

**ÍNDICE**

1. RESUMEN	2
ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 Aspectos básicos sobre la bioquímica y el metabolismo del almidón	6
2.2 Estrategias empleadas para el incremento de almidón	8
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL Y MÉTODOS	13
4.1 Material vegetal utilizado en este trabajo	13
4.2 Condiciones de cultivo de las líneas transgénicas	13
4.3 Análisis por PCR de líneas transgénicas	14
4.4 Extracción de proteínas y preparación para el análisis por western blot	15
4.5 Electroforesis y transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa	15
4.6 Cuantificación de almidón en semillas de cebada transgénicas	16
4.7 Microscopía confocal	17
4.8 Cuantificación de biomasa y número de granos	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
5.1 Análisis por PCR	18
5.2 Análisis por western blot	20
5.3 Localización subcelular por microscopía confocal	23
5.4 Cuantificación de almidón	23
5.5 Caracterización del efecto de SSIV sobre la biomasa	26
5.6 Caracterización del efecto de SSIV sobre el peso de mil granos	29
6. BIBLIOGRAFÍA	34
7. ANEXO 1	37

## **1.-TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CEBADA CON SSIV Y ANÁLISIS DE SU EFECTO EN EL METABOLISMO DEL ALMIDÓN Y BIOMASA**

El almidón es el principal carbohidrato de reserva en plantas. Este metabolito es empleado por la planta para su crecimiento y desarrollo durante la ausencia de luz. Este valioso polisacárido es acumulado en órganos heterotróficos, tales como semillas de cereales, raíces de cassava y tubérculos de patata. El almidón representa la fuente más importante de carbohidratos en la dieta humana y posee muchas aplicaciones tanto comerciales como industriales (Delcour *et al.*, 2010). Se han llevado a cabo muchas investigaciones a través de la ingeniería genética con el fin de mejorar el rendimiento y calidad de almidón, respondiendo a la demanda del sector industrial.

Estudios recientes han demostrado que la almidón sintasa clase IV (starch synthase class IV, SSIV) de *Arabidopsis Thaliana* está envuelta en la iniciación de gránulos de almidón en hojas ya que el doble mutante en los genes SSIII y SSIV mostró un menor contenido de almidón las mismas (Szydlowski *et al.*, 2009). Más significativo resulta el hecho de que la sobreexpresión de At-SSIV en *Arabidopsis* induce la acumulación de almidón en hojas y aumenta el contenido de almidón en tubérculos de patata (Gámez-Arjona *et al.*, 2011).

Con el objeto de caracterizar el papel de SSIV en la producción de biomasa y almidón tanto en órganos autótrofos como en heterótrofos, se generarán líneas de cebada (Golden Promise *c.v.*) que sobre-expresan SSIV y SSIV fusionada a la proteína verde fluorescente (SSIV-GFP). La transformación genética de la cebada fue llevada a cabo siguiendo el método descrito por Hansel *et al.* (2004) mediante la cepa de *Agrobacterium Tumefaciens* AGL1, utilizando los vectores binarios, PBract214-AtSSIV y PBract214-AtSSIV-GFP.

Primeramente se seleccionarán líneas transgénicas de cebada mediante germinación en medio selectivo y análisis por PCR. Seguidamente se realizarán análisis por western blot para comprobar la expresión de SSIV y SSIV-GFP. Por último, se cuantificará el contenido en almidón y la biomasa en semillas y hojas de las líneas transgénicas de cebada seleccionadas.

## **1.-GENETIC ENGINEERING OF BARLEY BY STARCH SYNTHASE CLASS IV AND ANALYSIS OF ITS EFFECT ON STARCH METABOLISM AND BIOMASS**

Starch is the main storage carbohydrate in plants which is used to sustain growth and development during absence of light, this valuable polysaccharide is accumulated in heterotrophic organs and many storage organs such as seeds of cereal crops, roots of cassava and potato tubers which represents the most important carbohydrate in human diet and has a number of commercial and industrial applications (Delcour *et al.*, 2010). Many researches has been carried out using breeding and genetic engineering to improve yields, quality of starch and produce starch with novel feature in plant, including cereal grains (wheat, rice, corn, oats, barley as well as tubers such as potato) that fits industrial requirements.

Recent studies have shown that Arabidopsis starch synthase class IV (SSIV) is involved in the initiation of starch granule in Arabidopsis leaves and Arabidopsis double mutant SSIII and SSIV display a decreased starch content in leaves (Szydlowski *et al.*, 2009). Even more, the over expression of Arabidopsis SSIV induce the accumulation of starch in chloroplast leaves of Arabidopsis and leads to increased starch content in potato tubers (Gámez-Arjona *et al.*, 2011).

In this work we will produce barley lines (Golden promise *c.v.*) overexpressing SSIV and SSIV fused with green fluorescent protein (SSIV-GFP) using *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 strain, with the aim to characterize the effect of SSIV on starch accumulation and biomass in both autotrophic and heterotrophic organs.

First we will select transgenic barley lines by selective germination and using PCR analysis, followed by western blot analysis in order to achieve SSIV and SSIV-GFP gene expression. Finally starch content and biomass in seeds and leaves from the different transgenic barley lines selected will be measured.

## 2.-INTRODUCCIÓN

El almidón es el principal carbohidrato de reserva en planta, siendo su principal fuente de carbono y energía. Además del almidón, los productos de su hidrólisis constituyen la mayor parte de los carbohidratos digeribles de la dieta habitual, llegando a representar el 50% de las calorías de la dieta del ser humano (Martin y Smith, 1995).

Los almidones comerciales se obtienen a partir de las semillas de cereales, particularmente de maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum spp.*), arroz (*Oryza sativa*), y de algunas tubérculos y raíces, particularmente de patata (*Solanum tuberosum*), batata (*Ipomoea batatas*) y mandioca (*Manihot esculenta*). El almidón posee un número enorme de posibles aplicaciones industriales.

En la industria agroalimentaria se emplea como espesante, estabilizante o gelificante en infinidad de alimentos tales como pan, salsas, repostería... Dentro del sector agronómico, el almidón proveniente del grano de cereales, supone la base de la dieta del ganado, dado que aporta un elevado contenido nutricional (**tabla 1**).

**Tabla 1.** Composición grano cebada

<b>Composición de 100g de cebada</b>	
Proteínas	10.5 g
Grasas	2.1 g
Carbohidratos	69.3 g
Fibra	4 g
Ácido Fólico	50 mg
Hierro	6 mg
Calcio	50 mg

Como se observa en la **tabla 1** los granos de cebada presentan un elevado contenido en carbohidratos y proteína, siendo actualmente muy utilizados en la elaboración de piensos.

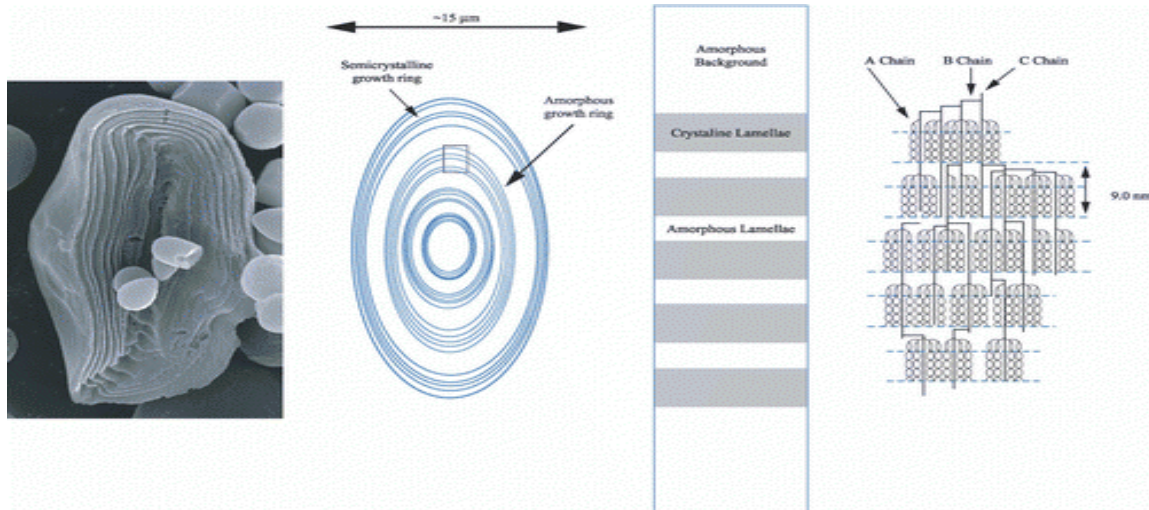
Recientemente la industria farmacéutica ha mostrado mucho interés en la producción de proteínas recombinantes de interés en plantas con vistas a almacenarlas en semillas, junto al almidón. Entre éstas proteínas de interés se encontrarían anticuerpos secundarios, proteínas terapéuticas y vacunas comestibles (Giddings *et al.*, 2000; Daniell *et al.*, 2001).

En la industria cosmética el almidón es empleado como espolvorante en el uso de maquillajes. Actualmente está sustituyendo al uso de talco en diferentes formulaciones como diversos sprays y desodorantes corporales, debido a las propiedades no irritantes que posee.

Además de las industrias anteriormente mencionadas, existe un importante sector energético, como es el de los biocombustibles, muy interesado en el almidón de diferentes cultivos, para la producción de bioetanol. La industria de biocombustibles representa un mercado emergente y que toma cada vez más fuerza ante la escasez y alto precio del petróleo (Smith, 2008).

## 2.1.-Aspectos básicos sobre la bioquímica y el metabolismo del almidón.

El almidón es un homopolímero de moléculas de glucosa agrupadas en cadenas de amilosa y amilopectina que, a su vez, se organizan para dar lugar a estructuras semicristalinas llamadas gránulos (**Figura 1**).

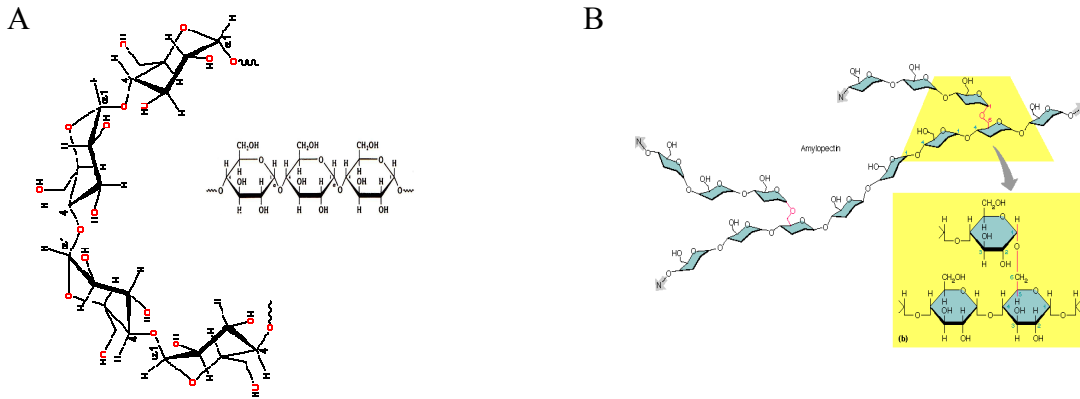


**Figura 1:** Vista esquemática del orden jerárquico dentro de los gránulos de almidón de maíz. Los gránulos de almidón (que varían en tamaño de 1 micra a 100 micras, dependiendo de la especie) contienen el orden interno en la forma de un hilo central rodeado de almidón depositado en anillos concéntricos de crecimiento. Adaptación de Ball y Morell, (2003).

### 2.1.1.- Amilosa y amilopectina

Las cadenas de amilosa (**Figura 2A**) están constituidas por moléculas de glucosa unidas covalentemente mediante enlaces  $\alpha$ -(1-4) con un 0,1% de ramificaciones surgidas a partir de enlaces  $\alpha$ -1,6 (Hizukuri y Takagi, 1984; Takeda y Hizukuri, 1986; Ball *et al.*, 1996; Ball y Morell, 2003). Su tamaño molecular está comprendido entre los  $10^5$  y  $10^6$  Da. La amilopectina está compuesta por moléculas de glucosa unidas entre sí a través de enlaces  $\alpha$ -1,4 pero presenta ramificaciones cada 24-30 unidades de

glucosa, mediante enlaces  $\alpha$ -(1-6). El tamaño molecular de la amilopectina (**Figura 2B**) oscila entre los  $10^7$  y los  $10^9$  Da.



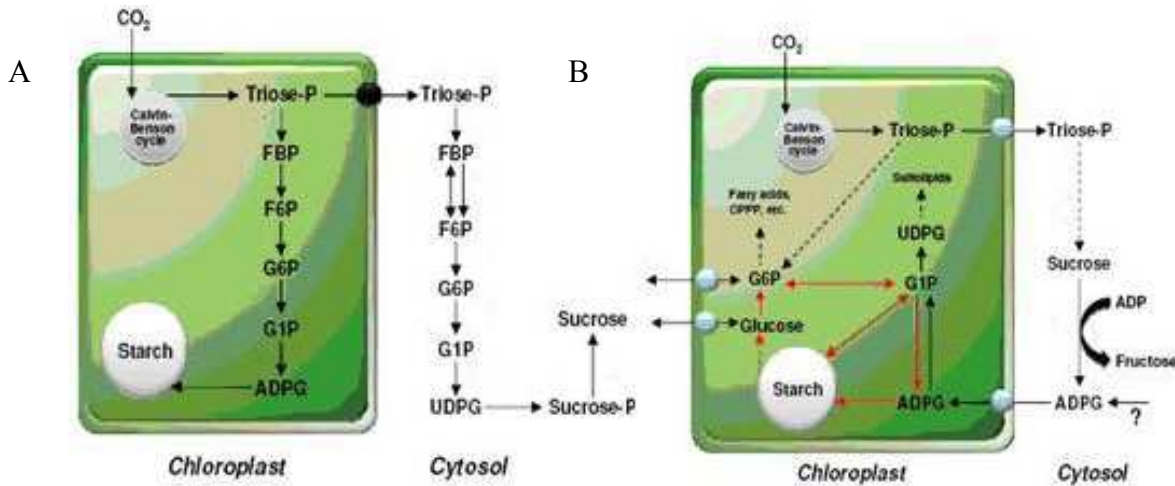
**Figura 2.** Estructura de los homopolímeros que componen el almidón: (A) amilosa y (B) amilopectina.

Tanto el balance amilosa/amilopectina, como la forma y el tamaño de los gránulos de almidón varían según especies de plantas. Estos parámetros son fundamentales para las aplicaciones industriales del almidón (Itoh *et al.*, 2003).

### 2.1.2.- Metabolismo del almidón

El conocimiento básico sobre la biosíntesis del almidón de las plantas avanzó sustancialmente tras el descubrimiento del ADP-glucosa (ADPG) (Murata *et al.*, 1963; Recondo y Leloir, 1963). Este azúcar-nucleótido actúa como donador de glucosa en la reacción de biosíntesis del almidón catalizada por la almidón sintasa (SS). Desde entonces, se ha aceptado de manera generalizada que la ADPG pirofosforilasa (AGP) (EC 2.7.7.27) es la única enzima productora de ADPG y, por lo tanto, actúa como paso enzimático limitante del proceso de biosíntesis del almidón en plantas (Preiss, 1988; Müller-Röber *et al.*, 1992; Okita, 1992; Neuhaus *et al.*, 2005; Streb *et al.*, 2009) (**Figura 3A**). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la enzima citosólica sacarosa sintasa (SuSy) (EC 2.4.1.13) es capaz de sintetizar ADPG a partir de

sacarosa y ADP, tanto en tejidos autotróficos como en tejidos heterotróficos de patata (Baroja-Fernández *et al.*, 2003, 2004, 2009; Muñoz *et al.*, 2005) (**Figura 3B**).



**Figura 3.** Modelos de biosíntesis del almidón en órganos heterotróficos de plantas. (A) Modelo clásico según el cual la AGP es el único enzima que produce ADPG. (B) Modelo alternativo según el cual tanto la AGP como SuSy producen ADPG. Adaptación de Baroja-Fernández *et al.* 2001.

## 2.2.-Estrategias empleadas para el incremento de almidón

Muchas investigaciones biotecnológicas se han centrado en el aumento de la producción de almidón en órganos heterotróficos de diferentes especies de plantas. Unos se han basado en el incremento en los niveles de ADP-glucosa o de ATP disponible como estrategia para la biosíntesis de almidón. Esta estrategia consistía en incrementar la actividad de la AGPasa. Además la sobre-expresión de GlgC-16 (forma mutante de la AGPasa de *Escherichia Coli*) en patata mostró un aumento en la producción de almidón del 35% con respecto a plantas control (Stark *et al.*, 1992). Sin embargo el aumento de la actividad AGPasa no siempre conduce al aumento de almidón, ya que Sweetlove *et al.* (1996) alcanzaron en patata elevados niveles de AGPasa, pero el contenido en almidón era comparable al de las plantas control. Smidansky *et al.* (2003) e Ihemere *et al.* (2006) obtuvieron un incremento de biomasa como resultado de incrementar la actividad AGPasa en órganos heterótrofos de cassava y arroz, pero sin conseguir incremento del contenido en almidón (Smidansky *et al.*, 2003; Ihemere *et al.*,



2006). Recientemente, se ha demostrado que la sobreexpresión de los genes Brittle2 (BT2) o Shrunken2 (SH2), que codifican para la subunidad menor y mayor de la AGPasa de maíz respectivamente, tiene como resultado el aumento del tamaño de la semilla y de su contenido en almidón en plantas de maíz (Li *et al.*, 2011).

Otra exitosa estrategia para aumentar los niveles de ADPG consistió en incrementar la actividad de la enzima Sacarosa Sintasa (Susy). Para ello se transformaron plantas de patata introduciendo el gen Susy de patata (Sus4). Los tubérculos de plantas de patata sobre-expresando SuS4 mostraron un sustancial aumento del contenido en ADPG y almidón al ser comparados con los tubérculos control de planta de patata, tanto en condiciones de invernadero como en campo abierto (Baroja-Fernández *et al.*, 2009).

### **2.2.1. Enzimas involucradas en la biosíntesis de almidón**

Existen numerosas enzimas involucradas en la biosíntesis de almidón. Además de las ya mencionadas AGPasa y Susy, se conoce que tanto las enzimas ramificantes (Starch Branching Enzymes: SBE), como las enzimas desramificantes (Starch Debranching Enzymes: SDE) desempeñan un importante papel en la síntesis de almidón (Ball y Morell, 2003; Ohdan *et al.*, 2005). También existen investigaciones que sugieren que las enzimas DPE-1 (Disproportionating Enzyme-1) y PHO (almidón fosforilasa, Starch Phosphorilase: SP) a las que se les atribuía un papel en la degradación de almidón, tienen un rol en la síntesis de almidón, aunque se desconocen aún los mecanismos concretos (Colleoni *et al.*, 1999; Ball y Morell, 2003; Tetlow *et al.*, 2006). Por último, las enzimas almidón sintasas (SSs), a las que se les atribuyen diferentes roles en la biosíntesis de los gránulos de almidón, serán abordadas en mayor profundidad.

### 2.2.1.1.- Familia Almidón Sintasa

Se conocen cinco clases diferentes de enzimas de la familia almidón sintasa (SS) en plantas (EC 2.4.1.21): Una Granule Bound SS (GBSS1) que se localiza unida al gránulo de almidón y es responsable de la síntesis de la cadena lineal de amilosa (Maddelein *et al.*, 1994), y cuatro SS solubles; SSI, SSII, SSIII y SSIV. Se postula que SSI, SSII y SSIII están envueltas en la elongación de las cadenas de amilopectina, siendo SSI la responsable de la elongación de cadenas cortas, SSII de las intermedias y SSIII junto con GBSSI de las cadenas largas (Zeeman *et al.*, 2007). SSIII y SSIV se encuentran exclusivamente en el estoma, mientras SSI y SSII se encuentran distribuidos entre estoma y gránulo (Roldán *et al.*, 2007). Estas enzimas se encuentran ampliamente conservadas en especies vegetales, sugiriendo que sus funciones específicas han ido seleccionándose a lo largo del proceso evolutivo (Ral *et al.*, 2004). Diferentes análisis mutacionales corroboran esta hipótesis, como el hecho de que la delección del gen que codifica para una enzima SS concreta resulta en la alteración de una o más características del almidón; tales como la estructura de la amilopectina, la proporción amilosa/amilopectina, morfología o número de gránulos (Craig *et al.*, 1998; Delvallé *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005 2008; Roldán *et al.*, 2007). Mientras se ha mantenido que cada isoforma de SS posee un único rol en la biosíntesis de almidón, estudios en *Arabidopsis* sobre líneas transgénicas y mutantes en esta familia de genes, sugieren que puede existir solapamiento de funciones entre las diferentes isoformas (Gámez-Arjona *et al.*, 2011; Roldán *et al.*, 2007; Lloyd *et al.*, 1999).

Se ha propuesto que los enzimas de la familia SS, además de tener cada uno de ellos un rol en la biosíntesis de almidón, interactúan entre ellas, jugando cada una de ellas un importante papel en la estructura de los gránulos de almidón (Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008; Tetlow *et al.*, 2008).

### 2.2.1.2.-ALMIDÓN SINTASA IV

Poco se conoce de los procesos bioquímicos que llevan a la iniciación de la formación de gránulos de almidón. Se ha propuesto que las enzimas desramificantes (esencialmente isoamilasas) juegan un papel importante controlando el número de gránulos de almidón en el endospermo de cebada (Burton *et al.*, 2002) y en tubérculos de patata (Bustos *et al.*, 2004). Sin embargo, actualmente se postula que las enzimas desramificantes no están directamente envueltas en la iniciación de la síntesis de los gránulos de almidón (Delatte *et al.*, 2005; Wattedled *et al.*, 2005,2008; Streb *et al.*, 2009)

La deleción del gen SSIV, en *Arabidopsis Thaliana* provoca la formación de un único gránulo de almidón en la mayoría de los casos. Sin embargo, la estructura molecular de este gránulo de almidón no se ve alterada al ser comparada con el acumulado por una variedad silvestre, sugiriendo, tal y como anteriormente se citaba, que SSIV podría desempeñar un papel importante en el proceso de iniciación de los gránulos de almidón (Szydlowski *et al.*, 2009).

Recientemente se ha demostrado que la sobre-expresión de SSIV, tal y como algunos investigadores apuntaban, induce un incremento de los niveles de almidón, tanto transitorio como de reserva, logrando un aumento del 30-40% en hojas de *Arabidopsis Thaliana* y un aumento del 15-45% en tubérculos de patata, tanto en condiciones de invernadero como en campo abierto. Estos resultados apuntan a que el producto del gen SSIV es una de las enzimas que regulan los niveles de almidón acumulado en los plastidios (Gámez-Arjona *et al.*, 2011).

Debido a que se ha demostrado que la sobre-expresión de AtSSIV conduce al aumento de los niveles de almidón en tubérculos de plantas de patata (*Solanum tuberosum*) y en hojas de *Arabidopsis thaliana* (Gámez-Arjona *et al.*, 2011), en este trabajo se analizará el efecto de AtSSIV sobre los niveles de almidón en plantas de cebada (*Golden promise*).

### **3.-OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Estudio del papel de la almidón sintasa IV de *Arabidopsis thaliana* en la biosíntesis de almidón en cebada.

#### **Objetivos concretos**

- Expresión de SSIV en plantas de cebada.
- Estudio de la localización subcelular de SSIV-GFP en cebada.
- Cuantificación del contenido de almidón en plantas de cebada que expresan At-SSIV y At-SSIV-GFP.
- Análisis de la producción de biomasa vegetal de plantas de cebada que expresan At-SSIV y At-SSIV-GFP.

## **4.-MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1.-Material vegetal utilizado en este trabajo**

Este trabajo se llevó a cabo utilizando 3 tipos de semillas de cebada transgénicas; semillas que expresan GFP, At-SSIV y AtSSIV-GFP. La transformación genética fue llevada a cabo a partir de embriones inmaduros de cebada (*Golden Promise c.v*) mediante el uso la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, utilizando los vectores binarios PBract214-GFP, PBract214-AtSSIV y PBract214-AtSSIV-GFP usando el método de transformación descrito por Hansel *et al.* (2007). Las líneas que sobre-expresan GFP se emplearon como líneas control.

Se seleccionaron 8 líneas transgénicas independientes de la generación F<sub>1</sub> mediante análisis por PCR, 4 de ellas albergando el gen SSIV y otras 4 el gen SSIV fusionado a GFP. Sobre ellas se llevaron a cabo análisis por western blot y cuantificación de almidón. Las semillas de cada línea F<sub>1</sub> de plantas de cebada transgénicas seleccionadas, fueron germinadas en medio selectivo y cultivadas bajo condiciones de invernadero, obteniendo así ocho líneas F<sub>2</sub> de plantas transgénicas, sobre las cuales se llevaría a cabo análisis de la biomasa y PMG.

### **4.2.-Condiciones de cultivo de las líneas transgenicas**

El material de partida fueron semillas pertenecientes a la generación (F<sub>1</sub>) de diferentes líneas de plantas de cebada transformadas. Fueron germinadas en medio selectivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con una concentración de 50 mg/l de higromicina. Las semillas que germinaron en medio selectivo se utilizaron para el análisis por PCR y western blot, seguidamente se plantaron en macetas de cinco litros de forma individual y fueron crecidas en invernadero, siguiendo un régimen controlado de temperatura de 22°C día/18°C noche. Estas plantas fueron destinadas al análisis de biomasa, rendimiento y cuantificación de almidón

### 4.3.-Análisis por PCR de líneas transgénicas

La PCR se realizó sobre muestras genómicas de material vegetal de diferentes líneas de plantas de cebada transgénica. Concretamente se utilizaron hojas, sobre las cuales se llevó a cabo una extracción genómica con el kit de extracción de Sigma. Con el fin de comprobar que las semillas de cebadas transgénicas germinadas en medio selectivo han integrado las secuencias AtSSIV y AtSSIV-GFP conferidas mediante la transformación genética anteriormente descrita, se realizaron análisis por PCR dirigidas a amplificar diferentes fragmentos de la secuencia que codifica para AtSSIV y AtSSIV-GFP.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue llevada a cabo en reacciones de 20  $\mu$ l que contiene 4  $\mu$ l de la muestra proveniente de la extracción genómica y 16  $\mu$ l de una mezcla que proporcionará unas concentraciones finales de 10mM Tris pH 8.2, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs y 1.000 unidades/ml de Taq DNA polimerasa. Tres parejas de cebadores (10  $\mu$ M) fueron diseñadas, tal y como muestra la **tabla 2**. Las condiciones de PCR comenzaron con un ciclo de 5min a 94°C, seguido de 30 ciclos consecutivos de 45seg a 94°C, 45seg a 58°C y 1min a 72°C. Tras completar los 30 ciclos, se finaliza con 10min a 72°C. Las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0,5mg/ml). La electroforesis se llevó a cabo a 100V durante 30min hasta la resolución deseada. Los geles fueron fotografiados mediante el sistema Gel Doc.

**Tabla 2.** Relación de cebadores empleados en las diferentes reacciones de PCR

<b>Cebadores utilizados</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Fragmento amplificado (pb)</b>
GFP 5'	TGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT	417
GFP 3'	TTGTGCCCCAGGATGTTGCCGT	
AtSSIV-2 5'	CAAGATTAGTACCACAGAAAGG	706
GFP-2 3'	CCGGACACGCTGAACTTGTG	
AtSSIV 5'	CAGTTATAGTGTTACAACAGAAC	881
AtSSIV 3'	GCCGGACTGAAGAAGCAACTCTAG	

#### **4.4.-Extracción de proteínas y preparación para el análisis por western blot**

Tras la germinación en oscuridad de semillas de cebada que sobre-expresan AtSSIV y AtSSIV-GFP en medio selectivo suplementado con higromicina 50 mg/l, durante 72h, las plántulas transgénicas de cebada fueron molidas en un mortero con Nitrógeno líquido hasta la obtención de polvo. 100mg de polvo se resuspendieron en 300µl de buffer de extracción (50 mM HEPES, 2 mM EDTA, 2 mM DTT) y se incubaron 30min en hielo para favorecer la extracción de proteínas. Posteriormente se centrifugaron durante 15 min. a 4°C y a 14.000rpm. El sobrenadante fue empleado para cuantificar proteínas por el método de Bradford (1976). 70 µg de proteína suplementados con el buffer de carga ( $\beta$ -mercaptoetanol) fueron hervidas durante 2 minutos a 100°C antes de ser cargadas en el gel de electroforesis.

#### **4.5.-Electroforesis y transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa**

Tras cargar 70µg de proteína por muestra sobre el gel de poliacrilamida al 10%, se procedió a la electroforesis desnaturalizante en un gel de poliacrilamida según el método descrito por Laemmli, (1970). Tras finalizar la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa que permaneció durante 60 min en solución de bloqueo (TBS 1X, 5% leche en polvo) y seguidamente fue lavada 4 veces por periodos de 5 min con solución de lavado (TBS 1X, 5% leche en polvo y Tween 0.001%). La membrana se incubó durante 90min con el anticuerpo primario anti-SSIV, diseñado y empleado en la investigación de Roldán *et al.* (2007). Concretamente la zona antigénica que reconoce el anticuerpo primario es un fragmento que pertenece a la región amino-terminal de la proteína AtSSIV(Aa:236-414) que no presentaba homología con otras SSs presentes en *Arabidopsis*. Transcurridos 90 min, se le realizaron 4 lavados para finalmente ser incubado con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Sigma). La visualización de la banda correspondiente a SSIV o SSIV-GFP tuvo lugar una vez incubada la membrana con la solución de revelado (1 M MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris (pH 9,5), 1,5% BCIP, 0,3%

NBT). Tras la aparición de las bandas, la reacción se detuvo lavando la membrana con agua destilada.

Como control positivo se emplearon extractos proteicos de tubérculos de plantas de patata que sobre-expresa la enzima AtSSIV. Concretamente, pertenecientes a la línea SSIV-7 de Gámez-Arjona *et al.* (2011).

#### **4.6.-Cuantificación de almidón en semillas de cebada transgénicas**

Para la cuantificación del contenido en almidón de las semillas de cebada, 150 mg de polvo obtenido tras la molienda de las semillas de cebada transgénicas fueron resuspendidos en 1ml de etanol 100 % hasta su homogenización. Tras ello se añadió 1ml de etanol 80 % y se resuspendió nuevamente hasta conseguir una mezcla homogénea. Se mantuvo 1 hora a 80°C en termobloque, con el objetivo de extraer los azúcares solubles. A continuación las muestras se centrifugaron durante 20 min a 4000 rpm y a 4°C, desechando el sobrenadante y dejando secar los pellets durante 24h a temperatura ambiente (20°C). El pellet de cada muestra fue resuspendido en 20ml de agua destilada estéril y homogenizado mediante un homogeneizador "*UltraTurrax*". 1ml del extracto homogéneo fue autoclavado durante 60 min a 130°C, tiempo tras el cual se realiza la digestión de la amiloglucosidasa mediante la adición de 75 µl de agua destilada y 25 µl de amiloglucosidasa (en buffer citrato del kit de almidón de Sigma) sobre 100 µl de muestra. Otros 100 µl de muestra, sobre los que se adicionaron 100 µl de agua destilada estéril fueron utilizados como blanco (control). La enzima actúa sobre los enlaces  $\alpha$ 1-4 y  $\alpha$ 1-6 del almidón liberando unidades de glucosa al medio. Tras ser incubada la mezcla en agitación (1000 rpm) durante 60 min a 60°C en un termobloque, se centrifugó a 16.400 rpm durante 20 min a 4°C. Una alícuota de esta solución se utilizó para ser cuantificada en el espectrofotómetro a 340 nm: Sobre 10 µl del sobrenadante diluido 50 veces se adicionan 290 µl de solución (HEPES 1M pH7, EDTA 0.5M,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1M, KCl 1.5M, ATP 0.1M, NAD 40Mm, Hexokinasa y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Sigma)). Se midió el aumento de absorbancia periódicamente hasta alcanzar los valores máximos. Se realizaron un mínimo de cuatro lecturas.



#### **4.7.-Microscopía confocal**

La localización subcelular de SSIV-GFP se realizó utilizando un microscopio confocal D-Eclipse C1 (NIKON, Japón) equipado con un láser de excitación estándar modelo Ar 488, un filtro BA515/30 para la emisión en verde, un filtro BA650LP para la emisión en rojo y un detector de transmitancia.

#### **4.8.-Cuantificación de biomasa y número de granos**

Para la cuantificación de la biomasa seca de las plantas, se cosechó la parte aérea de todas las plantas y se secó en una estufa a 70°C durante 72 horas. Transcurrido este tiempo se separaron las espigas de los tallos. Se procedió al cálculo del peso seco por planta de las diferentes líneas de plantas de cebada que expresan At-SSIV y At-SSIV-GFP.

Para la determinación del peso de mil granos (PMG), se contaron las semillas producidas por cada una de las ocho líneas de plantas de cebada, seguidamente se pesaron y se calculó el peso de mil granos.

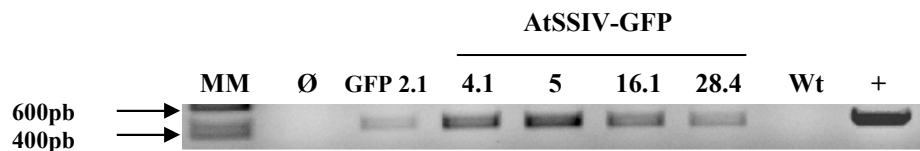
## 5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1.-Análisis por PCR

A través de un screening realizado sobre aproximadamente 60 líneas transgénicas de cebada que expresan At-SSIV y At-SSIV-GFP mediante análisis por PCR, fueron seleccionadas 8 líneas (4 de ellas expresan At-SSIV y 4 At-SSIV-GFP) para el análisis de la expresión de proteínas por western blot. Los análisis por PCR, tal y como a continuación se muestra, revelaron que las líneas seleccionadas habían integrado los transgenes.

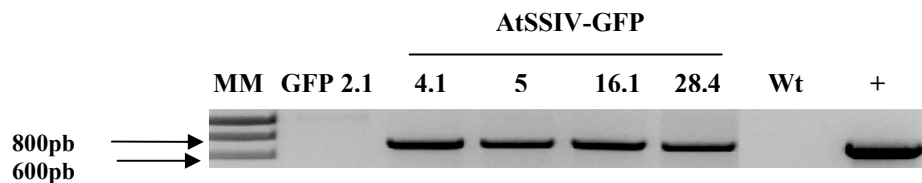
#### 5.1.1-Análisis por PCR de las líneas transgénicas de cebada que sobre-expresan SSIV-GFP

La primera pareja de cebadores, GFP 5' y GFP 3' (**Tabla 2**), fue diseñada para amplificar una región de 417 pares de bases pertenecientes a un fragmento de la secuencia que codifica para GFP. Las cuatro líneas F1 de plantas de cebada transgénicas que albergan la construcción SSIV-GFP mostraron una banda de aproximadamente 417pb que corresponde al tamaño esperado. Esta banda también está presente en la línea de cebada que expresa GFP (**Figura 4**, línea 3), pero no está presente en el control negativo (cebada silvestre).



**Figura 4.** Producto de PCR, muestra la amplificación de una región de 417pb de la secuencia de GFP en líneas transgénicas de cebada. Como control positivo se utilizó el plásmido SSIV-GFP, que muestra una banda del mismo tamaño que las líneas transgénicas de cebada.

La figura 5 muestra el producto de amplificación de la secuencia entre SSIV y GFP en líneas transgénicas de cebada. Los cebadores At-SSIV 2-5' y GFP 2-3' (**Tabla 2**) fueron diseñados para unirse a un fragmento del final de la secuencia perteneciente a SSIV y a un fragmento del inicio de la secuencia de GFP, resultando así el producto de amplificación de 706pb (**Tabla 2**).

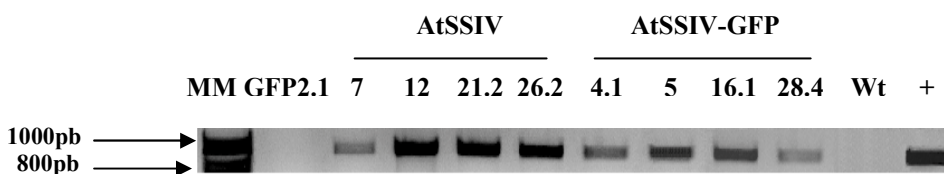


**Figura 5.** Producto de PCR utilizando cebadores para amplificar una región de 706 pb de la secuencia de unión entre SSIV y GFP en líneas transgénicas de cebada. Como control positivo se utilizó el plásmido SSIV-GFP como molde, que muestra una banda del mismo tamaño que las líneas transgénicas de cebada.

Aquí vemos (**Figura 5**) la amplificación de una banda de 706pb que está presente en las cuatro líneas transgénicas de cebada (líneas 3-6). Sin embargo esta banda no está presente ni en la línea GFP 2.1, ni en el control negativo (Wt).

### 5.1.2.-Análisis por PCR de las líneas transgénicas de cebada que sobre-expresan SSIV y SSIV-GFP

La figura 6 muestra la amplificación de un fragmento de aproximadamente 880 pb. En esta reacción de PCR se utilizaron los cebadores At-SSIV 5' y At-SSIV 3' (**Tabla 2**) y como molde se empleó ADN genómico, tanto de plantas de cebada que expresan SSIV como SSIV-GFP.



**Figura 6.** Producto de PCR utilizando cebadores para amplificar una región de 881pb de la secuencia de SSIV en líneas transgénicas de cebada. Como control positivo se utilizó el plásmido SSIV-GFP, que muestra una banda del mismo tamaño que las líneas transgénicas de cebada.

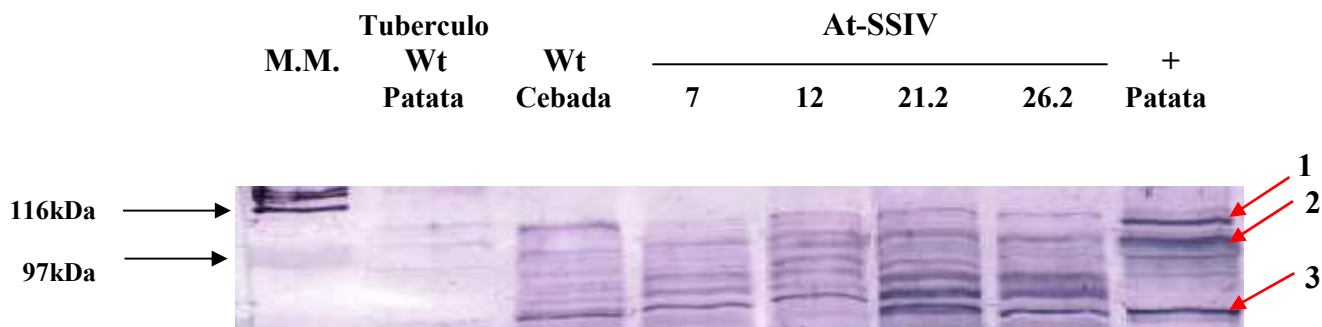
Las ocho líneas de cebada que expresan SSIV y SSIV-GFP mostraron una banda de 880pb aproximadamente, parecida a la amplificada en el positivo. En cambio, las líneas GFP 2.1 y Wt no mostraron ninguna banda.

Las líneas de cebada, tanto las que expresan SSIV como SSIV-GFP, mostraron la integración de los genes SSIV y SSIV-GFP en el ADN genómico. Las líneas expresando SSIV-GFP demostraron que GFP se encuentra unida a SSIV.

## **5.2.-Análisis de las plantas de cebada que expresan AtSSIV y AtSSIV-GFP por western blot**

Con el objetivo de confirmar que las líneas de cebada transgénica seleccionadas expresan la proteína de interés, se realizaron análisis por western blot utilizando un anticuerpo primario policlonal que reacciona con AtSSIV (ver Material y Métodos). Antes de interpretar los resultados obtenidos mediante western blot, hay que tener en cuenta que el anticuerpo primario utilizado en el presente trabajo, carece de alta especificidad, ya que, tal y como se muestra en la **figura 7**, son muchas las bandas (proteínas) reconocidas por el anticuerpo en cada muestra, incluso en la muestra de cebada silvestre (**Figuras 7 y 8A**).

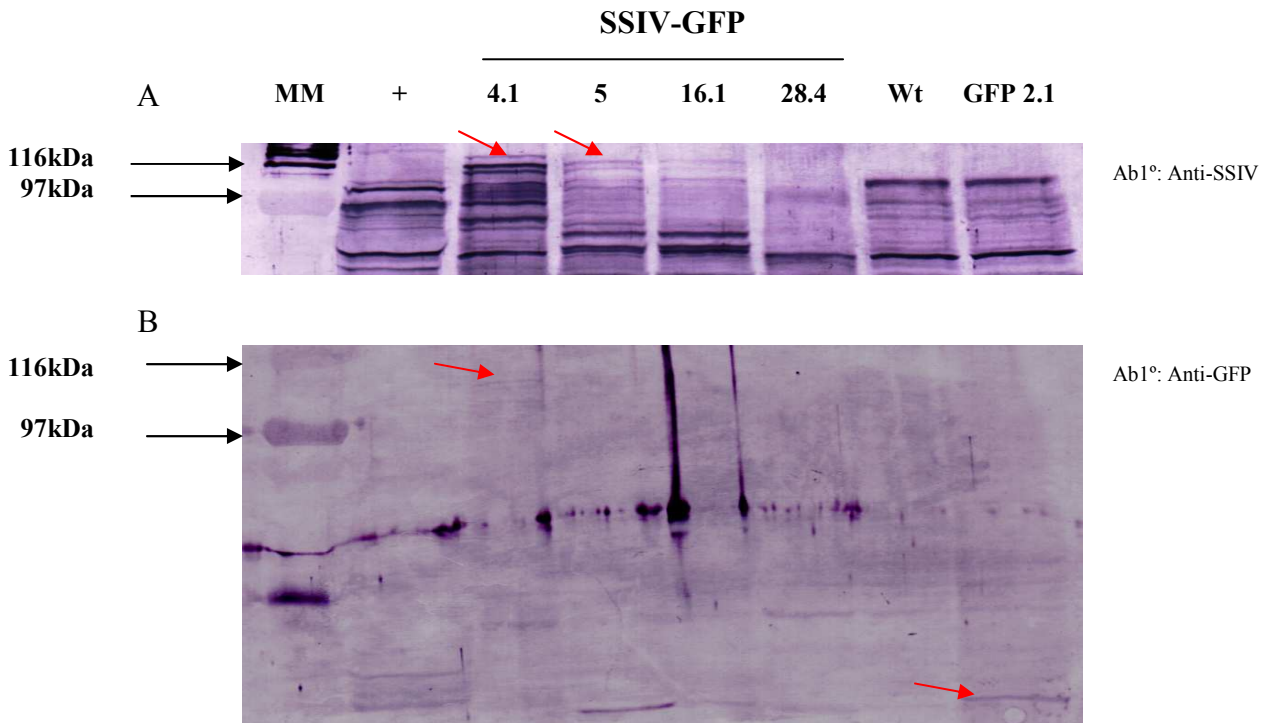
SSIV de *Arabidopsis thaliana* presenta un tamaño aproximado de 112 kDa, por lo que se espera una banda de aproximadamente este tamaño. Sin embargo, y tal y como muestran los resultados de los análisis por western blot en tubérculos de patata sobreexpresando At-SSIV expuestos por Gámez-Arjona *et al.* (2011), la esperada banda de 112kDa aparece con dos bandas de menor tamaño claramente reconocidas por el anticuerpo anti-SSIV. La presencia de estas bandas se asocia a modificaciones post-traduccionales de SSIV (Gámez-Arjona *et al.*, 2011).



**Figura 7.** Fotografía de membrana de nitrocelulosa ilustrando las proteínas de diferentes líneas transgénicas de cebada

El análisis de los western blot realizados sobre las líneas transgénicas de cebada no mostraron una correlación clara con el patrón de bandas presentes en los tubérculos de patata que sobre-expresan At-SSIV empleados como control positivo. Las líneas 21.2 y 26.2 muestran unas bandas más intensas que las bandas presentes en la cebada silvestre. Por lo tanto, se puede deducir por una parte que las líneas transgénicas de cebada expresan SSIV y muestran un patrón de bandas diferente a los de las plantas transgénicas de patata. Por otra parte y dado que el anticuerpo primario anti-SSIV es inespecífico y presenta poca afinidad a la proteína SSIV, ya que reconoce muchas otras proteínas, incluso en la cebada silvestre empleada como control negativo. Puede que las bandas que presentan las líneas 21.2 y 26.2 sean inespecíficas, no correspondiendo a la de la proteína At-SSIV.

Debido a que los análisis realizados mediante western blot sobre líneas que expresan At-SSIV arrojaron unos resultados inconcluyentes, se procedió a realizar el análisis sobre las líneas que sobre-expresan el gen AtSSIV fusionado a GFP (**Figura 8**). Para ello, se emplearon dos anticuerpos primarios diferentes (anti-SSIV y anti-GFP). Como en el anterior caso, uno de ellos reconocerá la enzima AtSSIV, aunque con una baja especificidad debido a que no se trata de un anticuerpo muy purificado y, el otro, será un anticuerpo específico que reconoce la proteína GFP.



**Figura 8.** Fotografía de membrana de nitrocelulosa ilustrando las proteínas reconocidas por el anticuerpo primario anti-SSIV (A), y por el anticuerpo primario anti-GFP (B).

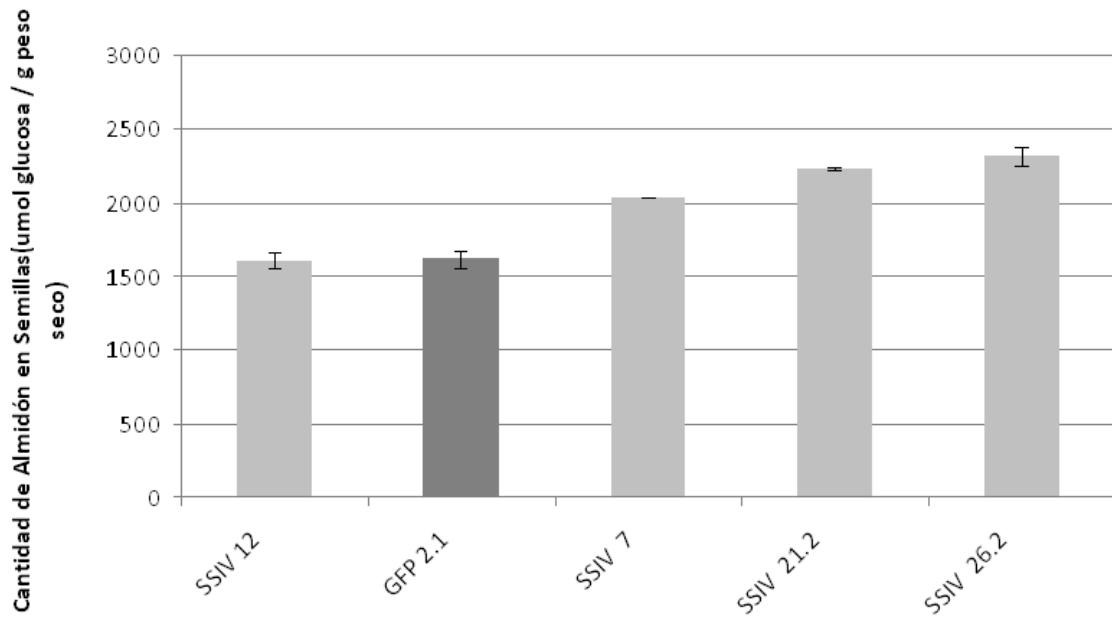
En la **figura 8A** la membrana de nitrocelulosa fue incubada con el anticuerpo primario anti-SSIV, donde las líneas transgénicas de cebada 4.1, 5 y 16.1 muestran una banda de 139 kDa aproximadamente que puede corresponder con el tamaño de la proteína SSIV de 112 kDa unida a GFP que presenta un tamaño de 27 kDa. Para comprobar este dato se procedió a incubar la membrana de nitrocelulosa con anticuerpo primario anti-GFP (**Figura 8B**), que es un anticuerpo muy específico para GFP. Se supone que las bandas reconocidas por el anticuerpo anti-SSIV en las líneas que sobreexpresan SSIV-GFP deberían ser reconocidas por el anticuerpo anti-GFP. Sin embargo, en la **figura 8B** las líneas transgénicas de cebada no mostraron ninguna banda reconocida por el anticuerpo anti-GFP, excepto la línea 4.1 donde podemos observar una banda muy tenue de un tamaño semejante al de SSIV-GFP. También se aprecia una banda de un tamaño aproximado de 27 kDa en la línea empleada control GFP 2.1 que podría corresponder a GFP.

### 5.3.-Localización subcelular por microscopía confocal

Ante la imposibilidad de detectar las proteínas SSIV y SSIV-GFP por western blot mediante el uso de los dos anticuerpos primarios (anti-SSIV y anti-GFP), se emplearon muestras de hoja y semillas germinadas de líneas transgénicas de cebada para su análisis por microscopía confocal, con el objetivo de localizar la ubicación subcelular de SSIV-GFP. Se lleva a cabo mediante un láser de excitación a 395nm y un detector de transmitancia que recoge la fluorescencia de la proteína GFP. Tras la imposibilidad de identificar la proteína de fusión SSIV-GFP mediante la acción del anticuerpo diseñado para reconocer GFP en el western blot de la **figura 8B**, se comprobó que tampoco mediante microscopía confocal se podía ver señal alguna de la fluorescencia de GFP en las muestras de las líneas de cebada transgénicas que componen este trabajo. Estos resultados en la identificación de la proteína de fusión, a través de GFP, mediante análisis por western blot y microscopía confocal parecían indicar que se había producido un error durante el proceso de clonación y construcción de SSIV-GFP por la presencia de un codón de paro entre SSIV y GFP. Por ello se procedió a secuenciar un producto de PCR utilizando como molde el ADN genómico perteneciente a estas líneas. Se sugirió la posibilidad de la existencia de un codón de paro en la unión de ambas secuencias, posibilidad que fue descartada tras la secuenciación del producto de PCR.

### 5.4.-Cuantificación de almidón

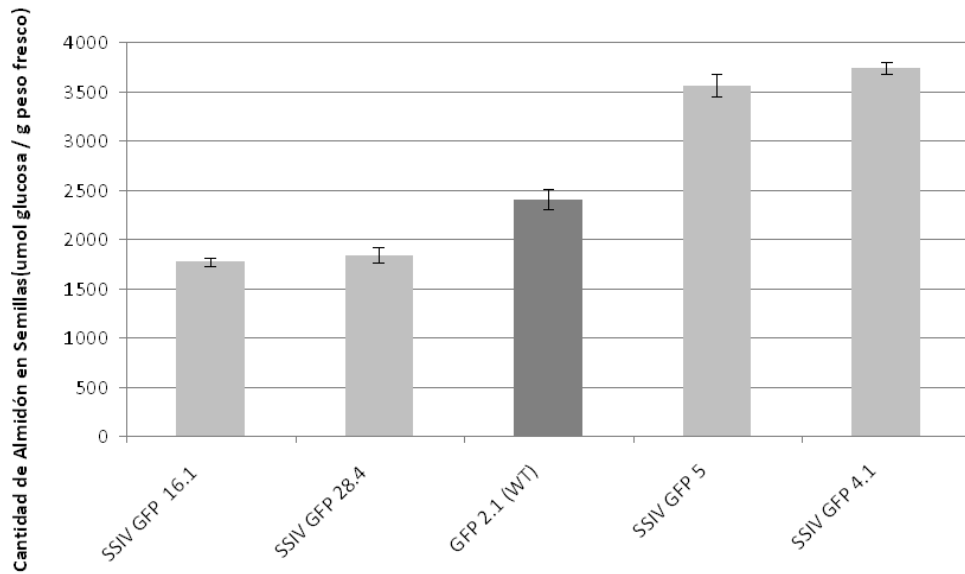
La **figura 9** muestra el contenido en almidón en cuatro líneas transgénicas de cebada (SSIV-7, SSIV-12, SSIV-21.2, SSIV-26.2) con respecto a la línea control, en este caso se ha empleado como control una planta de cebada transformada con el gen marcador GUS. Todas las líneas transgénicas de cebada mostraron un aumento significativo de almidón comparado con la línea control, con la excepción de la línea SSIV-12 que presenta un contenido de almidón comparable al de la planta control. Los valores mostrados en este gráfico son el promedio de tres mediciones independientes de almidón



**Figura 9.** Contenido en almidón en semillas de las líneas transgénicas de cebada comparadas con la línea control (línea transgénica de cebada que expresa el gen marcador GFP).

La **figura 10** muestra el contenido de almidón en cuatro líneas transgénicas de cebada (SSIV-GFP-4.1, SSIV-GFP-5, SSIV-GFP-16.1, SSIV-GFP-28.4) con respecto a la línea control, en este caso se ha empleado una línea transgénica de cebada que expresa GFP. Dos líneas SSIV-GFP (4.1 y 5) muestran un contenido de almidón significativamente mayor al ser comparado con la línea control (GFP 2.1). Sin embargo, las otras dos líneas transgénicas de cebada SSIV-GFP (16.1 y 28.4) mostraron niveles bajos de almidón comparados con la línea control. Los valores de esta gráfica representan el promedio de tres medidas independientes de almidón.





**Figura 10.** Contenido de almidón en semillas de líneas transgénicas de cebada comparadas con las líneas control (línea transgénica de cebada que expresa el gen marcador GFP).

Partiendo de que no se ha podido confirmar la expresión de At-SSIV y At-SSIV-GFP mediante ninguno de los anticuerpos primarios (anti-SSIV y anti-GFP) ensayados, y tampoco se ha podido determinar la localización subcelular de GFP mediante microscopía confocal, las líneas transgénicas de cebada que expresan tanto SSIV como SSIV-GFP han mostrado un aumento significativo del contenido en almidón en semillas. Este aumento de almidón en semillas de las líneas transgénicas de cebada debe ser debido a la expresión de SSIV, sin embargo esta expresión se encuentra por debajo del nivel de detección por western blot.

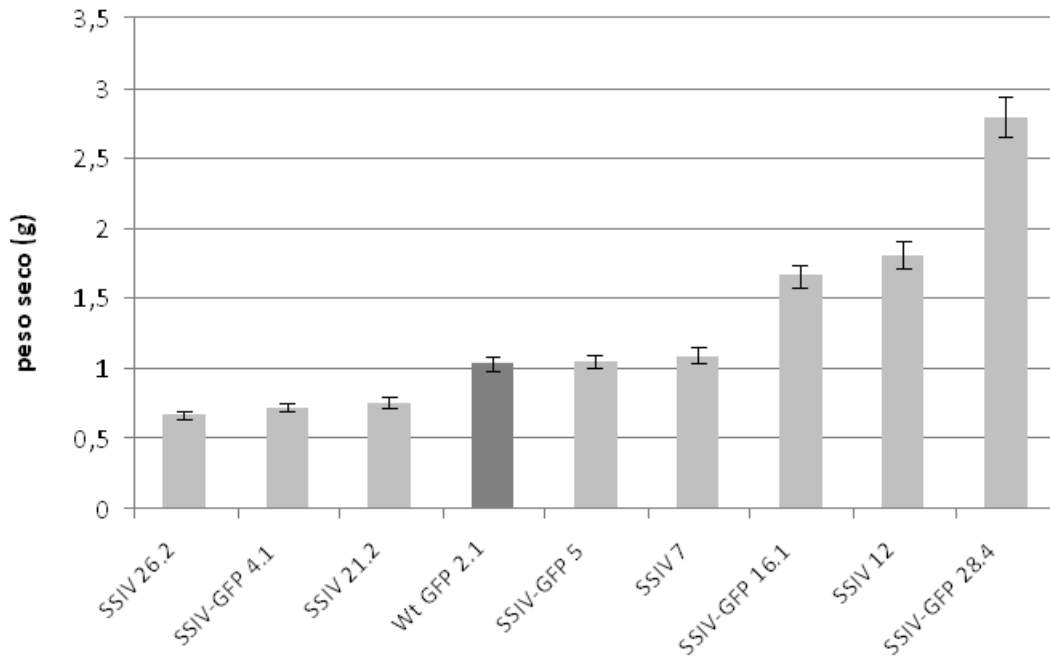
### 5.5.-Caracterización del efecto de SSIV sobre la biomasa

Las semillas de las ocho líneas de plantas F<sub>1</sub> utilizadas en el presente trabajo, fueron crecidas hasta obtener la generación F<sub>2</sub>, tal y como se explicó anteriormente (Ver Material y Métodos). A partir de éstas, trataremos de caracterizar el efecto de la enzima SSIV de *Arabidopsis* sobre la biomasa aérea (tallos y grano).

El número de plantas utilizadas para cuantificar la biomasa osciló entre 5 y 28, dependiendo del número de semillas obtenidas en la generación F<sub>1</sub> y de la germinación en medio selectivo.

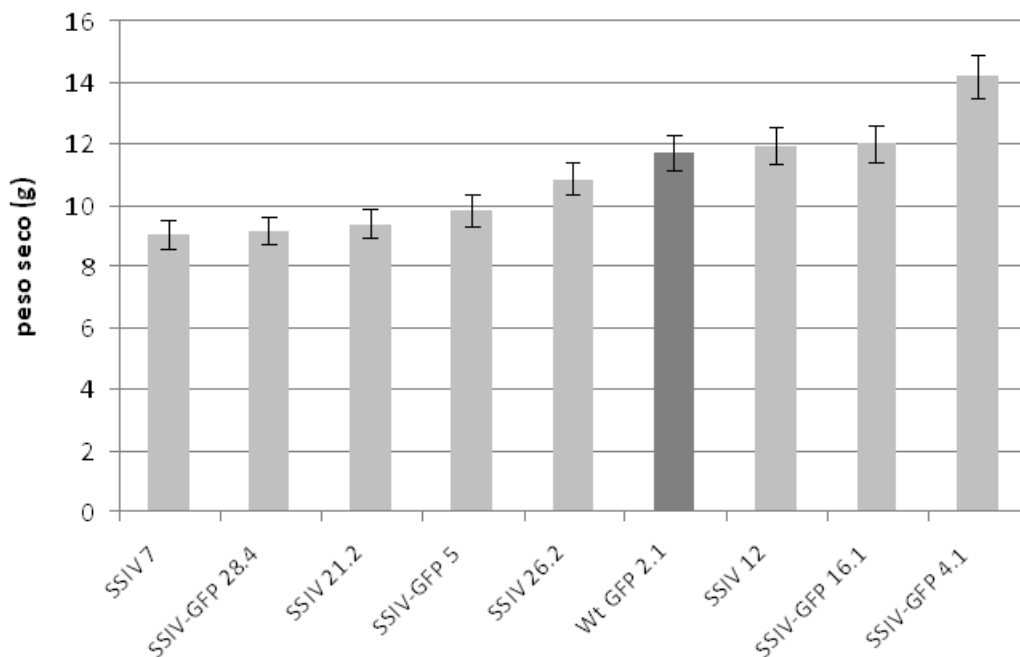
**Tabla 3.** Las diferentes líneas de plantas de cebada transgénica sobre las que se caracterizó el efecto de AtSSIV sobre biomasa y semillas.

Línea	Nº plantas
SSIV 7	5
SSIV 12	20
SSIV 21.2	7
SSIV 26.2	11
SSIV-GFP 4.1	14
SSIV-GFP 5	16
SSIV-GFP 16.1	9
SSIV-GFP 28.4	15
GFP 2.1 (WT)	28



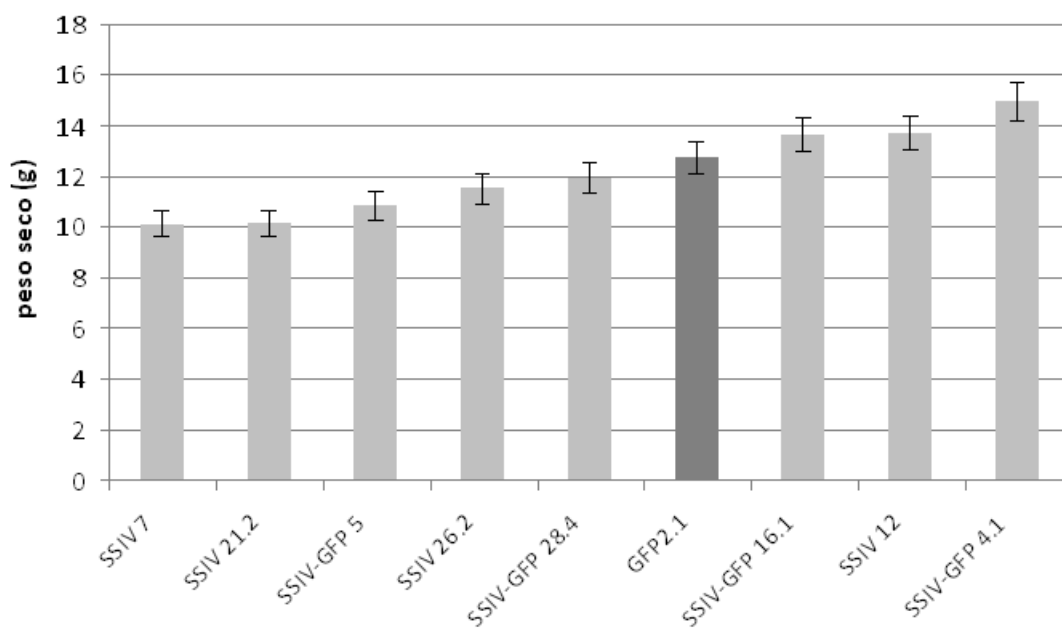
**Figura 11.** Peso seco de las espigas por planta

La **figura 11** muestra el peso de las espigas de cada línea transgénica de cebada referido al peso por planta. Existen tres líneas (SSIV-GFP 16.1, SSIV-12 y SSIV-GFP 28.4) que presentan un peso significativamente superior a la línea control y a la otras cinco líneas transgénicas que componen este trabajo.



**Figura 12.** Peso seco de los tallos por planta

Los pesos de los tallos de las diferentes líneas transgénicas de cebada empleadas en este trabajo para caracterizar el efecto de At-SSIV sobre la biomasa, se representan en la **figura 12**. Se observa que no existen diferencias significativas salvo en la línea SSIV-GFP 4.1 que presenta un peso medio de tallos por planta de 15 g, por los 13 g por planta que exhibe la línea de cebada que expresa GFP.



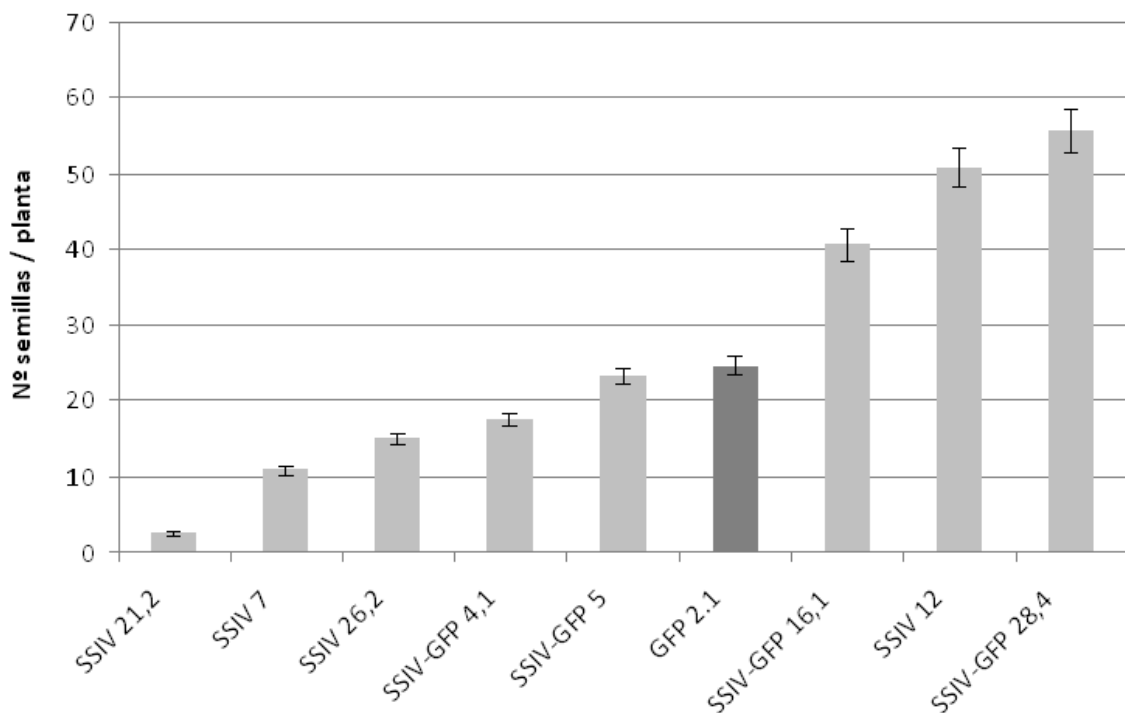
**Figura 13.** Valor medio del peso seco calculado por planta

En la **figura 13** está representado el peso total de la biomasa aérea seca de las líneas transgénicas de cebada. La línea SSIV-GFP 16.1, al igual que la línea SSIV 12 presentan un mayor peso en las espigas (**Figura 11**), razón por la cual muestran los mayores pesos en la biomasa seca total. La línea SSIV-GFP 4.1, que evidencia la mayor biomasa por planta de las líneas analizadas, debe la mayor parte de su peso a la mata. Este dato, unido al relevante aumento de almidón mostrado por esta misma línea (**Figura 10**), sugieren que se ha podido llevar a cabo la expresión del gen At-SSIV, teniendo como resultado un ligero aumento en la biomasa y un significativo aumento del contenido de almidón en semillas.

### 5.6.-Peso de mil granos (PMG)

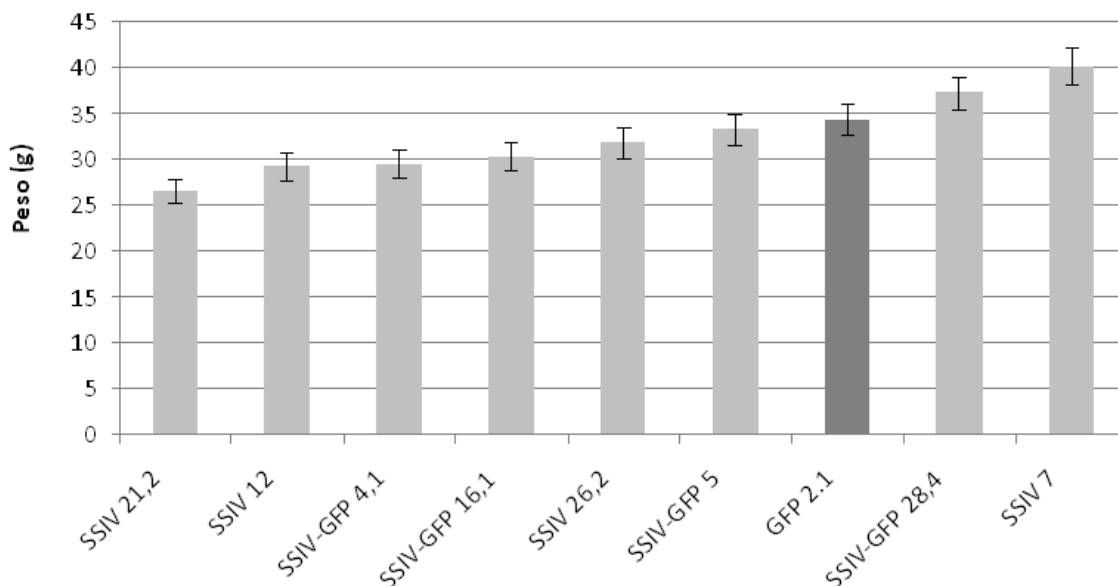
El PMG es un parámetro agronómico que nos ayuda a relacionar los resultados obtenidos referentes a la cebada cultivada en campo. Varía de 31.8 a 47.5g, con un promedio de 43.9g, dependiendo de las condiciones ambientales y de manejo en que se haya desarrollado el cultivo (Goñi y Segura, 2010). Esto nos permite comparar los resultados obtenidos, además de con las plantas establecidas como control, con las plantas de cebada cultivadas en campo con fines agronómicos.

Con el objetivo de caracterizar el efecto de SSIV sobre la producción de semillas, se calculó el valor PMG. Además de analizar indirectamente el tamaño y peso del grano de cebada a través del PMG, también se contabilizaron el número de granos que producía cada línea de plantas transgénicas, con el objetivo de comparar los valores y referenciarlos como número de granos por planta.



**Figura 14.** Número de semillas por planta de cada una de las líneas en estudio.

Si nos fijamos en los resultados obtenidos para el número de semillas por planta (**figura 14**), dentro de cada línea de plantas transgénicas, observamos la gran variabilidad presente, existiendo tres líneas (SSIV-GFP 16.1, SSIV 12 y SSIV-GFP 28.4) que producían una cantidad considerablemente mayor de semillas por planta. Esto nos indica que las líneas transgénicas de cebada que mostraron mayor peso seco de las espigas, fue debido a la presencia de mayor número de semillas.



**Figura 15.** Peso de mil granos de las diferentes líneas en estudio.

Los resultados obtenidos en la **figura 15** muestran el valor obtenido para el peso de mil granos de las diferentes líneas transgénicas de cebada analizadas, oscilando este valor entre los 26 g de la línea SSIV 21.2 y los 41.67 g de SSIV-GFP 28.4. Estos datos, lejanos a los expuestos por Goñi y Segura (2010), pueden ser explicados en parte por la variedad de cebada empleada en la presente investigación (*Golden Promise c.v.*), que pertenece a una variedad rutinariamente utilizada en la investigación, no siendo una variedad ampliamente empleada en agronomía.

## 6.- BIBLIOGRAFÍA

- Bahaji, A., Li, J., Ovecka, M., Ezquer, I., Muñoz, F.J., Baroja-Fernández, E., Romero, J.M., Almagro, G., Montero, M., Hidalgo, M., Sesma, M.T., and Pozueta-Romero, J. (2011) Arabidopsis thaliana mutants lacking ADP-glucose pyrophosphorylase accumulate starch and wild-type 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(7)**:1162-1176.
- Ball, S., Guan, H., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P., and Preiss, J. (1996) From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**: 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.
- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Montero, M., Etxeberria, E., Sesma, M.T., Ovecka, M., Bahaji, A., Ezquer, I., Li, J., Prat, S., and Pozueta-Romero J. (2009) Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield. *Plant Cell Physiol.* **50**: 1651-1662.
- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Saiukusa, T., Rodríguez-López, M., Akazawa, T., and Pozueta-Romero, J. (2003) Sucrose synthase catalyzes the 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., Zandueta-Criado, A., Moran-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Alonso-Casajús, N., and Pozueta-Romero, J. (2004) Most of ADP-glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 13080-13085.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry* **72**: 248-254.
- Burton, R.A., Jenner, H., Carrangis, L., Fahy, B., Fincher, G.B., Hylton, C., Laurie, D.A., Parker, M., Waite, D., van Wegen, S., Verhoeven, T., and Denyer, K. (2002) Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J.* **31**: 97-112.
- Bustos, R., Fahy, B., Hylton, C., Seale, R., Nebane, N.M., Edwards, A., Martin, C., and Smith, A.M. (2004) Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 2215-2220.

- Craig, J., Lloyd, J.R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T.L., Martin, C., Hedley, C.L., and Smith, A.M. (1998) Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* **10**: 413-426.
- Delatte, T., Trevisan, M., Parker, M.L., and Zeeman, S.C. (2005) *Arabidopsis* mutants *Atisa1* and *Atisa2* have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant J.* **41**: 815-830.
- Delcour, J.A., Bruneel, C., Derde, L.J., Gomand, S.V. and Pareyt, L. (2010) Fate of starch in Food Processing: From Raw material to final Food products. *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* **1**:87-111
- Delvallé, D., Dumez, S., Watterbled, F., Roldán, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Mérida, A., and D'Hulst, C. (2005) Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J.* **43**: 398-412.
- Gámez-Arjona, F.M., Baroja-Fernández, E., Li J., Raynaud, S., Muñoz, F.J., Ovecka, M., Ragel, P., Bahaji, A., Pozueta-Romero, J. and Mérida, A. (2011) Enhancing expression of starch synthase Class IV results in increased levels of both transitory and long-term storage starch. *Plant Biotech. J.* **10**: 1-12
- Goñi, J. y Segura, A. (2010) Ensayo de cebadas en secanos semiáridos. <http://www.navarraagraria.com/> **182**: 14-26
- Hansel, G. and Kumhlen, J. (2004) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by co-culture of immature embryos with *Agrobacterium*. Curtis, I., ed, *Transgenic Crops of the World: Essential Protocols*. Kluwer Academic Publishers. **3**: 35-45.
- Hennen-Bierwagen, T., Liu, F., Marsh, R., Kim, S., Gan, Q., Tetlow, I., Emes, M., James, M., and Myers, A. (2008) Starch biosynthetic enzymes from developing *Zea mays* endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiology* **146**.
- 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**: 1459-67.
- Ihemere, U., Arias-Garzón, D., Lawrence, S., and Sayre, R. (2006) Genetic modification of cassava for enhanced starch production. *Plant Biotechnol. J.* **4**: 453-465.
- Itoh, K., Ozaki, H., Okada, K., Hori, H., Takeda, Y., and Mitusui, T. (2003) Introduction of Wx transgene into rice wx mutants leads to both high and low-amylose rice. *Plant Cell Physiol.* **44**: 473-480.



- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Li, N., Zhang, S., Zhao, Y., Li, B., and Zhang, J. (2011) Over-expression of AGP-ase genes enhances seed weight and starch content in transgenic maize. *Planta* **233**: 241-250.
- Lloyd, J.R., Landschutze, V., and Kossmann, J. (1999) Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin. *Biochemical Journal* **338**: 515-521.
- Maddelein, M.L., Libessart, N., Bellanger, F., Delrue, B., D'Hulst, C., Van den Koornhuysse, N., Fontaine, T., Wieruszkeski, J.M., and Ball, S. (1994) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 25150-25157.
- Martin, C., and Smith, A.M. (1995) Starch biosynthesis. *Plant Cell*. **7**:971-985.
- Muñoz, F.J., Baroja-Fernández, E., Morán-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Etxeberria, E., Alonso-Casajús, N., and Pozueta-Romero, J. (2005) Sucrose synthase controls the intracellular levels of ADPglucose linked to transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1366-1376.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised médium for rapad growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473-497.
- Murata, T., Minamikawa, T., and Akazawa, T. (1963) *Biochem Biopys Res. Commun.* **13**: 439-443.
- Müller-Röber, B., Sonnewald, U., and Willmitzer, L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* **11**: 1229-1238.
- 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. *Trend Plant Sci.* **10**: 154-156.
- Okita, T.W. (1992) Is there an alternative pathway for starch synthesis. *Plant Physiol.* **100**: 560-564.
- Preiss, J. (1988) In *The biochemistry of plants*. Preiss, J. (ed). New York: Academic Press, pp.181-254.
- Ral, J.P., Derelle, E., Ferraz, C., Wattebled, F., Farinas, B., Corellou, F., Buleón, A., Slomianny, M.C., Delvallé, D., d'Hulst, C., Rombauts, S., Moreau, H., and Ball, S. (2004) Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic geen alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol.* **136(2)**: 3333-3340.

- Recondo, E., and Leloir, L.F. (1963) Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**: 85-88.
- Roldán, I., Lucas, M.M., Delvallé, D., Planchot, V., Jiménez, S., Pérez, R., Ball, S., D'Hulst, C., and Mérida A. (2007) The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J.* **49**: 492-504.
- Shewmaker, C.K., Boyer, C.D., Wiesenborn, D.P., Thompson, D.B., Boersig, M.R., Oakes, J.V., and Stalker, D.M. (1994) Expression of *Escherichia coli* Glycogen Synthase in the tubers of transgenic potatoes (*Solanum tuberosum*) results in a high starched starch. *Plant Physiol.* **104**: 1159-1166.
- Smidansky, E.D., Martin, J.M., Hannah, L.C., Fischer, A.M., and Giroux, M.J. (2003) Seed yield and plant biomass increases in rice are conferred by deregulation of endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase *Planta* **216**: 656–664.
- Smith, A.M. (2008) Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *The Plant Journal* **54**: 546-558.
- Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J. and Kishore, G. (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADPglucose pyrophosphorylase. *Science* **258**: 287–292.
- 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-localized pathway. *Plant Physiol.* **151**: 1769-1772.
- Sweetlove, L.J., Burrell, M.M., and Rees, T. (1996) Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase. *Biochem. J.* **320**: 493-498.
- Szylowsky, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M.M., Roldán, I., Montero, M., Muñoz, F.J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., Pozueta-Romero, J., D'Hulst, C., and Mérida, A. (2009) Starch Granule Initiation in *Arabidopsis* Requires the Presence of Either Class IV or Class III Starch Synthases. *Plant Cell.* **21**:2443-2457.
- 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.
- Tatge, H., Marshall, J., Martin, C., Edwards, E. A. and Smith, A. M. (1999) Evidence that amylose synthesis occurs within the matrix of the starch granule in potato tubers. *Plant Cell Environ.* **22**: 543–550

- Tetlow, I. (2006) Understanding storage starch biosynthesis in plants: a means to quality improvement. *Can. J. Bot.* **84**: 1167-1185.
- Tetlow, I., Beisel, K., Cameron, S., Makhmoudova, A., Bresolin, N., Wait, R., Morell, M., and Emes, M. (2008) Analysis of protein complexes in wheat amyloplast reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiology* 146.
- van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J. P., Buléon, A., Visser, R. y Ball, S. (1998) Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin. *J. Biol. Chem.* **273**: 22232–22240
- Wattebled, F., Dong, Y., Dumez, S., Delvallé, D., Planchot, V., Berbezy, P., Vyas, D., Colonna, P., Chatterjee, M., Ball, S., and D'Hulst, C. (2005) Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phtytoglycogen and abnormal form of amylopectin. *Plant Physiol.* **138**: 184-195.
- Wattebled, F., Planchot, V., Dong, Y., Szydlowski, N., Pontoire, B., Devin, A., Ball, S., and D'Hulst, C. (2008) Further evidence for the mandatory nature of polysaccharide debranching for the aggregation of semicrystalline starch and for overlapping functions of debranching enzymes in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* **148**: 1309-1323.
- Zhang, X., Myers, A.M., and James, M.G. (2005) Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiol.* **138**: 663-674.
- Zhang, X., Szydlowski, N., Delvallé, D., D'Hulst, C., James, M.G., and Myers, A.M. (2008) Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **8**: 96

## ANEXO 1

Tabla1. Peso seco total por planta

Línea	Nº plantas	Peso seco mata (g)	Peso espigas (g)	Peso seco total plantas (g)
SSIV 7	5	45,08	5.46	50,54
SSIV 12	20	238,20	36.04	274,24
SSIV 21.2	7	65,70	5.25	70.95
SSIV 26.2	11	119,13	7.32	126,45
SSIV-GFP 4.1	14	198,76	10.06	208,82
SSIV-GFP 5	16	157,01	16.94	173,95
SSIV-GFP 16.1	9	107,84	14.93	122,33
SSIV-GFP 28.4	15	137	41.99	178,99
Wt GFP 2.1	28	327,43	28,93	356,36

Tabla2. Peso espigas

Línea	Nº plantas	Peso espigas (g)	Peso espigas / planta (g peso seco/ planta)
SSIV 7	5	5.46	1.09
SSIV 12	20	36.04	1.802
SSIV 21.2	7	5.25	0.75
SSIV 26.2	11	7.32	0.66
SSIV-GFP 4.1	14	10.06	0.72
SSIV-GFP 5	16	16.94	1.05
SSIV-GFP 16.1	9	14.93	1.66
SSIV-GFP 28.4	15	41.99	2.79
Wt GFP 2.1	28	28,93	1,03

**Tabla3.** Peso matas

Línea	Nº plantas	Peso matas (g peso seco)	Peso matas / planta (g peso seco / planta)
SSIV 7	5	45,08	9.016
SSIV 12	20	238,20	11.91
SSIV 21.2	7	65,70	9.38
SSIV 26.2	11	119,13	10.83
SSIV-GFP 4.1	14	198,76	14.19
SSIV-GFP 5	16	157,01	9.81
SSIV-GFP 16.1	9	107,84	11.98
SSIV-GFP 28.4	15	137	9.13
Wt GFP 2.1	28	327,43	11.69

**Tabla4.** Peso seco total

Línea	Nº plantas	Peso seco total plantas (g)	Peso seco total / planta (g/planta)
SSIV 7	5	50.54	10.11
SSIV 12	20	274.24	13.71
SSIV 21.2	7	70.95	10.14
SSIV 26.2	11	126.45	11.50
SSIV-GFP 4.1	14	208.82	14.92
SSIV-GFP 5	16	173.5	10.84
SSIV-GFP 16.1	9	122.77	13.64
SSIV-GFP 28.4	15	178.99	11.93
Wt GFP 2.1	28	356,36	12.72

**Tabla 5.** Peso de mil granos

Línea	Nº Semillas	Peso semillas (g)	Semillas/Planta	PMG (g)
SSIV 7	54	2,16	10.8	40
SSIV 12	1012	29,50	50.6	29.15
SSIV 21.2	17	5,25	2.42	26.47
SSIV 26.2	164	5,20	14.91	31.71
SSIV-GFP 4.1	245	7,20	17.5	29.39
SSIV-GFP 5	371	12,30	23.19	33.15
SSIV-GFP 16.1	365	11,02	40.55	30.2
SSIV-GFP 28.4	835	30,99	55.66	37.11
Wt GFP 2.1	689	23.54	24.61	34.17