RNA era tratado con DNasa I, siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar el DNA genómico contaminante. Una vez eliminado el DNA genómico, se procedía a la reacción de RT, para lo cual se seguían también las instrucciones del fabricante, partiendo de 1 µg de ARN, obteniéndose finalmente una preparación de cDNA de la muestra.

6.6 RT-PCR

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

La expresión relativa se calculó empleando el método de $\Delta(\Delta Ct)$, dónde Ct (*Threshold Cycle*), es el valor que representa el número de ciclos en los que la línea de la gráfica intercepa la línea base (Figura 9).

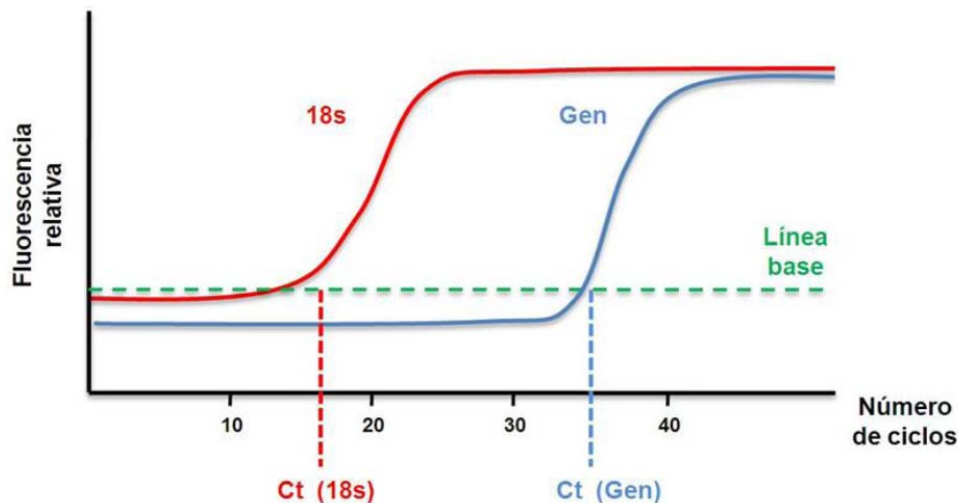


Figura 9. Representación gráfica de Ct en una qPCR.

Cuanto más pequeño es el valor de Ct más cantidad de molde existe en la mezcla de PCR, es decir, existe una mayor expresión del gen estudiado según la fórmula:

$$\text{Amplificación relativa (gen)} = 2^{-[\Delta Ct(\text{gen}) - \Delta Ct(18s)]}$$

Como control interno para normalizar los resultados se utilizó el gen del ARNr de la subunidad 18S que, debido a su abundancia, presenta siempre valores de Ct muy bajos.

Se empleó un equipo “IQ -5 Multicolor Real-Time PCR Detection System” (Bio-Rad). El sistema detecta al fluoróforo “SYBR Green I” unido al ADN formando un complejo que emite una señal fluorescente con máximos de excitación y emisión a 494 y 521 nm, respectivamente, y que es recogida y monitorizada por el detector del equipo, permitiéndonos seguir desde el inicio de la reacción la formación de nuevas moléculas. El fluoróforo forma parte del preparado comercial “SYBR Green Supermix” (Bio-Rad), que además contiene la enzima “iTaq DNA Polymerase” y todos los componentes necesarios para su funcionamiento. La polimerasa proporciona una alta especificidad y sensibilidad en la reacción de PCR, ya que es suministrada de forma inactiva por el fabricante y es necesaria una incubación previa de 10 min a 95 °C para su activación. De esta forma se previene la formación de productos inespecíficos en fases iniciales de la amplificación. Cada reacción se realizó por triplicado empleando las siguientes condiciones: 2 min a 50 °C, 10 min de activación a 95 °C y 35 ciclos de amplificación (30 s a 95 °C, 30 s a la temperatura de hibridación específica de cada pareja de oligonucleótidos y 30 s a 72 °C), seguidos de la curva de desnaturalización.

6.7 PCR cuantitativa

Con el objetivo de medir en tiempo real la amplificación por PCR de los genes de interés, se empleó un equipo “IQ -5 Multicolor Real-Time PCR Detection System” (Bio-Rad). El sistema detecta al fluoróforo “SYBR Green I” unido al ADN formando un complejo que emite una señal fluorescente con máximos de excitación y emisión a 494 y 521 nm, respectivamente, y que es recogida y monitorizada por el detector del equipo, permitiéndonos seguir desde el inicio de la reacción la formación de nuevas moléculas. El fluoróforo forma parte del preparado comercial “SYBR Green Supermix” (Bio-Rad), que además contiene la enzima “iTaq DNA Polymerase” y todos los componentes necesarios para su funcionamiento. La polimerasa proporciona una alta especificidad y sensibilidad en la reacción de PCR, ya que es suministrada de forma inactiva por el fabricante y es necesaria una incubación previa de 10 min a 95°C para su activación, de esta forma se previene la formación de productos inespecíficos en fases iniciales de la amplificación. Cada reacción se realizó por triplicado empleando las siguientes condiciones: 2 min a 50°C, 10 min de activación a 95°C y 40 ciclos de amplificación (30 s a 95°C, 30 s a la temperatura de hibridación específica de cada pareja de oligonucleótidos y 30 s a 72°C), seguidos de la curva de desnaturalización. La expresión relativa se calculó empleando el método de $\Delta(\Delta Ct)$, dónde Ct (*threshold cycle*), es el valor que representa el número de ciclos en los que la línea de la gráfica intercepta la línea base.

Como control interno para normalizar los resultados se utilizó, al igual que en la PCR semicuantitativa, el gen del ARNr de la subunidad 18S que, debido a su abundancia, presenta siempre valores de Ct muy bajos.

7. ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS.

7.1 Extracción de proteínas vegetales.

Para la obtención de los extractos de proteínas vegetales se maceraron en frío 50 mg de tejido vegetal en un mortero al que se añadía un tampón de extracción de proteínas compuesto por 25 mM Tris- HCl a pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF

y 50% de glicerol (v/v). A continuación, los extractos fueron centrifugados en frío a 13000 rpm durante 10 min tras los cuales se recogían los sobrenadantes, que contenían proteínas solubles en suspensión. Las proteínas se cuantificaron mediante el método Bradford (Bradford, 1976) usando para ello el reactivo “*Bio-Rad Assay Protein*” (Bio - Rad). Una vez cuantificados los extractos se conservaron a -20 °C.

7.2 Geles de poliacrilamida.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10 ó 12 % (plv) de 7,5 x 8 cm y 0,75 ó 1,5 mm de grosor, con un gel concentrador de poliacrilamida al 4 % (plv).

7.3 Electroforesis.

La electroforesis se desarrollaba durante 15 minutos a 100 v.

7.4 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.

Al finalizar la electroforesis, el gel de poliacrilamida se sumergía en el tampón de transferencia TGM constituido por Tris 48 mM, glicina 29 mM, SDS al 0,037 % (p/v) y metanol al 15 % (v/v) durante 15 min. Simultáneamente, se preparó una membrana de nitrocelulosa (Millipore) y 6 piezas de papel *Whatman* 3MM de dimensiones idénticas a las del gel, los cuales se humedecían también en el tampón de transferencia y se colocaban, a modo de sándwich, en el siguiente orden (de abajo a arriba): 3 piezas de papel *Whatman* – membrana de nitrocelulosa sumergida previamente en el tampón de transferencia durante unos segundos – el gel de acrilamida en la posición y orientación adecuada – 3 piezas de papel *Whatman*. Todo el montaje fue colocado en la plataforma del equipo de transferencia semi-húmedo “*Trans-Blot turbo*” (Bio-Rad) para someterlo durante 30 min a un voltaje máximo de 25 V y a una intensidad de corriente resultante de la siguiente expresión:

$$\text{Corriente (mA)} = \text{superficie (cm}^2\text{)} \times \text{número de membranas} \times 0,8$$

7.5 Tinción de proteínas en membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau.

Tras finalizar el paso anterior, para poder comprobar que la transferencia era homogénea por toda la membrana de nitrocelulosa, se procedió a la visualización de las proteínas transferidas mediante tinción con rojo Ponceau.

Para ello se incubaba con el reactivo (0,1% (p/v) Ponceau S en 5 % ácido acético) en agitación y a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min. Seguidamente se daban varios lavados con agua destilada para eliminar el exceso de reactivo.

8. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN ARABIDOPSIS.

8.1 Determinación de la actividad de las diferentes isoformas de superóxido dismutasa.

Las diferentes isoenzimas de SOD se analizaron mediante la técnica de isoelectroenfoque, siguiendo básicamente el método descrito por Zelitch y col. (1991). Las muestras se prepararon en una solución que contenía glicerol al 15 % (v/v) y anfolitos de pH 5-7 al 5 % (v/v) de Pharmacia Biotech. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 5 % (p/v) de 1,5 mm de grosor, conteniendo un 10 % (v/v) de glicerol y un 2 % (p/v) de anfolitos de intervalo de pH 5-7. Para prevenir inactivaciones por la solución del cátodo, sobre las muestras se colocó una solución de glicerol al 7 % (v/v) y anfolitos de pH 5-7 al 5 % (v/v). Las soluciones anódica y catódica fueron ácido acético 20 mM y NaOH 25 mM, respectivamente. La electroforesis se realizó a 4 °C, con un voltaje de 200 V durante dos horas seguido de 400 V durante otras dos horas, en un equipo 'Mini-Protean II' de Bio-Rad.

La actividad enzimática se localizó mediante un método fotoquímico basado en la reducción del NBT por los radicales libres O₂-generados por la acción de la luz sobre una solución de riboflavina y tetrametiletildiamina (TEMED) (Beauchamp y Fridovich, 1971). Así se obtiene una tinción azul de los geles debida a la formación de azul de formazano, excepto en aquellas zonas donde hay actividad SOD que permanecen acromáticas. Una vez terminada la electroforesis, los geles se incubaron en una solución con NBT 2,45 mM preparada en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, durante 20 min en oscuridad tras lo cual, se incubaron en otra solución con riboflavina 28 µM y TEMED 28 mM preparada en el mismo tampón, durante 15 min en oscuridad. Finalmente, los geles se enjuagaron en tampón y se expusieron a la luz durante unos minutos hasta que los geles se teñían de un color azul excepto en aquellas zonas donde había actividad SOD. La cuantificación de las distintas bandas de actividad obtenidas se llevó a cabo mediante el tratamiento de imágenes con *Photoshop CS5*.

8.2 Inmunodetección de carbonilos.

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

Se partió de 0,2-0,5 mg de hojas de rosetas que fueron machacados en un mortero con 200-500 µl de tampón de extracción, cuya composición era: 10mM de tampón fosfato sódico pH 7,4, 1mM de EDTA, 0,2 % de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas (1-5 µl/ml). Las muestras machacadas se centrifugaron 30 min a 4 °C y 13000 rpm. Se preparaban 200 µg de proteína en 200 µl de tampón de extracción y se añadían 50 µl de DNP 10 mM preparada en HCl 2N. Como controles se utilizaron blancos incubados en HCl sin DNPH. Se incubaban las muestras 1 h a temperatura ambiente con agitación y, a continuación, se añadían 300 µl de TCA al 20 % y se incubaban 10 min en hielo para precipitar las proteínas y eliminar la DNP. Se centrifugaba 10 min a 4 °C y 2500 g. El precipitado era lavado tres veces - hasta que el color amarillo del precipitado desaparecía - con acetato de etilo:etanol (1:1): se resuspendía el precipitado, se dejaba 5 min en agitación y se centrifugaba (10 min a 4 °C y 2500 g). Finalmente, se resuspendía en 125 µl de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,4, se añadía tampón de carga 2x y se separaban las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12 % el gel separador y al 4 % el gel concentrador.

A continuación, eran transferidas a membranas de nitrocelulosa, que eran teñidas con rojo Ponceau. Posteriormente, para evitar la unión de anticuerpo a otras regiones de la membrana, esta se bloqueó con una solución que contenía el 5 % (p/v) de leche en polvo en tampón TBS (Tris-HCl 0,1 M a pH 7,5 y NaCl al 0,9 % (p/v)), durante 1 h a temperatura ambiente. Después se lavó la membrana tres veces durante 5 min con tampón TBST (TBS con tween-20 al 0,1 % (v/v)) y se incubó la membrana durante toda la noche, a 4 °C y en agitación, con una solución de TBS con anti-DNP (1:50000), como anticuerpo primario. Tras la incubación se lavó la membrana tres veces con TBST. Posteriormente se incubó con una dilución 1:10000 en TBS con anticuerpo secundario Anti-Rabbit IgG conjugado con la enzima peroxidasa HRP (Sigma-Aldrich).

8.2.1 Revelado de membranas.

La solución de revelado se preparó disolviendo en 20 ml de tampón de luminol (Tris-HCl 50 mM a pH 8,6 y NaCl 150 mM), 100 µl de luminol 80 mg/ml en DMSO (Applichem), 40 µl de solución de 4-Yodo-fenol a 50 mg/ml en DMSO y 3,4 µl de H₂O₂ al 33 % justo antes del revelado. Las imágenes de las membranas fueron capturadas mediante el uso de un equipo “*ChemiDoc Molecular Imager XRS System*” (Bio-Rad) y analizadas mediante el software “*Quantity One*” (Bio-Rad).

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

8.3 Determinación del contenido en peróxido de hidrógeno.

Para la medida peróxido de hidrógeno en extractos crudos de hojas se usó un método fluorimétrico descrito por Creissen y col. (Creissen et al., 1999). La extracción del peróxido de hidrógeno se realizó con ácido sulfúrico 25 mM (2 µl/mg de material vegetal) y con mortero. Luego se centrifugaba 25 min a 4 °C y 14000 rpm para eliminar los restos de hoja. Se añadió carbón activo a los extractos para eliminar pigmentos que pudieran interferir en la reacción. El carbón activo y los pigmentos se eliminaron por centrifugación a 5000 g durante 5 min. El sobrenadante resultante se neutralizaba con NaOH 1 N. Se preparaba además una solución madre de peróxido de hidrógeno 1 M en ácido sulfúrico 25 mM neutralizado con NaOH 5 N, para realizar la recta patrón.

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

8.4 Determinación de los niveles de peroxidación lipídica.

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

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

8.5 Determinación de la actividad catalasa en solución.

Se midió espectrofotométricamente según el método descrito por Aebi (1984), basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm ocasionada por la desaparición del H₂O₂. La determinación se efectuó a 25 °C en una mezcla de reacción que contenía H₂O₂ 10,6 mM en tampón fosfato-K 50 mM a pH 7,0 y en un volumen de 2,9 ml. La reacción se inició añadiendo la muestra previamente diluida con el tampón de reacción conteniendo Triton X-100 al 0,2 % (v/v). La actividad enzimática, expresada en μ moles de H₂O₂ x min⁻¹ x mg⁻¹ prot. (o x ml⁻¹), se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ de 39,58 M⁻¹ x cm⁻¹ (del Río y col., 1977).

8.6 Determinación de la actividad ascorbato peroxidasa.

Para llevar a cabo el análisis de esta actividad se utilizaron homogenados preparados en un medio de extracción conteniendo ascorbato 2 mM, para prevenir la inactivación de la APX. La actividad se determinó según describe Jiménez y col. (1997), midiendo a 290 nm la oxidación del ácido ascórbico, durante un minuto. La mezcla de reacción contenía tampón Hepes-NaOH 50 mM, pH 7,6, ascorbato 0,2 mM, H₂O₂ 0,3 mM, y la muestra convenientemente diluida. La reacción (en un volumen final de 1 ml) se realizó a 25°C y se inició con la adición del H₂O₂. La actividad enzimática, expresada en nmoles de ácido ascórbico oxidado x min⁻¹ x ml⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico de 2,8 mM⁻¹ x cm⁻¹ (Hossain y Asada, 1984a). Se utilizaron tres controles, uno sin H₂O₂, otro sin

ascorbato y otro sin muestra. Como control negativo de la reacción se utilizó un inhibidor de la APX, el pcloromercurifenilsulfónico (pCMS).

8.7 Determinación de la actividad glicolato oxidasa.

Se midió espectrofotométricamente según el método de Kerr y Groves (1975). La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía tampón fosfato-K 50 mM, pH 8,3, fenilhidracina 10 mM y glicolato 5 mM. La reacción se inició por adición de la muestra, midiéndose la formación del complejo glioxilato-fenilhidrazona a 324 nm durante 3 min. La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el complejo de $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kerr y Groves, 1975).

9. SOFTWARE.

9.1 Tratamiento de imágenes.

Para el tratamiento de imágenes y el cálculo de áreas se usó el programa “*Photoshop CS5*®” (Adobe).

Para el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se usó el programa de edición de imágenes “*Nikon EZ-C1 FreeViewer*®” (Nikon).

Para el revelado de membranas se utilizó el programa “*Quantity One*” (Bio-Rad).

9.2 Análisis de parámetros fotosintéticos.

Los datos de fotosíntesis neta (A) frente a PAR fueron analizados mediante el programa *Photosyn Assistant* de la Universidad de Dundee (UK) (www.ddsci.com). Este software permitió estimar la eficiencia cuántica aparente (ϕ), el valor de fotosíntesis neta a Ci saturantes (Amax) y la tasa de respiración mitocondrial aparente (Rday).

9.3 Cálculos y representaciones gráficas.

Para el tratamiento de datos, realización de gráficos y figuras se ha utilizado la aplicación informática SigmaPlot 10.0 y Microsoft Office Excel 2007.

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólica: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

IV. RESULTADOS

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólica: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

IV. RESULTADOS

1. Aislamiento de los mutantes de inserción de ADN-T y análisis de la pérdida de función

1.1 Aislamiento de las líneas *cfbp1*, *cyfbp* y *cyfbp cfbp*

Las líneas homocigotas *cfbp1* y *cyfbp* se obtuvieron mediante genotipado por PCR detectando la localización de la inserción del ADN-T en la posición indicada por los laboratorios SALK (Figura 1A). La línea homocigota del doble mutante de pérdida de función de las FBPasas, *cfbp1 cyfbp* se obtuvo mediante cruce entre las dos líneas mutantes simples.

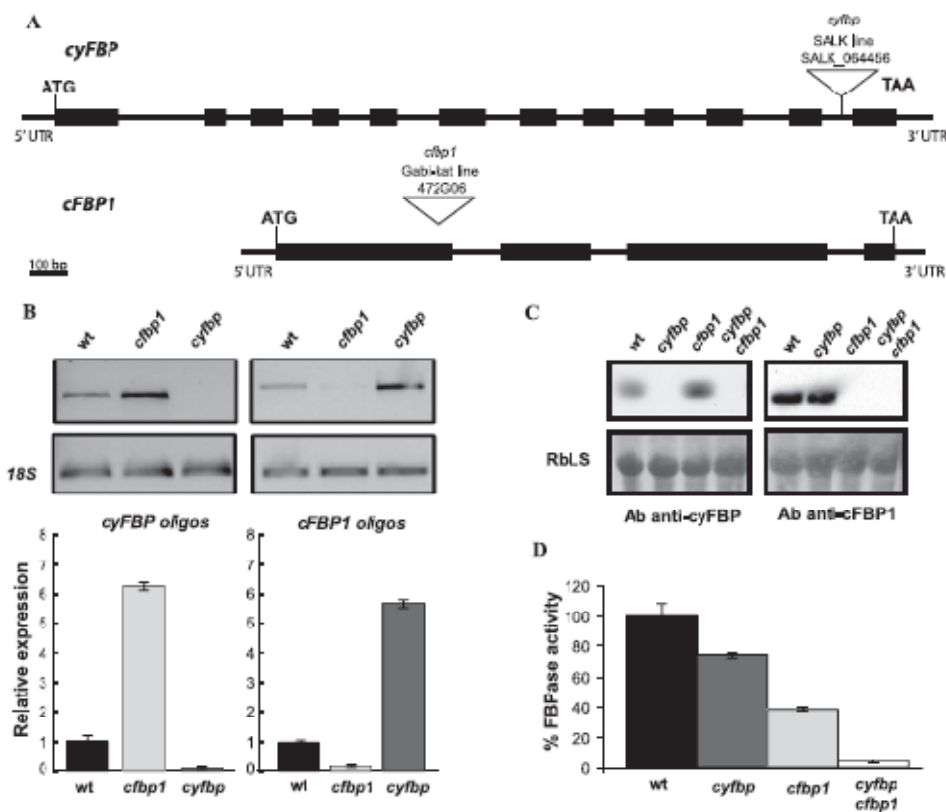


Figura 1. Análisis de líneas mutantes. (A) Estructura genómica de *cyFBP* y *cFBP1*. Los exones e intrones están indicados como barras gruesas y delgadas, respectivamente. Los sitios de inserción de T-DNA en las líneas mutantes *Atcyfbp* y *Atcfbp1* en el intrón 11 y el exón 1 respectivamente están indicados por triángulos. (B) Perfil de expresión de cada AtFBPasa utilizando oligonucleótidos específicos en los mutantes *Atcyfbp* y *Atcfbp1* y de tipo silvestre (WT-Col0), se usó el gen 18s de “housekeeping”. (C) Western blot análisis de extractos de hojas crudas de los mutantes *Atcyfbp*, *Atcfbp1*, *cyfbp cfbp1* y silvestre. Las proteínas (25 μ g) fueron separadas por electroforesis de SDS-PAGE, transferidas a filtros de nitrocelulosa e inmunomarcadas con antisuero de conejo inmunizado contra las proteínas Ab *cyFBP* y Ab *cFBP1* (ver Materiales y métodos). Las bandas tienen aproximadamente 40 kDa y se usó RbLS como control de carga.

Las líneas homocigotas se identificaron por la observación de un solo amplicón que contiene la secuencia del gen y del ADN-T, y de mayor tamaño que el amplicón procedente del gen silvestre. A las líneas mutantes defectivas en los genes FBPassa cloroplastídica y citosólica se les denominó *cfbp1* y *cyfbp*, respectivamente. El doble mutante *cfbp1 cyfbp* se obtuvo mediante cruce de las líneas mutantes *cfbp1* y *cyfbp* y al aislamiento tras la segregación de la descendencia del doble heterocigoto.

El análisis mediante RT-PCR semicuantitativa usando oligonucleótidos específicos confirmó la ausencia de transcritos en los mutantes simples *cfbp1* y *cyfbp*, indicando que ambas líneas de pérdida de función o knock-out para las respectivas FBPassas plastidial y citosólica (Figura 1B). Ensayos de western blotting con anticuerpos específicos anti-cFBP1 y anti-cyFBP indicaron la desaparición de las bandas que corresponden a las proteínas tanto en los mutantes simples como en el mutante doble (Figura 1C).

2. Caracterización fisiológica.

2.1 Porcentaje de germinación

Los porcentajes de germinación del silvestre Col0 y *cfbp1* alcanzaron el 92 y 90% respectivamente a partir de los 4 días de crecimiento in vitro. Mientras que el porcentaje de germinación de las líneas mutantes *cyfbp* y doble mutante *cfbp1 cyfbp* fueron levemente más bajos, 87 y 86% respectivamente, en relación a las plantas silvestres tras 4 días en medio de cultivo in vitro (Figura x y Tabla x).

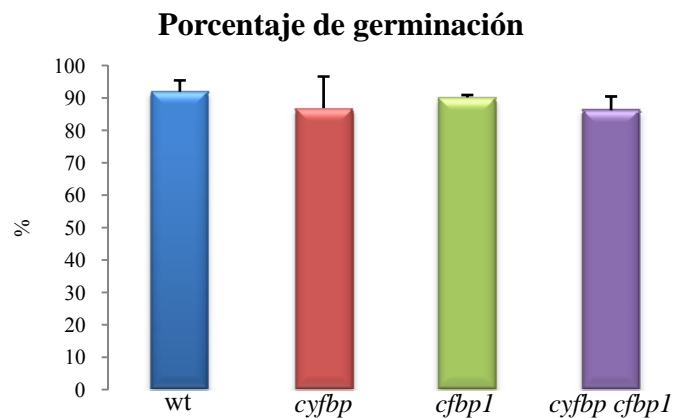


Figura 2. Porcentaje de germinación de las líneas mutantes *cyfbp*, *cfbp1*, doble mutante *cyfbp cbp1* y de la planta silvestre Col 0. Cada punto es la media de 7 plantas.

Tabla 1. Porcentaje de germinación

	Porcentaje de germinación (%)
wt	92 ± 3,5
<i>cyfbp</i>	87 ± 9,7
<i>cfbp1</i>	90 ± 0,7
<i>cyfbp cfbp1</i>	86 ± 4,3

Valores en tanto por ciento del índice de germinación de las líneas mutantes *cyfbp*, *cfbp1*, doble mutante *cyfbp cfbp1* y de la planta silvestre Col 0. Cada punto es la media de 7 plantas. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre medias con respecto a la correspondiente línea silvestre y se indican con asteriscos (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

2.2 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

2.2.1 Contenido de clorofilas y carotenoides en condiciones normales de cultivo

Los niveles de las clorofilas a, b y el ratio Chl a/b de los mutantes y de la línea control fueron medidos en hojas de roseta de plantas de 25 dpv que crecieron en condiciones de día largo.

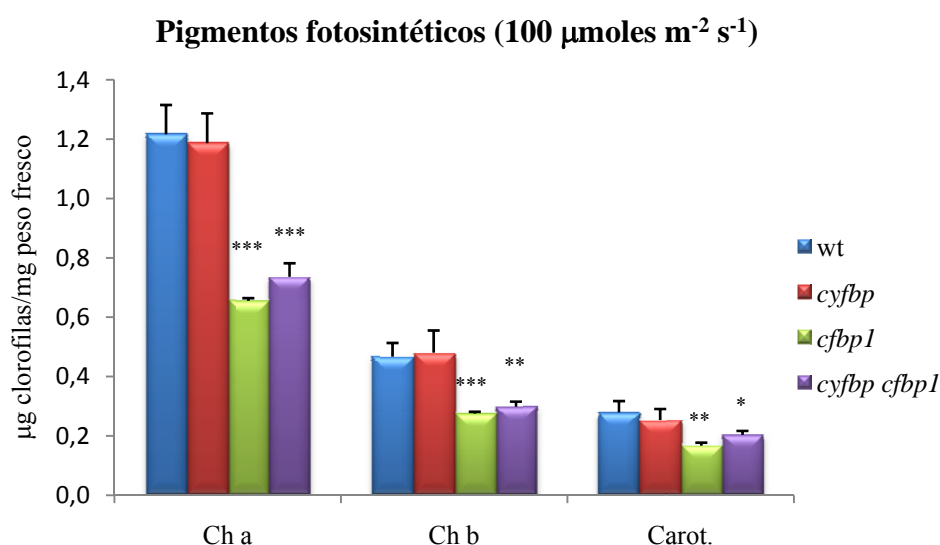


Figura 3. Contenido de pigmento de clorofila a y b y carotenoides en plantas de tipo silvestres (wt) y *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*. Los valores corresponden a las medias \pm SE de determinaciones en al menos 5-7 hojas de tres plantas diferentes. Las barras de error muestran el error estándar de la media al cuadrado. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre medias con respecto a la correspondiente línea silvestre y se indican con asteriscos (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

Los contenidos de Chla, Chlb y carotenoides se redujeron considerablemente (~ 40-50%) en los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* en comparación con el tipo silvestre, mientras que los del mutante *cyfbp* muestra valores similares a los de Col 0 (Fig. x, Tabla x).

Tabla 2. Contenido en pigmentos fotosintéticos en condiciones normales de crecimiento.

	Ch a	Ch b	Carot.	RCh a/Ch b
wt	1,22 ± 0,10	0,47 ± 0,05	0,28 ± 0,04	2,60
cyfbp	1,19 ± 0,10	0,48 ± 0,07	0,25 ± 0,04	2,48
cfbp1	0,66 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,17 ± 0,01	2,36
cyfbp cfbp1	0,74 ± 0,05	0,30 ± 0,02	0,20 ± 0,01	2,47

2.2.2 Contenido de clorofilas y carotenoides en condiciones de cultivo con intensidad lumínica ligeramente superior

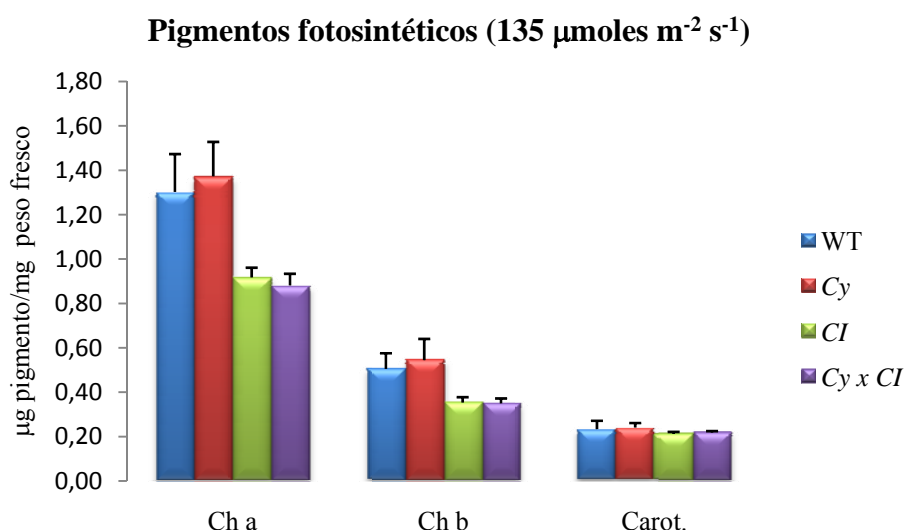


Figura 4. Contenido de pigmento de clorofila a y b y carotenoides en plantas de tipo silvestres (wt) y *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* en condiciones de luz ligeramente alta. Los valores corresponden a las medias \pm SE de determinaciones en al menos 5-7 hojas de tres plantas diferentes. Las barras de error muestran el error estándar de la media al cuadrado. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre medias con respecto a la correspondiente línea silvestre y se indican con asteriscos (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

Tabla 3. Contenido en pigmentos fotosintéticos en crecimiento con intensidad lumínica de 135 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

	Ch a	Ch b	Carot.	RCh a/Ch b
wt	1,30 ± 0,17	0,50 ± 0,07	0,23 ± 0,04	2,60
cyfbp	1,37 ± 0,16	0,54 ± 0,10	0,24 ± 0,02	2,54
cfbp1	0,92 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,21 ± 0,01	2,63
cyfbp cfbp1	0,88 ± 0,05	0,41 ± 0,02	0,22 ± 0,01	2,15

2.2.3 Contenido de clorofilas y carotenoides en condiciones de cultivo con alta intensidad de luz

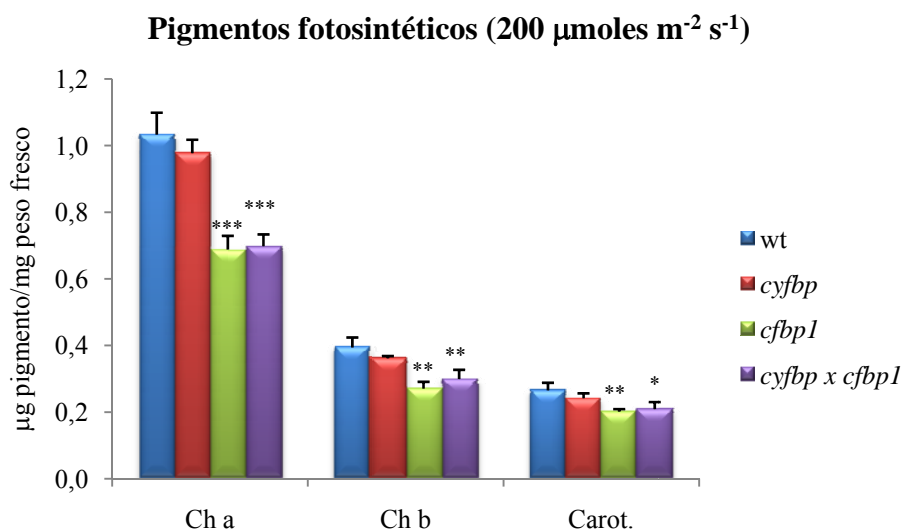


Figura 5. Contenido de pigmento de clorofila a y b y carotenoides en plantas de tipo silvestres (wt) y *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* en condiciones de alta luz. Los valores corresponden a las medias \pm SE de determinaciones en al menos 5-7 hojas de tres plantas diferentes. Las barras de error muestran el error estándar de la media al cuadrado. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre medias con respecto a la correspondiente línea silvestre y se indican con asteriscos (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001).

Tabla 4. Contenido en pigmentos fotosintéticos en crecimiento con intensidad lumínica de 200 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

	Ch a	Ch b	Carot.	RCh a/Ch b
wt	1,03 \pm 0,07	0,39 \pm 0,03	0,27 \pm 0,02	2,64
<i>cyfbp</i>	0,98 \pm 0,04	0,36 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01	2,72
<i>cfbp1</i>	0,69 \pm 0,04	0,27 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01	2,56
<i>cyfbp x cfbp1</i>	0,70 \pm 0,04	0,30 \pm 0,03	0,21 \pm 0,02	2,33

2.2.4 Contenido en antocianinas en condiciones normales de cultivo

La determinación del contenido de antocianinas en hojas de roseta de 25 dpq de las diferentes líneas mutantes mostró que la falta de cFBP1 indujo un incremento de más de 30 veces en el mutante *cfbp1* y del doble en *cyfbp cfbp1*, sugiriendo una situación de estrés.

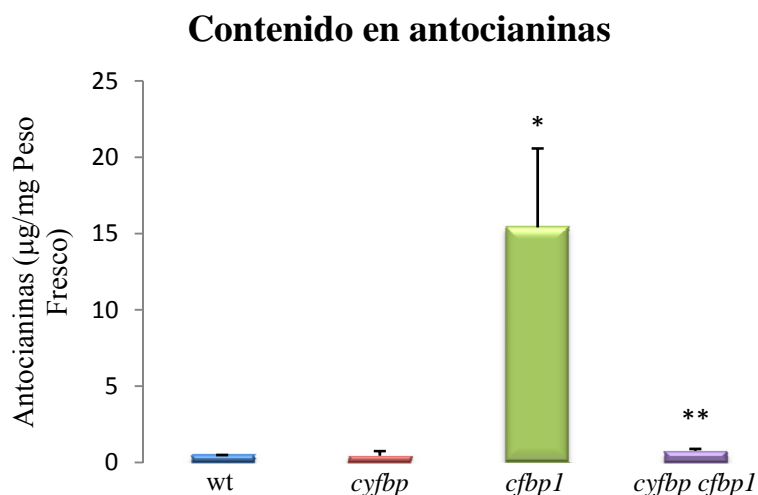


Figura 6. Contenido en antocianinas en las hojas de las líneas mutantes *cyfbp*, *cfbp1*, *cyfbp cfbp1* y de la línea control Col 0. Las extracciones se realizaron con hojas de roseta de plantas de 25 dpg cultivadas en condiciones de día largo. Se muestran las medias correspondientes a 5-7 hojas de 3 plantas diferentes. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre medias con respecto a la correspondiente línea silvestre y se indican con asteriscos (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Tabla 5. Contenido en antocianinas.

	(µg/mg Peso Fresco)
wt	0,5±0,0
<i>cyfbp</i>	0,4±0,3
<i>cfbp1</i>	15,4±5,2
<i>cyfbp cfbp1</i>	0,8±0,1

2.3 Medida del número de hojas de la roseta, peso fresco y área foliar en condiciones normales de crecimiento.

Las líneas mutantes y las plantas silvestres fueron sembradas en alveolos con una mezcla de compost y vermiculita. Tras el periodo de estratificación se pusieron a crecer en cámara de cultivo con un fotoperiodo de día largo, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, T^a de 23°C y 60% de humedad. Cada 5 días durante un periodo de 30 días se determinó el número de hojas por plántula, el peso de 5 plantas y el área foliar por roseta (Figura 7, A, B y C).



Figura 7. Línea silvestre y mutantes.

La apariencia del *cyfbp* es ligeramente menor que en las plantas de tipo silvestre (Fig. 7) y no se observa una diferencia importante para este mutante. Sin embargo, la ausencia de cFBP1 tiene un efecto dramático en el desarrollo de la planta y las rosetas tanto de *cfbp1* como del mutante *cyfbp cfbp1* tuvieron un menor número de hojas, un tamaño más pequeño y una menor tasa de crecimiento en relación a la planta control Col 0 (Fig.7). El peso fresco y el área de la hoja disminuyeron 7 y 5 veces, en los mutantes *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*, respectivamente, en comparación con las plantas control Col 0 (Fig. 8; Tabla 6).

	Nº hojas	Peso fresco (mg)	Área (cm ²)
wt	11,1 ± 0,8	1019,2 ± 101,6	9,6 ± 1,6
<i>cyfbp</i>	11,3 ± 0,8	730,2 ± 71,6*	6,3 ± 1,6**
<i>cfbp1</i>	9,3 ± 0,8***	151,3 ± 1,9**	2,0 ± 0,1***
<i>cyfbp cfbp1</i>	8,9 ± 1,0***	147,5 ± 11,7**	1,9 ± 0,1***

Tabla 6: Parámetros fisiológicos en condiciones de crecimiento normales de cultivo (CN).

Las condiciones de cultivo normales se corresponden con un ciclo de día largo, 16 h de iluminación y 8 h de oscuridad, con una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, siendo la concentración de CO₂ la ambiental, aproximadamente 350 ppm. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre medias con respecto a la correspondiente línea silvestre y se indican con asteriscos (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

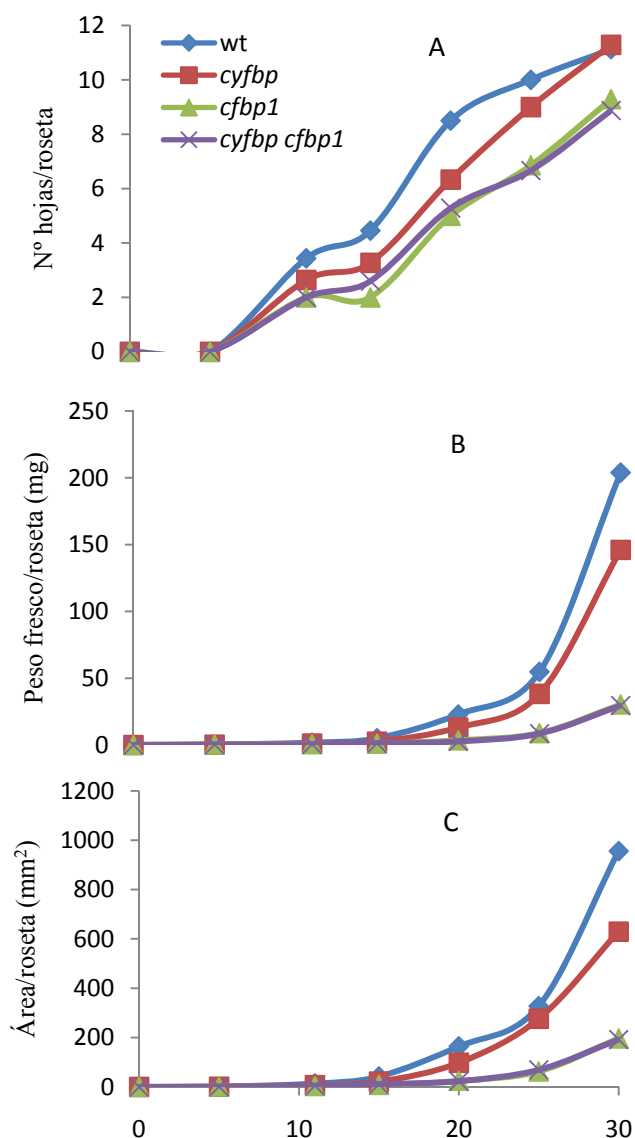


Figura 8.

2.4 Crecimiento en condiciones de alta luz.

Las líneas mutantes y las plantas silvestres fueron sembradas en alveolos con una mezcla de compost y arena. Tras el periodo de estratificación se pusieron a crecer en cámara de cultivo con un fotoperiodo de día largo, $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, T^a de 23°C y 60% de humedad. Cada 5 días durante un periodo de 30 días se determinó el número de hojas por plántula, el peso de 5 plantas y el área foliar por roseta (Figura 10, A, B y C).

Figura 9. Plantas crecida en condiciones de AL.

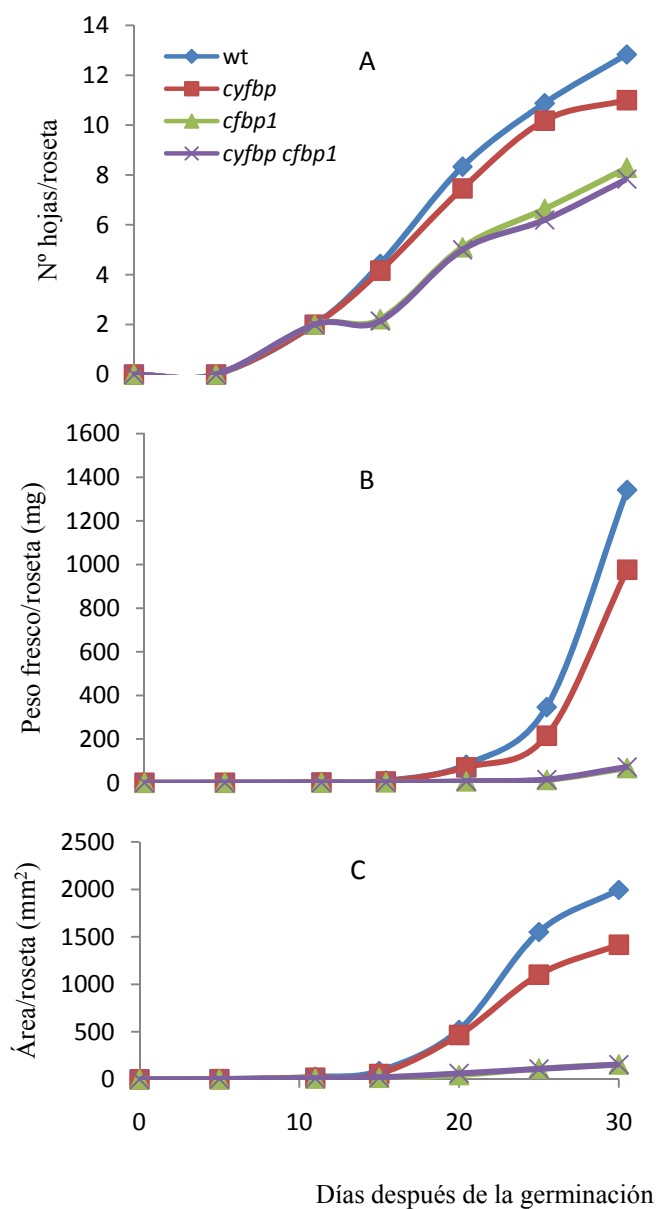
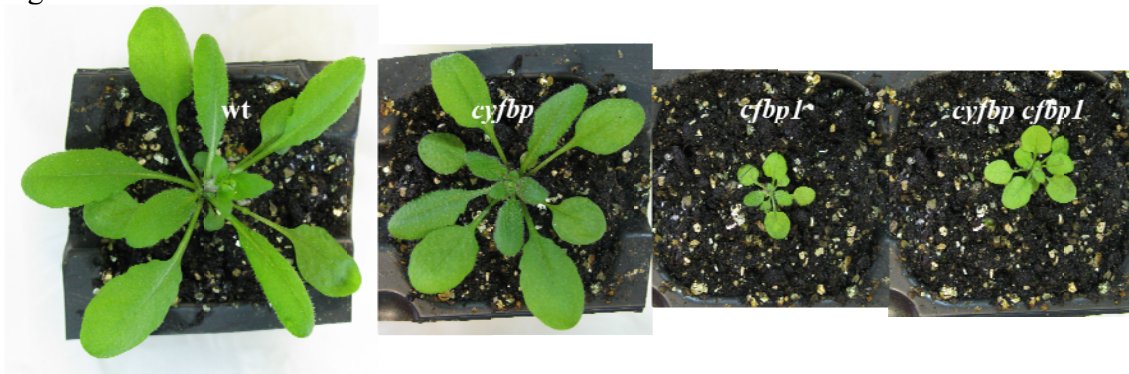


Figura 10.

	Nº hojas	Peso fresco (g)	Área (cm ²)
wt	12,8 ± 1,5	1341,9 ± 139,8	20,0 ± 5,4
<i>cyfbp</i>	11,0 ± 1,7*	976,5 ± 44,1***	14,2 ± 2,9
<i>cfbp1</i>	8,3 ± 1,0***	66,8 ± 30,4***	1,6 ± 0,3*
<i>cyfbp cfbp1</i>	7,8 ± 0,4***	72,5 ± 32,6***	1,6 ± 0,2*

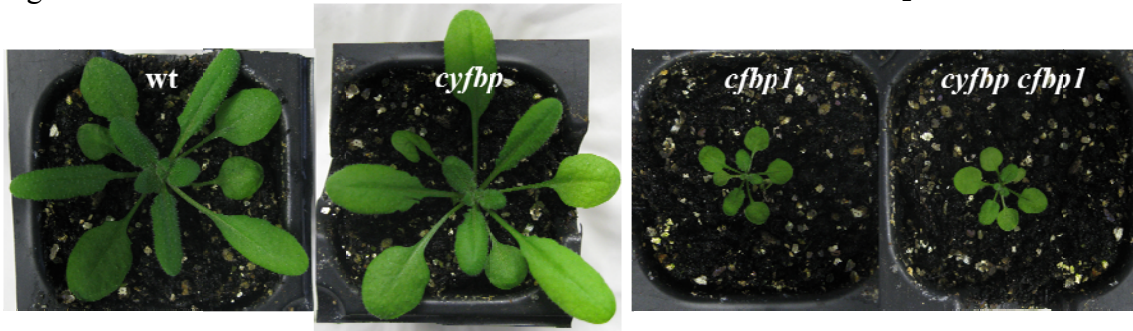
Tabla 7: Parámetros fisiológicos en condiciones de crecimiento de alta luz (AL). Las condiciones de cultivo en alta luz se corresponden con un ciclo de día largo, 16 h de iluminación y 8 h de oscuridad, con una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, siendo la concentración de CO₂ la ambiental, aproximadamente 350 ppm. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre medias con respecto a la correspondiente línea silvestre y se indican con asteriscos (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

El crecimiento con una intensidad de luz dos veces mayor, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, no afectó de forma significativa al número de hojas de las distintas líneas, pero provocó en la planta silvestre (Col 0) y la línea mutante *cyfbp* el aumento de un 30% de sus peso por plántula respectivamente, y 2 veces el área de sus hojas. El efecto contrario se observó en las líneas con pérdida de función de la cFBP1, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*, con una disminución de 2 veces el peso, y de un 20% el área con respecto a condiciones de luz normal.

2.5 Condiciones de crecimiento en alta concentración de CO₂.

Las líneas mutantes y las plantas silvestres fueron sembradas en alveolos con una mezcla de compost y arena. Tras el periodo de estratificación se pusieron a crecer en cámara de cultivo con un fotoperiodo de día largo, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 700 ppm de CO₂, T^a de 23°C y 60% de humedad. Cada 5 días durante un periodo de 30 días se determinó el número de hojas por plántula, el peso de 5 plantas y el área foliar por roseta (Figura 12, A, B y C).

Figura 11. Plantas crecidas en condiciones de alta concentración de CO₂.



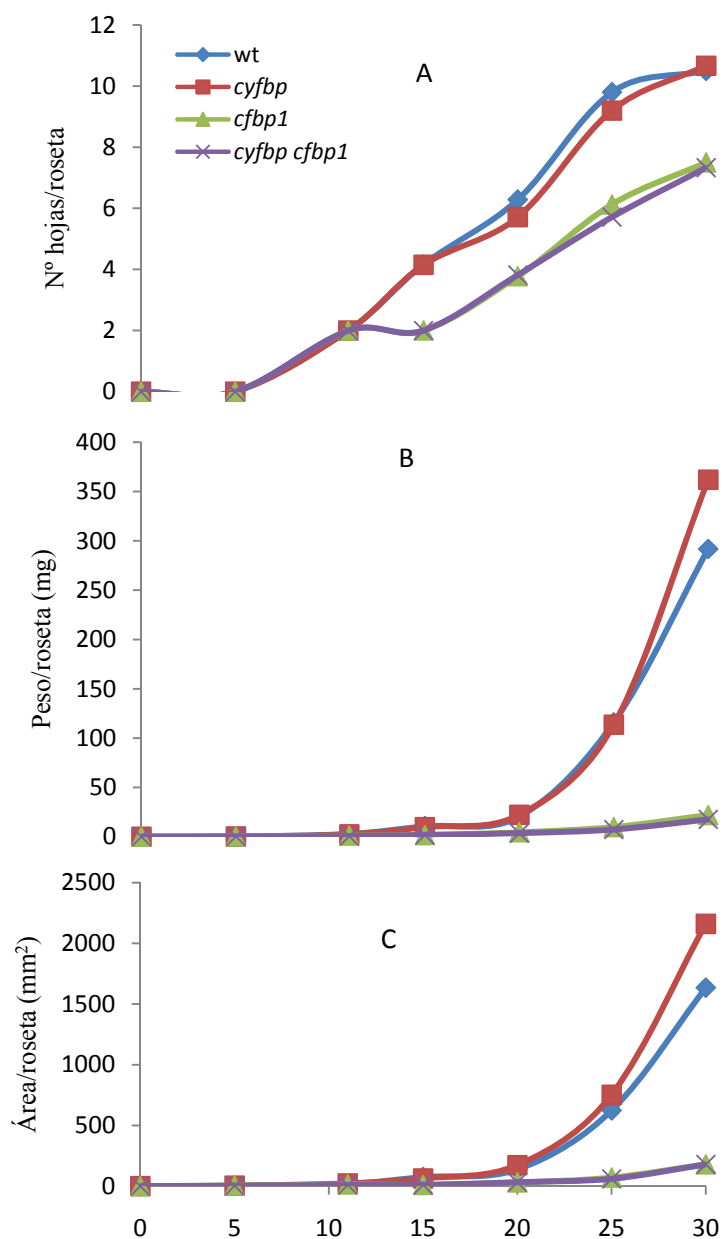


Figura 12.

Tabla 8: Parámetros fisiológicos en condiciones de crecimiento de alto CO₂ (AC)

	N° hojas	Peso fresco (g)	Área (cm ²)
wt	10,5 ± 0,5	291,8 ± 37,8	16,3 ± 0,2
<i>cyfbp</i>	10,7 ± 0,5	362,0 ± 1,7	21,6 ± 1,1*
<i>cfbp1</i>	7,5 ± 0,5***	21,9 ± 4,7***	1,8 ± 0,5***
<i>cyfbp cfbp1</i>	7,3 ± 0,8***	17,6 ± 7,6***	1,8 ± 0,3***

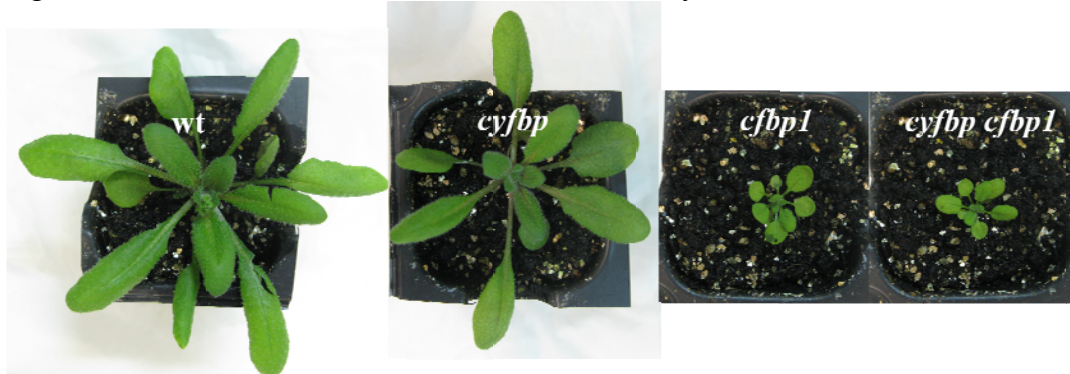
Las condiciones de cultivo en alta concentración de CO₂, se corresponden con un ciclo de día largo, 16 h de iluminación y 8 h de oscuridad, con una intensidad lumínica de 100 μmol·m⁻²·s⁻¹, siendo una concentración de CO₂ de 700 ppm. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre medias con respecto a la correspondiente línea silvestre y se indican con asteriscos (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001).

Comparando con las condiciones normales de crecimiento, se produce una ligera disminución del número de hojas cuando el crecimiento de las plántulas se hace en una cámara de cultivo cuya concentración de CO₂ es de 700 ppm, al menos el doble del que se encuentra en el medio ambiente. El peso de las plantas silvestres disminuyó un 75%, mientras que lo hizo un 50% para *cyfbp*. La reducción del peso para *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* fue de 7 y 8 veces respectivamente. El área de Col 0 incrementó un 70%, y fue 3,5 veces mayor para *cyfbp*. Los cambios no fueron significativos en el caso de las otras dos líneas mutantes.

2.6 Condiciones de crecimiento en alta luz y alta concentración de CO₂.

Las líneas mutantes y las plantas silvestres fueron sembradas en alveolos con una mezcla de compost y arena. Tras el periodo de estratificación se pusieron a crecer en cámara de cultivo con un fotoperiodo de día largo, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 700 ppm de CO₂, T^a de 23°C y 60% de humedad. Cada 5 días durante un periodo de 30 días se determinó el número de hojas por plántula, el peso de 5 plantas y el área foliar por roseta (Figura 14, A-C).

Figura 13. Plantas crecida en condiciones de alta luz y alta concentración de CO₂.



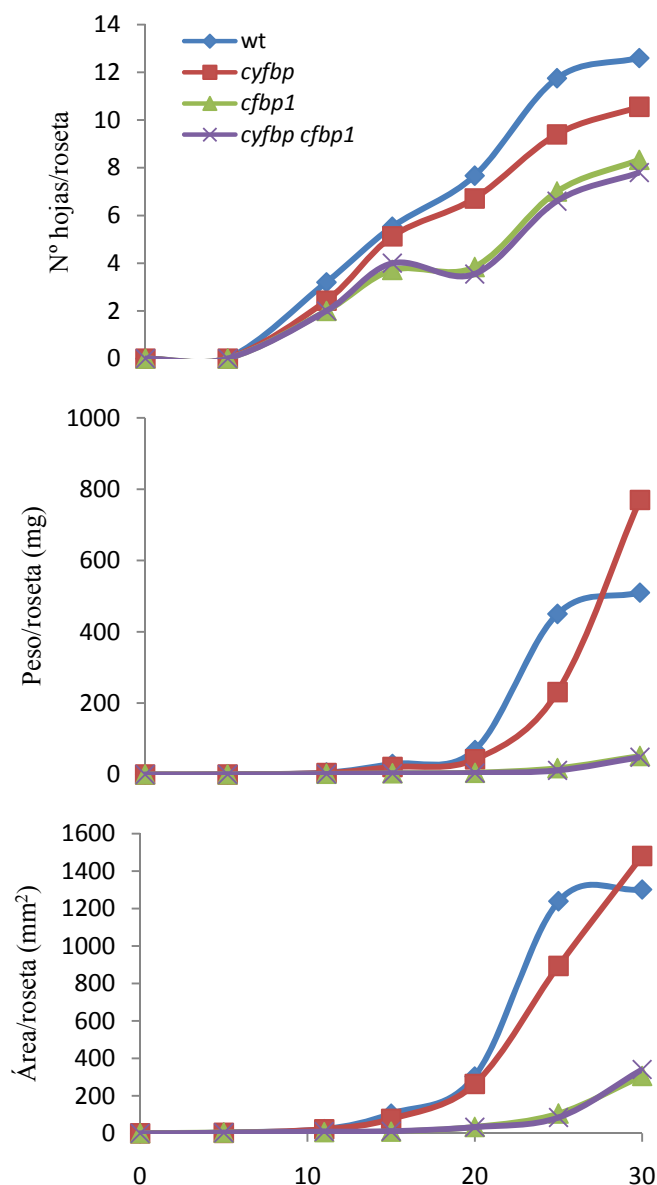


Figura 14.

Tabla 9: Parámetros fisiológicos en condiciones de crecimiento de alta luz y alto CO₂ (AC)

	N° hojas	Peso fresco (g)	Área (cm ²)
wt	12,6 ± 0,5	510,1 ± 98,9	13,0 ± 1,4
<i>cyfbp</i>	10,6 ± 0,5***	770,0 ± 179,1	14,8 ± 2,9
<i>cfbp1</i>	8,3 ± 0,5***	51,7 ± 18,4***	3,1 ± 1,0***
<i>cyfbp cfbp1</i>	7,8 ± 1,3***	48,5 ± 3,7**	3,4 ± 0,1***

Las condiciones de cultivo en alta luz y alta concentración de CO₂ luz se corresponden con un ciclo de día largo, 16 h de iluminación y 8 h de oscuridad, con una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, siendo la concentración de CO₂ de 700 ppm. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre medias con respecto a la correspondiente línea silvestre y se indican con asteriscos (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001).

Comparando el crecimiento en condiciones normales y en alta luz y alta CO₂, el número de hojas fue similar ó disminuyó muy ligeramente. El peso de las plantas silvestres fue la mitad que en condiciones normales, el mismo para *cyfbp*, y 3 veces menor en el caso de *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*. El área de todas las líneas aumentó 1.3, 2.3, 1.6 y 1.8 veces respectivamente.

2.7 Densidad e índice estomático

El análisis de la morfología de los estomas por microscopía electrónica de barrido (SEM) mostró del lado abaxial de las hojas de *Arabidopsis* mostró un mayor cierre estomático en *cfbp1* y doble mutante *cyfbp cfbp1* en comparación con la observación del estoma totalmente abierto de las hojas de plantas tipo silvestre crecidas bajo condiciones ambientales. Como se muestra en la Figura 15 B – D, y Tabla 10, la densidad estomática en el lado adaxial de los mutantes *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* fueron 41, 23 y 29% más bajas, respectivamente, que la que encuentra en la superficie adaxial de las hojas de tipo silvestre Col 0. Sin embargo, los mismos mutantes tenían un 46%, un 62% y el doble de estomas por mm² en el lado abaxial comparando con el control Col 0, respectivamente. En relación al tamaño de la hoja, los valores del índice estomático de las hojas de la roseta de *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* fueron todas más bajas que las de la planta silvestre.

Densidad estomática e índice estomático en la epidermis de hojas de planta silvestre y en las líneas mutantes de *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*, tanto en la cara adaxial como abaxial.

Tabla 10: Densidad e índice estomático

	Densidad estomática		Índice estomático (%)	
	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial
wt	384±26	215±13	23±2	12±1
<i>cyfbp</i>	228±20 *	315±36 *	15±1 *	16±3
<i>cfbp1</i>	296±30 *	349±67 *	10±1 *	18±2 *
<i>cyfbp cfbp1</i>	274±44 *	442±41 *	11±1 *	14±3

Densidad estomática= n° de estomas/mm²; ±S.D (n=8)

Índice estomático= n° de estomas/(n° células epidérmicas + n° de estomas) x 100

Tabla 11: Densidad celular

	Adaxial	Abaxial
wt	1279 ± 77	1546 ± 123
<i>cyfbp</i>	1318 ± 106	1435 ± 163
<i>cfbp1</i>	2663 ± 232 *	1528 ± 224
<i>cyfbp1 cfbp</i>	2316 ± 355 *	2632 ± 536 *

Densidad celular, número/mm², ± S.D. (n=8)

En la tabla 11 se observa que la densidad celular del lado abaxial de las hojas de *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* es dos veces la de Col 0 y *cyfbp*, mientras que del lado abaxial solo es el doble en el caso del doble mutante.

Figura 15. Fotografías (A, B, C y D) al microscopio electrónico de barrido.

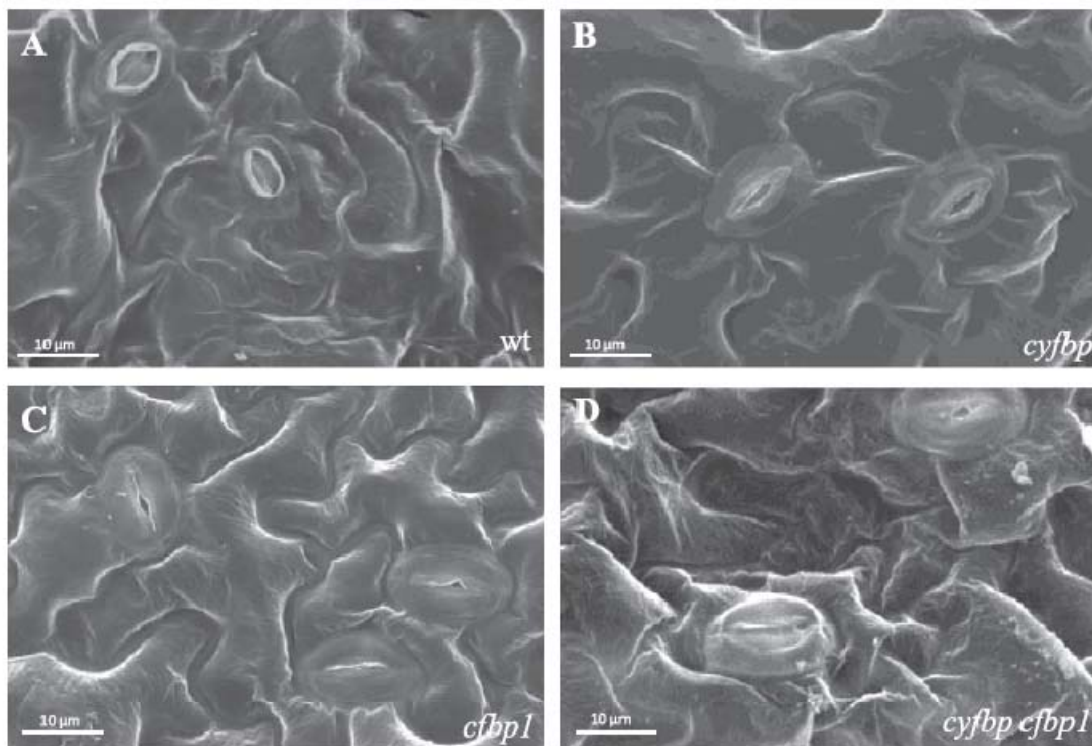
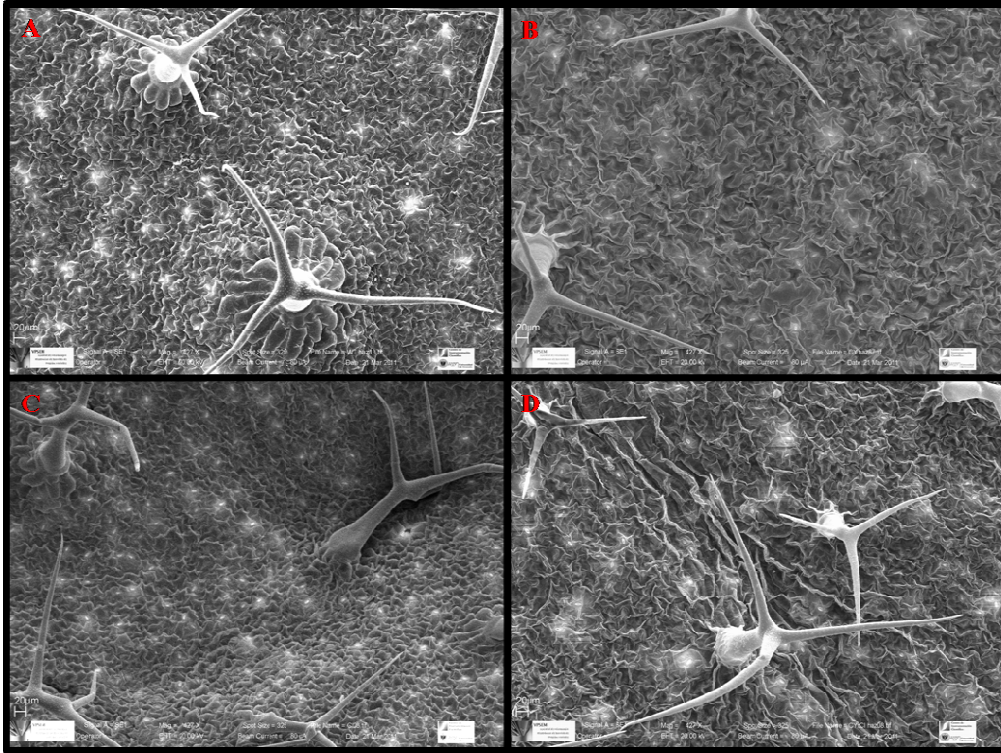


Figura 16. Fotografías (A, B, C y D) al microscopio electrónico de barrido.



Fotografías al microscopio electrónico de barrido que ilustran las diferencias morfológicas de los estomas de las superficies foliares "adaxiales" de *Arabidopsis* en el ecotipo silvestre wt (A), *cyfbp* (B), *cfbp1* (C) y *cyfbp cfbp1* (D). Las barras de escala son = 20 µm.

2.8 Alteraciones de la estructura celular de los mutantes *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*

La observación al microscopio óptico de secciones transversales de hojas de roseta y de raíz mostró diferentes tipos celulares en hojas, epidermis, mesófilo (empalizada y espongiforme), xilema, floema y estomas Figura 17.

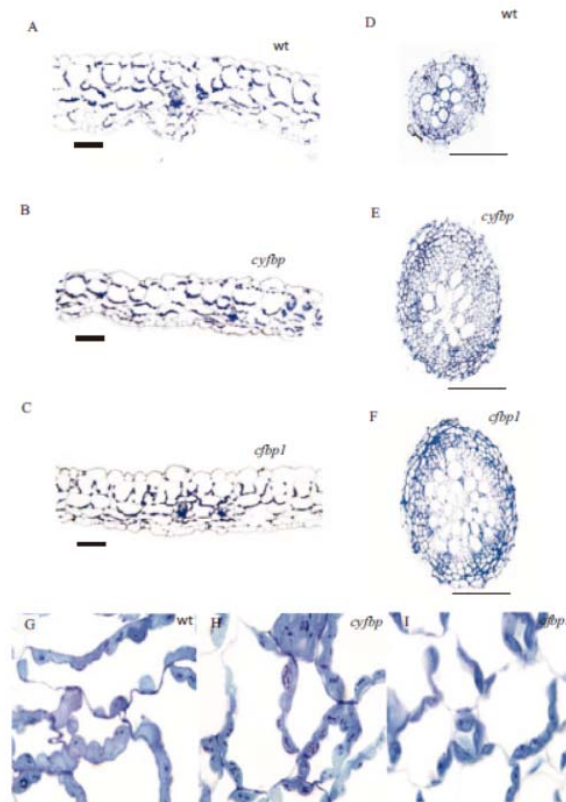


Figura 17. Imágenes de microscopía óptica de los tipos de células de la hoja (A – C), los cilindros vasculares de la raíz (D – F) y la estructura celular (G – I) del tipo silvestre (wt) y mutantes *cyfbp* y *cfbp1* de plantas de *Arabidopsis* cultivadas durante 21 días en un régimen de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. Sección transversal semi-fina de hojas y raíces de Col 0 (wt) (A, D, G), mutante *cyfbp* (B, E, H) y el mutante *cfbp1* (C, F, I) se tiñeron con azul de toluidina (que tiñe las proteínas). Barras de escala = 100 µm.

La estructura celular del mutante *cyfbp* es similar al de la planta de control, pero que cuando se examinaron a mayor aumento se observó que los cloroplastos contenían más gránulos de almidón (Fig. 17. Fotografías G – I). El mutante *cfbp1* tenía un mayor número de espacios intercelulares, y pocos cloroplastos con menos gránulos de almidón (solo uno en algunos casos) (Fig. 17. Fotografías I). Algunos de los cloroplastos tenían una distribución centrífuga, al ocupar una posición opuesta a la fuente de luz (Fig. 17. Fotografías C). La línea mutante *cyfbp cfbp1* mostró una estructura celular similar a su parental *cfbp1*. La mutación *cfbp1* dio lugar a un mayor número de capas de células en el cilindro vascular de la raíz, mostrando dos veces más células del tejido vascular por capa, en comparación con la raíz de tipo silvestre Col 0 (Fig. 17. Fotografías D, F). Sin embargo, no se observa desorganización, además la forma y tamaño de las células fueron normales. Las raíces del mutante *cyfbp* tenían un número ligeramente mayor de células en el cilindro vascular que en el control (Fig. 17. Fotografías D, E).

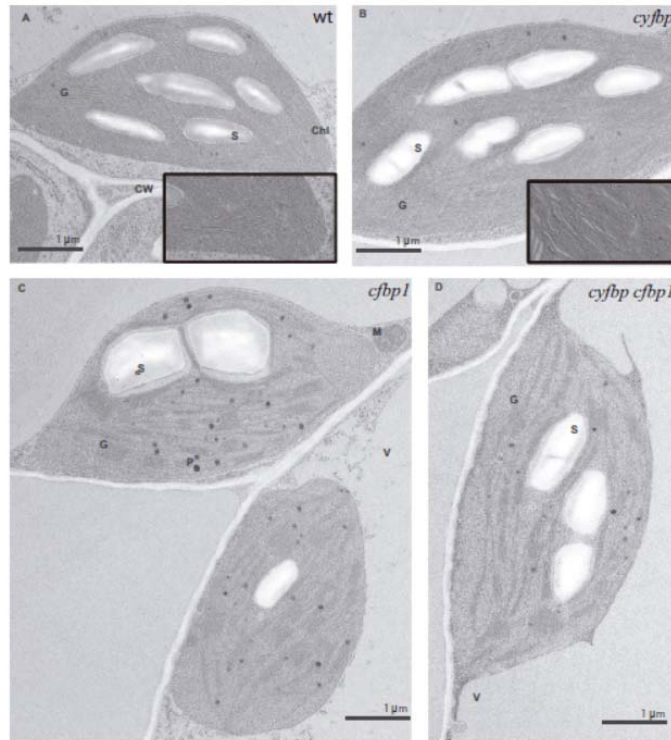


Figura 18. Análisis al microscopía electrónica de transmisión (TEM) de secciones transversales de hojas de plantas de tipo silvestre (wt) (A), *cyfbp* (B), *cfbp1* (C) y *cyfbp cfbp1* (D). Las hojas fueron recolectadas a las 4 h en un fotoperiodo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad, fijadas, embebidas y seccionadas como se describe en Materiales y métodos. G, grana; S, almidón; V vacuola P, plastoglóbulo; Chl, cloroplasto; CW, pared celular; M, mitocondria.

Las observaciones realizadas con el TEM mostraron una alteración en la estructura celular de los mutante *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*, que se caracterizó por una disminución en el número de tilacoides y láminas grana, pero sin interrumpir la ultraestructura del cloroplasto (Fig. 18). Asimismo, se detectó un mayor número de plastoglóbulos en los cloroplastos de las líneas mutantes *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* en comparación con el silvestre (Fig. 18, C, D). Se observó un menor contenido de almidón en *cfbp1* y el doble mutante que en *cyfbp* y Col 0 (Fig. 18, A, B).

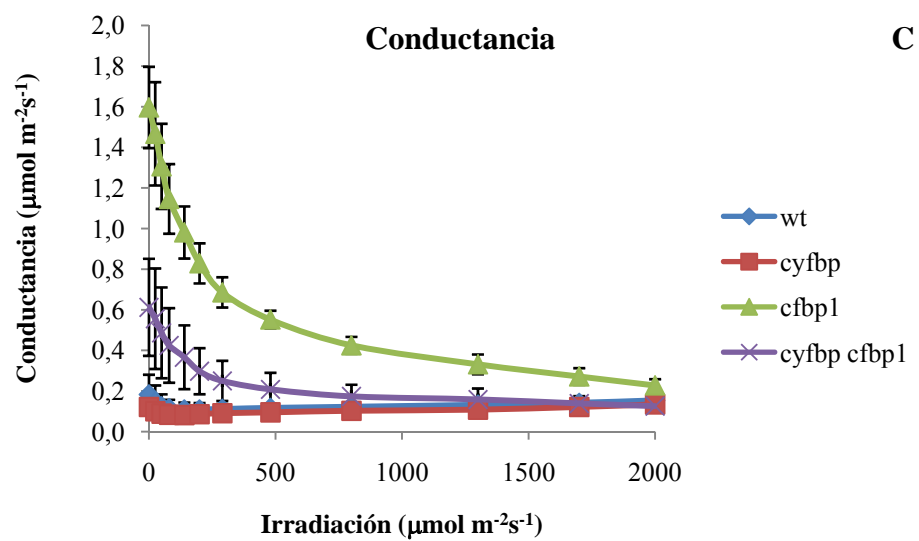
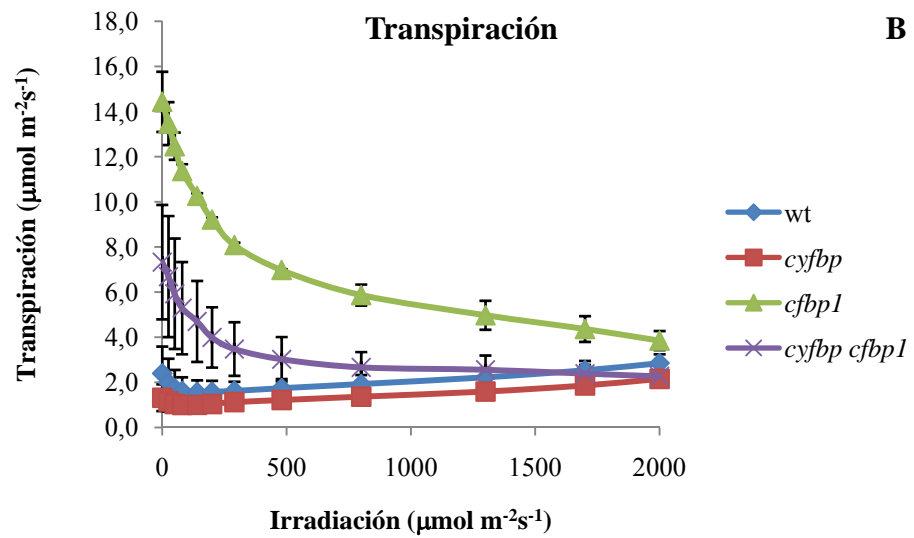
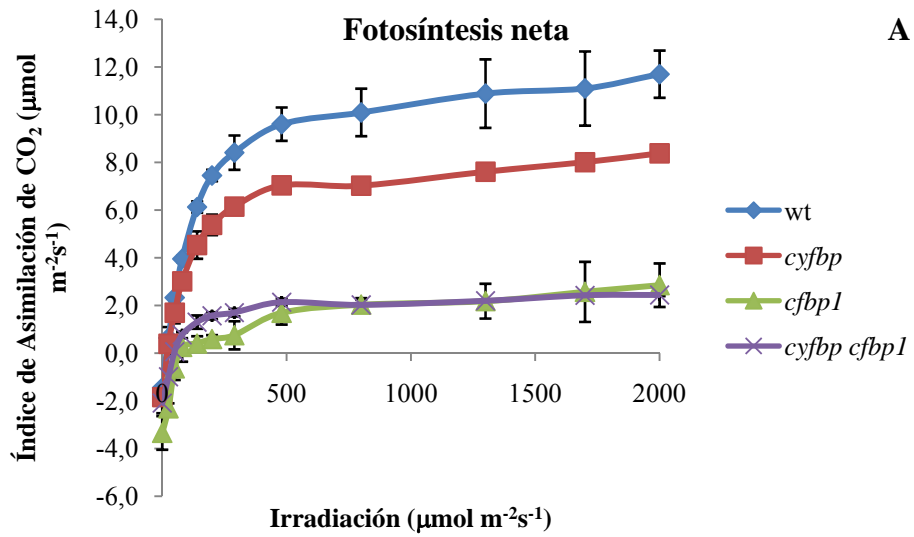
2.9 Determinación de la tasa fotosintética en distintas condiciones de cultivo

2.9.1 Determinación de parámetros fotosintéticos en condiciones normales de cultivo

- Medidas realizadas fijando la concentración de CO₂ (400 μmol) y variando la intensidad lumínica.

Se determinó con equipo IRGA el efecto de la eliminación de cFBP1 sobre la capacidad de asimilación de CO₂.

Con un sistema abierto de intercambio de gases (IRGA), se determinaron las tasas de asimilación de CO₂ (A) en hojas de plantas unidas al tallo cultivadas bajo una intensidad de luz 100 μmol m⁻² s⁻¹ y CO₂ ambiental. Las curvas de respuesta a la luz (A / Q) en CO₂ ambiental se muestran en la Figura 19 A. En estas condiciones, la tasa de fotosíntesis de la planta silvestre tenía un máximo de 13,5 μmol m⁻² s⁻¹ a 2000 μmol m⁻² s⁻¹. A intensidades de luz <250 μmol m⁻² s⁻¹, la tasa de asimilación del mutante *cyfbp* fue similar a la de Col 0, mientras que a mayores intensidades la tasa de asimilación fue ~ 33% menor. A intensidades de luz entre 100 μmol m⁻² s⁻¹ y 500 μmol m⁻² s⁻¹ (condiciones de crecimiento estándar), las curvas A de los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cbfp1* estaban superpuestas con valores cercanos a 1, indicando un deterioro en la capacidad de asimilación de CO₂ y un pobre ratio fotosíntesis / respiración. A intensidades más altas, ambos mutantes sin cFBP1 tenían una menor fijación de CO₂ (~ 6 veces) que el tipo silvestre, alcanzando un máximo de 3,4 μmol m⁻² s⁻¹ (Fig. 19 A). Los valores de transpiración (E) y conductancia estomática (gs) fueron mayores cuando menor era la irradiación en hojas *cfbp1* y *cyfbp cbfp1* en comparación con plantas de tipo silvestre (Fig. 19 B, C). Sin embargo, cuando se incrementó la intensidad de la luz, E y gs convergieron hasta alcanzar valores de Col 0 y el mutante *cyfbp* a 2000 μmol m⁻² s⁻¹ (Fig. 19 B, C).



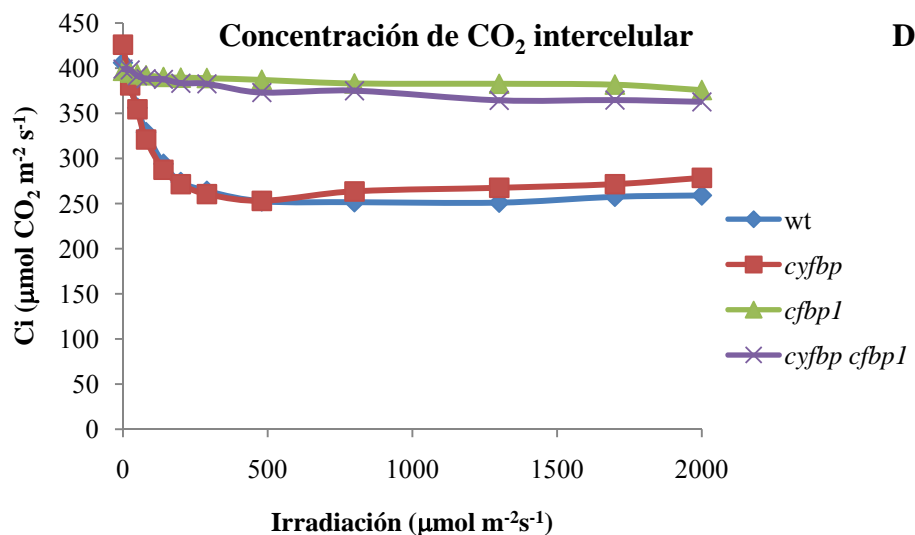
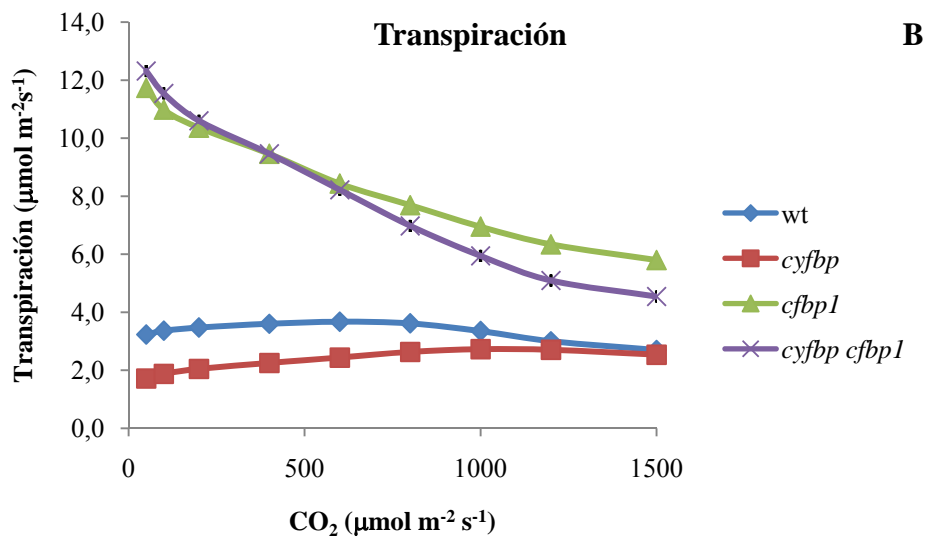
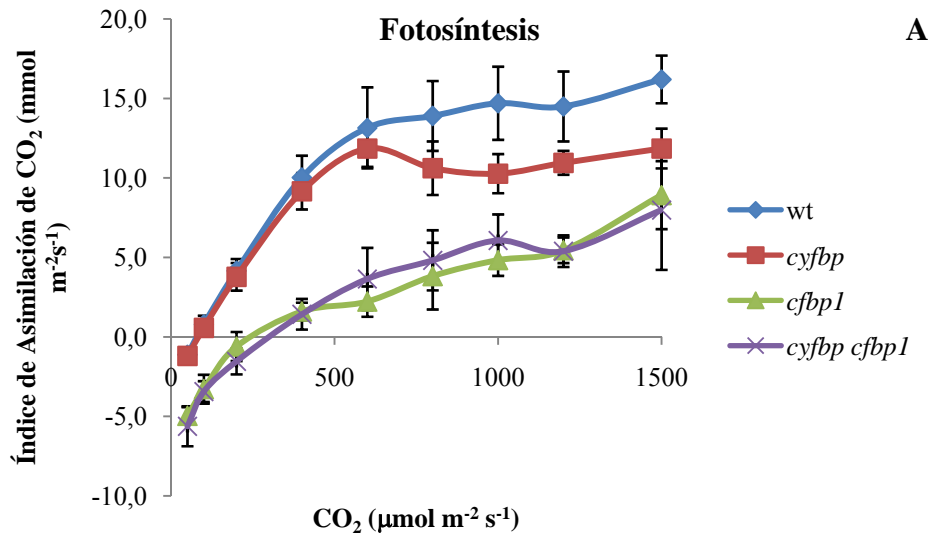


Figura 19. Capacidad fotosintética de los mutantes de tipo silvestre (wt) y *cyfbp*, *cpfbp1* y *cyfbp cpfbp1*. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas con intensidad de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 20 d. Las tasas de fijación de carbono fotosintético se determinaron en la hoja más joven totalmente expandida, en función del aumento de la irradiancia (A) a saturación de CO_2 ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$; curva de respuesta A / Q). La transpiración (E) y la conductancia estomática (gs) se determinaron en las mismas hojas (B y E). Los valores representan la media de ocho plantas \pm SE.

- Medidas realizadas fijando la intensidad lumínica ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y variando la concentración de CO_2 .

La respuesta de la fotosíntesis neta (A) al incremento interno de la concentración de CO_2 en la hoja (C_i) a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (curva A/ C_i) mostró un comportamiento similar (Fig. 20 D). La tasa fotosintética de plantas de tipo silvestre aumentó hasta un máximo de 16,2 a 1300 ppm de CO_2 . A la misma concentración de CO_2 , la A del mutante *cyfbp* disminuyó en un 25%, mientras que las plantas de *Arabidopsis cfbp1* y *cyfbp cfbp1* tenían una tasa de fotosíntesis dos veces más baja. Esto sugiere que la deficiencia de cFBP1 ejerce un mayor efecto sobre la fijación de CO_2 que la deficiencia de cyFBP. Los valores de transpiración del mutante *cfbp1* fueron más altos que los de las otras líneas mutantes y la planta control en todas las concentraciones de CO_2 probadas (Fig. 20 B). Curiosamente, la transpiración y la conductancia en el mutante *cyfbp cfbp1* (Fig. 20 B, C) mostró valores altos en concentraciones bajas de CO_2 pero estas disminuyeron lentamente a concentraciones más altas, alcanzando niveles similares a los valores de plantas control silvestre. No se detectaron diferencias

significativas para el E y gs de las plantas Col 0 y mutante *cyfbp* en relación con la concentración de CO₂ intercelular.



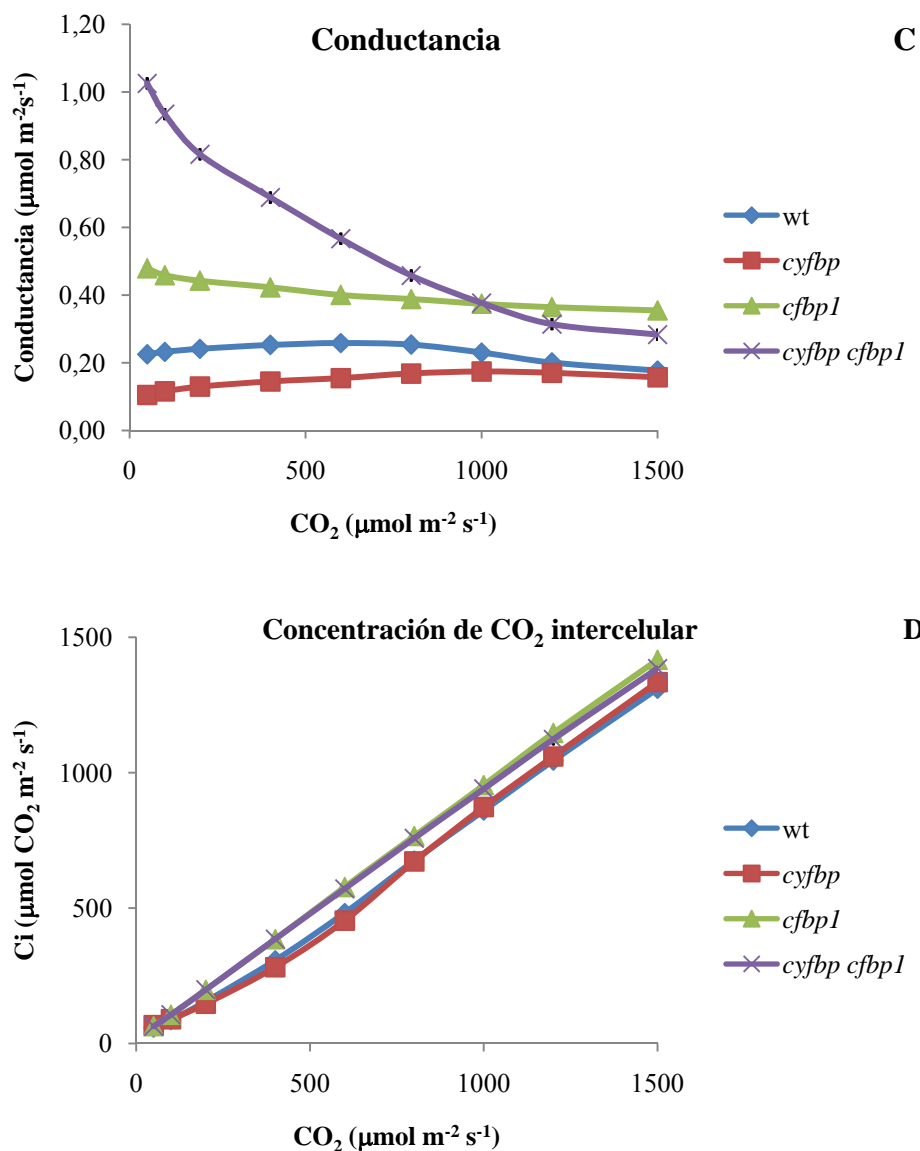
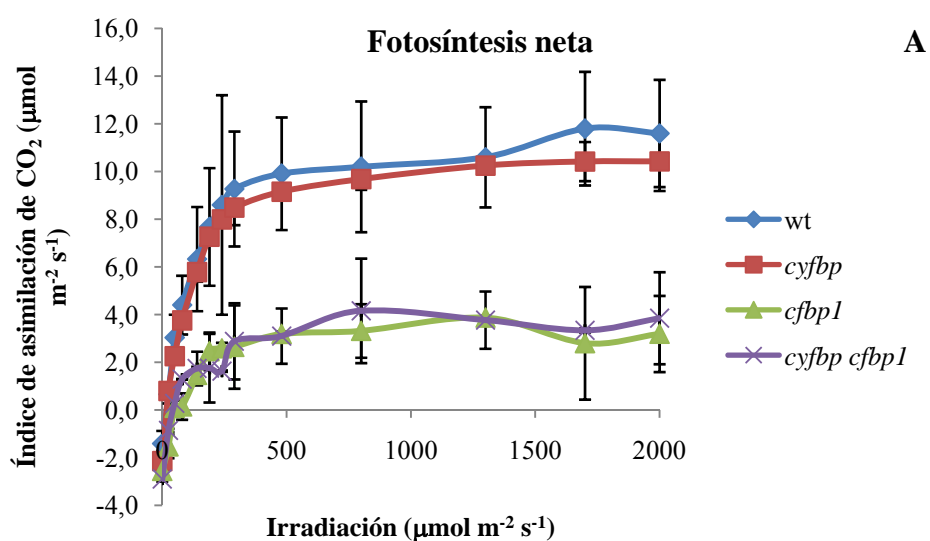


Figura 20. Capacidad fotosintética de los mutantes de tipo silvestre (wt) y *cyfbp*, *cpfbp1* y *cyfbp cpfbp1*. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas con intensidad de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 20 d. Las tasas de fijación de carbono fotosintético se determinaron en la hoja más joven totalmente expandida, en función del aumento de la concentración de CO₂ (D) a niveles de luz de saturación ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; curva de respuesta A / Ci). La transpiración (E) y la conductancia estomática (gs) se determinaron en las mismas hojas (B y C). Los valores representan la media de ocho plantas \pm SE.

2.9.2 Determinación de parámetros fotosintéticos en plantas crecidas en condiciones de cultivo con alta intensidad lumínica, $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

- Medidas realizadas fijando la concentración de CO₂ ($400 \mu\text{mol}$) y variando la intensidad lumínica.

Las curvas de respuesta a la luz (A / Q) en CO₂ ambiental se muestran en la Figura 21 A. En estas condiciones, la tasa de fotosíntesis de la planta silvestre tenía un máximo de 11.6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A intensidades de luz <250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la tasa de asimilación del mutante *cyfbp* fue igual a la de Col 0, alcanzando valores muy próximos al silvestre a mayores intensidades. A intensidades de luz entre 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (condiciones de crecimiento estándar), Las curvas A de los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cbp1* estaban superpuestas con valores que incrementaron en las primeras intensidad de luz del IRGA (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) hasta 3,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ manteniendo esos valores de tasa de asimilación hasta 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que representa 3 veces menos que la tasa obtenida para la planta silvestre (Fig. 21 A). Los valores de transpiración (E) y conductancia estomática (gs) fueron mayores cuando menor era la irradiación en hojas *cfbp1* en comparación con plantas de tipo silvestre (Fig. 21, B y C). Sin embargo, cuando se incrementó la intensidad de la luz, E y gs convergieron hasta alcanzar valores de *cyfbp cbp1*. La E y gs de Col 0 y el mutante *cyfbp* incrementaron hasta alcanzar un máximo a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pero que resultó ser inferior a los determinados para las líneas carentes de cFBP1 (Fig. 21, B y C).



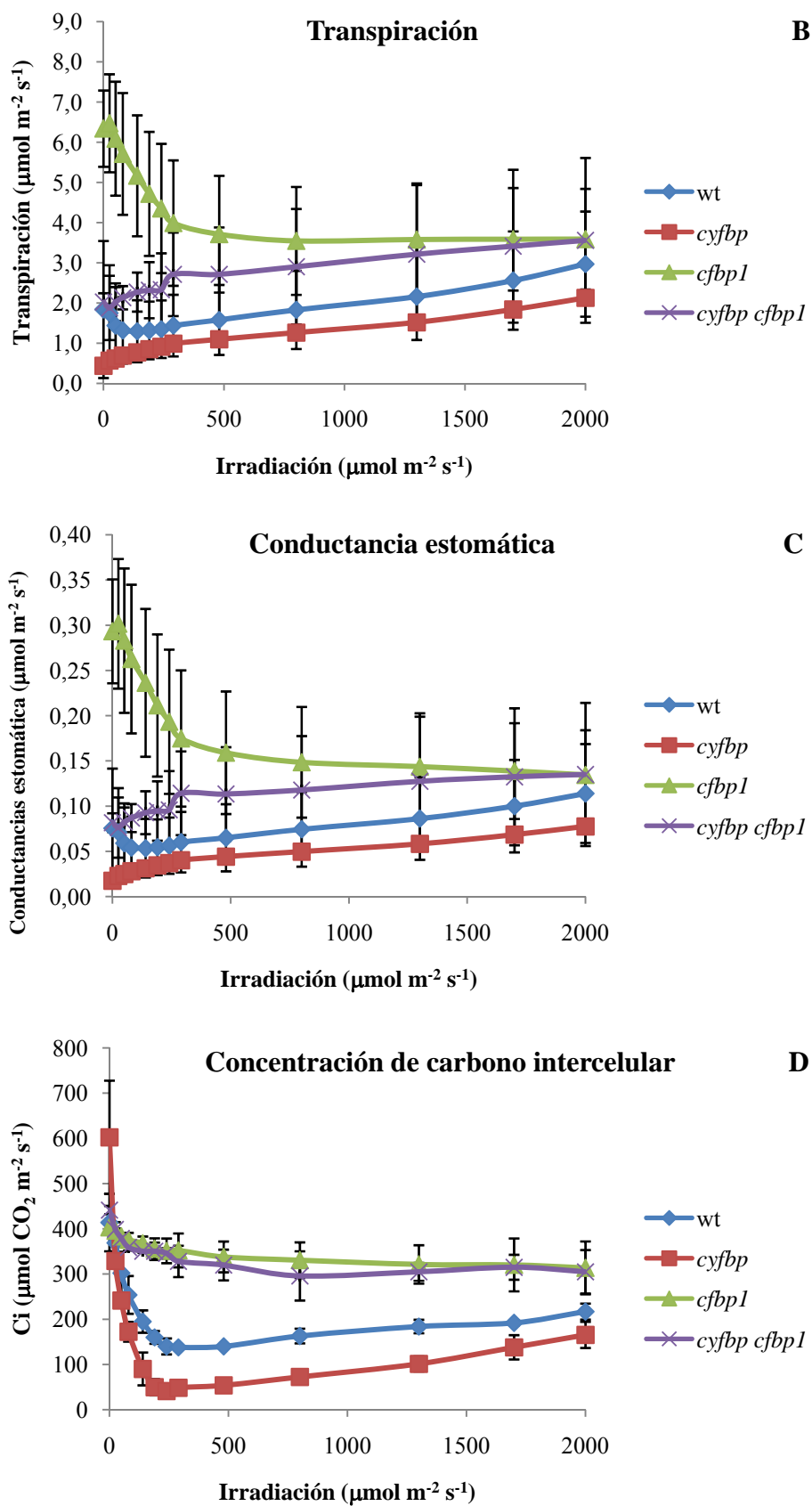
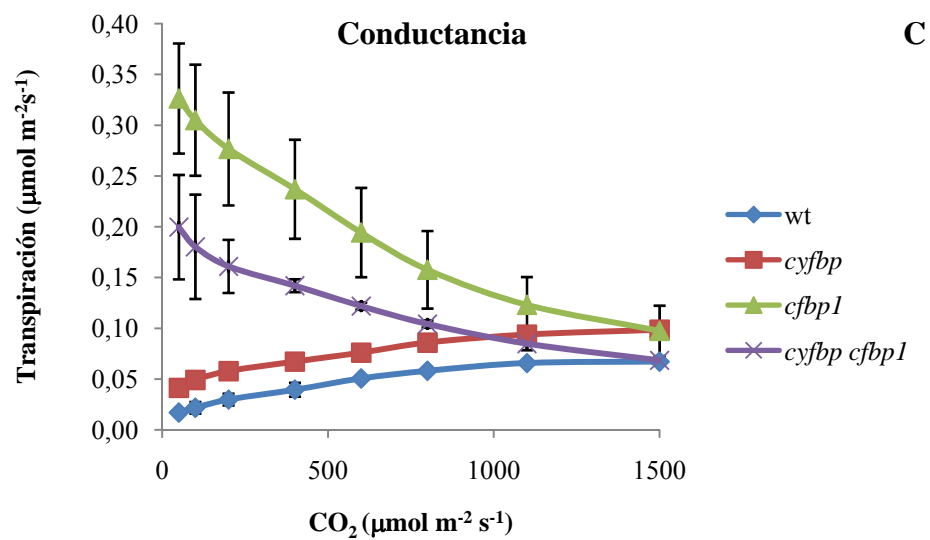
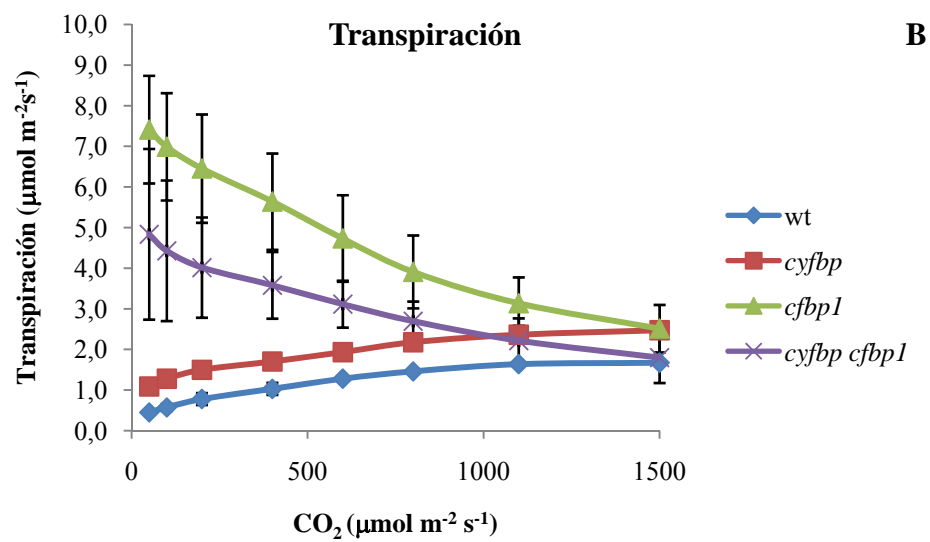
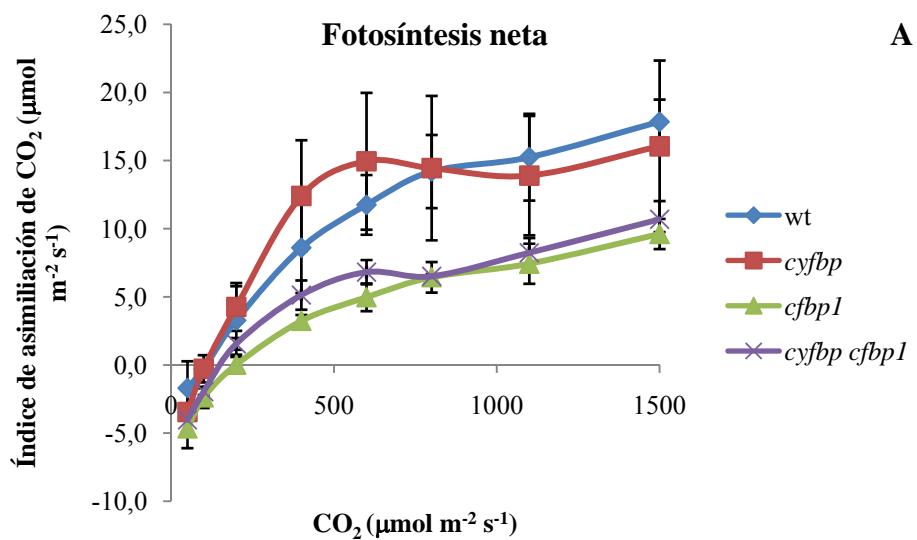


Figura 21. Capacidad fotosintética de los mutantes de tipo silvestre (wt) y *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas con intensidad de luz de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 20 d. Las tasas de

fijación de carbono fotosintético se determinaron en la hoja más joven totalmente expandida, en función del aumento de la irradiancia (A) a saturación de CO₂ (400 μmol mol⁻¹; curva de respuesta A / Q). La transpiración (E) y la conductancia estomática (gs) se determinaron en las mismas hojas (B y C). Los valores representan la media de ocho plantas ± SE.

- Medidas realizadas fijando la intensidad lumínica (1000 μmol m⁻² s⁻¹) y variando la concentración de CO₂.

La respuesta de la fotosíntesis neta (A) al incremento interno de la concentración de CO₂ en la hoja (C_i) a 1000 μmol m⁻² s⁻¹ (curva A/C_i) mostró un comportamiento distinto para las líneas carentes de cFBP1 en comparación con Col 0 y *cyfbp* (Fig. 23, D). La tasa fotosintética de plantas de tipo silvestre aumentó hasta un máximo de 17,9 a 1500 ppm de CO₂, el mutante *cyfbp* tuvo un valor de A muy ligeramente inferior. A la misma concentración de CO₂, la A de las plantas de *Arabidopsis cfbp1* y *cyfbp cfbp1* tenían una tasa de fotosíntesis de aproximadamente 10,5 μmol m⁻² s⁻¹ tras un incremento continuo dependiente del aumento de la concentración de CO₂. Los valores de transpiración y conductancia del mutante *cfbp1* fueron más altos que los de las otras líneas mutantes y la planta control en todas las concentraciones de CO₂ probadas (Fig. 23, B y C). La transpiración y la conductancia en el mutante *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* (Fig. 23, B y C) mostró valores altos en concentraciones bajas de CO₂ pero estas disminuyeron lentamente a concentraciones más altas, alcanzando niveles similares a los valores de plantas control silvestre y *cyfbp*. La E y gs de las plantas Col 0 y mutante *cyfbp* en relación con la concentración de CO₂ intercelular comenzaron siendo muy bajas para aumentar ligeramente hasta 1500 ppm de CO₂.



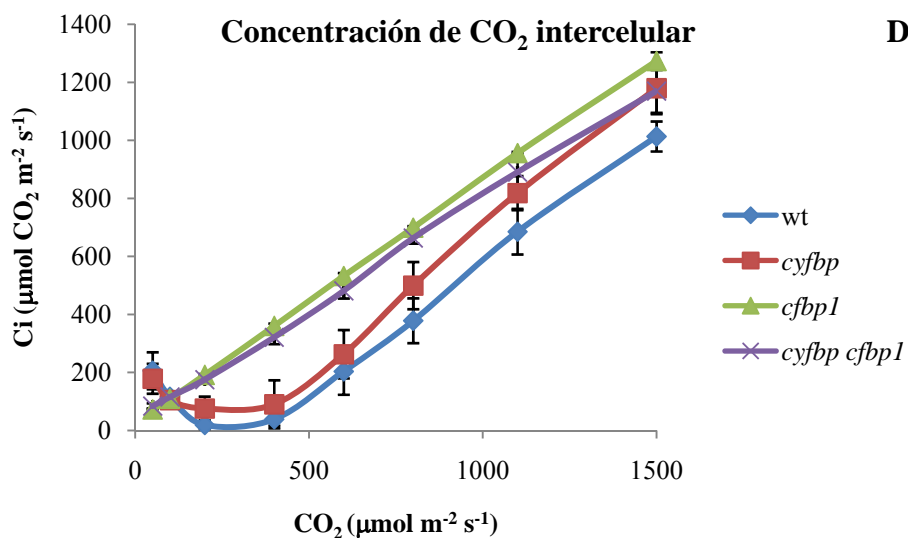


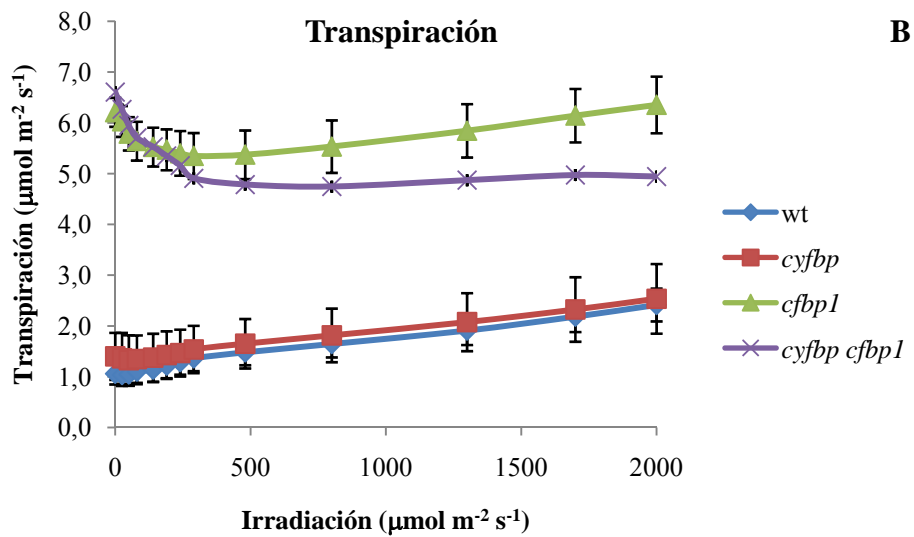
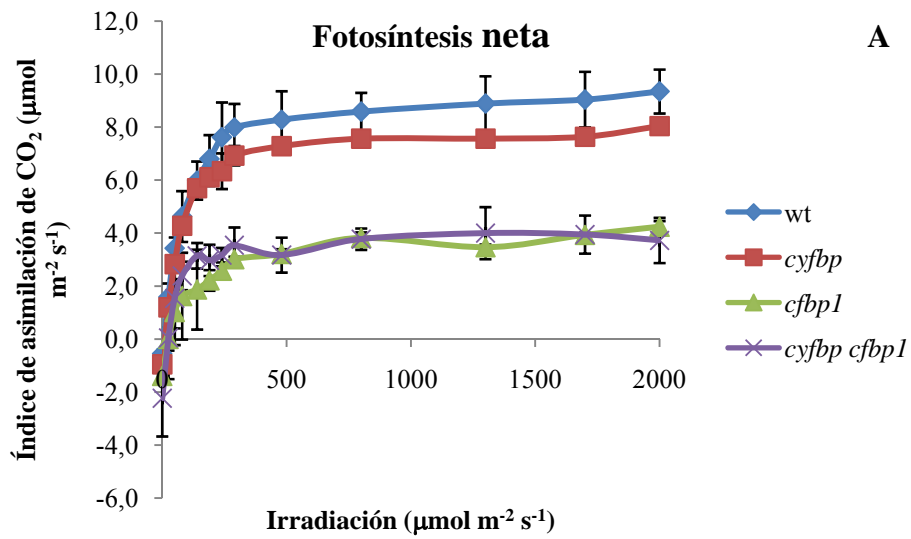
Figura 23. Capacidad fotosintética de los mutantes de tipo silvestre (wt) y *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas con intensidad de luz de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 20 d. Las tasas de fijación de carbono fotosintético se determinaron en la hoja más joven totalmente expandida, en función del aumento de la irradiancia (A) a saturación de CO_2 ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$; curva de respuesta A / Q). La transpiración (E) y la conductancia estomática (gs) se determinaron en las mismas hojas (B y C). Los valores representan la media de ocho plantas \pm SE.

2.9.3 Determinación de parámetros fotosintéticos en plantas crecidas en condiciones de cultivo con alta concentración de CO_2

- Medidas realizadas fijando la concentración de CO_2 ($400 \mu\text{mol}$) y variando la intensidad lumínica.

Las curvas de respuesta a la luz (A / Q) en CO_2 ambiental se muestran en la Figura 24, A. En estas condiciones, la tasa de fotosíntesis de la planta silvestre tenía un máximo de $9,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, inferior al que se determinó en condiciones de crecimiento normal. La tasa de asimilación del mutante *cyfbp* fue ligeramente inferior a la de Col 0 (8) a mayores intensidades la tasa de asimilación. Las curvas A de los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* han estado superpuestas excepto entre intensidades muy bajas (100 a $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) alcanzando valores máximos alrededor de 4, indicando que también en estas condiciones la capacidad de asimilación de CO_2 está afectada (Fig. 19, A). Los valores de transpiración (E) y conductancia estomática (gs) en hojas *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* después de una ligera disminución se mantuvieron o incrementaron para *cfbp1* hasta alcanzar un valor próximo al del inicio de la curva (Fig. 19, B y C). Sin embargo, la E y gs de Col 0 y el mutante *cyfbp* fueron entre 4-5 veces

menor que las líneas sin cFBP1 y apenas aumentaron a lo largo de la curva de CO₂ (Fig. 24, B y C).



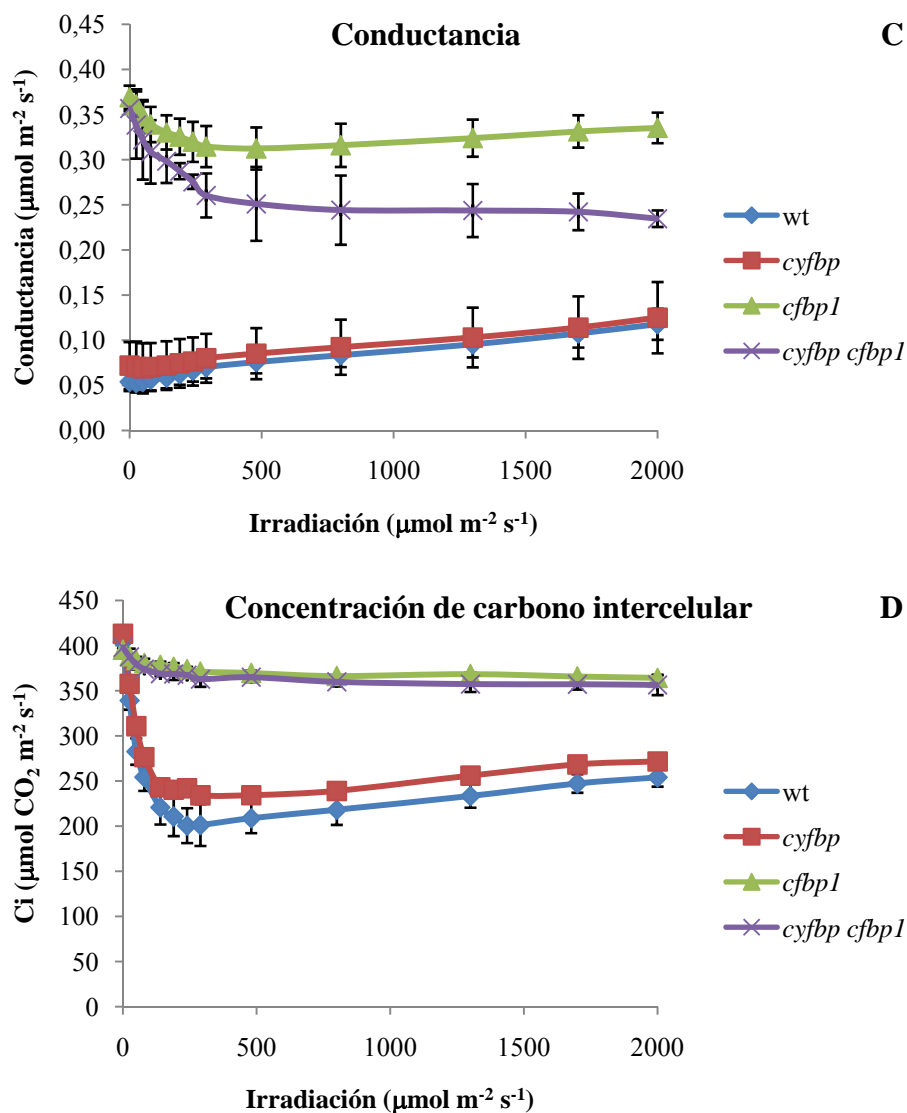
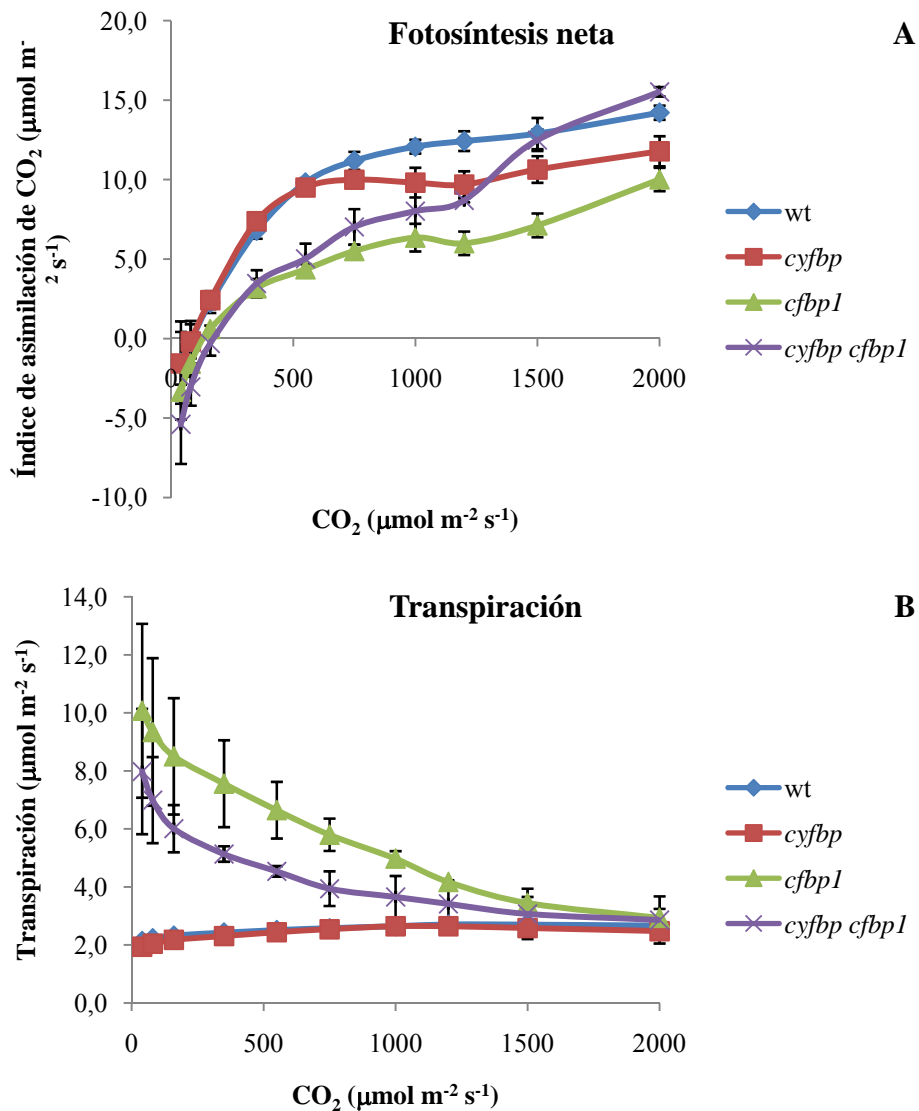


Figura 24. Capacidad fotosintética de los mutantes de tipo silvestre (wt) y *cyfbp*, *cpfbp1* y *cyfbp cpfbp1*. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas con intensidad de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 20 d y $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Las tasas de fijación de carbono fotosintético se determinaron en la hoja más joven totalmente expandida, en función del aumento de la irradiancia (A) (curva de respuesta A / Q). La transpiración (E) y la conductancia estomática (gs) se determinaron en las mismas hojas (B y C). Los valores representan la media de ocho plantas \pm SE.

- Medidas realizadas fijando la intensidad lumínica ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y variando la concentración de CO_2 .

La respuesta de la fotosíntesis neta (A) al incremento interno de la concentración de CO_2 en la hoja (C_i) a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (curva A/ C_i) mostró un comportamiento para casi todas las líneas y Col 0 muy similar con un incremento continuo con valores entre 10 (*cfbp1*), 15,5 (*cyfbp cfbp1*) (Fig. 25, D). Los valores de transpiración y conductancia del mutante *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* fueron más altos que los de las otros líneas mutantes y

la planta control en todas las concentraciones de CO₂ probadas (Fig. 25, B y C). La transpiración y la conductancia en el mutante *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* (Fig. 25, B y C) mostró valores altos en concentraciones bajas de CO₂ pero estas disminuyeron lentamente a concentraciones más altas de CO₂, alcanzando niveles similares a los valores de plantas control silvestre y *cyfbp*. La E y g_s de las plantas Col 0 y mutante *cyfbp* en relación con la concentración de CO₂ intercelular comenzaron siendo muy bajas para aumentar ligeramente hasta 2000 ppm de CO₂.



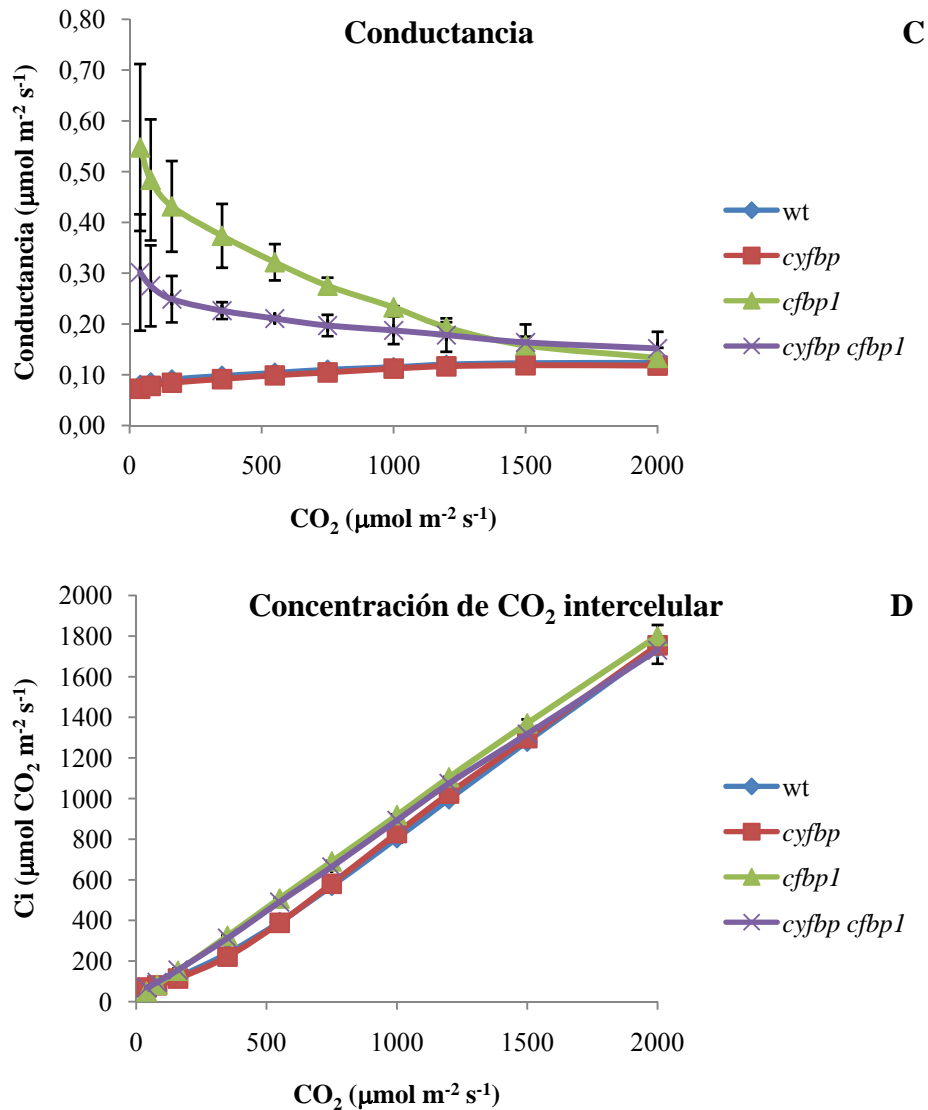


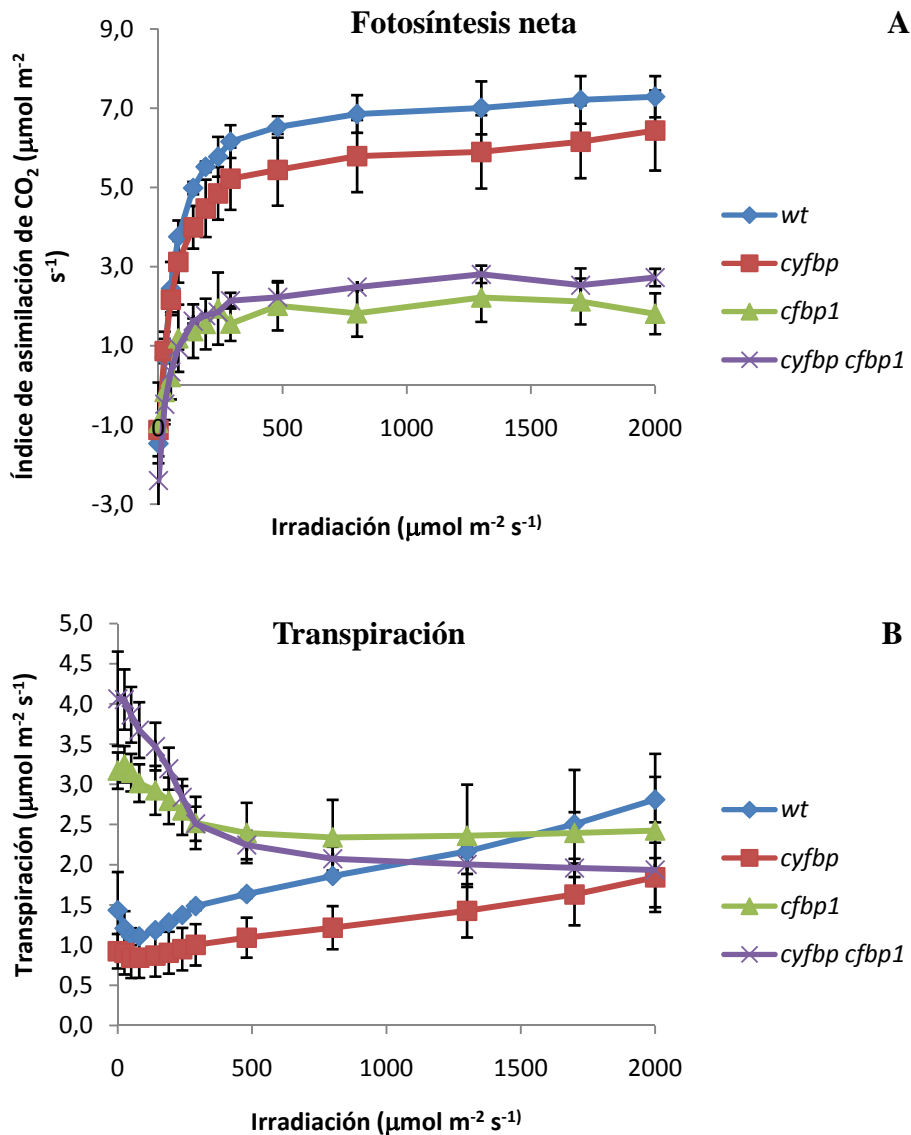
Figura 25. Capacidad fotosintética de los mutantes de tipo silvestre (wt) y *cyfbp*, *cpfbp1* y *cyfbp cpfbp1*. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas con intensidad de luz de 100 μmol m⁻² s⁻¹ durante 20 d y 700 μmol mol⁻¹. Las tasas de fijación de carbono fotosintético se determinaron en la hoja más joven totalmente expandida, en función del aumento de la irradiancia (A) (curva de respuesta A / Q). La transpiración (E) y la conductancia estomática (gs) se determinaron en las mismas hojas (B y C). Los valores representan la media de ocho plantas ± SE.

2.9.4 Determinación de parámetros fotosintéticos en plantas crecidas en condiciones de cultivo con alta intensidad lumínica y alta concentración de CO₂

- Medidas realizadas fijando la concentración de CO₂ (400 μmol) y variando la intensidad lumínica.

Las curvas de respuesta a la luz (A / Q) en CO₂ ambiental se muestran en la Figura 26 A. En estas condiciones, las tasas de fotosíntesis de la planta silvestre y las líneas

mutantes han sido inferiores a las obtenidas anteriormente. La curva A/Q de *cyfbp* fue la más alta alcanzando un máximo de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Hasta una intensidad de luz $<250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la tasa de asimilación del mutante *cyfbp* fue similar a la de Col 0, mientras que a partir de intensidades mayores la tasa de asimilación de la planta control fue $\sim 30\%$ menor. Las curvas A de los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cbp1* fueron muy bajas, siendo el doble mutante la que mostró una A de $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y de 3 para *cfbp1* (Fig. 26 A). Los valores de transpiración (E) y conductancia estomática (gs) fueron muy bajos en general para todas las líneas aunque incrementaron a lo largo de la curva A/Q. Este aumento fue en paralelo para *cfbp1/cyfbp cbp1* y *cyfbp/Col 0* (Fig. 26, B y C).



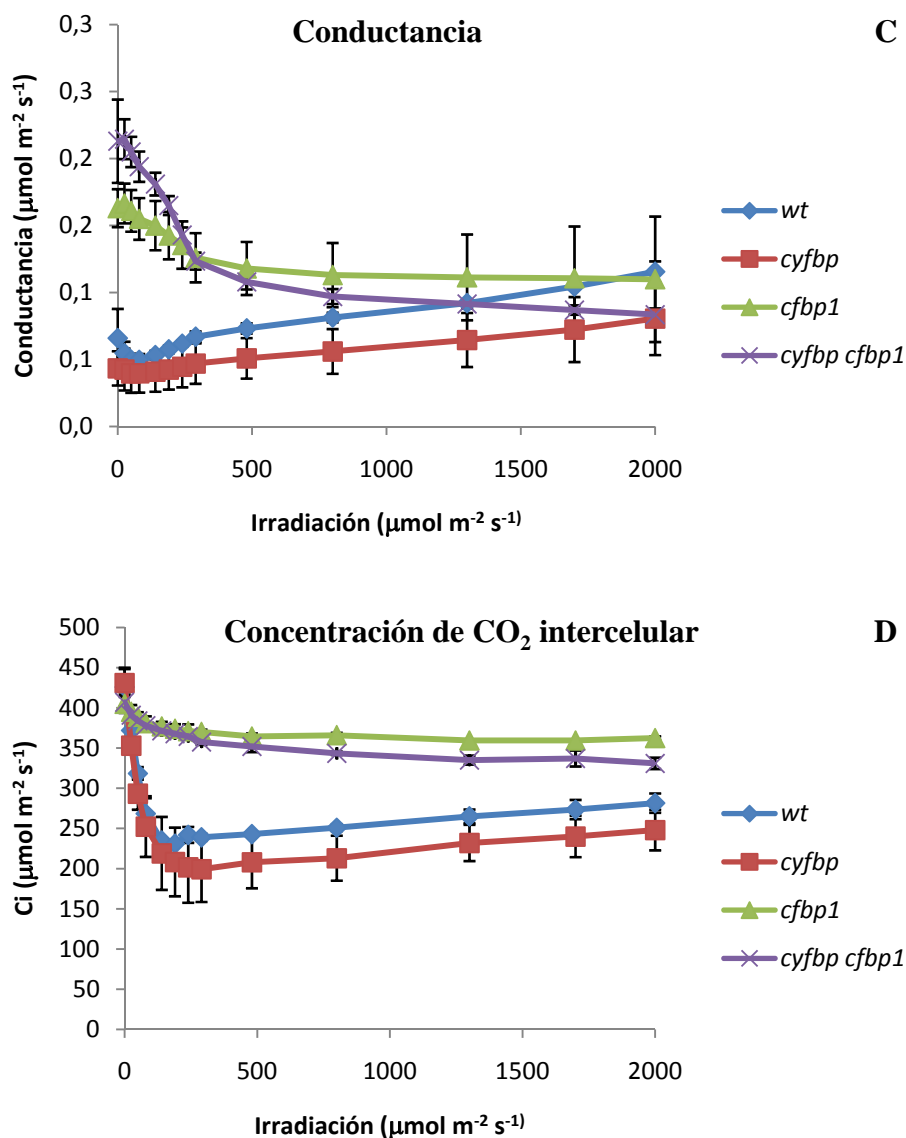
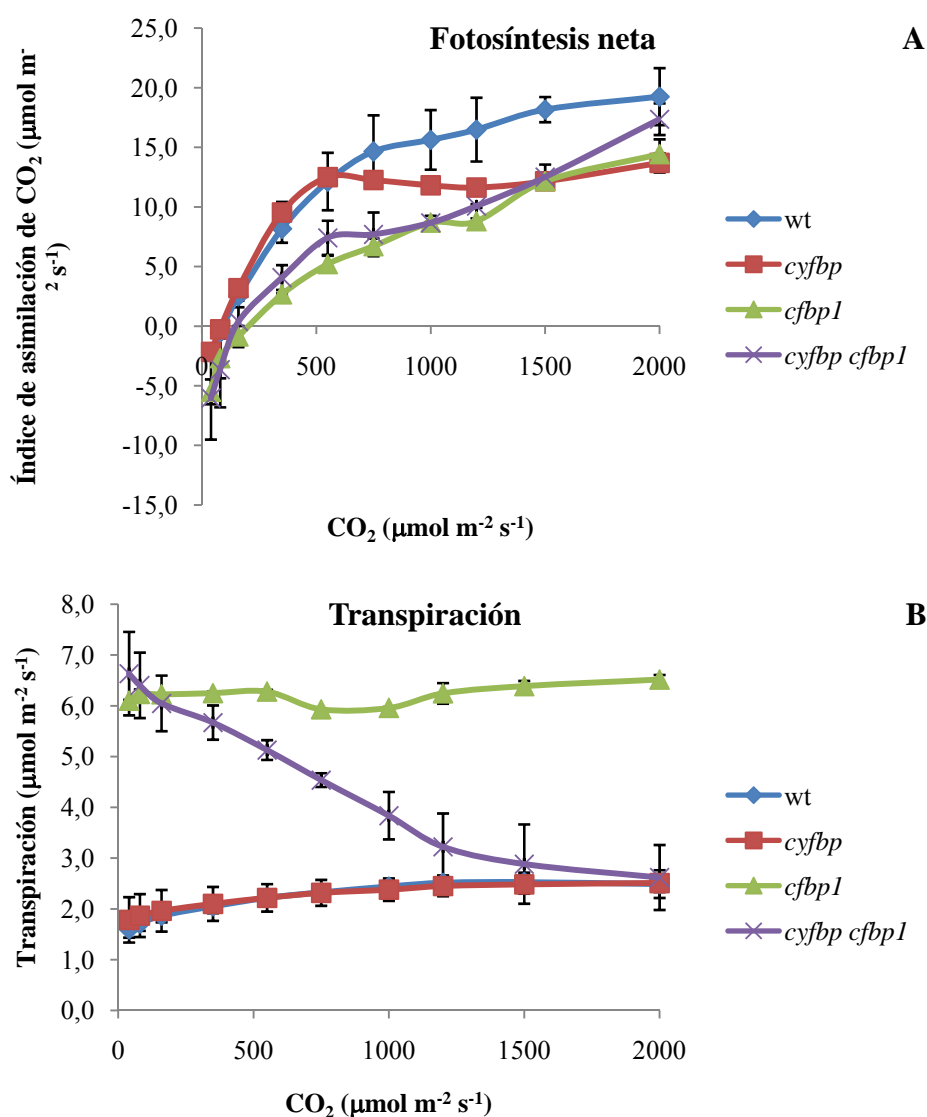


Figura 26. Capacidad fotosintética de los mutantes de tipo silvestre (wt) y *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas con intensidad de luz de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 20 d y $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Las tasas de fijación de carbono fotosintético se determinaron en la hoja más joven totalmente expandida, en función del aumento de la irradiancia (A) a saturación de CO₂ ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$; curva de respuesta A / Q). La transpiración (E) y la conductancia estomática (gs) se determinaron en las mismas hojas (B y C). Los valores representan la media de ocho plantas \pm SE.

- Medidas realizadas fijando la intensidad lumínica ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y variando la concentración de CO₂.

La respuesta de la fotosíntesis neta (A) al incremento interno de la concentración de CO₂ en la hoja (Ci) a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (curva A/Ci) mostró que los valores de A aumentaron hasta alcanzar valores de hasta 19,3, 13,7, 14,4 y $17,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para

Col 0, *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* (Fig. 27, D). Los valores de transpiración y conductancia del mutante *cfbp1* fueron más altos que los de las otras líneas mutantes y la planta control y permanecieron prácticamente constantes a lo largo de todas las concentraciones de CO₂ probadas (Fig. 27, B y C). La transpiración y la conductancia en el mutante *cyfbp cfbp1* con valores similares a *cfbp1* a 0 μmol m⁻² s⁻¹ de CO₂ disminuyó unas 3 veces su valor hasta alcanzar el máximo de *cyfbp* y Col 0 (Fig. 27, B y C). La E y g_s de las plantas Col 0 y mutante *cyfbp* en relación con la concentración de CO₂ intercelular aumentaron ligeramente a lo largo de la curva A/C_i hasta 2000 ppm de CO₂.



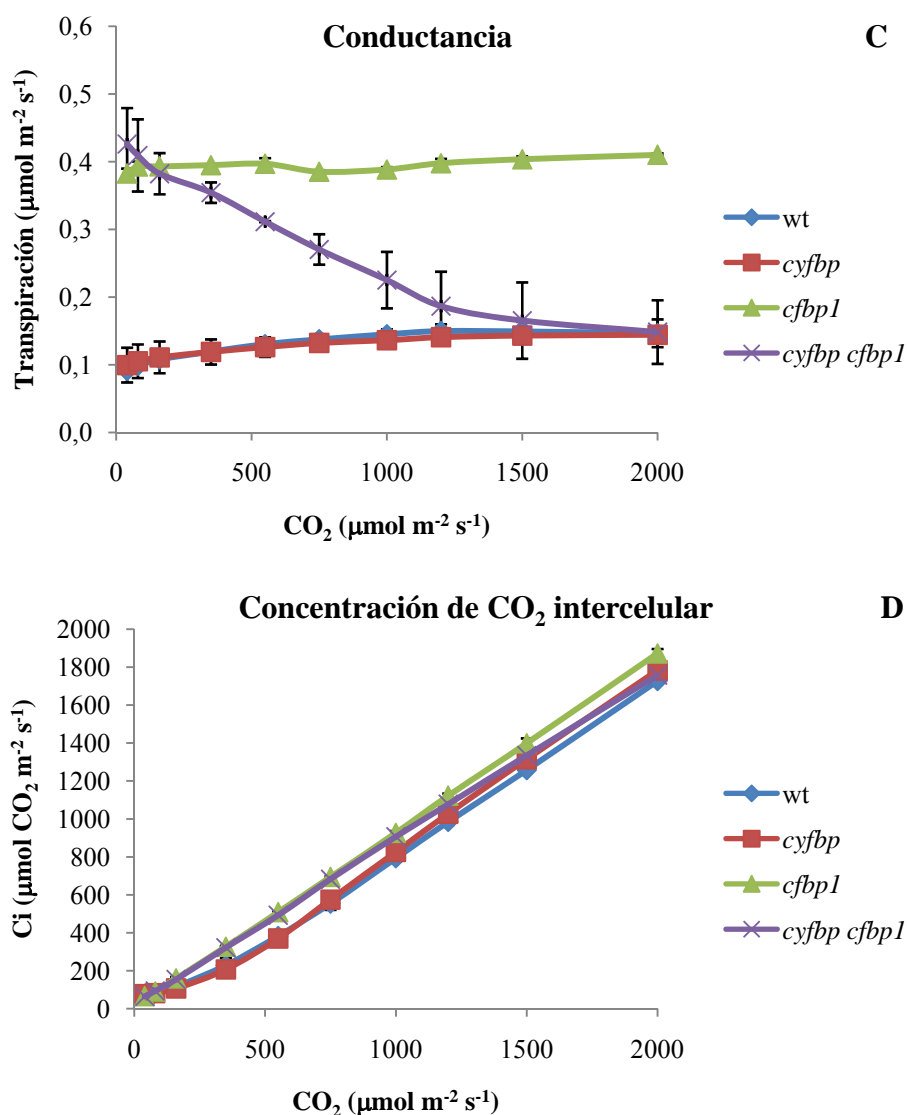


Figura 27. Capacidad fotosintética de los mutantes de tipo silvestre (wt) y *cyfbp*, *cpfbp1* y *cyfbp cpfbp1*. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas con intensidad de luz de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 20 d y $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Las tasas de fijación de carbono fotosintético se determinaron en la hoja más joven totalmente expandida, en función del aumento de la irradiancia (A) a saturación de CO_2 ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$; curva de respuesta A / Q). La transpiración (E) y la conductancia estomática (g_s) se determinaron en las mismas hojas (B y C). Los valores representan la media de ocho plantas \pm SE.

2.10 Eficiencia fotosintética en condiciones normales de cultivo

El análisis de la fluorescencia de la clorofila de PSII (F_v / F_m) mostró una disminución significativa del rendimiento fotoquímico para los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* (Tabla 12), lo que indica una menor eficiencia cuántica del transporte lineal de electrones a través del PSII en estos dos mutantes.

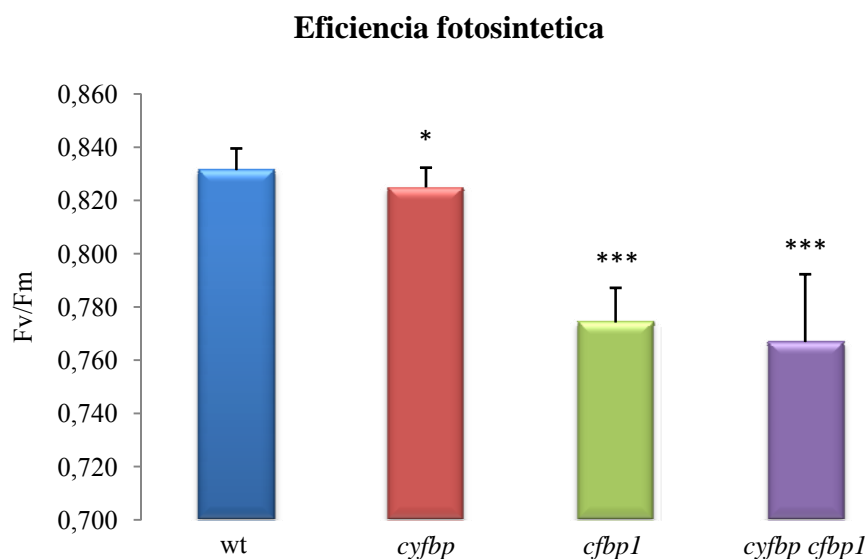


Figura 28.

Tabla 12. Eficiencia fotosintética en condiciones normales de cultivo

	wt	cyfbp	cfbp1	cyfbp cfbp1
F _v /F _m	0,831±0,008	0,825±0,007	0,774±0,013	0,767±0,025

2.11 Eficiencia fotosintética en condiciones de cultivo de alta intensidad lumínica

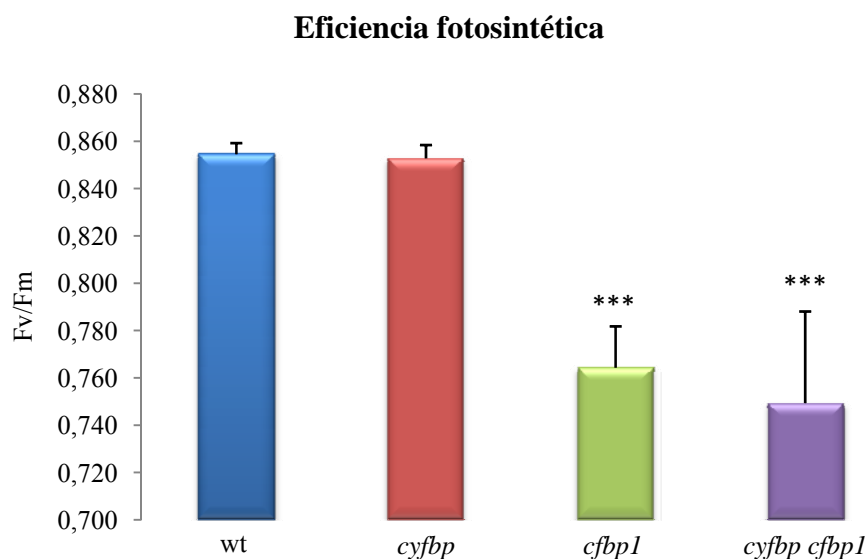


Figura 29

Tabla 13. Eficiencia fotosintética en condiciones de cultivo de alta intensidad lumínica

	wt	<i>cyfbp</i>	<i>cfbp1</i>	<i>cyfbp cfbp1</i>
Fv/Fm	0,855±0,005	0,853±0,006	0,764±0,017	0,749±0,039

Cuando el crecimiento de las plantas se realizó en condiciones de intensidades de luz mayores, el análisis de la fluorescencia de la clorofila de PSII (Fv / Fm) indicó igualmente una disminución significativa del rendimiento fotoquímico para los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cfbp1* (Tabla 13), sugiriendo una menor eficiencia cuántica del transporte de electrones a través del PSII en estos dos mutantes.

3. Caracterización del sistema antioxidante en Arabidopsis

3.1 Determinación de la actividad superóxido dismutasa en sus diferentes isoformas.

Las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas que forman parte del sistema antioxidante y que están encargadas de eliminar (dismutar) el $O_2^{\cdot-}$ para dar lugar a H_2O_2 , menos oxidante aunque con una vida media más larga. En la figura 30 se representa la actividad de las tres SOD que se encuentran en el cloroplasto: FeSOD, MnSOD y CuZnSOD, cuyas actividades dependen de Fe, Mn y Cu/Zn, respectivamente. En esta figura se aprecia un sensible incremento de la CuZnSOD en el doble mutante *cyfbp cfbp1*, indicando un posible aumento de $O_2^{\cdot-}$ en los cloroplastos de este mutante de Arabidopsis, si bien ni la FeSOD ni la MnSOD sufrieron cambios. Asimismo, se observaron incrementos de actividad, aunque menores, de la FeSOD en el mutante *cyfbp* y de CuZnSOD en la línea *cfbp1*. Este resultado indica que, como consecuencia de la pérdida de función de las dos isoformas de FBPassa, se podría estar disparando la acumulación de ROS debido a desajustes metabólicos tanto en el cloroplasto como en el citosol y que el sistema antioxidante de las SOD estaría respondiendo de manera muy específica a este incremento.

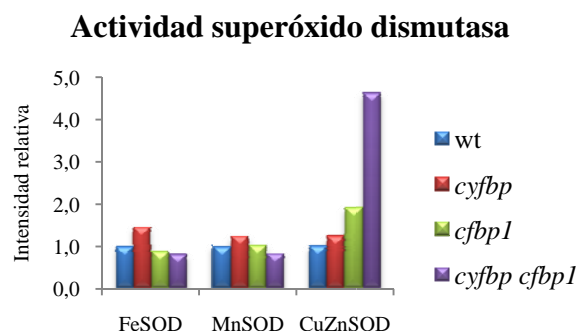


Figura 30. Actividad superóxido dismutasa

3.2 Inmunodetección de carbonilos.

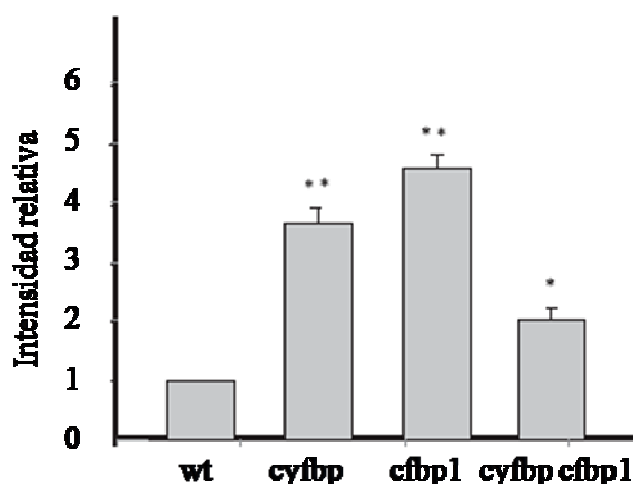


Figura 31. Carbonilos

3.3 Determinación del contenido en peróxido de hidrógeno.

Incrementos del H_2O_2 por encima de los niveles considerados normales (donde tendría una función meramente señalizadora y no tóxica) podrían resultar como consecuencia de un estrés oxidativo en plantas, siendo considerada como una molécula indicadora de estrés oxidativo. Esta ROS fue cuantificada en las diferentes líneas de *Arabidopsis* en estudio y reveló aumentos estadísticamente significativos, de entre un 40-60% (Figura x, Tabla x). A pesar de las diferencias en la actividad de la CuZnSOD observadas en el doble mutante *cyfbp cfbp1*, no se apreciaron diferencias en la acumulación de H_2O_2 respecto a los mutantes simples incluidos en el análisis.

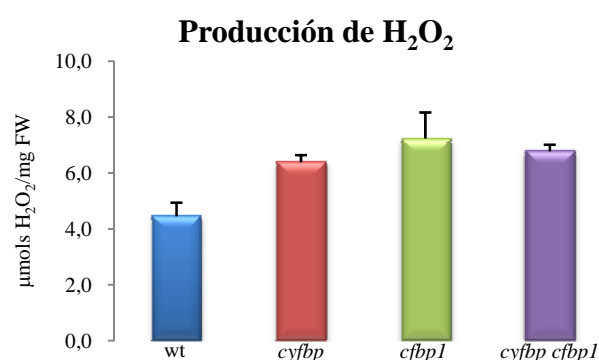


Figura 32. Producción de H_2O_2 .

Tabla 14. Producción de H_2O_2 .

	μmoles H_2O_2 /mg FW	Prueba.T
wt	4,5±0,5	
<i>cyfbp</i>	6,4±0,3	0,0008
<i>cfbp1</i>	7,2±0,9	0,0051
<i>cyfbp cfbp1</i>	6,8±0,2	0,0001

3.4 Determinación de los niveles de peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica se produce por el ataque oxidativo de un radical hidroxilo (OH^\cdot) a cadenas hidrofóbicas de los lípidos. Este proceso genera peróxidos de lípidos que pueden dañar la estabilidad de las membranas o la fluidez de estas y afectar a los procesos biológicos que allí tienen lugar. Es, por tanto, otro marcador de estrés oxidativo. Sin embargo, a diferencia de los incrementos observados para el H_2O_2 , la peroxidación lipídica pareció mantenerse en niveles similares a los de la línea silvestre, si bien el mutante *cfbp1* mostró un leve aumento del 5% que no llegó a ser estadísticamente significativo (Figura 33).

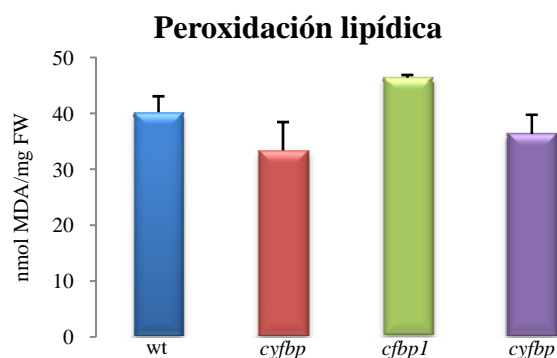


Figura 33. Peroxidación lipídica

Tabla 15 Peroxidación lipídica

	nmol MDA/mg FW	Prueba. T
wt	40,2±2,8	
<i>cyfbp</i>	33,4±5,1	0,901
<i>cfbp1</i>	46,4±0,5	0,062
<i>cyfbp</i>	36,3±3,4	0,204

3.5 Determinación de la actividad catalasa en solución.

La enzima catalasa cataliza la conversión de H_2O_2 a H_2O . La determinación de esta actividad enzimática (Figura 34) reveló una mayor inducción en el mutante doble *cyfbp cfbp1*, seguida por los mutantes simples *cfbp1* y *cyfbp*. Los niveles de actividad correlacionaron bien con los niveles de H_2O_2 encontrados en los mutantes analizados (Figura 32), siendo sendos valores mayores en *cfbp1* que en *cyfbp*, sugiriendo que una mayor situación de estrés oxidativo se estaría produciendo en la línea mutante *cfbp1*. La suma de las dos mutaciones conlleva un incremento esperado de la actividad catalasa en comparación con los mutantes simples.

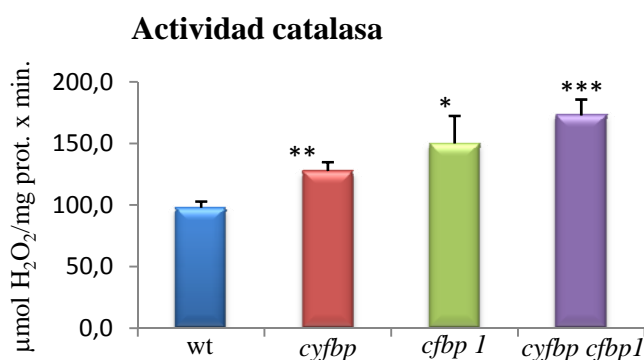


Figura 34. Actividad catalasa.

Tabla 16. Actividad catalasa.

	$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prot. x min.}$
wt	97,7 \pm 5,1
<i>cyfbp</i>	127,6 \pm 7,2
<i>cfbp 1</i>	150,0 \pm 22,3
<i>cyfbp cfbp1</i>	172,7 \pm 13,0

3.6 Determinación de la actividad ascorbato peroxidasa.

Como la catalasa, la enzima ascorbato peroxidasa (APX) también cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O . Sin embargo, a diferencia de la catalasa, la APX utiliza los electrones provenientes del ascorbato, que como consecuencia del mecanismo enzimático se oxida a monodehidroascorbato. De todas las enzimas antioxidantes analizadas hasta ahora, la APX fue la más fuertemente inducida en el doble mutante *cyfbp cfbp1*, duplicando los valores de actividad determinados para la línea silvestre Col0. Al igual que observamos con otras enzimas, los niveles de actividad en los mutantes simples no sufrieron incrementos significativos (Fig. 35).

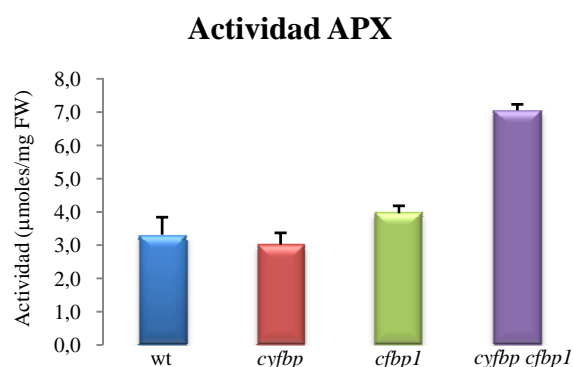


Figura 35. Actividad ascorbato peroxidasa

Tabla 17. Actividad ascorbato peroxidasa (APX)

	$\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{mg x min}$	Prueba.T
wt	3,3 \pm 0,5	
<i>cyfbp</i>	3,0 \pm 0,3	0,361
<i>cfbp1</i>	4,0 \pm 0,2	0,242
<i>cyfbp cfbp1</i>	7,1 \pm 0,2	0,035

Con la prueba.t sale que no hay valores significativos.

3.7 Determinación de la actividad glicolato oxidasa.

Para determinar el origen subcelular del H₂O₂ acumulado en los mutantes FBPassa se determinó la actividad enzimática de la glicolato oxidasa (GOX) que se encuentra en el peroxisoma. La GOX cataliza la oxidación de glicolato a glioxilato y a H₂O₂. En la figura x podemos observar ligeros incrementos que son más evidentes cuando el alelo mutante *cfbp1* se encuentra presente aunque solo fue estadísticamente significativo en el mutante doble *cyfbp cbp1*. Con los niveles de actividad enzimática cuantificados no podemos confirmar el origen peroxisomal causante de los incrementos de H₂O₂ observados en los mutantes (Fig. 36).

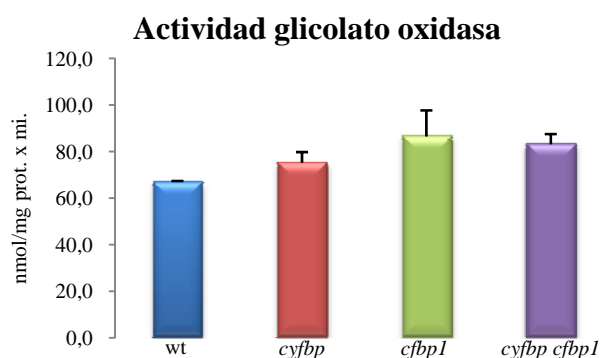


Figura 36. Actividad glicolato oxidasa

Tabla 18. Actividad glicolato oxidasa (GOX)

	Actividad (nmol/mg prot. x min)	Prueba.T
wt	67,2±0,2	
<i>cyfbp</i>	75,2±4,5	0,05
<i>cbp1</i>	86,5±11,2	0,07
<i>cyfbp cbp1</i>	83,1±4,4	0,02

3.8 Determinación de la actividad glutatión reductasa.

Junto a la síntesis *de novo*, la glutatión reductasa (GR) tiene un importante papel redox en la célula ya que es la encargada de mantener una concentración óptima de glutatión reducido (GSH) a partir de la reducción del glutatión oxidado (GSSG) utilizando el NADPH como poder reductor. Los resultados mostrados en la figura 37 y en la tabla 9 claramente indican un marcado descenso, de aproximadamente un 50% de la actividad GR. Esta caída de la actividad es similar tanto en el mutante simple *cfbp1* como en el doble *cyfbp cbp1*, sugiriendo que la presencia del alelo mutante *cfbp1* es suficiente para explicar la disminución observada de la actividad GR.

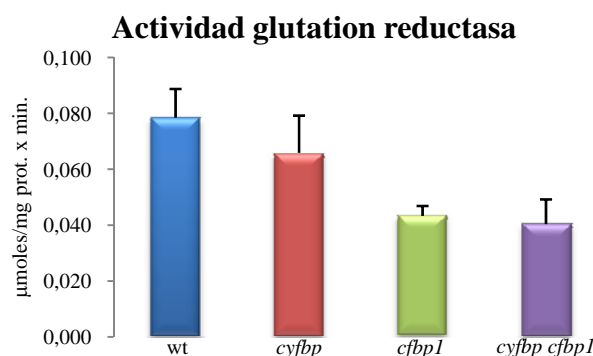


Figura 37. Actividad glutatión reductasa

Tabla 9. Actividad glutatión reductasa (GR)

	Actividad (μmoles/mg prot. x min.)	Prueba.T
wt	0,078±0,010	
cyfbp	0,066±0,013	0,4007
cfbp1	0,043±0,004	0,0446
cyfbp cfbp1	0,040±0,009	0,0577

4. Análisis metabólico

Las Tablas x muestran los niveles de metabolitos en las hojas de los mutantes FBPasa al final del periodo de oscuridad y después de 8 h de iluminación (a partir de ahora “día” y “noche” serán considerados como sinónimos de los periodos de oscuridad y de luz, respectivamente). La pérdida de la actividad cyFBPasa tuvo como consecuencia un ligero descenso en los niveles de azúcares durante la noche, con excepción de la maltosa y de la trehalosa. Sin embargo, el contrario de lo que ocurría durante la noche, la mayoría de los azúcares incrementaron su contenido durante el día, siendo estadísticamente significativas las diferencias observadas con la isomaltosa. Los mutantes *cfbp1* y *cyfbpcfbp1* mostraron un descenso de entre un 50% y un 90% de azúcares como la sacarosa, glucosa, fructosa, isomaltosa y trehalosa en comparación con las plantas silvestres, ocurriendo esto tanto al final de la noche como a mitad del día. Estos resultados sugieren que el ciclo de Calvin-Benson se encontraría afectado y no estaría llevando a cabo correctamente su función.

Tal y como esperábamos, la pérdida funcional de las FBPasas citosólica o cloroplástica condujo a una acumulación del contenido de F1,6BP durante el día, que fue de aprox. 4, 17 y 60 veces superior en las líneas *cfbp1*, *cyfbp* y *cyfbp cfbp1*, respectivamente. Asimismo, se observó un marcado incremento en las triosas fosfato (TPs) dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y en el ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA), todos ellos producidos en el ciclo de Calvin-Benson. Estos incrementos fueron más acusados en el doble mutante que en los mutantes simples. Al final de la noche, los niveles de las hexosas fosfato (HXs-Pi) y de la DHAP sufrieron un descenso significativo en todos los mutantes. Durante el periodo de luz, el 3-PGA se incrementó en todos los mutantes, especialmente en *cyfbp*, observando un descenso acusado tanto en *cfbp1* como en *cyfbp cfbp1* durante la noche (Tabla x).

La pérdida de cFBP1 condujo a llamativos cambios en los niveles de ácidos orgánicos. Como se puede observar en las Tablas X, los niveles de ácidos orgánicos descendieron después de las 8 h de luz, siendo este descenso aún más acusado durante la

noche, especialmente en los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cbp1*. Hay que destacar el bajo contenido de glicerato, malato, fumarato, gluconato, succinato y treonato observado y que estaría apuntando a un mal funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). Durante el periodo diurno, el mutante *cyfbp* mostró un incremento en el contenido de gluconato y gulonato.

La pérdida de función de cFBP1 también conllevó cambios en el contenido de aminoácidos. Comparando con la línea silvestre, el contenido en treonina se elevó aproximadamente 16 y 8 veces durante la noche y unas 9 y 5 veces durante el día en los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cbp1*, respectivamente. Tras 8 h de luz, se pudo observar en la línea *cfbp1* un aumento de la glicina y la prolina, mientras que el contenido en serina y leucina alcanzó valores del 50% respecto al silvestre en los mutantes simple *cfbp1* y doble. Los cambios en los niveles de glicina, serina y glicerato están sugiriendo que la fotorrespiración se encontraría fuertemente afectada. Únicamente se observó en la línea *cyfbp* un incremento en el nivel de aspártico (aprox. 3 veces) durante la noche.

Durante el día, el contenido de los azúcares alcoholes subió en la línea *cyfbp*, aunque en este mismo grupo de metabolitos se pudo observar un descenso generalizado tanto en *cfbp1* como en *cyfbp cbp1* (Tablas X). Durante el periodo de oscuridad, resultó interesante observar un mayor contenido de ascorbato observado en los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cbp1* (3 y 5 veces, respectivamente) en comparación con la línea silvestre. El mutante *cyfbp* también mostró un incremento en dehidroascorbato, un derivado oxidado del ácido ascórbico. Estos resultados sugieren que estarían ocurriendo cambios en el estado redox y la posible activación de los mecanismos de destoxicación en estos mutantes, como ya se había observado previamente con los ensayos con enzimas antioxidantes.

Los diagramas de Vanted de las figuras 50 y 51 proporcionan una visión general de los cambios metabólicos que estarían ocurriendo en *cyfbp*, *cfbp1* y *cyfbp cbp1* al final de la noche y durante el día. En ellos se puede apreciar cómo la pérdida de sendas isoformas de FBPa altera varios procesos del metabolismo primario, afectando tanto a la fisiología de la planta como al desarrollo.

4.1 Periodo de oscuridad

Tabla 10. Metabolitos analizados durante el periodo de oscuridad

Metabolites	Dark														
	wt			cyfbp			p-value	cfbp1			p-value	cyfbp cfbp1			p-value
<u>Sugars</u>															
Arabinose	1,00	±	0,20	0,89	±	0,50	0,623	0,56	±	0,19	0,003	0,76	±	0,20	0,066
Fructose	1,00	±	0,80	0,65	±	0,78	0,460	0,12	±	0,04	0,023	0,15	±	0,05	0,026
Fucose	1,00	±	0,28	0,90	±	0,50	0,690	0,47	±	0,16	0,002	0,53	±	0,12	0,007
Galactose	1,00	±	0,60	0,83	±	0,63	0,638	0,52	±	0,15	0,088	0,61	±	0,18	0,157
Glucose	1,00	±	0,71	0,67	±	0,57	0,391	0,11	±	0,07	0,013	0,07	±	0,02	0,010
Isomaltose	1,00	±	0,07	0,67	±	0,72	0,477	n.d.			n.d.				
Maltose	1,00	±	0,27	1,42	±	0,83	0,271	0,20	±	0,07	<0,001	0,35	±	0,09	<0,001
Mannose	1,00	±	0,58	0,80	±	0,58	0,559	0,27	±	0,08	0,012	0,33	±	0,10	0,019
Psicose	1,00	±	0,35	1,10	±	0,67	0,744	0,40	±	0,13	0,006	0,53	±	0,16	0,013
Rhamnose	1,00	±	0,26	0,95	±	0,63	0,865	0,85	±	0,26	0,347	0,86	±	0,19	0,316
Ribose	1,00	±	0,40	0,79	±	0,49	0,429	1,08	±	0,46	0,766	1,11	±	0,30	0,583
Sedoheptulose (beta-2,7-anhydro-)	1,00	±	0,39	0,84	±	0,53	0,556	0,61	±	0,23	0,063	0,64	±	0,17	0,065
Sucrose	1,00	±	0,23	1,00	±	0,63	0,997	0,17	±	0,05	0,000	0,25	±	0,07	<0,001
Trehalose	1,00	±	0,39	1,37	±	1,21	0,489	0,36	±	0,15	0,004	0,40	±	0,13	0,005
Xylose	1,00	±	0,22	0,75	±	0,44	0,243	0,34	±	0,12	0,000	0,34	±	0,10	<0,001
<u>Phosphateesters</u>															
Dihydroxyacetonephosphate	1,00	±	0,19	0,98	±	0,47	0,919	0,43	±	0,25	0,004	0,49	±	0,35	0,011
Fructose 6-phosphate	1,00	±	0,11	1,22	±	0,08	0,003	0,79	±	0,15	0,017	0,74	±	0,14	0,005
Fructose 1,6-bisphosphate	1,00	±	0,82	0,90	±	0,76	0,867	0,95	±	0,20	0,929	2,37	±	2,87	0,395
Glucose 1-phosphate	1,00	±	0,24	0,68	±	0,22	0,041	0,69	±	0,10	0,016	0,80	±	0,04	0,079
Glucose 6-phosphate	1,00	±	0,09	1,13	±	0,04	0,007	0,64	±	0,06	<0,001	0,65	±	0,07	<0,001
Glyceraldehyde 3-phosphate	1,00	±	0,25	1,02	±	0,25	0,914	1,63	±	0,24	0,004	1,07	±	0,37	0,690
Glycerol 3-phosphate	1,00	±	0,28	0,60	±	0,29	0,035	0,85	±	0,31	0,407	0,66	±	0,23	0,046
3-Phosphoglycerate	1,00	±	0,16	1,27	±	0,21	0,031	0,51	±	0,07	<0,001	0,62	±	0,07	<0,001

Metabolites	Dark														
	wt			<i>cyfbp</i>			p-value	<i>cfbp1</i>			p-value	<i>cyfbp cfbp1</i>			p-value
<u>Organicacids</u>															
Benzoate	1,00	±	0,29	0,98	±	0,58	0,955	0,93	±	0,19	0,640	0,84	±	0,24	0,334
Butanoate (4-amino-)	1,00	±	0,65	0,67	±	0,64	0,394	1,34	±	0,74	0,418	2,01	±	0,48	0,012
Fumarate	1,00	±	0,26	0,77	±	0,44	0,303	0,28	±	0,12	<0,001	0,13	±	0,04	<0,001
Galactonate	1,00	±	0,22	0,88	±	0,50	0,616	0,86	±	0,36	0,427	0,70	±	0,20	0,034
Gluconate	1,00	±	1,41	0,07	±	0,04	0,137	0,10	±	0,02	0,191	0,06	±	0,01	0,306
Glutarate (2-oxo-)	1,00	±	0,32	1,16	±	0,68	0,609	0,96	±	0,21	0,817	0,94	±	0,23	0,732
Glycerate	1,00	±	0,30	0,82	±	0,46	0,447	0,50	±	0,10	0,003	0,37	±	0,11	<0,001
Gulonate	1,00	±	0,92	0,91	±	1,03	0,881	0,12	±	0,02	0,042	0,09	±	0,03	0,037
Hexadecanoate	1,00	±	0,40	1,31	±	1,17	0,548	1,07	±	0,45	0,797	0,90	±	0,25	0,631
Malate	1,00	±	0,32	0,87	±	0,55	0,640	0,25	±	0,12	<0,001	0,15	±	0,04	<0,001
Maleate	1,00	±	0,37	0,95	±	0,55	0,853	0,83	±	0,39	0,465	0,54	±	0,21	0,025
Nicotinate	1,00	±	0,31	0,87	±	0,48	0,586	0,76	±	0,23	0,150	0,94	±	0,27	0,726
Octadecanoate	1,00	±	0,45	1,14	±	1,09	0,773	1,05	±	0,46	0,856	0,86	±	0,25	0,522
Pyruvate	1,00	±	0,35	1,04	±	0,69	0,910	1,08	±	0,29	0,658	0,84	±	0,24	0,376
Quinate	1,00	±	0,35	0,88	±	0,55	0,750	1,18	±	0,36	0,505	1,26	±	0,37	0,350
Shikimate	1,00	±	0,27	1,02	±	0,55	0,942	0,77	±	0,25	0,155	0,84	±	0,21	0,266
Sinapate (cis-)	1,00	±	0,40	0,78	±	0,43	0,374	0,83	±	0,34	0,449	0,71	±	0,27	0,161
Sinapate (trans-)	1,00	±	0,40	0,73	±	0,38	0,256	0,86	±	0,33	0,528	0,69	±	0,27	0,157
Succinate	1,00	±	0,36	1,39	±	0,93	0,361	0,35	±	0,13	0,002	0,30	±	0,07	<0,001
Threonate	1,00	±	0,20	0,77	±	0,42	0,264	0,51	±	0,18	0,001	0,35	±	0,11	<0,001

Metabolites	Dark														
	wt			<i>cyfbp</i>			p-value	<i>cfbp1</i>			p-value	<i>cyfbp cfbp1</i>			p-value
<u>Amino acids</u>															
Alanine	1,00	±	0,38	0,78	±	0,50	0,409	1,09	±	0,40	0,703	2,01	±	0,35	<0,001
Arginine	n.d.														
Aspartate	1,00	±	0,50	0,92	±	0,60	0,803	3,61	±	2,30	0,022	3,64	±	0,99	<0,001
Glutamate	1,00	±	0,96	0,77	±	0,67	0,647	2,92	±	2,03	0,063	2,03	±	0,76	0,066
Glycine	1,00	±	1,22	0,46	±	0,37	0,320	0,56	±	0,22	0,404	0,70	±	0,23	0,564
Isoleucine	1,00	±	1,17	0,54	±	0,43	0,391	1,20	±	0,37	0,692	0,83	±	0,09	0,726
Leucine	1,00	±	1,08	0,60	±	0,49	0,433	0,65	±	0,26	0,464	0,70	±	0,10	0,509
Proline	1,00	±	1,86	0,26	±	0,32	0,356	0,28	±	0,07	0,367	0,30	±	0,05	0,379
Pyroglutamate	1,00	±	0,21	0,88	±	0,40	0,538	1,05	±	0,44	0,803	1,27	±	0,30	0,093
Serine	1,00	±	0,46	1,01	±	0,82	0,986	0,55	±	0,18	0,050	1,16	±	0,33	0,500
Threonine	1,00	±	0,41	0,78	±	0,44	0,396	16,00	±	6,45	<0,001	8,56	±	1,51	<0,001
Tryptophan	1,00	±	0,21	0,88	±	0,64	0,763	0,91	±	0,25	0,622	1,04	±	0,23	0,840
Valine	1,00	±	0,61	0,90	±	0,53	0,768	0,93	±	0,24	0,802	1,14	±	0,25	0,604

<u>Metabolites</u>	<u>Dark</u>														
	<u>wt</u>			<u>cyfbp</u>			<u>p-value</u>	<u>cfbp1</u>			<u>p-value</u>	<u>cyfbp cfbp1</u>			<u>p-value</u>
<u>Sugaralcohols</u>															
Erythritol	1,00	±	0,39	0,97	±	0,54	0,922	0,88	±	0,19	0,504	0,82	±	0,24	0,355
Glycerol	1,00	±	0,26	0,88	±	0,50	0,603	0,65	±	0,17	0,021	0,65	±	0,16	0,018
Inositol (myo-)	1,00	±	0,34	1,09	±	0,62	0,772	0,20	±	0,05	<0,001	0,20	±	0,05	<0,001
Maltitol	1,00	±	0,87	0,85	±	0,73	0,757	0,08	±	0,03	0,027	0,06	±	0,03	0,040
Mannitol	1,00	±	0,73	0,67	±	0,36	0,346	0,77	±	0,44	0,524	1,21	±	0,39	0,669
<u>Others</u>															
Ascorbate	1,00	±	0,89	1,76	±	1,12	0,220	3,14	±	1,60	0,017	5,48	±	1,66	<0,001
Dehydroascorbatedimer	1,00	±	0,58	1,28	±	0,72	0,475	0,80	±	0,25	0,451	0,89	±	0,32	0,698
Ethanolamine	1,00	±	0,68	0,96	±	1,13	0,941	1,11	±	0,63	0,774	2,99	±	1,54	0,016
Phosphate	1,00	±	0,21	0,75	±	0,40	0,198	0,90	±	0,32	0,524	1,14	±	0,29	0,349
Spermidine	1,00	±	0,36	0,74	±	0,44	0,317	0,86	±	0,30	0,496	0,69	±	0,31	0,174
Uracil	1,00	±	0,32	1,12	±	0,84	0,745	1,16	±	0,32	0,410	0,93	±	0,25	0,681

4.2 Periodo de luz

Tabla 11 Metabolitos analizados durante el periodo de iluminación

Metabolites	Light														
	wt			<i>cyfbp</i>			p-value	<i>cfbp1</i>			p-value	<i>cyfbp cfbp1</i>			p-value
<u>Sugars</u>															
Arabinose	1,00	±	0,43	1,48	±	1,17	0,369	0,58	±	0,10	0,042	0,56	±	0,20	0,047
Fructose	1,00	±	0,83	1,54	±	1,50	0,458	0,13	±	0,03	0,028	0,10	±	0,06	0,024
Fucose	1,00	±	0,40	1,45	±	1,15	0,381	0,50	±	0,11	0,015	0,40	±	0,15	0,006
Galactose	1,00	±	0,57	2,71	±	2,15	0,090	0,48	±	0,19	0,059	0,52	±	0,21	0,080
Glucose	1,00	±	0,68	1,74	±	1,72	0,348	0,11	±	0,04	0,010	0,07	±	0,04	0,008
Isomaltose	1,00	±	0,53	4,51	±	3,54	0,037	0,47	±	0,10	0,090	0,29	±	0,09	0,033
Maltose	1,00	±	0,42	3,93	±	4,27	0,126	0,22	±	0,08	0,018	0,21	±	0,07	0,001
Mannose	1,00	±	0,59	1,63	±	1,30	0,307	0,27	±	0,08	0,013	0,25	±	0,10	0,011
Psicose	1,00	±	0,36	2,33	±	1,82	0,110	0,28	±	0,10	<0,001	0,34	±	0,11	0,002
Rhamnose	1,00	±	0,43	1,66	±	1,35	0,277	0,79	±	0,16	0,277	0,67	±	0,21	0,118
Ribose	1,00	±	0,36	1,77	±	1,51	0,256	1,18	±	0,34	0,390	1,22	±	0,44	0,370
Sedoheptulose (beta-2,7-anhydro-)	1,00	±	0,43	1,31	±	1,04	0,512	0,47	±	0,10	0,014	0,36	±	0,13	0,005
Sucrose	1,00	±	0,43	2,21	±	2,01	0,179	0,55	±	0,13	0,034	0,27	±	0,07	0,002
Trehalose	1,00	±	0,44	2,37	±	2,31	0,182	0,31	±	0,11	0,004	0,31	±	0,17	0,005
Xylose	1,00	±	0,48	1,40	±	1,05	0,421	0,35	±	0,08	0,009	0,30	±	0,10	0,006
<u>Phosphateester</u>															
Dihydroxyacetonephosphate	1,00	±	0,62	5,63	±	2,58	0,039	23,37	±	12,58	0,037	13,27	±	8,29	0,048
Fructose 6-phosphate	1,00	±	0,08	1,23	±	0,13	0,004	0,97	±	0,11	0,631	0,99	±	0,10	0,887
Fructose 1,6-bisphosphate	1,00	±	0,58	4,40	±	0,80	0,004	17,72	±	11,85	0,071*	9,85	±	5,64	0,039
Glucose 1-phosphate	1,00	±	0,27	1,06	±	0,43	0,776	1,05	±	0,21	0,741	0,74	±	0,16	0,065
Glucose 6-phosphate	1,00	±	0,06	1,25	±	0,06	<0,001	0,95	±	0,05	0,108	0,91	±	0,06	0,033
Glyceraldehyde 3-phosphate	1,00	±	0,63	2,38	±	1,11	0,134	6,96	±	1,89	0,007	11,22	±	0,98	<0,001
Glycerol 3-phosphate	1,00	±	0,42	0,74	±	0,50	0,359	0,63	±	0,30	0,111	0,45	±	0,20	0,017
3-Phosphoglycerate	1,00	±	0,09	2,88	±	0,24	<0,001	1,85	±	0,54	0,004	2,27	±	0,15	<0,001

Metabolites	Light														
	wt			<i>cyfbp</i>			p-value	<i>cfbp1</i>			p-value	<i>cyfbp cfbp1</i>			p-value
Organicacids															
Benzoate	1,00	±	0,37	1,47	±	1,26	0,399	0,60	±	0,18	0,039	0,57	±	0,22	0,036
Butanoate (4-amino-)	1,00	±	0,57	1,17	±	1,20	0,760	2,86	±	1,65	0,026	2,27	±	1,63	0,102
Fumarate	1,00	±	0,40	1,18	±	0,95	0,678	0,29	±	0,09	0,002	0,14	±	0,05	<0,001
Galactonate	1,00	±	0,44	1,23	±	0,91	0,599	0,49	±	0,18	0,026	0,37	±	0,12	0,007
Gluconate	1,00	±	0,29	2,01	±	1,04	0,044	0,29	±	0,10	0,002	0,28	±	0,14	<0,001
Glutarate (2-oxo-)	1,00	±	0,48	1,71	±	1,64	0,334	0,65	±	0,31	0,158	0,51	±	0,24	0,049
Glycerate	1,00	±	0,40	1,80	±	1,17	0,146	0,24	±	0,04	<0,001	0,26	±	0,10	0,001
Gulonate	1,00	±	0,37	2,87	±	1,17	0,004	0,06	±	0,02	<0,001	0,04	±	0,02	<0,001
Hexadecanoate	1,00	±	0,46	3,24	±	4,00	0,204	0,76	±	0,42	0,361	0,58	±	0,39	0,117
Malate	1,00	±	0,47	0,71	±	0,46	0,302	0,29	±	0,15	0,005	0,14	±	0,10	0,001
Maleate	1,00	±	0,31	0,91	±	0,53	0,729	0,49	±	0,25	0,010	0,29	±	0,11	<0,001
Nicotinate	1,00	±	0,34	1,04	±	0,68	0,906	0,49	±	0,15	0,007	0,58	±	0,20	0,026
Octadecanoate	1,00	±	0,48	3,24	±	4,19	0,222	0,80	±	0,50	0,487	0,56	±	0,39	0,111
Pyruvate	1,00	±	0,37	1,36	±	1,06	0,453	0,69	±	0,26	0,124	0,60	±	0,27	0,061
Quinate	1,00	±	0,59	1,47	±	1,25	0,421	0,91	±	0,44	0,759	1,08	±	1,10	0,884
Shikimate	1,00	±	0,39	1,40	±	1,00	0,378	0,62	±	0,12	0,044	0,49	±	0,16	0,014
Sinapate (cis-)	1,00	±	0,31	1,09	±	0,65	0,760	0,52	±	0,10	0,005	0,37	±	0,13	<0,001
Sinapate (trans-)	1,00	±	0,40	1,02	±	0,74	0,953	0,53	±	0,20	0,028	0,39	±	0,13	0,006
Succinate	1,00	±	0,35	1,56	±	0,75	0,127	0,18	±	0,05	<0,001	0,11	±	0,04	<0,001
Threonate	1,00	±	0,44	1,11	±	0,80	0,776	0,30	±	0,09	0,003	0,22	±	0,08	0,002

<u>Metabolites</u>	<u>Light</u>														
	wt			cyfbp			p-value	cfbp1			p-value	cyfbp cfbp1			p-value
<u>Amino acids</u>															
Alanine	1,00	±	0,43	1,43	±	1,27	0,453	1,16	±	0,43	0,525	1,22	±	0,53	0,445
Arginine	1,00	±	0,48	n.d.				0,76	±	0,08	0,243	0,83	±	0,59	0,651
Aspartate	1,00	±	1,10	0,61	±	0,58	0,466	0,78	±	0,35	0,645	0,63	±	0,41	0,462
Glutamate	1,00	±	0,84	4,16	±	4,49	0,122	2,38	±	2,55	0,236	1,20	±	0,94	0,699
Glycine	1,00	±	0,23	1,10	±	0,97	0,829	3,25	±	2,01	0,036	1,81	±	1,23	0,184
Isoleucine	1,00	±	0,26	1,67	±	1,67	0,357	1,21	±	0,14	0,110	1,03	±	0,29	0,874
Leucine	1,00	±	0,31	1,80	±	1,75	0,295	0,59	±	0,12	0,012	0,57	±	0,22	0,019
Proline	1,00	±	0,36	2,27	±	3,03	0,332	1,50	±	0,29	0,026	1,79	±	1,17	0,148
Pyroglutamate	1,00	±	0,37	1,00	±	0,64	0,993	0,81	±	0,28	0,332	0,61	±	0,22	0,052
Serine	1,00	±	0,43	0,88	±	0,37	0,631	0,50	±	0,18	0,024	0,40	±	0,09	0,008
Threonine	1,00	±	0,42	0,75	±	0,34	0,271	8,50	±	2,06	<0,001	4,74	±	1,43	<0,001
Tryptophan	1,00	±	0,55	1,98	±	1,86	0,247	0,72	±	0,28	0,292	0,57	±	0,36	0,166
Valine	1,00	±	0,38	1,59	±	1,48	0,363	0,50	±	0,12	0,012	0,68	±	0,20	0,104

<u>Metabolites</u>	<u>Light</u>														
	wt			cyfbp			p-value	cfbp1			p-value	cyfbp cfbp1			p-value
<u>Sugaralcohols</u>															
Erythritol	1,00	±	0,42	1,16	±	0,97	0,713	0,54	±	0,21	0,037	0,49	±	0,24	0,041
Glycerol	1,00	±	0,39	1,72	±	1,41	0,256	0,48	±	0,11	0,010	0,50	±	0,25	0,022
Inositol (myo-)	1,00	±	0,47	1,57	±	1,34	0,348	0,13	±	0,05	0,001	0,14	±	0,05	0,001
Maltitol	1,00	±	0,47	5,00	±	4,43	0,052	0,06	±	0,03	<0,001	0,03	±	0,02	<0,001
Mannitol	1,00	±	0,92	1,19	±	1,12	0,772	0,64	±	0,28	0,423	0,51	±	0,25	0,281
<u>Others</u>															
Ascorbate	1,00	±	0,70	0,70	±	0,52	0,422	1,15	±	0,60	0,693	1,29	±	0,80	0,525
Dehydroascorbatedimer	1,00	±	0,56	3,71	±	3,43	0,086	0,60	±	0,24	0,136	0,48	±	0,18	0,054
Ethanolamine	1,00	±	0,68	0,96	±	1,19	0,950	1,90	±	1,47	0,205	4,38	±	2,63	0,012

Phosphate	1,00	±	0,45		1,41	±	1,12	0,424		0,67	±	0,29	0,162		0,61	±	0,35	0,125
Spermidine	1,00	±	0,42		1,10	±	0,80	0,784		0,55	±	0,22	0,044		0,42	±	0,19	0,012
Uracil	1,00	±	0,46		1,16	±	0,85	0,702		0,66	±	0,26	0,150		0,64	±	0,31	0,139

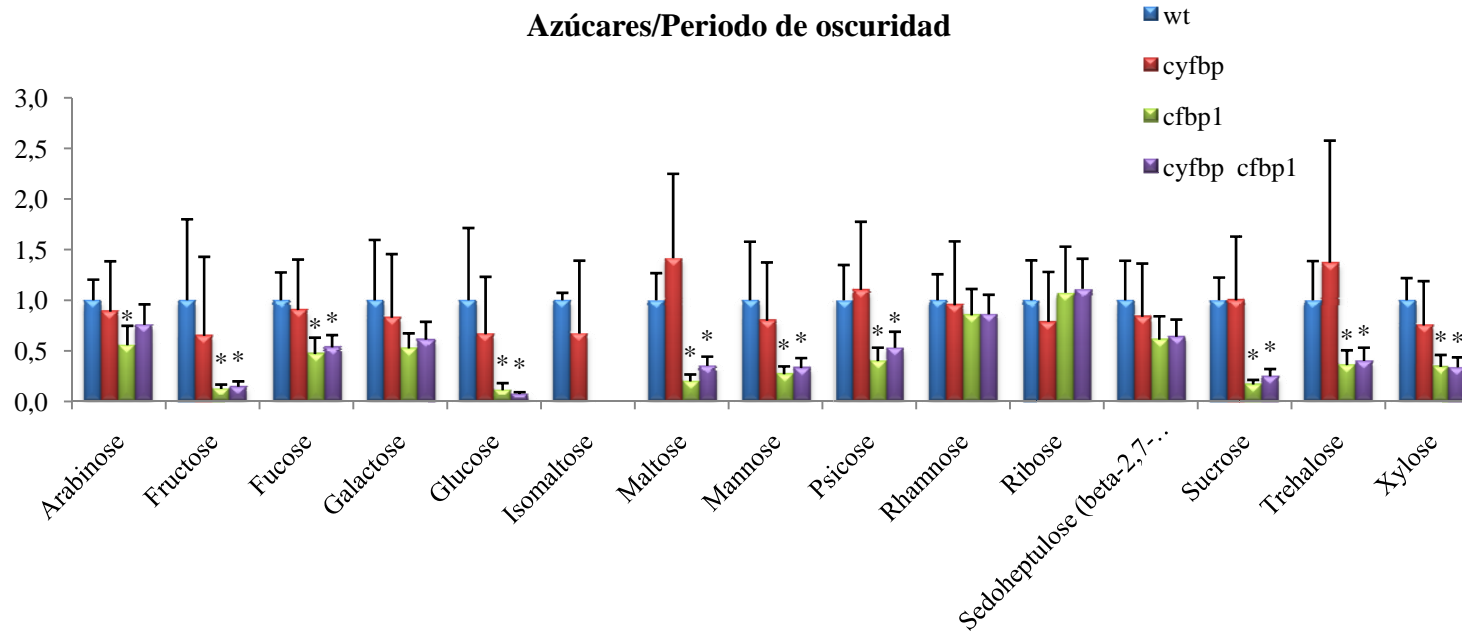


Figura 38. Azúcares analizados durante el periodo de oscuridad

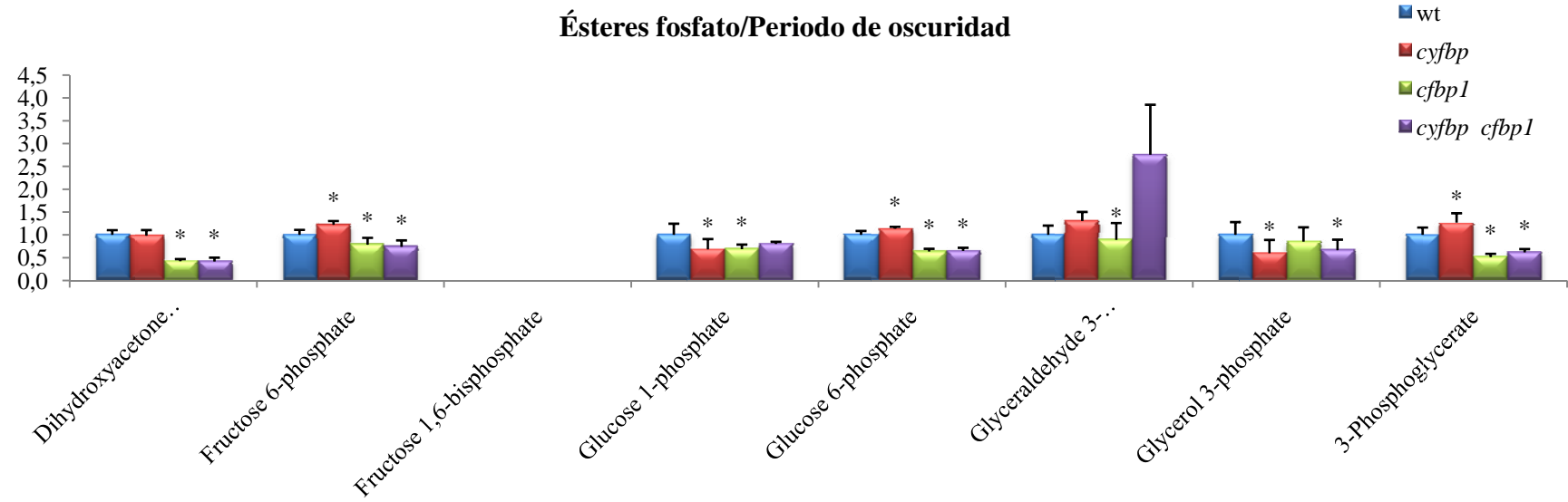


Figura 39. Ésteres fosfato analizados durante el periodo de oscuridad

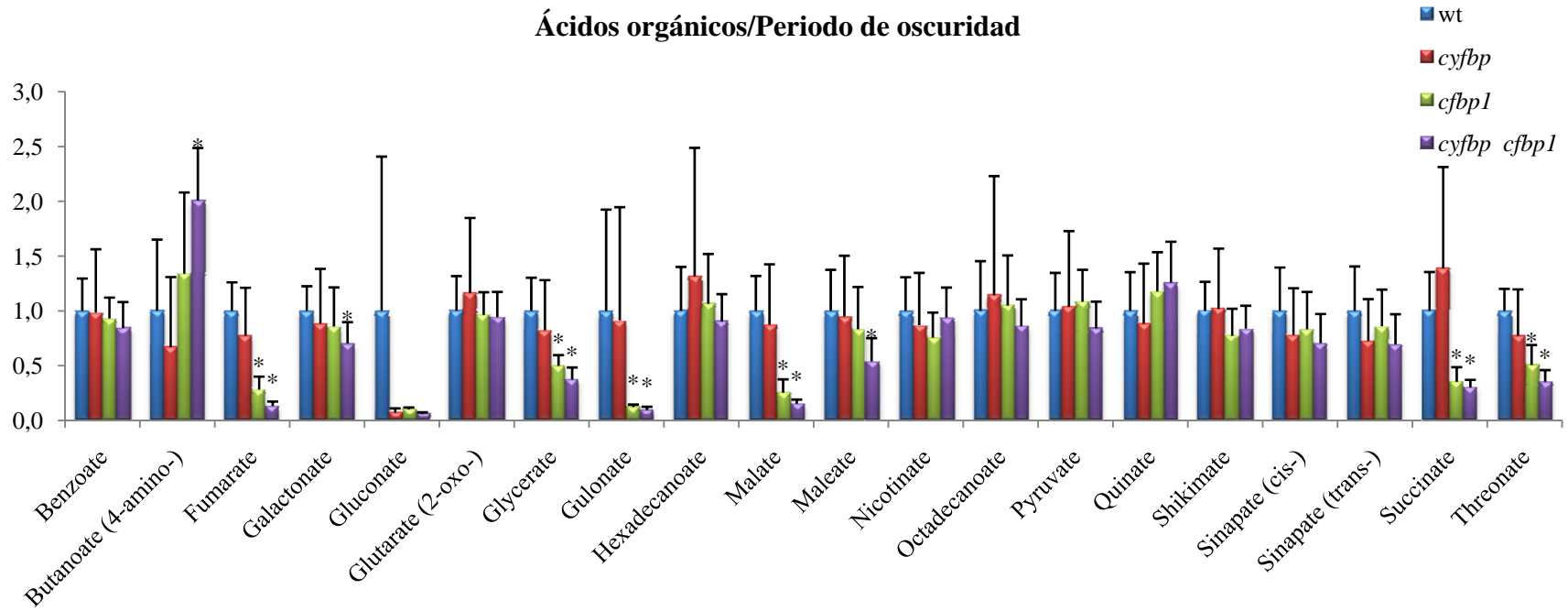


Figura 40. Ácidos orgánicos analizados durante el periodo de oscuridad

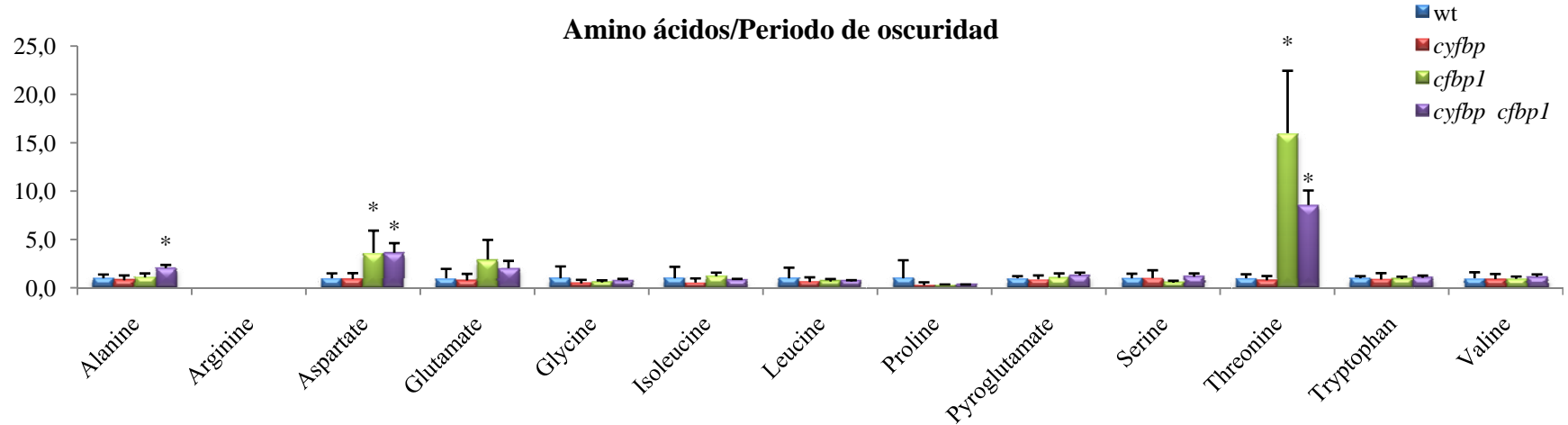


Figura 41 Amino ácidos analizados durante el periodo de oscuridad

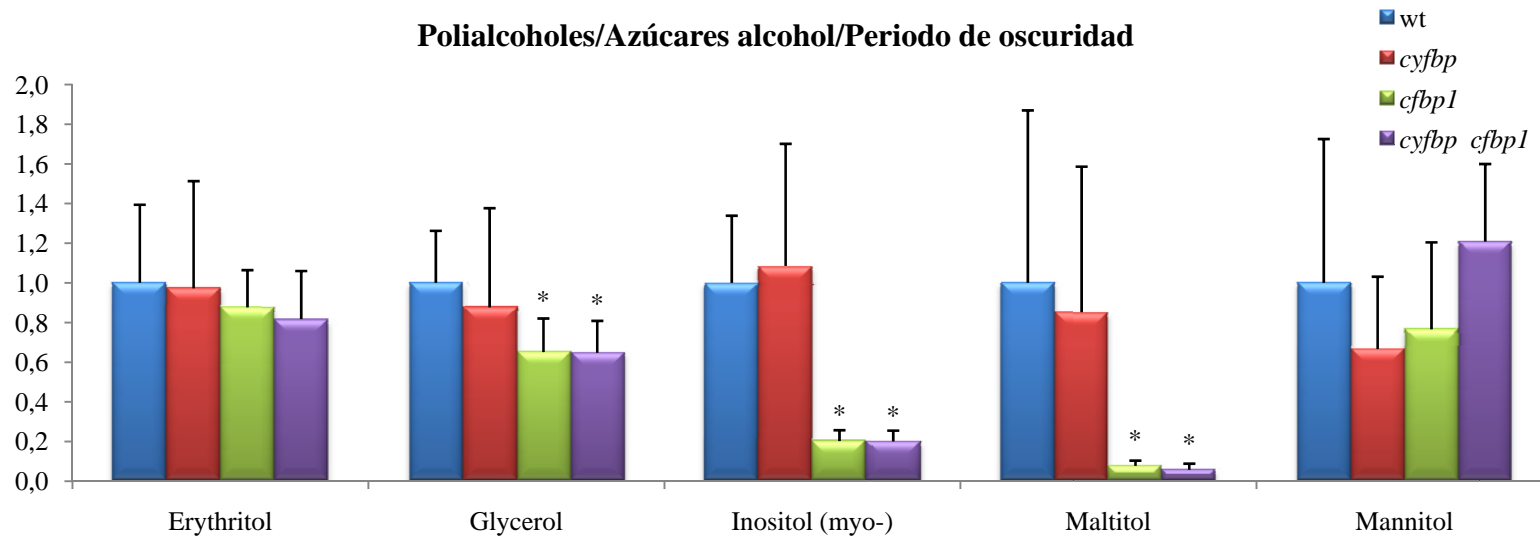


Figura 42 Polialcoholes analizados durante el periodo de oscuridad

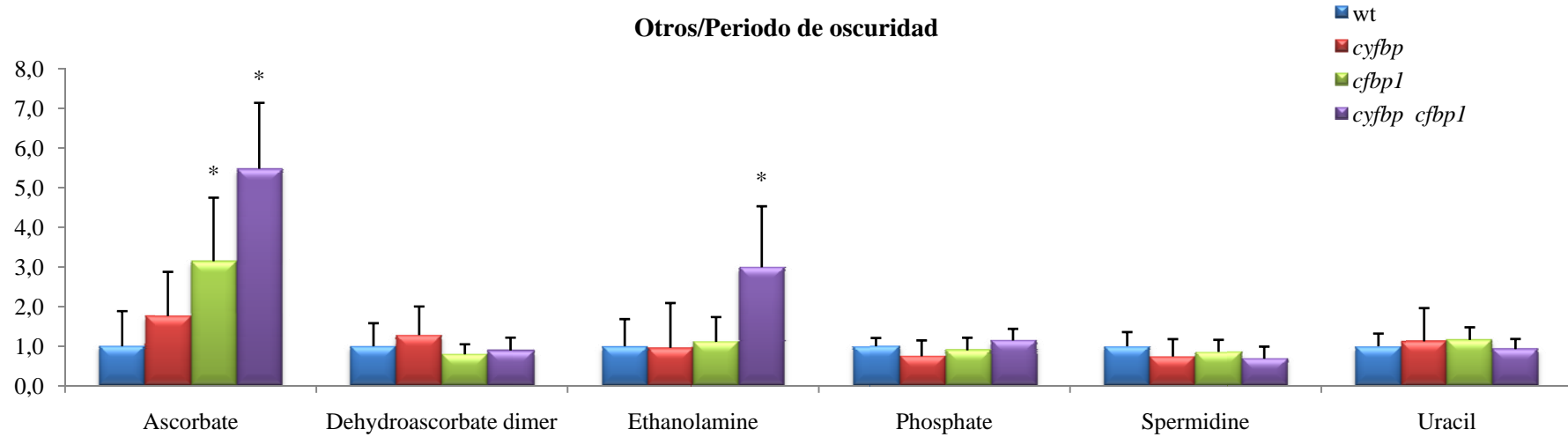


Figura 43. Otros metabolitos analizados durante el periodo de oscuridad.

Periodo de iluminación

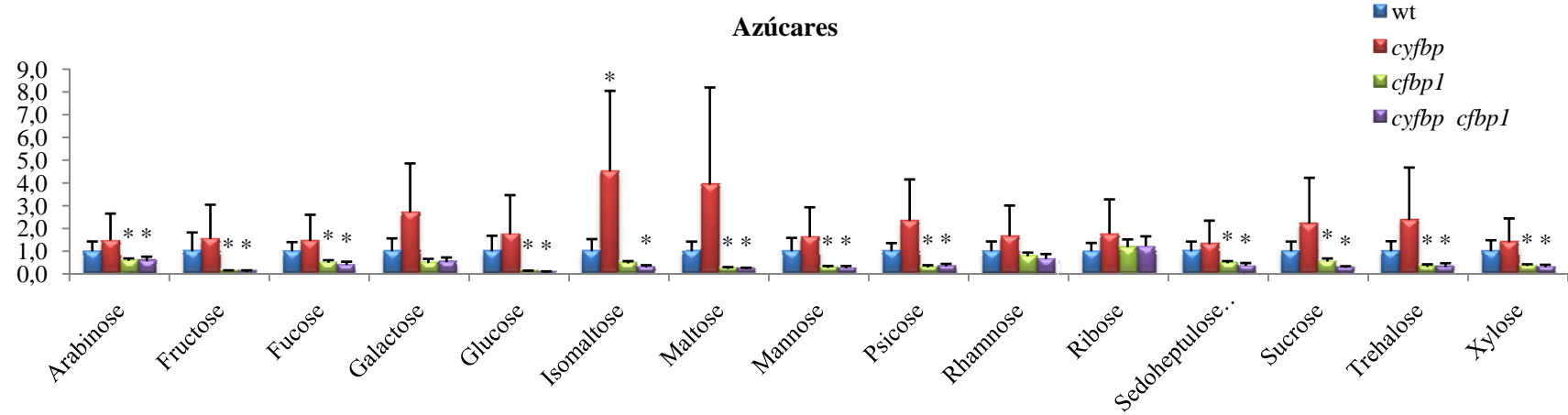


Figura 44. Azúcares analizados durante el periodo de iluminación

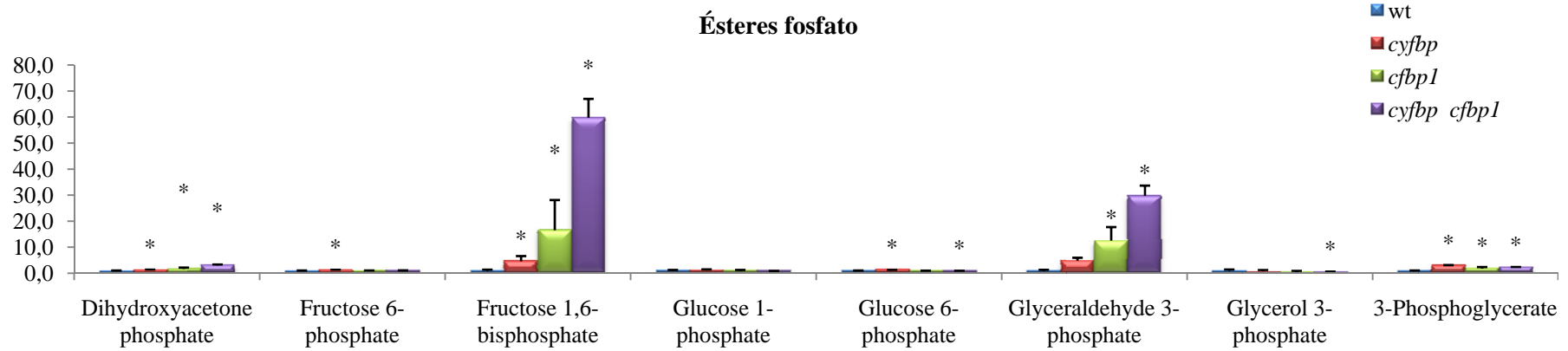


Figura 45. Ésteres fosfato analizados durante el periodo de iluminación

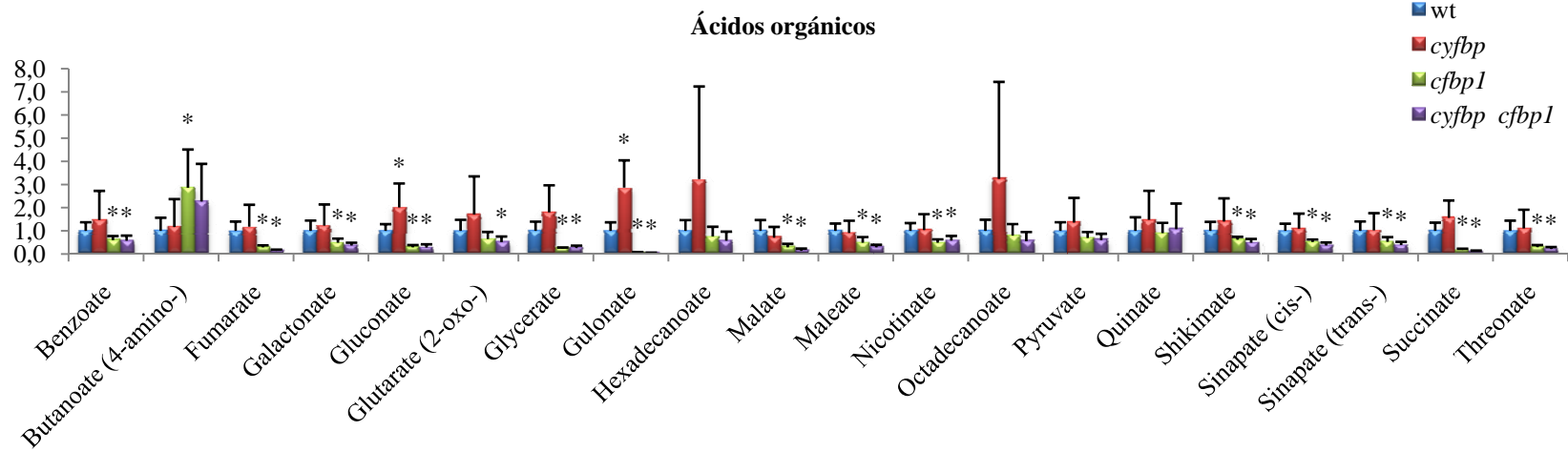


Figura 46. Ácidos orgánicos analizados durante el periodo de iluminación

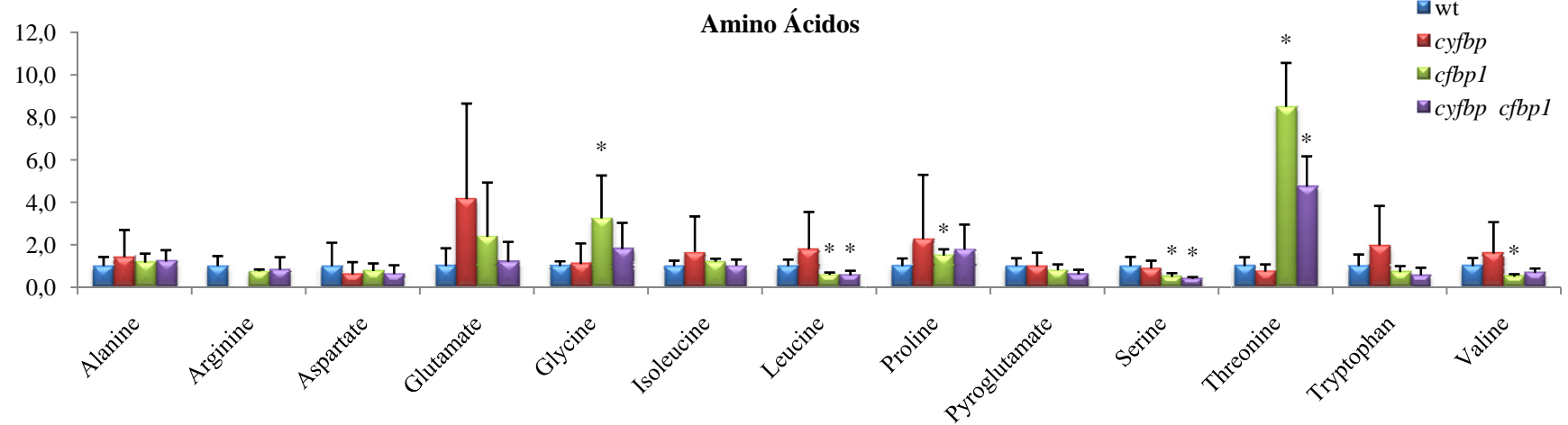


Figura 47. Amino ácidos analizados durante el periodo de iluminación

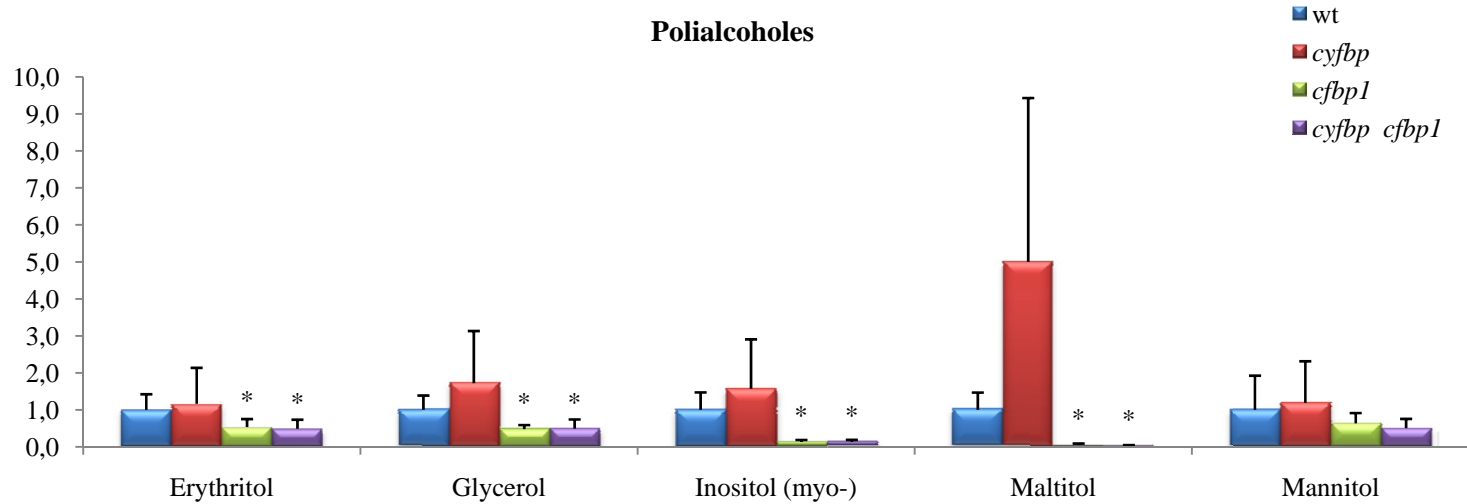


Figura 48. Polialcoholes analizados durante el periodo de iluminación

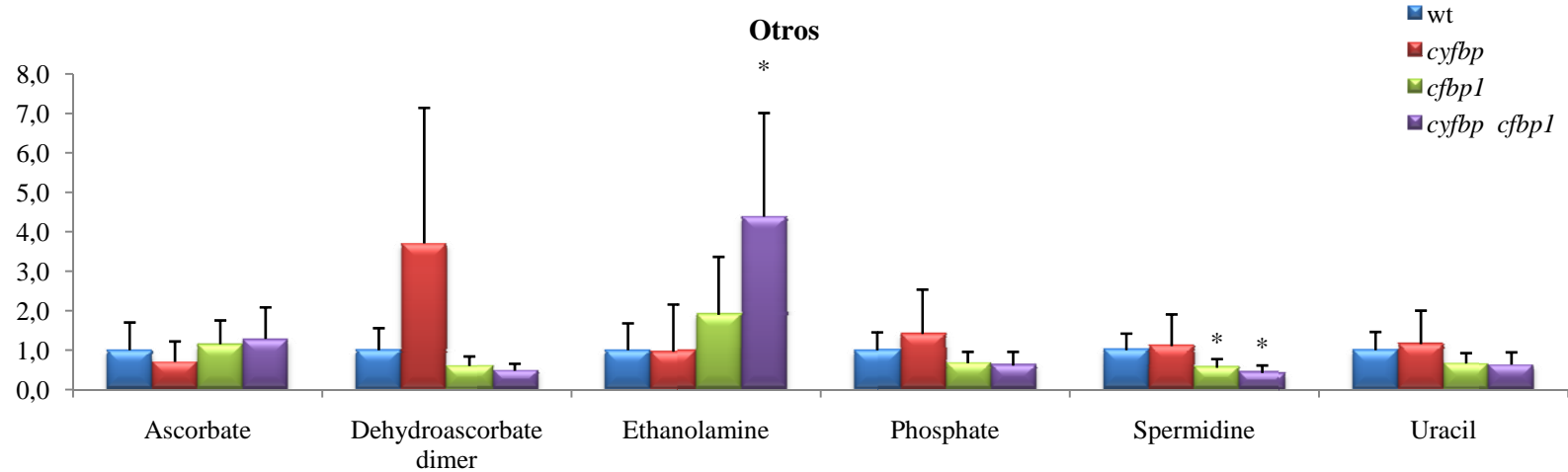


Figura 49. Otros metabolitos analizados durante el periodo de iluminación

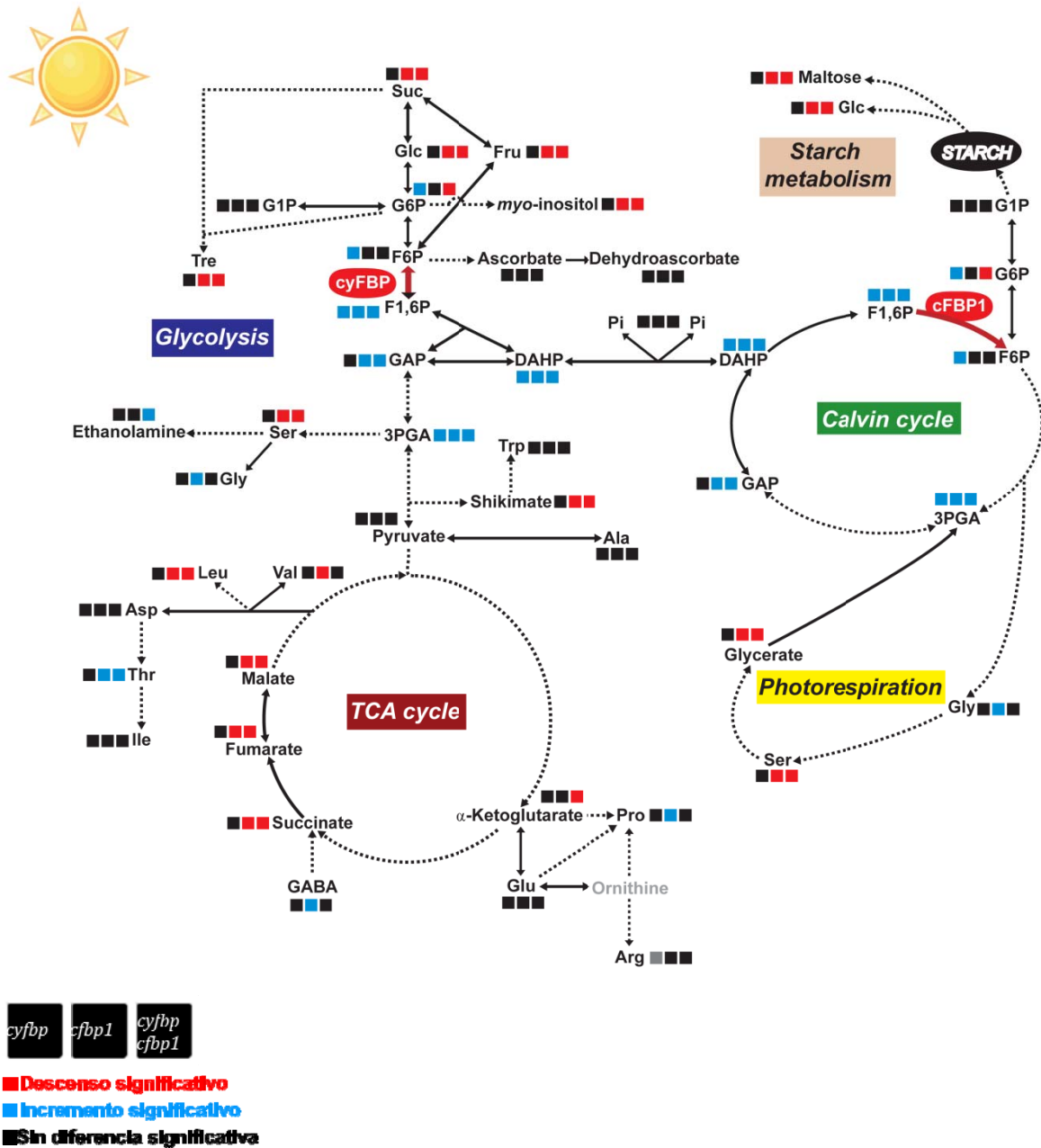


Figura 50. Niveles de metabolitos durante el periodo de iluminación

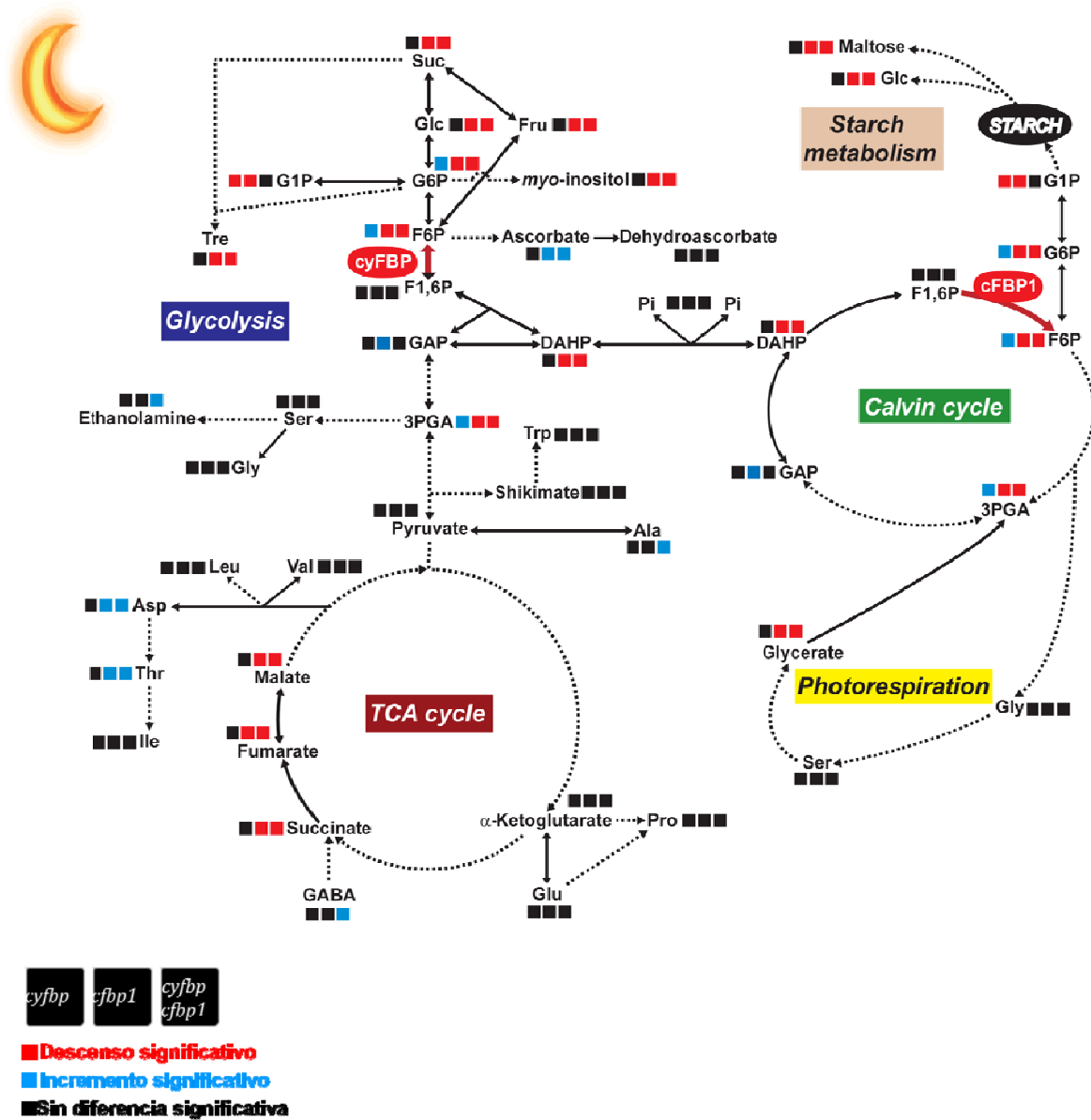


Figura 51. Niveles de metabolitos durante el periodo de oscuridad

V. DISCUSIÓN

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólica: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

V. DISCUSIÓN

La existencia de diferentes isoformas de FBPasa en plantas dificulta el poder predecir con precisión el papel metabólico de cada una de ellas. En estudios previos, utilizando mutantes del tipo “antisentido” de *A. thaliana* y otras especies vegetales (patata, tomate o arroz), diversos autores habían descrito el importante papel de las FBPasas para la regulación tanto del metabolismo primario que depende directamente de la fotosíntesis como de la biosíntesis de carbohidratos (Kobman et al., 1994; Obiadalla-Ali et al., 2004; Lee et al., 2008). Sin embargo, al comparar y analizarlos resultados obtenidos por los diferentes autores se podría llegar a obtener conclusiones contradictorias, debido posiblemente a las características metabólicas inherentes a cada especie vegetal en respuesta a ciclos de vida o a adaptaciones a condiciones medioambientales particulares adquiridas durante el proceso evolutivo.

El objetivo de esta tesis doctoral es el de profundizar en la interrelación entre las dos rutas gluconeogénicas principales y la contribución de las isoformas de FBPasa cloroplastídica, cFBP1, y citosólica, cyFBP, a través del estudio de tres mutantes de *Arabidopsis*: *cyfbp* (con la ruta de síntesis de sacarosa afectada), *cfbp1* (con un ciclo de Calvin-Benson y síntesis de almidón defectuosos) y *cyfbpcfbp1*. Mientras que las investigaciones de Cho y Yo (2011) se centraron en el papel de *fins1* (*cyfbp*) en la señalización por fructosa, en este trabajo se ha llevado a cabo una profunda caracterización metabólica y fisiológica de *cyfbp* cultivado en condiciones de crecimiento más naturales, también junto al mutante *cfbp1* y a la línea resultante de combinar sendos alelos mutantes en un mismo fondo genético. La pérdida de expresión de cyFBP no se vio reflejada en el fenotipo de *cyfbp*, parecido al de la línea silvestre, indicando que, en *Arabidopsis*, la biosíntesis de sacarosa sería posible gracias a las hexosas (HXs) o hexosas-Pi (HXs-Pi) exportadas del cloroplasto (Fettke et al., 2011), probablemente debido a la sobre-activación de la biosíntesis de almidón. Una serie de resultados obtenidos con este mutante respaldarían esta hipótesis: (i) no hay ninguna compensación de la actividad FBPasa por parte de la fosfofructofosfatasa (PF) (Fig. x); (ii) existe una sobre-acumulación de almidón (Fig. x) y un mayor contenido en los productos de degradación de almidón (Fig. x); y (iii) se produce una mayor acumulación de transcrito del gen que codifica para el transportador de maltosa (*MEX1*), el translocador de glucosa del plastidio (*pGlcT*) y los translocadores de glucosa-6-Pi/Pi del plastidio (*GPT1* y 2) (Fig. x) (Cho et al., 2011). En la misma línea de resultados, la reducción de los niveles del translocador de triosas fosfato (TPs) en el mutante *tpt-2* de *Arabidopsis* (Fig.x), en el que se encontraría parcialmente bloqueada (mutante *knock-down*) la salida de TP hacia el citosol, produce una mayor acumulación de almidón comparada con plantas silvestres, aunque manteniendo unos valores similares de sacarosa. Curiosamente, a pesar de tener niveles normales de sacarosa, el mutante *tpt-2* muestra menores niveles de transcrito de cyFBP (Fig. x) (Cho et al., 2011). Estos datos sugieren que *A. thaliana* podría prescindir de la ruta citosólica

gluconeogénica mediante la acumulación y movilización de más almidón para poder exportar así más HXs y HXs-Pi del cloroplasto al citosol, sufriendo solo una ligera pérdida de su capacidad fotosintética. Al contrario de lo que ocurre con cyFBP, la ausencia de cFBP1 produce en la planta un fenotipo enano muy exacerbado, que hacen pensar que varios procesos fisiológicos se encontrarían afectados, principalmente la fotosíntesis y la fijación de CO₂, como se ha quedado de manifiesto en los resultados expuestos en este trabajo de tesis doctoral. Asimismo, se ha demostrado que la inducción de cyFBP no es suficiente para compensar la pérdida funcional de cFBP1 (Fig. x). La hipótesis de partida de este trabajo anticipaba un efecto deletéreo de la suma de las dos mutaciones *fbp* que afectan a las dos principales rutas gluconeogénicas en *Arabidopsis*. Sin embargo, sorprendentemente, el doble mutante *cyfbp fbp1* es viable, y muestra un fenotipo similar al de *fbp1* (Fig. x). Experimentos de análisis de expresión revelaron solo una pequeña inducción de los niveles de transcrito del gen que codifica para la otra isoforma plastidial cFBP2 en la línea *cyfbp fbp1* (Fig. x). No obstante, dado el pequeño incremento de la actividad FBPa observado en este mutante, la contribución tanto de cFBP2 como de PFP parece ser muy limitada (Fig. x). Además, habría que tener en cuenta que la no inducción de los niveles de transcrito de *cFBP2* en el mutante *fbp1* haría bastante improbable la sustitución funcional de ambas isoformas de FBPa (Fig. x).

El fenotipo clorótico de las hojas de *fbp1* y *cyfbp fbp1* claramente estaría indicando que la pérdida de cFBP1 condiciona tanto el potencial fotosintético como la producción de biomasa en ambos mutantes. Además, los resultados obtenidos con la fluorescencia de la clorofila, que apuntan a que el alelo mutante *fbp1* está afectando al PSII y al transporte de electrones fotosintético, estarían en línea con los datos mostrados por otros autores en el que mutante de pérdida de función para cFBP1 (también nombrado como *hcfe1*, de *highcyclicelectronflow 1*) tiene inducido de manera constitutiva el flujo cíclico de electrones (CEF), como respuesta para poder equilibrar un desajustado (incrementado) ratio NADPH/ATP (Livingston et al., 2010). La caída de la eficiencia del PSII y la tasa del transporte electrónico fotosintético (J_{max} , basado en el requerimiento de NADPH) para *fbp1* y *cyfbp fbp1* indica que la asimilación de CO₂ está siendo limitada por el transporte electrónico y por la regeneración de la RuBP. Asimismo, la pérdida de la actividad FBPacloroplastídica condujo a un descenso de la V_{cmax} y de TPU y, como consecuencia, un incremento en la acumulación de TPs. Los cambios tan llamativos observados con los ácidos orgánicos malato, fumarato y succinato podrían explicar el cierre estomático durante el día en el mutante *fbp1*, coincidiendo con una actividad fotosintética que teóricamente debería estar funcionando a pleno rendimiento (Fig. 3). Esta situación conduciría a una limitación en la captación de CO₂ atmosférico (Discroll et al., 2006); Araujo et al., 2011; Zheng et al., 2013). A diferencia de *fbp1*, la línea mutante *cyfbp* no mostró diferencias significativas en su capacidad fotosintética.

Sorprendentemente, se observó un mayor número de capas celulares en el cilindro vascular de la raíz de *cfbp1* en comparación con la línea silvestre, sugiriendo que factores ontogénicos de la raíz podrían estar ayudando a restablecer el equilibrio metabólico perdido y destacando la coordinación existente entre órganos fotosintéticos y no fotosintéticos en plantas. Aunque no esté dentro de los objetivos de esta tesis doctoral, sería interesante conocer el significado fisiológico del remodelado de la raíz y la naturaleza de los factores responsables (como hormonas y/o factores de transcripción). Para contrarrestar las deficiencias en la fotosíntesis y el metabolismo de carbohidratos, los tejidos de la raíz de *cfbp1* podrían activar rutas metabólicas alternativas. En este sentido, un estudio transcriptómico de Soto y colaboradores (2007) mostró como se inducen numerosos genes que codifican para enzimas del metabolismo del C en raíces del mutante doble *cyfbp cfbp1* en comparación con la línea silvestre.

La fotosíntesis, además de conducir a la producción de NADPH y ATP necesarios para la fijación de CO₂, tiene asociada invariablemente la producción de subproductos como las ROS, nocivas para la célula (Mittler *et al.*, 2002). En los mutantes *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*, debido a los cambios importantes a nivel de PSII y del ciclo de Calvin-Benson, la producción de ROS supera a la de la línea silvestre. Estas ROS se estarían produciendo porque el O₂ estaría actuando como último aceptor de electrones de la fotosíntesis para dar lugar a O₂^{·-}, que se acumularía en los cloroplastos. Esta situación se confirmó por la clara inducción observada en CuZnSOD2 y FeSOD3 (Fig. x) (Kliebenstein *et al.*, 1998). Otra fuente de ROS es la enzima GOX, asociada a la fotorrespiración en los peroxisomas y que se encontró inducida en todos los mutantes FBPasa. La acumulación de H₂O₂ en estos orgánulos (producido por dismutación del O₂^{·-}) indujo la actividad de la enzima CAT (Fig. x), aunque esta no fue capaz de evitar el daño oxidativo ocasionado en los mutantes analizados. Los mayores productores de H₂O₂ en una célula fotosintética son el cloroplasto y el peroxisoma, aunque también existen otras fuentes de ROS como las NADPH oxidasas o la cadena de transporte electrónico mitocondrial. A pesar de que la actividad APX se encuentra inducida en el doble mutante FBPasa, el análisis mediante *western blot* (Fig. x) indica que la 2-Cys PRX plastidial no se encontraría sobre-oxidada en los mutantes FBPasa, indicando que el cloroplasto no se encontraría bajo un elevado nivel de estrés oxidativo (Iglesias-Baena *et al.*, 2010). Asimismo, la pérdida de ambas isoformas, principalmente de cFBP1, provoca cambios en el metabolismo de las ROS y ajustes en la razón ascorbato/dehidroascorbato como mecanismo de detoxificación. La producción de grupos carbonilos (Fig. x) afecta a las subunidades grande y pequeña de la RUBISCO, la RUBISCO activasa, la OCE3 del complejo de catálisis del H₂O y a las proteínas de unión a clorofilas (Johansson *et al.*, 2004).

El completo análisis metabólico llevado a cabo mediante las técnicas GC-TOF MS y de espectroscopía de fluorescencia proporciona una visión general de las alteraciones metabólicas en los mutantes de FBPasa, especialmente significativa en *cfbp1* y *cyfbp cfbp1*,

y que estarían detrás del exacerbado fenotipo que muestran. La inactivación de *cyFBP* conduce a una acumulación general de F1,6BP, HXs-Pi y de TPs durante el periodo de luz y que haría que se produjera una mayor acumulación de almidón. Sin embargo, serán necesarios análisis metabólicos a nivel subcelular para confirmar esta hipótesis (Geigenberger *et al.*, 2011). Los niveles de la mayoría de los azúcares incrementaron, principalmente de maltosa e isomaltosa, los productos mayoritarios de la movilización del almidón en cloroplastos, mientras que los niveles de sacarosa se mantuvieron similares a los de la línea silvestre. En este sentido, Cho y colaboradores (2011) también demostraron que mutantes de *Arabidopsis* que han perdido la capacidad de exportar maltosa o glucosa desde el cloroplasto tienen muy reducidas sus capacidades fotosintéticas, menores niveles de sacarosa, sufren una reducción del metabolismo del almidón y presentan retraso en el crecimiento. La mutación *cyfbp* produjo un sensible incremento en el contenido de trehalosa. Algunos autores han propuesto que la trehalosa-6-fosfato, el intermediario de la biosíntesis de trehalosa, es un componente de la ruta de señalización que media la regulación de la acumulación y/o movilización del almidón acumulado transitoriamente en las hojas de *Arabidopsis*. En una asociación lógica de ideas, podríamos pensar que el incremento de la trehalosa estaría respondiendo a las nuevas demandas metabólicas derivadas de la sobre-acumulación de almidón y de la inactivación de la ruta de biosíntesis citosólica de sacarosa (Martinet *et al.*, 2013). Los efectos positivos de la trehalosa incluyen una disminución del daño foto-oxidativo (Ba *et al.*, 2005). En cuanto al metabolismo de los aminoácidos, no se observaron cambios en el mismo, acotando las diferencias observadas al metabolismo de los carbohidratos.

A diferencia de la pérdida funcional de *cyFBP*, la inactivación de *cFBP1* tiene un profundo efecto en el ciclo de Calvin-Benson y la fotorrespiración, conduciendo a profundos cambios en el estado redox relacionados con los niveles de ascorbato. Adicionalmente, el metabolismo de los aminoácidos y de los ácidos orgánicos mitocondriales también se encuentra afectado en estos mutantes. Como cabría esperar, la pérdida del alelo silvestre *cFBP1* conlleva una acumulación, durante el período de luz, de F1,6BP, TPs y 3-PGA y un descenso de las HXs-Pi y de muchos azúcares como sacarosa, glucosa, fructosa, trehalosa y maltosa. Por otro lado, la biosíntesis de aminoácidos también se encontraba afectada; el contenido en serina disminuyó en *cfbp1* y el doble mutante, mientras que los niveles de glicina aumentaron en los mutantes con el alelo *cfbp1* durante el periodo de luz. Ambos aminoácidos están involucrados en las rutas fotorrespiratoria y no fotorrespiratoria y los cambios opuestos observados con la serina y la glicina indicarían que, durante la fotorrespiración, la actividad de la glicina descarboxilasa podría estar alterada. Timm y colaboradores (2013) han sugerido que la serina, posiblemente junto a la glicina, actuaría como metabolito señal para la regulación transcripcional de la fotorrespiración, especialmente para las reacciones de interconversión glicina/serina. Además, en los desequilibrios biosintéticos sacarosa/almidón y la producción de intermediarios fosforilados del ciclo de Calvin-Benson, la fotorrespiración podría

proporcionarle a la célula una ruta alternativa que harías las veces de ruta gluconeogénica, con la salvedad de que los productos finales no serían carbohidratos sino compuestos nitrogenados como la serina y la glicina(Harley y Sharkey, 1991).

La inactivación de la FBPasa cloroplastídica en *cfbp1* y *cyfbp cbp1* condujo a la caída de los niveles de varios ácidos orgánicos del ciclo TCA de la mitocondria y de aminoácidos como el triptófano, la fenilalanina y la tirosina, así como del shikimato, un precursor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Todo ello podría ser una consecuencia secundaria del descenso de la fijación de CO₂. Estos aminoácidos aromáticos pueden ser precursores de la biosíntesis de numerosos compuestos en plantas como pigmentos, alcaloides, hormonas y componentes de la pared celular.

Finalmente, como consecuencia de la inactivación de sendas isoformas de FBPasa, el incremento más acusado de F1,6BP y TPs y la bajada del contenido en sacarosa se observó en el mutante *cyfbpcfbp1*. A pesar de mostrar un fenotipo similar a *cfbp1*, el doble mutante conserva algunas características de *cyfbp*, como el cambio en el contenido en almidón. La pregunta que surge a continuación es la de cómo la planta es capaz de incrementar el contenido en almidón a partir de un fondo genético en el que faltaría cFBP1. Aunque la principal incógnita sería quizás cómo la planta es capaz de sobrevivir faltándole enzimas que catalizan reacciones en rutas metabólicas consideradas como fundamentales. El ligero incremento en la expresión de *cFBP2* podría responder a una respuesta de la planta para recuperar el equilibrio metabólico perdido con la pérdida de las otras dos isoformas de FBPasa. Sin embargo, de acuerdo con los resultados, la redundancia funcional de las dos isoformas de FBPasa plastidial es poco probable.

Resumiendo todos los resultados mostrados en este trabajo de tesis doctoral, el análisis de los mutantes simples y doble de pérdida de función para cFBP1 y cyFBP nos conduce a considerar que ambas enzimas desempeñan funciones importantes para la síntesis de sacarosa y almidón y contribuyen significativamente a la correcta regulación del metabolismo de carbohidratos en plantas. Asimismo, la pérdida de cFBP1 produjo cambios estructurales a nivel tisular y la aparición de un fenotipo enano. La isoforma cFBP2 no es capaz de sustituir funcionalmente a las otras dos isoformas. Además, este trabajo de tesis doctoral ha puesto de manifiesto la relación existente entre los azúcares, la biomasa, el contenido proteico e importantes rutas metabólicas, siendo las más importantes la fotorrespiración, la biosíntesis de aminoácidos y el ciclo TCA.

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólica: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

VI. CONCLUSIONES

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólíca: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

VI. CONCLUSIONES

1. La ausencia de cpFBP1 afecta drásticamente el fenotipo de la planta, indicando un papel esencial en el desarrollo de la misma.
2. El mayor número de estomas en el envés no implican mayor tasa fotosintética en los mutantes analizados.
3. Un aporte de glucosa o sacarosa acelera el crecimiento del mutante *cfbp1* igualándolo al del WT.
4. La viabilidad del mutante *cyfbp cfbp1* sugiere procesos alternativos para la supervivencia de la planta.
5. El contenido de glucosa y sacarosa es mayor en *cfbp1* a las 8 h y 16 h, respectivamente, y menor en la fase oscura. A mitad de la noche (20 h) en el mutante *cyfbp* se produce una mayor acumulación de sacarosa.
6. Existe un incremento de peróxido de hidrógeno en todos los mutantes respecto al WT. Este incremento provoca un mayor daño en proteínas en todos los mutantes y una mayor peroxidación lipídica en el mutante *cfbp1*.
7. La modificación del contenido de sacarosa y de almidón de forma controlada podría ser una herramienta biotecnológica interesante para los cultivos de interés agronómico.

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólica: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólíca: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson LE** (1971) Chloroplast and cytoplasmic enzymes. II. Pea leaf triose phosphate isomerases. *Biochim Biophys Acta* **235**: 237-244
- Balzergue S, Dubreucq B, Chauvin S, Le-Clainche I, Le Boulaire F, de Rose R, Samson F, Biaudet V, Lecharny A, Cruaud C, Weissenbach J, Caboche M, Lepiniec L** (2001) Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders. *Biotechniques* **30**: 496-498, 502, 504
- Ballicora MA, Frueauf JB, Fu Y, Schurmann P, Preiss J** (2000) Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *J Biol Chem* **275**: 1315-1320
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR** (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci* **15**: 330-336
- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Buckley TN** (2005) The control of stomata by water balance. *New Phytol* **168**: 275-292
- Buege J, Aust S** (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* **52**: 302-310
- Caemmerer Sv, Farquhar G** (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**: 376-387
- Comparot-Moss S, Kotting O, Stettler M, Edner C, Graf A, Weise SE, Streb S, Lue WL, MacLean D, Mahlow S, Ritte G, Steup M, Chen J, Zeeman SC, Smith AM** (2010) A putative phosphatase, LSF1, is required for normal starch turnover in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* **152**: 685-697
- Cséke C, Balogh A, Wong J, Buchanan B, Stitt M, Herzog B, Heldt H** (1984) Fructose 2,6-bisphosphate. A regulator of carbon processing in leaves. *Trends in Biochemistry Science* **9**: 533-535
- Cséke C, Buchanan B** (1986) Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* **853**: 43-63
- Curran PJ, Dungan JL, Gholz HL** (1990) Exploring the relationship between reflectance red edge and chlorophyll content in slash pine. *Tree Physiol* **7**: 33-48
- de Dios Barajas-Lopez J, Tezycka J, Travaglia CN, Serrato AJ, Chueca A, Thormahlen I, Geigenberger P, Sahrawy M** (2012) Expression of the chloroplast thioredoxins f and m is linked to short-term changes in the sugar and thiol status in leaves of *Pisum sativum*. *J Exp Bot* **63**: 4887-4900
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rebeille F** (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci* **6**: 167-176
- Driscoll SP, Prins A, Olmos E, Kunert KJ, Foyer CH** (2006) Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO₂ enrichment in maize leaves. *J Exp Bot* **57**: 381-390
- Erbán A, Schauer N, Fernie AR, Kopka J** (2007) Nonsupervised construction and application of mass spectral and retention time index libraries from time-of-flight gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiles. *Methods Mol Biol* **358**: 19-38

- Filella I, Serrano I, Serra J, Peñuelas J** (1995) Evaluating wheat nitrogen status with canopy reflectance indices and discriminant analysis. *Crop Science* **35**: 1400-1405
- Fu Y, Ballicora MA, Leykam JF, Preiss J** (1998) Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *J Biol Chem* **273**: 25045-25052
- Geigenberger P** (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiology* **155**: 1566-1577
- Gibson SI** (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 93-102
- Graf A, Schlereth A, Stitt M, Smith AM** (2010) Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9458-9463
- Graf A, Smith AM** (2011) Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Trends Plant Sci* **16**: 169-175
- Harley P, Sharkey T** (1991) An improved model of C₃ photosynthesis at high CO₂:reversed O₂ sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast. *Photosynthesis Research* **27**: 169-178
- Hausler RE, Fischer KL, Flugge UI** (2000) Determination of low-abundant metabolites in plant extracts by NAD(P)H fluorescence with a microtiter plate reader. *Anal Biochem* **281**: 1-8
- Heldt**, ed (2005) *Plant Biochemistry*,
- Ho CL, Saito K** (2001) Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in Arabidopsis thaliana. *Amino Acids* **20**: 243-259
- Jang HK, Lee SW, Lee YH, Hahn TR** (2003) Purification and characterization of a recombinant pea cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase. *Protein Expr Purif* **28**: 42-48
- Ke HM, Zhang YP, Lipscomb WN** (1990) Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 6-phosphate, AMP, and magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5243-5247
- Kebeish R, Niessen M, Thiruveedhi K, Bari R, Hirsch HJ, Rosenkranz R, Stabler N, Schonfeld B, Kreuzaler F, Peterhansel C** (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in Arabidopsis thaliana. *Nat Biotechnol* **25**: 593-599
- Kerr MW, Groves D** (1975) Purification and properties of glycolate oxidase from *Pisum sativum* leaves. *Phytochemistry* **14**: 359-362
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P** (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11118-11123
- Koßman J, Sonnewald U, L.Willmitzer** (1994) Reduction of the chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth. *The Plant Journal* **6**: 637-650
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lecoeur J, Wery J, Turc O, Tardieu F** (1995) Expansion of pea leaves subjected to short water-deficit: cell number and cell-size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1093-1101
- Lee SK, Jeon JS, Bornke F, Voll L, Cho JI, Goh CH, Jeong SW, Park YI, Kim SJ, Choi SB, Miyao A, Hirochika H, An G, Cho MH, Bhoo SH, Sonnewald U,**

- Hahn TR** (2008) Loss of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase limits photosynthetic sucrose synthesis and causes severe growth retardations in rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Environ* **31**: 1851-1863
- Lichtenthaler H, Wellburn A** (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* **11**: 591-592
- Liepmann AH, Olsen LJ** (2001) Peroxisomal alanine : glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **25**: 487-498
- Liepmann AH, Olsen LJ** (2003) Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**: 215-227
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408
- Lu Y, Gehan JP, Sharkey TD** (2005) Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol* **138**: 2280-2291
- Lu Y, Sharkey TD** (2006) The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant Cell Environ* **29**: 353-366
- MacRae EA, Lunn JE** (2006) Control of sucrose biosynthesis. In WC Plaxton, MT McManus, eds, *Advances in Plant Research: Control of Primary Metabolism in Plants Vol. 22*: Blackwell, Oxford, pp 234-257
- Maeda H, Dudareva N** (2012) The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 73-105
- Martins MC, Hejazi M, Fettke J, Steup M, Feil R, Krause U, Arrivault S, Vosloh D, Figueroa CM, Ivakov A, Yadav UP, Piques M, Metzner D, Stitt M, Lunn JE** (2013) Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology* **163**: 1142-1163
- Maurino VG, Peterhansel C** (2010) Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 249-256
- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P** (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 9908-9913
- Milla R, de Diego-Vico N, Martín-Robles N** (2013) Shifts in stomatal traits following the domestication of plant species. *J Exp Bot* **64**: 3137-3146
- Milla Rn, de Diego-Vico N, Martín-Robles N** Shifts in stomatal traits following the domestication of plant species. *Journal of Experimental Botany* **64**: 3137-3146
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Niittyla T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC** (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* **303**: 87-89
- Obiadalla-Ali H, Fernie AR, Lytovchenko A, Kossmann J, Lloyd JR** (2004) Inhibition of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphatase in tomato fruits leads to decreased fruit size, but only small changes in carbohydrate metabolism. *Planta* **219**: 533-540
- Parsons R, Ogston S** (1999) *Photosyn Assistant Ver. 1.1.2*. Dundee Scientific, Dundee. *In*,
- Portis AR, Jr., Parry MA** (2007) Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynth Res* **94**: 121-143

- Ragel P, Streb S, Feil R, Sahrawy M, Annunziata MG, Lunn JE, Zeeman S, Merida A** (2013) Loss of starch granule initiation has a deleterious effect on the growth of arabidopsis plants due to an accumulation of ADP-glucose. *Plant Physiol* **163**: 75-85
- Reumann S, Weber AP** (2006) Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled--others remain. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1496-1510
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 675-709
- Romero-Puertas M, Palma J, Gómez M, Río Ld, Sandalio L** (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell and Environment* **25**: 677-686
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM** (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1122-1134
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeekens S** (1998) Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J* **15**: 253-263
- Rosso MG, Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K, Weisshaar B** (2003) An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* **53**: 247-259
- Ruzanski C, Smirnova J, Rejzek M, Cockburn D, Pedersen HL, Pike M, Willats WG, Svensson B, Steup M, Ebenhoh O, Smith AM, Field RA** (2013) A bacterial glucanotransferase can replace the complex maltose metabolism required for starch to sucrose conversion in leaves at night. *J Biol Chem* **288**: 28581-28598
- Sahrawy M, Avila C, Chueca A, Canovas FM, Lopez-Gorge J** (2004) Increased sucrose level and altered nitrogen metabolism in Arabidopsis thaliana transgenic plants expressing antisense chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase. *J Exp Bot* **55**: 2495-2503
- Salisbury E** (1927) On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland Flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **216**: 1-65
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA** (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* **52**: 2115-2126
- Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Paul M** (2003) Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6849-6854
- Sekin S** (1978) Enzymatic determination of glucose, fructose and sucrose in tobacco. *Tobacco Science* **23**: 75-77
- Serrano I, Suárez C, Olmedilla A, Rapoport A, Rodríguez-García M** (2008) Structural organization and cytochemical features of the pistil in olive (*Olea europaea* L.) var. Picual at anthesis. *Sex Plant Reprod* **21**: 99-111
- Serrato AJ, de Dios Barajas-Lopez J, Chueca A, Sahrawy M** (2009b) Changing sugar partitioning in FBPase-manipulated plants. *J Exp Bot* **60**: 2923-2931
- Serrato AJ, Yubero-Serrano EM, Sandalio LM, Munoz-Blanco J, Chueca A, Caballero JL, Sahrawy M** (2009a) cpFBPaseII, a novel redox-independent chloroplastic isoform of fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Cell Environ* **32**: 811-827

- Sharkey T, Svitch L, Vanderveer P, Micallef B** (1992) Carbon partitioning in a *Flaveria linearis* mutant with reduced cytosolic fructose biphosphatase. *Plant Physiology* **100**: 210-215
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL** (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C(3) leaves. *Plant Cell Environ* **30**: 1035-1040
- Sharkey TD, Berry JA, Raschke K** (1985) Starch and Sucrose Synthesis in *Phaseolus vulgaris* as Affected by Light, CO(2), and Abscisic Acid. *Plant Physiol* **77**: 617-620
- Sharkey TD, Kobza J, Seemann JR, Brown RH** (1988) Reduced Cytosolic Fructose-1,6-Bisphosphatase Activity Leads to Loss of O(2) Sensitivity in a *Flaveria linearis* Mutant. *Plant Physiol* **86**: 667-671
- Sheen J** (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* **2**: 1027-1038
- Slater SM, Micallef MC, Zhang J, Micallef BJ** (2010) Identification and characterization of a null-activity mutant containing a cryptic pre-mRNA splice site for cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in *Flaveria linearis*. *Plant Mol Biol* **74**: 519-536
- Smith AM, Kruger NJ, Lunn JE** (2012) Source of sugar nucleotides for starch and cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E776; author reply E777
- Smith AM, Stitt M** (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* **30**: 1126-1149
- Smith AM, Zeeman SC, Smith SM** (2005) Starch degradation. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 73-98
- Stitt M** (1987) Fructose 2,6-bisphosphate and plant carbohydrate metabolism. *Plant Physiol* **84**: 201-204
- Stitt M** (1990) Fructose-2,6-Bisphosphate as a Regulatory Molecule in Plants *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 153-185
- Stitt M, Bulpin PV, Rees Ta** (1978) Pathway of Starch Breakdown in Photosynthetic Tissues of *Pisum-Sativum*. *Biochimica Et Biophysica Acta* **544**: 200-214
- Stitt M, Lunn J, Usadel B** (2010) Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism – more than the icing on the cake. *The Plant Journal* **61**: 1067-1091
- Stitt M, Zeeman SC** (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 282-292
- Strand A, Zrenner R, Trevanion S, Stitt M, Gustafsson P, Gardestrom P** (2000) Decreased expression of two key enzymes in the sucrose biosynthesis pathway, cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and sucrose phosphate synthase, has remarkably different consequences for photosynthetic carbon metabolism in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **23**: 759-770
- Szydlowski N, Ragel P, Raynaud S, Lucas MM, Roldan I, Montero M, Munoz FJ, Ovecka M, Bahaji A, Planchot V, Pozueta-Romero J, D'Hulst C, Merida A** (2009) Starch granule initiation in *Arabidopsis* requires the presence of either class IV or class III starch synthases. *Plant Cell* **21**: 2443-2457
- Takizawa K, Cruz JA, Kanazawa A, Kramer DM** (2007) The thylakoid proton motive force in vivo. Quantitative, non-invasive probes, energetics, and regulatory consequences of light-induced pmf. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1767**: 1233-1244
- Tiessen A, Hendriks JH, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farre EM, Geigenberger P** (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory

- mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* **14**: 2191-2213
- Timm S, Florian A, Wittmiss M, Jahnke K, Hagemann M, Fernie AR, Bauwe H** (2013) Serine acts as a metabolic signal for the transcriptional control of photorespiration-related genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **162**: 379-389
- Tolbert NE** (1997) The C2 Oxidative Photosynthetic Carbon Cycle. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 1-25
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354
- Veljovic-Jovanovic S, Noctor G, Foyer CH** (2002) Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 501-507
- Veljovic-Jovanovic S, Noctor G, Foyer CH** (2002) Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 501-507
- von Caemmerer S, Lawson T, Oxborough K, Baker NR, Andrews TJ, Raines CA** (2004) Stomatal conductance does not correlate with photosynthetic capacity in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco. *J Exp Bot* **55**: 1157-1166
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Groner F, Hebbeker U, Flugge UI** (2000) Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* **12**: 787-802
- Weise SE, Weber AP, Sharkey TD** (2004) Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* **218**: 474-482
- Wingler A, Delatte TL, O'Hara LE, Primavesi LF, Jhurrea D, Paul MJ, Schluepmann H** (2012) Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiol* **158**: 1241-1251
- Yazdanbakhsh N, Sulpice R, Graf A, Stitt M, Fisahn J** (2011) Circadian control of root elongation and C partitioning in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* **34**: 877-894
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM** (2010) Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 209-234
- Zeeman SC, Smith SM, Smith AM** (2007) The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J* **401**: 13-28
- Zheng Y, Xu M, Hou R, Shen R, Qiu S, Ouyang Z** (2013) Effects of experimental warming on stomatal traits in leaves of maize (*Zea mays* L.). *Ecol Evol* **3**: 3095-3111
- Zhou L, Jang JC, Jones TL, Sheen J** (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10294-10299
- Zimmermann G, Kelly GJ, Lutzko E** (1976) Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase. *European Journal of Biochemistry* **70**: 361-367
- Zrenner R, Krause KP, Apel P, Sonnewald U** (1996a) Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. *Plant J* **9**: 671-681