

TESIS DE MÁSTER

Células del mesófilo de plantas de
Arabidopsis que no poseen
fosfoglucoisomerasa plastidial acumulan
almidón.

Adriana Ricarte Bermejo

Curso 2013-14

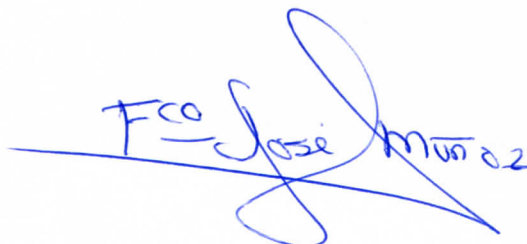
Director: Dr. Francisco José Muñoz Pérez
Codirector: Dr. Abdellatif Bahaji

El **Dr. FRANCISCO JOSÉ MUÑOZ PÉREZ**, Científico Titular del CSIC, como director de D^a. Adriana Ricarte Bermejo,

INFORMA

Que la presente memoria de Trabajo Fin de Master "*Células del mesófilo de plantas de Arabidopsis que no poseen fosfoglucoisomerasa plastidial acumulan almidón*" elaborada por D^a. Adriana Ricarte Bermejo, cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para ser presentada y defendida.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Pamplona a diecinueve de junio de 2014.



Dr. FRANCISCO JOSÉ MUÑOZ PÉREZ

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. Resumen | 2 |
| Abstract | 3 |
| 2. Abreviaturas | 4 |
| 3. Introducción | 5 |
| 4. Objetivos | 10 |
| 5. Materiales y Métodos | 11 |
| Material vegetal y condiciones de crecimiento | 11 |
| Obtención del doble mutante <i>pgi1-2/sex1</i> | 12 |
| Identificación de los dobles mutantes <i>pgi1-2/sex1</i> mediante PCR | 13 |
| Determinación de la presencia de almidón mediante tinción con iodina | 14 |
| Cuantificación de almidón | 14 |
| Extracción de proteínas | 15 |
| Gel nativo para detectar actividad PGI (Zimograma) | 15 |
| Medición de la fotosíntesis | 15 |
| Análisis estadísticos | 16 |
| 6. Resultados | 17 |
| Obtención y caracterización del doble mutante <i>pgi1-2/sex1</i> | 17 |
| Las células del mesófilo de hojas <i>pgi1-2/sex1</i> acumulan más almidón que las células del mesófilo de hojas <i>pgi1-2</i> | 18 |
| Hojas de mutantes de <i>pgi1-2</i> y <i>pgi1-2/sex1</i> presentan una capacidad fotosintética reducida | 20 |
| 7. Discusión | 21 |
| 8. Conclusiones | 24 |
| 9. Bibliografía | 25 |

1. Resumen

Está generalmente admitido que todo el proceso de biosíntesis del almidón que tiene lugar en las células del mesófilo de la hoja reside exclusivamente en el cloroplasto. Según esta interpretación el almidón transitorio es el producto final de una ruta metabólica en la que participan las enzimas fosfoglucomutasa plastidial (pPGM), ADP-glucosa pirofosforilasa (AGP) y almidón sintasa (SS) que estaría conectada con el ciclo de Calvin-Benson a través de de la fosfoglucosa isomerasa plastidial (pPGI). Sin embargo, estudios llevados a cabo en el grupo “Metabolismo de Carbohidratos” del Instituto de Agrobiotecnología de Navarra han demostrado que hojas del mutante *pgil-2* sin actividad pPGI (a) acumulan en las células del mesófilo un 10% del almidón que poseen las hojas de una planta salvaje (WT), (b) poseen niveles WT de la molécula precursora del almidón, el ADP-glucosa, y (c) poseen una reducida capacidad fotosintética y una elevada actividad degradadora de almidón. En este trabajo nos planteamos producir y caracterizar un doble mutante *pgil-2/sex1* incapaz de degradar almidón. El rationale de esta aproximación experimental es que si el mutante *pgil-2* es capaz de acumular almidón en las células del mesófilo, las hojas del doble mutante *pgil-2/sex1* deberían acumular más almidón que las hojas *pgil-2*, dado que el alelo *sex1* impide que se degrade el almidón. Los resultados obtenidos en este trabajo (a) apoyan aún más la idea de que las células del mesófilo del mutante *pgil-2* acumulan almidón, y (b) soportan la existencia de importantes vía(s) alternativa(s) de síntesis de almidón diferentes a la vía clásica.

Abstract

It is widely assumed that the whole starch biosynthetic process occurring in leaf mesophyll cells resides exclusively in the chloroplast. According to this view, the transitory starch is considered the end product of a metabolic pathway involving in the plastid phosphoglucomutase enzymes (pPGM), ADP-glucose pyrophosphorylase (AGP) and starch synthase (SS) that is linked to the Calvin-Benson cycle by means of the plastid phosphoglucose isomerase (pPGI). The *pgil-2* mutant is a null mutant of pPGI by insertion of a T-DNA. Given that (a) leaves of this mutant have 10% of WT starch, (b) starch is accumulated in mesophyll cells, and (c) *pgil-2* possesses WT levels of the starch precursor molecule, ADP- glucose, in this work I carried out the characterization of the *pgil-2/sex1* double mutant. The rationale behind this experimental approach was that, if *pgil-2* mesophyll cells do indeed accumulate starch, *pgil-2/sex1* leaves should accumulated more starch than *pgil-2*, since *sex1* mutation impedes β -amylase-mediated starch breakdown. The overall data (a) showed that mesophyll cells of pPGI null mutants are able to accumulate starch, and (b) supported the occurrence of important starch biosynthetic pathway (s) alternative (s) to the classic pathway.

2. Abreviaturas

ADPG, ADP-glucosa; AGP, ADPG pirofosforilasa; F6P, fructosa-6-fosfato; G1P, glucosa-1-fosfato; G6P, glucosa-6-fosfato; GBSS, almidón sintasa unida al gránulo de almidón; GFP, proteína verde fluorescente; LC, luz continua; LD, día largo; OPPP, fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato; pPGI, fosfoglucosa isomerasa plastidial; pPGM, fosfoglucmutasa plastidial; SD, día corto; SS; almidón sintasa; SuSy, sacarosa sintasa; WT, planta silvestre.

3. Introducción

El almidón es el principal carbohidrato de reserva en plantas vasculares. Este polímero constituye la principal fuente de calorías en la dieta humana y, tras la celulosa, es el componente de la biomasa terrestre más abundante. El almidón es utilizado en multitud de procesos en la industria alimentaria, textil, farmacéutica, cosmética, papelera, bioenergética, etc... (Slattery et al., 2000; Burrell, 2003; Goldemberg, 2007; Mooney, 2009).

La producción anual a nivel mundial de almidón procedente de cereales es de aproximadamente 2 mil millones de toneladas, mientras que la producción de almidón a partir de raíces y tubérculos supera los 700 millones de toneladas (Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org>), siendo en gran parte destinado a la industria no alimentaria. El incremento en la demanda de almidón para su uso industrial, junto con el rápido incremento de la población mundial ha dado lugar tanto a una masiva deforestación para la producción de terrenos cultivables de terrenos destinados a cultivos de especies domesticadas como aun considerable aumento de los precios de los alimentos. Con el fin de contribuir a evitar esta situación insostenible es importante investigar los mecanismos del metabolismo del almidón y su regulación. Ello permitirá diseñar y obtener de manera racional variedades de interés agronómico que produzcan más y mejores polímeros optimizando así las superficies de cultivo y satisfaciendo las demandas industriales y sociales.

Desde el punto de vista bioquímico, el almidón es un homopolisacárido formado por moléculas de α -D-glucosa y está constituido por dos componentes, la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero de moléculas de glucosa unidas covalentemente por enlaces α -1,4 dando lugar a una estructura lineal (**Figura 1**). La amilopectina presenta una estructura lineal de moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1,4 con ramificaciones debidas a enlaces α -1,6 (**Figura 2**) (Hizukuri y Takagi, 1984; Takeda et al., 1986; Ball et al., 1996; Ball y Morell, 2003). El balance amilosa/amilopectina varía según especies y órganos de una misma planta y constituye un parámetro fundamental de la aplicación industrial del almidón, ya que afecta a la gelatinización y textura de los productos derivados de este polímero (Itoh et al., 2003).

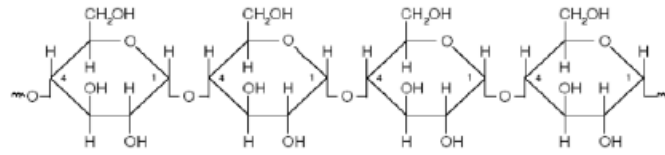


Figura 1: Estructura de la amilosa.

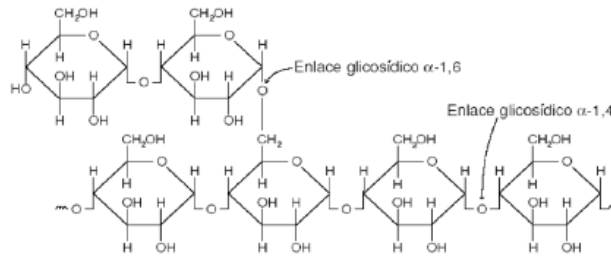


Figura 2: Estructura de la amilopectina.

El almidón se acumula en un compartimento subcelular denominado plastidio. En hojas, estos plastidios se denominan cloroplastos y poseen capacidad autónoma para producir energía química en forma de ATP, fijar CO₂ atmosférico y sintetizar almidón. A diferencia de lo que ocurre en cloroplastos, el almidón de reserva que se produce en amiloplastos de órganos de reserva tales como tubérculos, raíces y endospermos de semillas depende del suministro de moléculas de carbono y energía provenientes del citosol. Esta diferencia entre las capacidades metabólicas de los cloroplastos y de los amiloplastos ha generado la visión ampliamente aceptada de que las rutas de biosíntesis del almidón son diferentes entre las células fotosintéticas y las células no fotosintéticas (Bahaji et al., 2014a).

En hojas, gran parte del carbono fijado fotosintéticamente es retenido en el cloroplasto durante el día para sintetizar almidón, el cual será utilizado en la siguiente fase de oscuridad para aportar carbono al metabolismo no fotosintético y permitir el crecimiento de la planta. Debido a estos ciclos de síntesis y degradación, el almidón acumulado en las hojas se denomina “almidón transitorio”. Está ampliamente establecido que todo el proceso de biosíntesis del almidón en las células del mesófilo de las hojas ocurre únicamente en los cloroplastos (Arnon, 1955; Streb et al., 2009; Stitt y Zeeman, 2012). Según esto, el almidón es considerado el producto final de una ruta metabólica que está conectada con el ciclo de Calvin-Benson por medio la fosfoglucoasa isomerasa plastidial (pPGI) (**Figura 3**). Esta enzima cataliza la conversión de la

fructosa-6-fosfato (F6P) proveniente del ciclo de Calvin-Benson en glucosa-6-fosfato (G6P), la cual es convertida a su vez en glucosa-1-fosfato (G1P) por medio de la enzima fosfoglucomutasa plastidial (pPGM). A continuación, la enzima ADP-glucosa (ADPG) pirofosforilasa (AGP), convierte G1P y ATP en pirofosfato inorgánico y ADPG necesario para la biosíntesis del almidón. Esta visión además considera que la AGP es la única fuente de ADPG, y actúa como el paso regulador del proceso de biosíntesis del almidón (Kleczkowski, 1999, 2000; Neuhaus et al., 2005; Streb et al., 2009; Stitt y Zeeman, 2012).

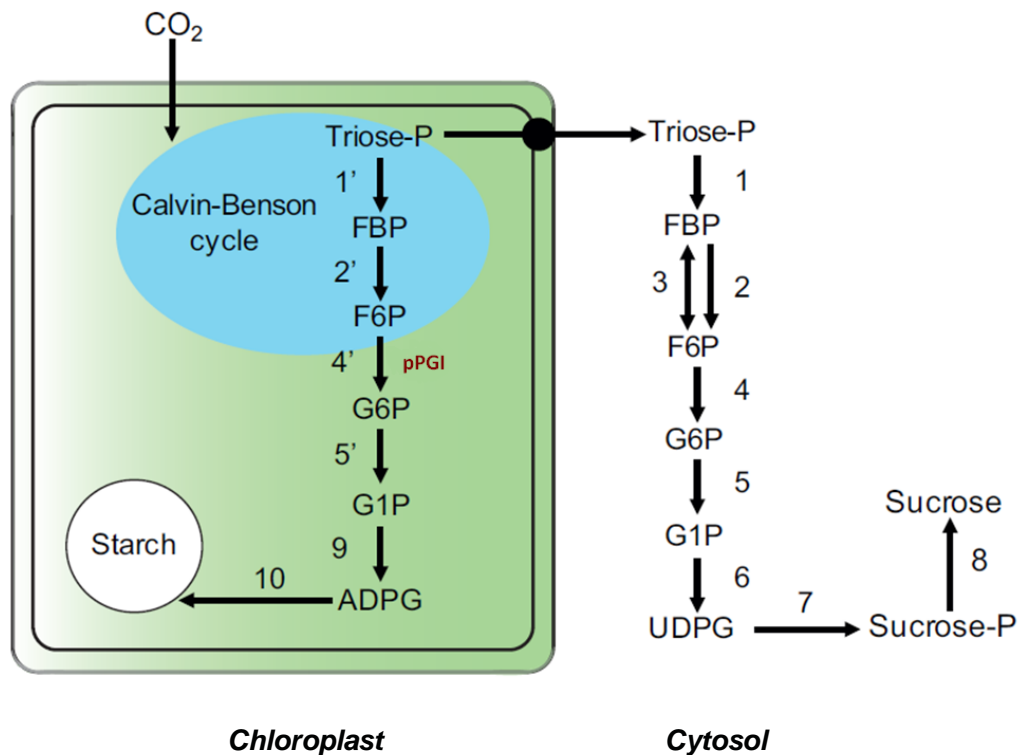


Figura 3: Modelo clásico de biosíntesis del almidón en hojas. Las enzimas implicadas son: 1, 1', fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; 2, 2', fructosa 1,6-bisfosfatasa; 3, PPI:fructosa-6-fosfato fosfotransferasa; 4, 4', PGI; 5, 5', PGM; 6, UDP-glucosa pirofosforilasa; 7, sacarosa fosfato sintasa; 8, sacarosa fosfato fosfatasa; 9, AGP; 10, SS.

Pese a la enorme cantidad de información que apoya el modelo clásico de biosíntesis del almidón, durante los últimos años han ido apareciendo una serie de evidencias que indican que (a) pPGI no conecta el ciclo de Calvin-Benson con la biosíntesis del almidón y (b) la biosíntesis del almidón transitorio en las células del mesófilo de las hojas involucra tanto al cloroplasto como al citosol. En este sentido hay

que remarcar que pPGI está fuertemente inhibida por la luz (Heuer et al., 1982) y por intermediarios del ciclo de Calvin-Benson, como el 3-fosfoglicerato, que se acumula en el cloroplasto durante la fase de iluminación (Dietz, 1985) y que a su vez es un activador alostérico de la AGP (Kleczkowski, 1999, 2000). Además, la proporción de G6P/F6P que ocurre en cloroplastos iluminados está por debajo de la constante de equilibrio de pPGI (Dietz, 1985; Sharkey y Vassey, 1988), lo que indicaría que en condiciones en las que se acumula el almidón transitorio pPGI está inactiva.

Evidencias genéticas a favor de que la biosíntesis del almidón transitorio ocurre únicamente via pPGI han sido obtenidas a partir de la caracterización de mutantes deficientes en pPGI (Jones et al., 1986, Kruckeberg et al., 1989, Neuhaus et al., 1989; Yu et al., 2000; Niewiadowski et al., 2005; Kunz et al., 2010). En *Arabidopsis*, estas evidencias han sido obtenidas a partir de la caracterización de los mutantes *pgil-1* y *pgil-2* que acumulan un 30% y un 10% del contenido de almidón de una planta de tipo silvestre (WT), respectivamente (Niewiadowski et al., 2005; Kunz et al., 2010). En hojas del mutante *pgil-1* poseen aproximadamente un 6% de la actividad pPGI de una planta WT (Yu et al., 2000), mientras que el mutante insercional *pgil-2* no posee actividad pPGI detectable (Kunz et al., 2010).

Las hojas *pgil-2* acumulan aproximadamente 10 veces más almidón que las hojas desprovistas de actividad pPGM y AGP (Caspar et al., 1985; Kofler et al., 2000; Ventriglia et al., 2008; Kunz et al., 2010; Bahaji et al., 2011). Esto entra en conflicto con la idea de que la biosíntesis del almidón transitorio ocurre únicamente a través de la ruta ciclo de Calvin-Benson-pPGI-pPGM-AGP-SS ilustrado en la **Figura 3**. Análisis mediante microscopía de hojas de plantas *pgil-2* han mostrado que los gránulos de almidón están restringidos a células adyacentes a los haces vasculares y a células guarda del estoma (Kunz et al., 2010). A diferencia de los cloroplastos de hojas WT, que muestran una pobre actividad transportadora de G6P, los cloroplastos de hojas *pgil-2* tienen una alta actividad transportadora de G6P como consecuencia de la elevada expresión de *GPT2* (Kunz et al., 2010), un gen que codifica para un transportador de G6P/Pi que actúa principalmente en tejidos heterotróficos, donde la G6P importada puede ser utilizada en la síntesis de almidón y ácidos grasos o entrar en la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (OPPP) (Kang y Rawsthorne, 1996; Kammerer et al., 1998; Fox et al., 2000; Weber y Flügge, 2002; Bowsher et al., 2007; Rolletschek et al., 2007; Zhang et al., 2008). Por lo tanto, la existencia de almidón en las células adyacentes a los haces vasculares y en las células guarda de hojas del mutante en *pgil-2*

se atribuye a la incorporación en los cloroplastos de G6P mediada por GPT2, y su posterior conversión en almidón por medio de la reacción pPGM-AGP-SS (Kunz et al., 2010).

Análisis llevados a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión de hojas *pgil-2*, así como análisis por microscopía confocal de fluorescencia de hojas *pgil-2* que expresaban la almidón sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS) fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP), revelaron la presencia de gránulos de almidón en las células del mesófilo de las hojas de *pgil-2* (Bahaji et al., 2014b). Las plantas de *Arabidopsis pgil-2* mostraron un fenotipo con crecimiento reducido y baja capacidad fotosintética cuando se cultivaron bajo regímenes de fotoperiodo de día corto (SD), día largo (LD) o luz continua (CL) (Bahaji et al., 2014b). Además, se comprobó que el mutante *pgil-2* mostraba reducidos niveles de SS y un aumento en la actividad β -amilasa (Bahaji et al., 2014b). Todos estos datos nos proporcionan fuertes evidencias de que el bajo contenido de almidón que presentan las células del mesófilo de hojas de *pgil-2* es la consecuencia de factores combinados, incluyendo la baja capacidad fotosintética y la actividad alterada de enzimas directamente relacionadas con el metabolismo del almidón. Todo ello invita a reevaluar la visión ampliamente aceptada de que pPGI conecta el ciclo de Calvin-Benson con la biosíntesis de almidón en células del mesófilo.

En este trabajo nos planteamos conocer si la introducción de la mutación *sex1* en *pgil-2* podría revertir el fenotipo “low starch” de *pgil-2*. *Sex1* es una mutación que impide en gran medida la degradación del almidón mediante la β -amilasa. El rationale de esta aproximación experimental es que si el mutante *pgil-2* es capaz de acumular almidón en las células del mesófilo, las hojas del doble mutante *pgil-2/sex1* deberían acumular más almidón que las hojas *pgil-2*. Los resultados obtenidos en este trabajo soportan aún más la existencia de rutas biosintéticas del almidón transitorio según las cuales el ciclo de Calvin-Benson no estaría conectado con la biosíntesis de almidón a través de la pPGI e implicaría la participación del citosol y del plastidio (Bahaji et al., 2014b).

4. Objetivos

- 1) Producir dobles mutantes *pgi1-2/sex1* a partir de plantas *pgi1-2* y *sex1* mediante cruzamiento.
- 2) Caracterizar plantas *pgi1-2/sex1* midiendo el contenido de almidón y la capacidad fotosintética. .

5. Materiales y Métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Este trabajo se llevó a cabo utilizando *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) (ecotipo Ws-2) y los mutantes: *pgil-2* (Kunz et al., 2010), *sex1* (SALK_077211) y *aps1* (SALK_040155) (Ventriglia et al., 2008). Los mutantes utilizados en este trabajo presentan una mutación por inserción de un T-DNA. El doble mutante de *pgil-2/sex1* fue producido mediante el cruzamiento entre los mutantes simples *pgil-2* y *sex1* y fue confirmado por PCR usando los oligonucleótidos mostrados en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Oligonucleótidos usados para la identificación de los mutantes *pgil-2/sex1* por PCR

| mutante | designación | secuencia |
|---------------|-------------|-------------------------------------|
| <i>pgil-2</i> | RP | 5'-TATACTCTTCTTCTCCATCTCTCAAAC-3' |
| | LP | 5'-CTTTTAATCAGAAAAACCTAAGAGAGG-3' |
| | T-DNA | 5'-CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC-3' |
| <i>sex1</i> | RP | 5'-GTCAGTCTATCCTGCGCTTTG-3' |
| | LP | 5'-TCCGGTATGACAAGTCGAATC-3' |
| | T-DNA | 5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3' |

Las semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas mediante lavados sucesivos con etanol 70% durante 2 minutos, hipoclorito sódico 1% durante 20 minutos y agua destilada estéril. Una vez esterilizadas se germinaron en medio Murashige and Skoog (MS) suplementado con 90 mM de sacarosa, y posteriormente se transfirieron a macetas con sustrato que contenía una mezcla de vermiculita y turba con una proporción 1:3. Las plantas fueron cultivadas en cámaras de crecimiento con un fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad (LD)), a 22°C día/20°C noche, una humedad del 70% y una intensidad lumínica de 120 μ E/m²s.

Las muestras recogidas fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido, trituradas a polvo fino con un mortero y guardadas a -80°C hasta su uso.

Obtención del doble mutante *pgi1-2/sex1*

Para realizar un cruzamiento entre dos estirpes de *Arabidopsis thaliana*, se utiliza una de ellas como donante (*pgi1-2*) y otra como receptora de polen (*sex1*). Según el procedimiento descrito por Kranz y Kirchheim (1987) (**Figura 4**), se elige un grupo de capullos florales en el ápice de un tallo inflorescente de la planta que se usará como parental femenino, eliminando todas las flores maduras, presuntamente autofecundadas, así como todos los capullos, salvo aquellos cuyos pétalos sean apenas visibles. A estos últimos se les extirpan los sépalos, los pétalos y los estambres inmaduros, obteniendo de este modo flores cuya única estructura funcional es un pistilo no fecundado. De la planta que se utilizará como donante de polen se selecciona una flor madura que presente los pétalos abiertos y con estambres en cuyas anteras sean visibles los granos de polen. Se ponen en contacto las anteras con el pistilo de la flor receptora de polen. Finalmente, la planta que ha sido fecundada por este procedimiento es devuelta a la cámara de cultivo, en la que permanecerá hasta que se forme y madure la silicua. Las semillas obtenidas de estas plantas (F₁) son heterocigotas para las dos mutaciones. En la segunda generación (F₂) obtenida por autofecundación de la F₁ se realizó la detección del doble mutante mediante PCR como se indica a continuación.

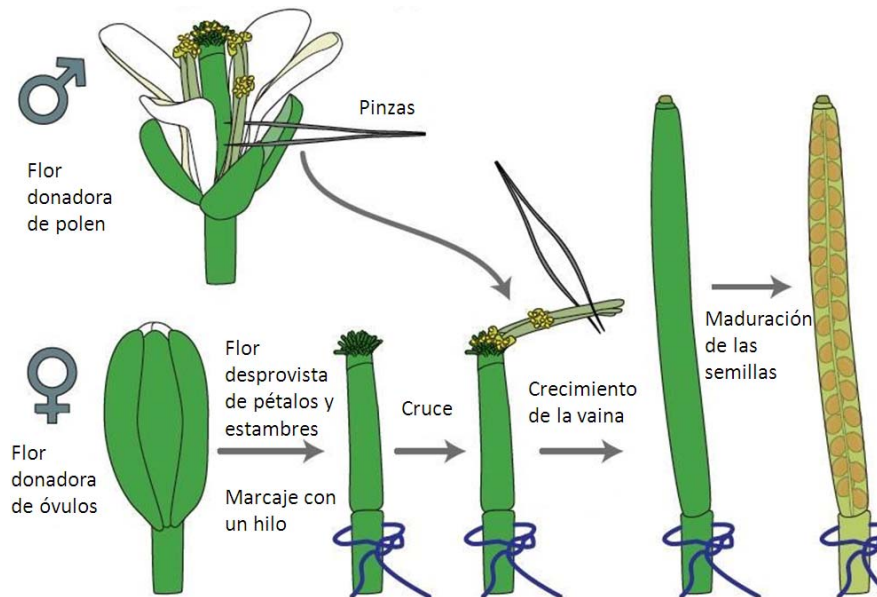


Figura 4: Esquema ilustrando los pasos necesarios para realizar el cruzamiento entre los mutantes *pgi1-2* y *sex1* para obtener el doble mutante *pgi1-2/sex1*.

Identificación de los dobles mutantes *pgi1-2/sex1* mediante PCR

Los mutantes *pgi1-2* y *sex1* son mutantes que tienen interrumpida la secuencia del gen por la inserción de un T-DNA. La estrategia para su identificación se basa en la amplificación selectiva, mediante PCR, de eventos de inserción del T-DNA dentro del gen elegido. Para ello se diseñan dos oligonucleótidos homólogos del gen de interés que flanquean la zona donde está insertado el T-DNA (oligonucleótidos LP y RP) y un tercer oligonucleótido específico de un borde del T-DNA (**Figura 5**).

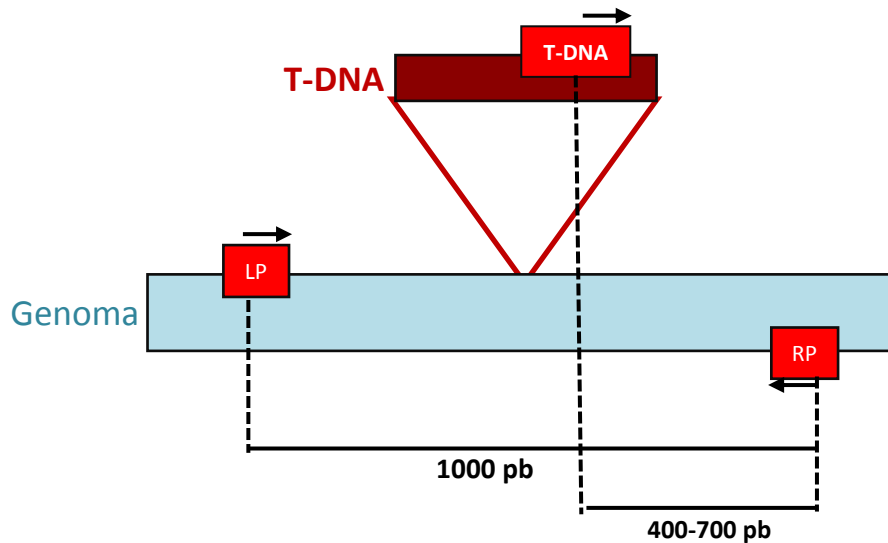


Figura 5: Posición y dirección de los oligonucleótidos utilizados para identificar la presencia del T-DNA en un gen.

En la reacción de PCR se combinan los tres oligonucleótidos, de manera que abarque todas las posibles combinaciones que nos podemos encontrar, es decir, que la planta sea homocigota, heterocigota o WT para la mutación que estamos analizando. El resultado que nos podemos encontrar en la PCR es que únicamente aparezca una banda de aproximadamente 1000 pb que indicaría que la planta es WT y no ha tenido lugar la inserción del T-DNA en ninguno de sus dos alelos. Si la PCR produce una banda de entre 400-700 pb nos indicaría que la planta es homocigota y tiene el T-DNA en sus dos alelos. La presencia de las dos bandas descritas anteriormente en una PCR nos indicaría que la planta es heterocigota para la mutación, ya que aparece un alelo WT y otro mutado (**Figura 6**). Para la realización de las PCRs se utilizó el Kit Extract-N-Amp Plant (Sigma) siguiendo sus indicaciones.



Figura 6: Esquema ilustrativo del resultado de la PCR, indicando el genotipo de la planta que estamos analizando.

Determinación de la presencia de almidón mediante tinción con iodina

Para llevar a cabo la tinción con iodina se fijaron 4 hojas de cada mutante en formaldehído 3.5% durante 24 h a 37°C. A continuación se mantuvieron las hojas durante 24 h a 37°C en cada una de las siguientes soluciones: tampón fosfato 0.1M, etanol 50% y etanol 96%. Tras el proceso de fijación se pasó a rehidratar las muestras con incubaciones de 24 h a 37°C con etanol 50% y posteriormente con agua. Las muestras rehidratadas fueron teñidas en una solución de iodina (KI 2%, I₂ 1%) durante 6 horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

Cuantificación de almidón

Se utilizó 100 mg del polvo congelado en nitrógeno líquido para cuantificar el contenido de almidón. El polvo se resuspendió en 1 ml de etanol 90% y se incubó a 70°C durante 90 minutos con agitación, se centrifugó a 10,000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se guardó para medir azúcares solubles. El pellet, que contenía el almidón, se resuspendió en 200 µl de KOH 0.2 M y se incubó durante 90 minutos a 95°C para posteriormente neutralizar la muestra con ácido acético 0.1 M. La liberación de las moléculas de glucosa se llevó a cabo mediante la liberación con amilglucosidasa (Boehringer-Mannheim) durante 60 minutos a 60°C. La cantidad de glucosa liberada se determinó mediante unas reacciones acopladas en las que cada molécula de glucosa es convertida en una molécula de NADPH que es cuantificado en un espectrofotómetro a 340 nm (**Figura 7**).

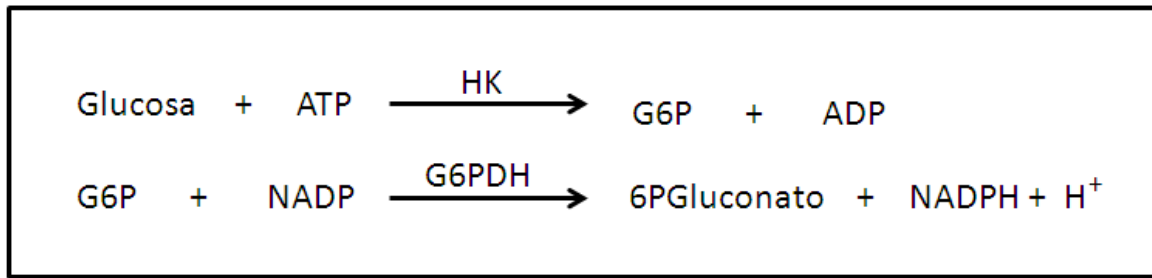


Figura 7: Reacciones acopladas para la cuantificación de glucosa. HK, hexoquinasa; G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Extracción de proteínas

Se resuspendió 1 gramo del polvo de hoja congelado en nitrógeno en 3 ml de HEPES 100 mM (pH 7.5), 2 mM EDTA, 2 mM ditioneol, 1 mM PMSF y 10 ml/L de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma P9599) a 4°C y se centrifugó a 10,000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se desaló por ultrafiltración en Centricon YM-10 (Amicon, Bedford, MA) y el extracto de proteína así obtenido se usó para el ensayo de las actividades enzimáticas.

Gel nativo para detectar actividad PGI (Zimograma)

El zimograma para detectar la actividad de PGI se realizó como se describe en Caspar et al. (1985). Los extractos de proteína obtenidos de hojas de *Arabidopsis* WT y *pgil-2* se cargaron en un gel de poliacrilamida al 7.5% (w/v) sin SDS. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron incubándolos a temperatura ambiente con una solución que contenía 0.1 M de Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM de F6P, 1 mM de NAD⁺, 4 mM de MgCl₂, 0.2 mM bromuro de methylthiazolyldiphenyl-tetrazolio (Sigma M5655) y 0.25 mM metosulfato de fenacina (Sigma P9625) y 1 U/mL de Glucosa-6P deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma G8404).

Medición de la fotosíntesis

La fotosíntesis de plantas con cuatro semanas de edad fue determinada usando el medidor de fotosíntesis portátil LCpro (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, Herts), que permite controlar las condiciones ambientales, dentro de un rango estándar, de la hoja durante la medida. La temperatura del aire en la cámara era de 25°C y la intensidad de la luz fue mantenida a 350 μmol m⁻² s⁻¹. La tasa de asimilación de CO₂ fue determinada con una concentración de CO₂ de 450 ppm.

Análisis estadísticos

Los datos presentados en este trabajo son las medias de tres experimentos independientes, con 3-5 repeticiones para cada experimento (media \pm SE).

6. Resultados

Obtención y caracterización del doble mutante *pgil-2/sex1*

Para la obtención del doble mutante *pgil-2/sex1* se realizó el cruzamiento de plantas *pgil-2* con plantas *sex1* según se describe en Materiales y Métodos. Las plantas obtenidas de la F₂ se analizaron mediante PCR utilizando los tres oligonucleótidos descritos en la **Tabla 1**. La **Figura 8** muestra el resultado de la PCR utilizando los oligonucleótidos para *pgil-2* y *sex1* en una planta mutante *pgil-2*, doble mutante *pgil-2/sex1*, WT y mutante *sex1*. La presencia de un producto de PCR de aproximadamente 700 pb nos indica la presencia de la mutación *pgil-2*, mientras que la presencia de un producto de PCR de 550 pb nos indica la mutación *sex1*. Con esta sencilla técnica de PCR confirmamos la existencia de plantas doble mutantes *pgil-2/sex1* dentro de la población F₂.

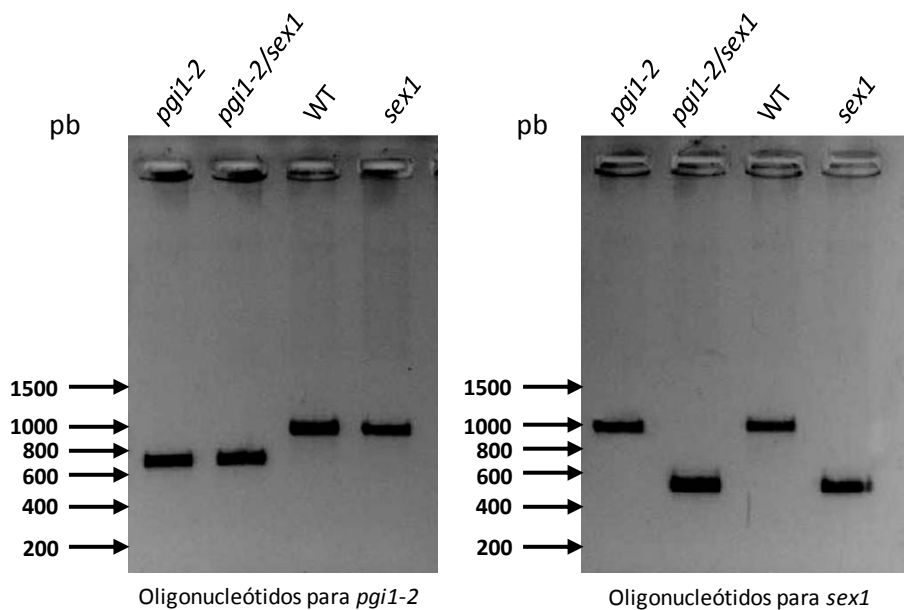


Figura 8: Gel de agarosa (1%) ilustrando la electroforesis del producto de las PCRs utilizadas para determinar la presencia de las mutaciones *pgil-2* y *sex1*.

Una vez identificadas las plantas *pgil-2/sex1* por PCR, se analizó la presencia de pPGI en las plantas *pgil-2*, *pgil-2/sex1*, *sex1* y WT mediante un zimograma tal y como se describe en Materiales y Métodos. En *Arabidopsis* existen dos isoformas de PGI, una citosólica (cytPGI) y la pPGI (Yu et al., 2000; Tsai et al., 2009). Normalmente la actividad de pPGI constituye aproximadamente el 20-30% de la PGI celular total (Jones et al., 1986; Kunz et al., 2010). El análisis del zimograma revela la existencia de

las dos isoformas en hojas de plantas WT y *sex1* (**Figura 9**). Sin embargo, sólo cytPGI está presente en las hojas de *pgil-2* y *pgil-2/sex1* (**Figura 9**), lo que nos indica la ausencia de actividad pPGI en estas plantas.

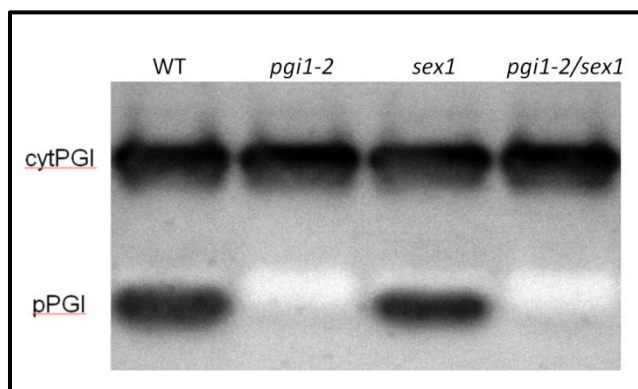


Figura 9: Zimograma para detectar la actividad PGI en hojas de las plantas WT, *pgil-2*, *sex1* y *pgil-2/sex1*.

Las células del mesófilo de hojas *pgil-2/sex1* acumulan más almidón que las células del mesófilo de hojas *pgil-2*

Para comprobar si las células del mesófilo de los mutantes *pgil-2* son capaces de acumular almidón procedimos a analizar el contenido de almidón del doble mutante *pgil-2/sex1*. El fundamento de este enfoque experimental es que, si las células del mesófilo de *pgil-2* tienen capacidad de acumular almidón, el doble mutante *pgil-2/sex1* debería acumular más almidón que el mutante simple *pgil-2*, puesto que se ha eliminado la posibilidad de degradarlo durante la noche. Si por el contrario, las células del mesófilo del mutante *pgil-2* son incapaces de producir almidón por no tener actividad pPGI, tanto el mutante simple *pgil-2* como el mutante doble *pgil-2/sex1* deberían acumular la misma cantidad de almidón.

Las hojas de *pgil-2* se tiñen de un color marrón claro de manera homogénea (**Figura 10**), consistente con la posible existencia de bajos niveles de almidón. Por el contrario, el mutante de *aps1* mostró un fenotipo amarillo de tinción en iodina como consecuencia de su muy reducido contenido de almidón. SEX1 es necesaria para la degradación del almidón mediada por β -amilasa que ocurre durante la noche. Las hojas del mutante *sex1*, tras la tinción con iodina, adquieren un color negro debido a la sobreacumulación de almidón (**Figura 10**). El doble mutante *pgil-2/sex1* mostró tener un color de tinción más oscura que las hojas de *pgil-2* y más clara que una hoja WT. La

tinción se mostró en todos los casos homogéneamente distribuida por toda la hoja, indicando que las células del mesófilo de hojas *pgi1-2/sex1* acumulan más almidón que las células del mesófilo de hojas *pgi1-2*.



Figura 10: Tinción con iodina de hojas procedentes de plantas *aps1*, *pgi1-2*, *pgi1-2/sex1*, WT y *sex1*.

Confirmando esta hipótesis la cuantificación bioquímica del contenido de almidón mostró que las hojas de *pgi1-2/sex1* acumulan alrededor de un 50% de almidón de una planta WT en las células del mesófilo de la hoja (Figura11).

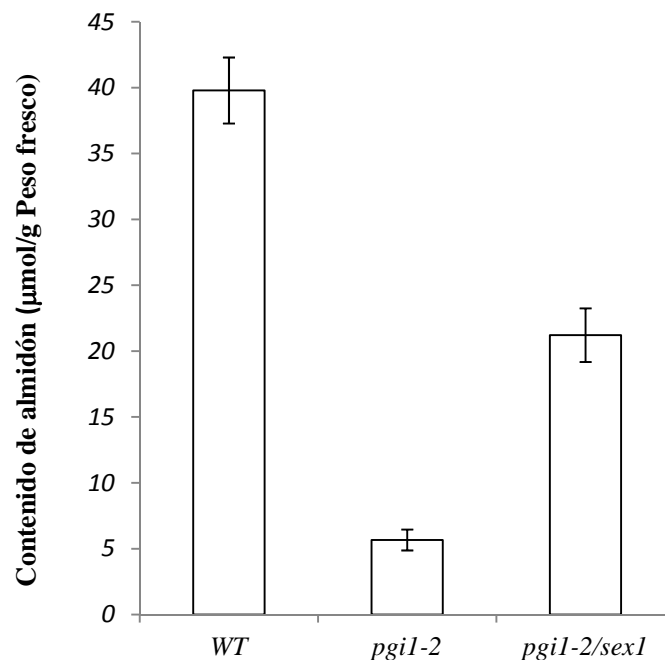


Figura 11: Contenido de almidón en hojas de mutantes *pgi1-2*, *pgi1-2/sex1*, y plantas WT.

Hojas de mutantes de *pgil-2* y *pgil-2/sex1* presentan una capacidad fotosintética reducida

Estudios previos han demostrado que las plantas *pgil-2* tienen reducida su capacidad fotosintética, lo cual podría explicar en parte su bajo contenido en almidón y su crecimiento reducido (Bahaji et al., 2014b). Con el fin de investigar una posible relación causa-efecto entre la presencia de almidón y la capacidad fotosintética de una planta decidimos analizar la capacidad fotosintética de *pgil-2/sex1*. Tal y como se observa en la **Figura 12** los dobles mutantes *pgil-2/sex1* presentaron una tasa fotosintética reducida comparable a la del mutante simple *pgil-2*. Por lo tanto, el incremento del contenido de almidón como consecuencia de la introducción del alelo *sex1* en el mutante *pgil-2* no es debido a un incremento de la actividad fotosintética.

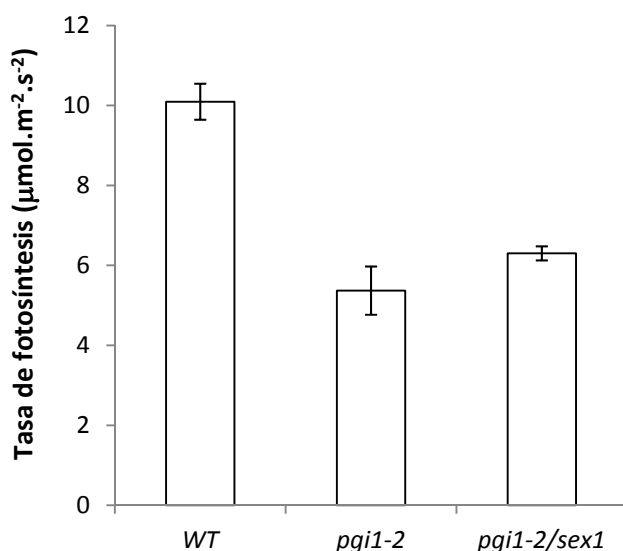


Figura 12: Tasa fotosintética de las plantas WT, *pgil-2*, *pgil-2/sex1* crecidas en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

7. Discusión

Está ampliamente aceptado que la ruta de biosíntesis del almidón transitorio en tejidos fotosintéticos discurre según la ruta clásica mostrada en la **Figura 3**. La **Figura 11** muestra que las células del mesófilo de las hojas de las plantas *pgil-2*, desprovistas de actividad pPGI, acumulan entre un 10 y un 15 % del contenido de almidón de una planta WT, dato similar al descrito por Kunz et al. (2010). Este dato entra en conflicto con el modelo clásico de biosíntesis de almidón, según el cual el ciclo de Calvin-Benson estaría conectado con la ruta de biosíntesis de almidón por medio de la enzima pPGI.

Según Kunz et al. (2010) el almidón presente en las hojas de *pgil-2* podría ser debido a la incorporación de G6P desde el citosol al cloroplasto a través del transportador GPT2. Esto ocurriría únicamente en las células adyacentes a los haces vasculares y en las células guarda de los estomas. Si esto fuera así, las hojas teñidas con iodina deberían mostrar un color más oscuro en los haces vasculares y en los estomas. Sin embargo, no se aprecia este patrón y la tinción está homogéneamente distribuida en las células del mesófilo de la hoja (**Figura 10**). Además, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que GPT2 no juega un papel en la biosíntesis del almidón transitorio ya que tanto el doble mutante *pgil-2/gpt2* como plantas *pgil-2* que sobreexpresan GPT2, acumulan niveles de almidón iguales al del mutante *pgil-2*.

La caracterización del mutante *pgil-2* mostró que (a) la capacidad fotosintética de las hojas de las plantas *pgil-2* esta reducida un 50%, (b) la actividad SS soluble en *pgil-2* es un 30% menor que en plantas WT y (c) la actividad β -amilasa en hojas *pgil-2* es 2-3 veces más alta que en plantas WT (Bahaji et al., 2014b). Con todo ello es muy probable que la deficiencia de almidón que presentan las hojas de *pgil-2* sea consecuencia de cualquiera de los efectos mencionados anteriormente y no solo la consecuencia de la interrupción del flujo mediado por pPGI entre el ciclo de Calvin-Benson y la ruta biosintética del almidón.

Para explicar el bajo contenido de almidón del mutante *pgil-2* también habría que tener en cuenta que pPGI participa en la regeneración de moléculas de G6P en el OPPP en tejidos heterotróficos y en hojas no iluminadas. El OPPP produce NADPH necesario para la producción de lípidos, la asimilación de nitrógeno (Kang y Rawsthorne, 1996; Bowsher et al., 2002, 2007), la respiración y para producir precursores necesarios en la producción de RNA y DNA. Algunos intermediarios del OPPP son utilizados en la producción de compuestos tales como ligninas, flavonoides,

fitoalexinas, hormonas y carotenoides. Con todo ello podemos concluir que tanto el bajo contenido de almidón como el reducido crecimiento de las plantas *pgil-2* puede ser debido a uno o múltiples factores descritos anteriormente.

Teniendo en cuenta que (a) los cloroplastos poseen un maquinaria capaz de transportar ADPG a su interior (Pozueta-Romero et al., 1991), (b) existe una considerable cantidad de ADPG fuera de los cloroplastos (Baroja-Fernández et al., 2004; Bahaji et al., 2011, 2014a), (c) hojas de plantas *pgil-2* acumulan niveles WT de ADPG, (d) enzimas citosólicas tales como la sacarosa sintasa (SuSy) pueden producir ADPG (Delmer, 1970; Baroja-Fernández et al., 2003, 2012) y (e) SuSy se expresa en las células del mesófilo (Fu et al., 1995; Wang et al., 1999), proponemos un modelo alternativo de biosíntesis de almidón transitorio que se ilustra en la **Figura 13**. Según este modelo pPGI no estaría directamente implicado en la producción de almidón transitorio. Además el ADPG necesario para la biosíntesis de almidón se produciría en el citosol por SuSy y sería transportado al interior del cloroplasto por un transportador todavía no identificado molecularmente. Las enzimas pPGM y AGP jugarían un papel muy importante en la recuperación de las unidades de glucosa derivadas de la degradación del almidón (Baroja-Fernández et al., 2004, 2005; Muñoz et al., 2005; Bahaji et al., 2011, 2014a). La existencia de un ciclo fútil de síntesis y degradación de almidón ha sido descrito en cloroplastos aislados (Stitt y Heldt, 1981; Fox y Geiger, 1984), en hojas (Scott y Kruger, 1995; Walters et al., 2004) y en cultivo de células fotosintéticas (Lozovaya et al., 1996).

El objetivo principal de este trabajo era aportar más evidencias a favor de nuestra hipótesis de que pPGI no conecta el ciclo de Calvin-Benson con la biosíntesis del almidón transitorio y que plantas carentes de pPGI acumulan almidón en las células del mesófilo. Con este fin se procedió a realizar el doble mutante *pgil-2/sex1*. Confirmando nuestra hipótesis, los datos obtenidos mostraron que el doble mutante *pgil-2/sex1* acumula 4-5 veces más almidón que el mutante simple *pgil-2* (**Figura 11**) y este almidón está homogéneamente distribuido en las células del mesófilo (**Figura 10**) y no sólo en las células adyacentes a los haces vasculares como indica Kunz et al. (2010).

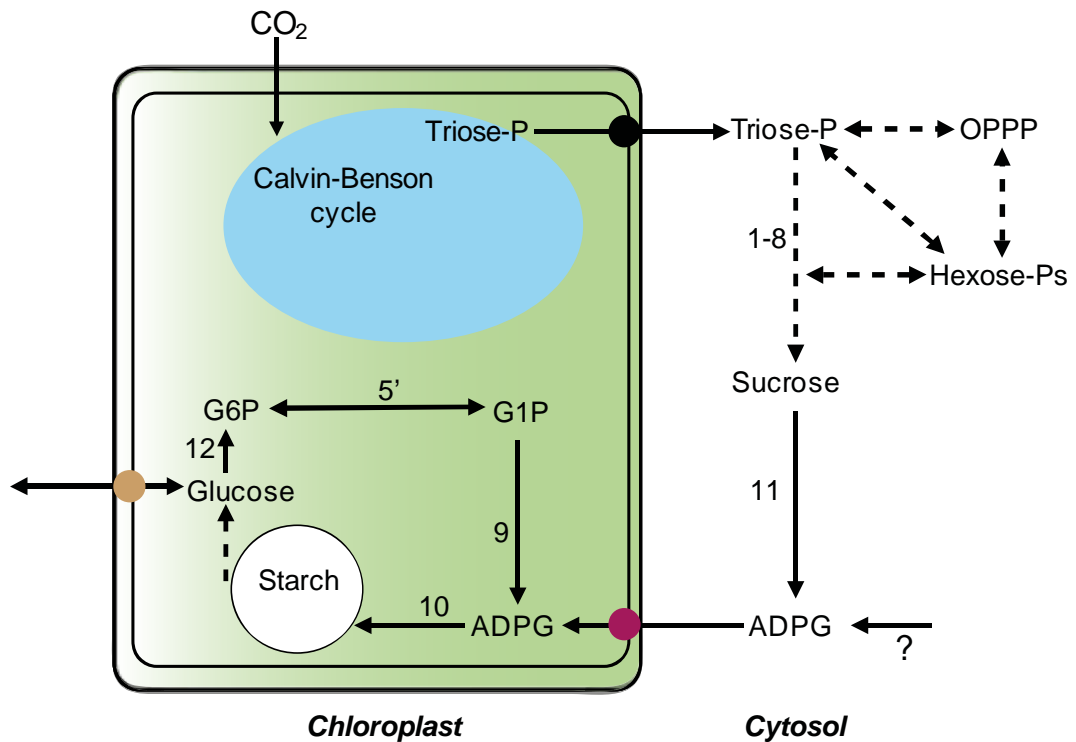


Figura 13: Modelo alternativo sugerido de la biosíntesis de almidón en el que (a) ADPG se produce en el citosol y luego se transporta al cloroplasto por la acción de un translocador de ADPG aún no identificado, y (b) pPGM y AGP juegan un papel importante en la formación de las unidades de glucosa derivadas de la degradación del almidón. Este punto de vista predice que la recuperación hacia la biosíntesis del almidón de las unidades de glucosa derivadas de la ruptura del almidón estaría bloqueada en mutantes *pPGM* y *AGP*, lo que resultaría en una disminución de la acumulación de almidón y un aumento del contenido de azúcares solubles. Las actividades enzimáticas 1-10 son las mismas que en la Figura. 3. Otras enzimas implicadas están numeradas de la siguiente manera: 11, SuSy; 12, hexoquinasa plastidial (Olsson et al. 2003, Giese et al. 2005).

8. Conclusiones

- 1) Las células del mesófilo de las hojas *pgil-2/sex1* acumulan más almidón que las células del mesófilo de las hojas *pgil-2*.
- 2) Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis de que el ciclo de Calvin-Benson no está conectado directamente mediante pPGI con los procesos de biosíntesis del almidón en los tejidos fotosintéticos.

9. Bibliografía

- Arnon, D.I. (1955) The chloroplast as a complete photosynthetic unit. *Science* **122**: 9-16.
- Ball, S., Guan, H., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., et al. (1996) From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**: 349-352.
- Ball, S., and Morell, M.K. (2003) From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 207-233.
- Bahaji, A., Li, J., Ovecka, M., Ezquer, I., Muñoz, F.J., Baroja-Fernández, E., et al. (2011) *Arabidopsis thaliana* mutants lacking ADP-glucose pyrophosphorylase accumulate starch and wild-type of ADP-glucose content: further evidence for the occurrence of important sources, other than ADP-glucose pyrophosphorylase, of ADP-glucose linked to leaf starch biosynthesis. *Plant Cell Physiol* **52**: 1162-1176.
- Bahaji, A., Li, J., Sánchez-López, A.M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Ovecka, M., et al. (2014a) Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields. *Biotechnol Adv* **32**: 87-106.
- Bahaji, A., Sánchez-López, A.M., Muñoz, F.J., Baroja-Fernández, E., Li, J., Almagro, G., et al. (2014b) Reevaluating the involvement of plastidic phosphoglucose isomerase in starch biosynthesis in mesophyll cells. *Plant Cell Physiol (Enviado)*.
- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Li, J., Bahaji, A., Almagro, G., Montero, M., et al. (2012) Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* Arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 321-326.
- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., and Pozueta-Romero, J. (2005) A response to Neuhaus et al. *Trends Plant Sci* **10**: 156-158.
- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Saikusa, T., Rodríguez-López, M., Akazawa, T., and Pozueta-Romero, J. (2003) Sucrose synthase catalyzes the *de novo* production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol* **44**: 500-509.
- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Zanduetta-Criado, A., Morán-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Alonso-Casajús, N., et al. (2004) Most of ADP-glucose linked to starch

- biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proc Nat Acad Sci USA* **101**: 13080-13085.
- Bowsher, C.G., Boulton, E.L., Rose, J., Nayagam, S., and Emes, M.J. (2002) Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *Plant J* **2**: 893-898.
- Bowsher, C.G., Lacey, A.E., Hanke, G.T., Clarkson, D.T., Saker, L.R., Stulen, I., et al. (2007) The effect of Glc6P uptake and its subsequent oxidation within pea root plastids on nitrite reduction and glutamate synthesis. *J Exp Bot* **58**: 1109-1118.
- Burrell, M.M. (2003) Starch: the need for improved quality and quantity - an overview. *J Exp Bot* **54**: 6-451.
- Caspar, T., Huber, S.C., and Somerville, C. (1985) Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol* **79**: 11-17.
- Delmer, D.P. (1970) The purification and properties of sucrose synthase from etiolated *Phaseolus aureus* seedlings. *J Biol Chem* **247**: 3822-3828.
- Dietz, K-J. (1985) A possible rate-limiting function of chloroplast hexosemonophosphate isomerase in starch synthesis of leaves. *Biochem Biophys Acta* **839**: 240-248.
- Fox, S.R., Hill, L.M., Rawsthorne, S., and Hills, M.J. (2000) Inhibition of the glucose-6-phosphate transporter in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis. *Biochem J* **352**: 525-532.
- Fox, T.C., and Geiger, D.R. (1984) Effects of decreased net carbon exchange on carbohydrate metabolism in sugar beet source leaves. *Plant Physiol* **76**: 763-768.
- Fu, H., Kim, S.Y., and Park, W.D. (1995) A potato *sus3* sucrose synthase gene contains a context-dependent 3' element and a leader intron with both positive and negative tissue-specific effects. *Plant Cell* **7**: 1395-1403.
- Giese, J.O., Herbers, K., Hoffmann, M., Klösgen, R.B., and Sonnewald, U. (2005) Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*. *FESB Lett* **579**: 827-831.
- Goldemberg, J. (2007) Ethanol for a sustainable energy future. *Science* **315**: 10-808.

- Heuer, B., Hansen, M.J., and Anderson, L.E. (1982) Light modulation of phosphofructokinase in pea leaf chloroplasts. *Plant Physiol.* **69**: 1404-1406.
- Hizukuri, T., and Takagi, T. (1984) Molecular weight and related properties of lily amylose determined by monitoring of elution from TSK-GEL PW high performance gel chromatography columns by the low-angle laser light scattering technique and precision differential refractometry. *J Biochem* **95**: 67-1459.
- Huber, S.C., and Hanson, K.R. (1992) Carbon partitioning and growth of a starchless mutant of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol* **99**: 1449-1454.
- Itoh, K., Ozaki, H., Okada, K., Hori, H., Takeda, Y., and Mitsui, T. (2003) Introduction of Wx transgene into rice wx mutants leads to both high- and low-amylose rice. *Plant Cell Physiol* **44**: 473-480.
- Jones, T.W.A., Gottlieb, L.D., and Pichersky, E. (1986) Reduced enzyme activity and starch level in an induced mutant of chloroplast phosphoglucose isomerase. *Plant Physiol* **81**: 367-371.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A. et al. (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **10**: 105-117.
- Kang, F., and Rawsthorne, S. (1996) Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta* **199**: 321-327.
- Kleczkowski, L.A. (1999) A phosphoglycerate to inorganic phosphate ratio is the major factor in controlling starch levels in chloroplasts via ADP-glucose pyrophosphorylase regulation. *FEBS Lett* **448**: 153-156.
- Kleczkowski, L.A. (2000) Is leaf ADP-glucose pyrophosphorylase an allosteric enzyme? *Biochim Biophys Acta* **1476**: 103-108.
- Kofler, H., Häusler, R.E., Schulz, B., Gröner, F., Flügge, U-I., and Weber, A. (2000) Molecular characterization of a new mutant allele of the plastid phosphoglucomutase in Arabidopsis, and complementation of the mutant with the wild-type cDNA. *Mol Gen Genet* **262**: 978-986.

- Kranz A.R., and Kirchheim B. (1987) Handling of Arabidopsis. Genetic resources in Arabidopsis, ed Kranz A.R. (Arabidopsis Information Service, Frankfurt, Germany), pp 4.1.1–4.2.7.
- Kruckeberg, A.L., Neuhaus, H.E., Feil, R., Gottlieb, L.D., and Stitt, M. (1989) Decreased activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*. *Biochem J* **261**: 457-467.
- Kunz, H.H., Häusler, R.E., Fettke, J., Herbst, K., Niewiadomski, P., Gierth, M., et al. (2010) The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in starch biosynthesis. *Plant Biol (Stuttg)* **12 Suppl 1**: 115-128.
- Lozovaya, V.V., Zabolina, O.A., and Widholm, J.M. (1996) Synthesis and turnover of cell-wall polysaccharides and starch in photosynthetic soybean suspension cultures. *Plant Physiol* **111**: 921-929.
- Muñoz, F.J., Baroja-Fernández, E., Morán-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Etxeberria, E., Alonso-Casajús, N. et al. (2005) Sucrose synthase controls the intracellular levels of ADPglucose linked to transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant Cell Physiol* **46**: 1366-1376.
- Mooney, B.P. (2009) The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics. *Biochem J* **418**: 32-219.
- Neuhaus, H.E., Häusler, R.E., and Sonnewald, U. (2005) No need to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves. *Trends Plant Sci* **10**: 154-156.
- Neuhaus, H.E., Kruckeberg, A.L., Feil, R., and Stitt, M. (1989) Reduced-activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*. *Planta* **178**: 110-122.
- Niewiadomski, P., Knappe, S., Geimer, S., Fischer, K., Schulz, B., Unte, U.S., et al. (2005) The Arabidopsis plastidial glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* **17**: 760-775.

- Olsson, T., Thelander, M., and Ronne, H. (2003) A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *J Biol Chem* **278**: 44439-44447.
- Pozueta-Romero, J., Ardila, F., and Akazawa, T. (1991) ADPglucose transport by adenylate translocator in chloroplasts is linked to starch biosynthesis. *Plant Physiol* **97**: 1565-1572.
- Rolletschek, H., Nguyen, T.H., Häusler, R.E., Rutten, T., Göbel, C., Feussner, I., et al. (2007) Antisense inhibition of the plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocator in *Vicia* seeds shifts cellular differentiation and promotes protein storage. *Plant J* **51**: 468-484.
- Schulze, W., Stitt, M., Schulze, E.D., Neuhaus, H.E., and Fichtner, K. (1991) A quantification of the significance of assimilatory starch for growth of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Plant Physiol* **95**: 890-895.
- Sharkey, T.D., and Vassey, T.L. (1988) Low oxygen inhibition of photosynthesis is caused by inhibition of starch synthesis. *Plant Physiol* **90**: 385-387.
- Scott, P., and Kruger, N.J. (1995) Influence of elevated fructose-2,6-bisphosphate levels on starch mobilization in transgenic tobacco leaves in the dark. *Plant Physiol* **108**: 1569-1577.
- Slattery, C.J., Kavakli I.H., and Okita, T.W. (2000) Engineering starch for increased quantity and quality. *Trens Plants Sci* **5**: 8-291.
- Stitt, M., and Heldt, H.W. (1981) Simultaneous synthesis and degradation of starch in spinach chloroplasts in the light. *Biochim Biophys Acta* **638**: 1-11.
- Stitt, M., and Zeeman, S.C. (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr. Opinion Plant Biol* **15**: 1-11.
- Streb, S., Egli, B., Eicke, S., and Zeeman, S.C. (2009) The debate on the pathway of starch synthesis: a closer look at low-starch mutants lacking plastidial phosphoglucomutase supports the chloroplast-localised pathway. *Plant Physiol* **151**: 1769-1772.
- Takeda, Y., and Hizukuri, S. (1986) Actions of *Aspergillus oryzae* alpha-amylase, potato phosphorylase, and rabbit muscle phosphorylase a and b on phosphorylated (1-4)-alpha-D-glucan. *Carbohydrate Res* **132**: 83-92.

- Tsai, H.L., Lue, W.L., Lu, K.J., Hsieh, M.H., Wang, S.M., and Chen, J. (2009) Starch synthesis in *Arabidopsis* is achieved by spatial cotranscription of core starch metabolism genes. *Plant Physiol.* 151: 1582-1595.
- Ventriglia, T., Kuhn, M.L., Ruiz, M.T., Ribeiro-Pedro, M., Valverde, F., Ballicora, M.A., et al. (2008) Two *Arabidopsis* ADP-glucose pyrophosphorylase large subunits (APL1 and APL2) are catalytic. *Plant Physiol* **148**: 65-76.
- Walters, R.G., Ibrahim, D.G., Horton, P., and Kruger, N.J. (2004) A mutant of *Arabidopsis* lacking the triose-phosphate/phosphate translocator reveals metabolic regulation of starch breakdown in the light. *Plant Physiol* **135**: 891-906.
- Wang, A-Y., Kao, M-H., Yang, W-H., Sayion, Y., Liu, L-F., Lee, P-D., and Su, J-C. (1999) Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes. *Plant Cell Physiol* **40** : 800-807.
- Weber, A., and Flügge, U-I. (2002) Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *J Exp Bot* **53** : 865-874.
- Yu, T-S., Lue, W-L., Wang, S-M., and Chen, J. (2000) Mutation of *Arabidopsis* plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiol* **123**: 319-325.
- Zhang, L., Häusler, R.E., Greiten, C., Hajirezaei, M-R., Haferkamp, I., Neuhaus, H.E., et al. (2008) Overriding the co-limiting import of carbon and energy into tuber amyloplasts increases the starch content and yield of transgenic potato plants. *Plant Biotechnol J* **6**: 453-464.