



Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

División de Estudios de Posgrado

Análisis del rendimiento de sacarificación de plantas de
Arabidopsis thaliana L. que expresan constitutivamente
a los genes *SUB1A-1* y *SUB1C-1*.

TESIS

Para obtener el título de Maestra en Biotecnología

Presentada por:

IBQ Lizeth Núñez López

ASESOR DE TESIS:

Dr. Julián Mario Peña Castro

Julio del 2015.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tuxtepec, Oaxaca a 13 de Abril de 2015

IBQ. Lizeth Núñez López
Estudiante de la Maestría en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Por este medio le informo que el jurado para su examen para obtener el grado en Maestro en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores

Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura	UNPA	Presidente
Dra. Lorena Amaya Delgado	CIATEJ	Vocal
Dr. Andrés Aguirre Cruz	UNPA	Secretario
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	1er Suplente
Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	2o Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente



Dr. Guillermo Ramírez Galicia
Jefe de la División de Estudios de
Posgrado

Ccp Dr. Julián Mario Peña Castro, Asesor
Ccp LP Yesenia Barrientos Arenal, Jefa de Servicios Escolares
Ccp Archivo

M en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
VoBo



CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax. Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax. Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 4 de Junio de 2015

LP Yesenia Barrientos Arenal
Jefa de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología de la IBQ. Lizeth Núñez López, matrícula 12140007, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **“Análisis del rendimiento de sacarificación de plantas de *Arabidopsis thaliana* L. que expresan constitutivamente a los genes *SUB1A-1* y *SUB1C-1*”** para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular me despido quedando atento ante cualquier duda o aclaración

Atentamente,

Dr. Guillermo Ramírez Galicia
Jefe de la División de Estudios de Posgrado
Cubículo 10. gramirez@unpa.edu.mx, memorgal@gmail.com



Ccp IBQ Lizeth Núñez López
Ccp Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax. Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax. Tel. 01(281)8729230

Las personas no son recordadas por el número de veces que fracasan, si no por el número de veces que tienen éxito.

Thomas Alva Edison

Dedicatoria

Son tantas las personas a las que debo esta etapa de mi vida, que siento que me faltarán las palabras para demostrar mi gratitud, pero por medio de estas líneas quiero darles las gracias.

Principalmente a mi familia por haberme brindado su apoyo y comprensión incondicional y por todos esos consejos durante estos años de estudio.

A todas esas personas extraordinarias que puedo llamar amigos que me ayudaron a crecer y madurar como persona, que siempre estuvieron conmigo compartiendo tantos momentos dentro y fuera del laboratorio y también por transmitirme su conocimiento y experiencia durante este camino que llamamos estudio.

A los profesores que tuve durante mi estancia en la Universidad del Papaloapan, por la paciencia, por su entrega y dedicación que día a día nos demostraron para transmitir su experiencia, que siempre estuvieron ahí para guiarnos en el mundo del conocimiento y el desarrollo biotecnológico.

También a Dios por permitirme llegar y estar en donde estoy ahora, por darme vida, salud y por haberme dado la fuerza para cumplir una meta más de este camino que se llama vida.

Agradecimientos

Al Dr. Julián Mario Peña Castro, por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo de tesis en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por todas sus enseñanzas, el apoyo incondicional y por la paciencia que tuvo en todo momento.

A la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa y al Dr. Andrés Cruz Aguirre por el apoyo durante la realización de mi tesis, en situaciones de dudas en el trabajo experimental y teórico.

A la Dra. Sandra del Moral, Dra. Jacqueline Capataz, Dr. José Abad, Dr. Enrique Villalobos y al Ing. Juan Hernández de la Universidad del Papaloapan por compartir reactivos y equipos usados en el desarrollo de este trabajo.

A la Profesora Julia Bailey-Serres de la University of California at Riverside (USA) por la donación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo y por revisar tan generosamente el artículo científico derivado de esta tesis.

A la Dra. Gladys Labrada-Delgado, por haber tomado la microscopia de los gránulos de almidón con el HELIOS NANOLAB del IPICYT.

Al Dr. Guillermo Ramírez Galicia, jefe de la división de estudios de posgrado, por el apoyo y consejos en varias ocasiones.

A la Dra. Lorena Amaya Delgado, que confió, me ayudó y animó a seguir adelante.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la asesoría del Dr. Julián Mario Peña Castro y con el apoyo del Programa de Mejoramiento del Profesorado a través del proyecto PROMEP 103.5/11/6720 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto de Ciencia Básica 152643.

Fragmentos de esta tesis fueron presentados en los siguientes congresos y publicaciones:

Congresos

1. **Lizeth Núñez-López**, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Andrés Aguirre-Cruz and Julián Mario Peña-Castro. Enzymatic saccharification improvement of *Arabidopsis thaliana* overexpressing rice *SUB1A* and *SUB1C* transcription factors. Ciudad de México, México. 9–12 de septiembre de 2014. The 4th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering. Poster.
2. Julián Mario Peña-Castro, **Lizeth Núñez-López** and Blanca Estela Barrera-Figueroa. The biotechnological potential of submergence and signaling pathways to improve plant biomass for bioethanol production. Ciudad de México, México, 9–12 de septiembre del 2014. The 4th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering. Presentación Oral.
3. **Lizeth Núñez-López**, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Andrés Aguirre-Cruz and Julián Mario Peña-Castro. Mejoramiento de la sacarificación en plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan a los genes *SUB1A* y *SUB1C* involucrados en la inundación. Tuxtepec, Oaxaca, 20 y 21 de octubre de 2014. IV Encuentro de Biotecnología de la Cuenca del Papaloapan, por un Desarrollo Sustentable. Presentación Oral.
4. **Lizeth Núñez-López**, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Andrés Aguirre-Cruz and Julián Mario Peña-Castro. Improvement of enzymatic saccharification yield in *Arabidopsis thaliana* by expression of rice *SUB1A* transcription factor. Guadalajara, Jalisco, 2 – 8 de noviembre del 2015. XXX Congreso Nacional de Bioquímica. Presentación Oral.

Artículo indexado (PubMed, JCR, WoK, Scopus, DOAJ)

1. **Lizeth Núñez-López**, Andrés Aguirre-Cruz, Blanca Estela Barrera-Figueroa and Julián Mario Peña-Castro, 2015. Improvement of enzymatic saccharification yield in *Arabidopsis thaliana* by ectopic expression of the rice *SUB1A-1* transcription factor. PeerJ, 3:e817; DOI 10.7717/peerj.817

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Consumo de combustible.....	2
1.2 Crisis Energética.....	3
1.3 Biocombustibles.....	4
1.3.1 Biogás.....	5
1.3.2 Biodiésel.....	6
1.3.3 Bioetanol.....	6
1.4 Biomasa vegetal como materia prima.....	10
1.4.1 Almidón como materia prima.....	10
1.4.2 La pared celular como materia prima.....	12
1.5 Sacarificación.....	13
1.6 La biotecnología vegetal y la sacarificación.....	17
1.7 El locus <i>SUB1</i> , la inundación y el almidón.....	19
1.8 <i>Arabidopsis</i> y el almidón.....	21
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS.....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo General.....	25
4.1.1 Objetivos Específicos.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 Material vegetal	26
5.2 Condiciones de crecimiento.....	27
5.3 Colecta de plantas.....	27
5.4 Determinación de azúcares reductores.....	28
5.5 Sacarificación de la biomasa lignocelulósica.....	28
5.6 Sacarificación de la biomasa lignocelulósica y el almidón.....	30
5.7 Fluorescencia de clorofila.....	30
5.8 Tinción con yodo.....	31

5.9 Resistencia a la fractura	31
5.10 Microscopia electrónica de barrido de gránulos de almidón.....	31
5.11 Análisis cuantitativo de la expresión de genes (qPCR)	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1 Fenotipos de líneas transgénicas <i>OxSUB1A</i> y <i>OxSUB1C</i>	33
6.2 Verificación del funcionamiento de Accellerase 1500.....	35
6.3 Mejoramiento de la sacarificación.....	36
6.4 Dinámicas de acumulación de almidón diurna y en el desarrollo.....	42
6.5 Mecanismos moleculares de acumulación de almidón.....	47
6.6 Dureza de las hojas.....	57
6.7 Vitricación.....	58
6.8 Penalización en el crecimiento de <i>OxSUB1A</i>	61
6.9 Modelo de mejoramiento de la sacarificación por el gen <i>SUB1A-1</i>	62
7. CONCLUSIONES.....	65
8. PRESPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	66
9. REFERENCIAS.....	67
10. ANEXOS.....	77
Anexo A. Preparación de reactivos y soluciones.....	77
Anexo B. Condiciones de crecimiento.....	81
Anexo C. Crio-molienda del tejido vegetal.....	83
Anexo D. Determinación de azúcares reductores.....	83
Anexo E. Protocolo de sacarificación.....	84
Anexo F. Tinción con yodo.....	86
Anexo H. Extracción de ADN.....	86
Anexo I. Extracción de ARN. Mediante Trizol.....	87
Anexo J. Paso 2. Purificación de la digestión con Trizol.....	88
Anexo K. Paso 3. Purificación de la digestión con acetato de sodio.....	89
Anexo L. qPCR.....	90
Anexo M. Tablas de Microarreglos.....	92

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Consumo global de los combustibles fósiles para obtener energía.....	2
Figura 2. Reservas anuales de hidrocarburos de México.....	3
Figura 3. Aumento del consumo y de la importación de gasolina en México	4
Figura 4. El efecto en la reducción de la emisión de los gases invernadero	5
Figura 5. Biotecnología del etanol	9
Figura 6. Forma del granulo de almidón y estructura química de la amilosa y amilopectina.	11
Figura 7. La sacarificación vegetal	13
Figura 8. La sacarificación enzimática del almidón	14
Figura 9. La sacarificación enzimática de la celulosa.....	15
Figura 10. Rendimiento de sacarificación de los compartimentos de carbohidratos..	16
Figura 11. La respuesta al estrés por inundación en el arroz	19
Figura 12. Fenotipos de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Figura 13. Posible efecto de la sobreexpresión del gen <i>SUB1A-1</i> en <i>Arabidopsis</i> ..	24
Figura 14. Esquema de diferencias de <i>Arabidopsis</i> silvestres y transgénica y el casete de expresión	26
Figura 15. Diagrama de flujo de la sacarificación del tejido vegetal	29
Figura 16. Diferencias de los fenotipos entre Col-0 y las plantas transgénicas.....	34
Figura 17. Contenido de carbohidratos reductores libres en <i>OxSUB1A</i>	35
Figura 18. Cinética de sacarificación con Accellerase.....	36
Figura 19. Contenido relativo de azúcares reductores libres.....	37
Figura 20. Contenido relativo de glucosa tratamiento celulolítico.....	38
Figura 21. Contenido relativo de glucosa tratamiento mixto	39
Figura 22. Tinción con yodo plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
Figura 23. Oscilación diurna del rendimiento de sacarificación	43
Figura 24. Acumulación del almidón a lo largo del desarrollo.....	44
Figura 25. Tinción de yodo de muestras en diferentes etapas del desarrollo.....	46
Figura 26. Morfología del granulo de almidón de Col-0	49
Figura 27. Morfología del granulo de almidón de <i>OxSUB1A-L5</i>	50

Figura 28. Morfología del granulo de almidón de <i>OxSUB1A-L12</i>	51
Figura 29. Morfología de los gránulos de almidón de los diferentes genotipos	52
Figura 30. Comprobación de ausencia de ADN genómico en muestras de RNA para qPCR.....	54
Figura 31. RNAs extraído de Col-0 y <i>OxSUB1A</i> ambas líneas	54
Figura 32. Resistencia de las hojas	58
Figura 33 Hojas de <i>Arabidopsis</i> con la característica del fenotipo de vitrificación....	59
Figura 34. Fenotipo de vitrificación.....	60
Figura 35. Peso seco de Col-0 y las líneas transgénicas <i>OxSUB1A</i> y <i>OxSUB1C</i>	61
Figura 36. Modelo propuesto para mejorar la sacarificación de <i>OxSUB1A-1</i>	63
Figura 37. Diferentes mecanismos moleculares reportados en la literatura que intervienen en la acumulación del almidón en las plantas.....	64

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Inicio del brote floral en plantas de <i>Arabidopsis</i> Col-0 y <i>OxSUB1A</i>	33
Tabla 2. Cuantificación de la eficiencia del PSII (Fv/Fm), fluorescencia máxima (Fm) y neutral (Fo), y la relación de la variable neutra del incremento de fluorescencia (Fv/Fo).....	47
Tabla 3. Cuantificación de la eficiencia del PSII (Fv/Fm), fluorescencia máxima (Fm) y neutral (Fo), y la relación de la variable neutra del incremento de fluorescencia (Fv/Fo).....	48
Tabla 4. Enzimas de degradación y factores de transcripción que intervienen en el metabolismo del almidón en plantas de <i>Arabidopsis</i>	55
Tabla 5. PCR cuantitativo de plántulas de <i>Arabidopsis</i> de 7 días de edad, que expresan en el ecotipo Col-0 el gen SUB1A-1 del arr.....	56
Tabla 6. Genes involucrados en la variación natural de contenido de carbohidratos en <i>Arabidopsis</i> (Calegen <i>et al.</i> , 2006) y su expresión en plantas de <i>OxSUB1A</i> -L12..	92
Tabla 7. Genes involucrados en el metabolismo de la trehalosa en <i>Arabidopsis thaliana</i> (Ponnu <i>et al.</i> , 2011) y su expresión en plantas de <i>OxSUB1A</i> -L12.	93
Tabla 8. Genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis del almidón en <i>Arabidopsis</i> (Zeeman <i>et al.</i> , 2012) y su expresión en plantas de <i>OxSUB1A</i> -L12	94
Tabla 9. Genes que codifican proteínas implicadas en la degradación de almidón y genes relacionados (Zeeman <i>et al.</i> , 2012) y su expresión en plantas de <i>OxSUB1A</i> -L12..	95
Tabla 10. Genes que codifican el transporte de carbohidratos en el interior del plásmido (Zeeman <i>et al.</i> , 2012). Y su expresión en plantas de <i>OxSUB1A</i> -L12.....	96

Abreviaturas

°C	grados centígrados
μl	microlitro
μm	micrómetros
ABA	ácido absícico
<i>ACT2</i>	<i>ACTIN2</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNg	ácido desoxirribonucleico genómico
AGA	ácido galacturónico
AGI	<i>Arabidopsis</i> Genome Initiative
ARN	ácido ribonucleico
<i>AtEXP2</i>	<i>EXPANSIN2</i>
BGL2	glucano-1,3-glucanasa
BM	Banco Mundial
C ₆ H ₁₂ O ₆	g
<i>CG1</i>	<i>CORNGRASS1</i>
cm ²	centímetros cuadrados
CMC	carboximetil celulosa
<i>CO</i>	<i>CONSTANS</i>
CO ₂	dióxido de carbono
Col-0	planta silvestre <i>Arabidopsis thaliana</i>
d	día
DNS	ácido 3,5-dinitrosalícilico
EUA	Estados Unidos de América

ERF	factor de respuesta al etileno
ES	error estándar
Fig	figura
Fm	fluorescencia máxima
Fo	fluorescencia neutra
<i>FT</i>	<i>FLOWERING LOCUS T</i>
<i>FUL5</i>	<i>FRUITFUL</i>
Fv	fluorescencia variable
<i>g</i>	gravedad
g	gramos
GO	glucosa oxidasa
<i>GWD</i>	GLUCANO AGUA DIKINASA
h	horas
H ₂ O	agua
l	litros
M	molar
m	metros
mdb	millones de barriles
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mmbpce	millones de barriles de petróleo crudo equivalente
MS	sales Murashige-Skoog
N	Newton
n	número

N ₂	nitrógeno
nm	nanómetros
NPK	nitrógeno-fosforo-potasio
O ₂	oxígeno
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEMEX	Petróleos Mexicanos
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SE	Secretaria de Energía
<i>SEX4</i>	<i>FOSFATASA FOSFOGLUCANASA</i>
<i>SLP</i>	<i>SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE</i>
<i>SOC1</i>	<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESION OF CONSTANS1</i>
<i>SUB1</i>	SUBMERGENCE1
<i>TG</i>	<i>TRANSLUCENT GREEN</i>
<i>TUB2</i>	<i>TUBULIN2</i>
UV/VIS	ultravioleta/visible
v/v	relación volumen-volumen
w/w	relación peso-peso

RESUMEN

En la actualidad, existe la necesidad de buscar sustitutos de los combustibles fósiles. Los biocombustibles son una alternativa promisorio, especialmente el bioetanol, que es un derivado de la fermentación de la biomasa vegetal sacarificada, principalmente de almidón y celulosa. La biotecnología vegetal es una herramienta que se puede usar para aumentar en las plantas el contenido de carbohidratos. Los genes *SUB1A-1* y *SUB1C-1* están involucrados en la respuesta de estrés por inundación en el arroz, su función es retrasar la elongación y mantener el contenido de almidón por periodos largos. La hipótesis de este trabajo es que *SUB1A-1* y *SUB1C-1* pueden aumentar el contenido de almidón y mejorar la sacarificación en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para esto, se analizaron plantas silvestres (Col-0) y dos líneas transgénicas 35S:*SUB1A-1* (*OxSUB1A*) y 35S:*SUB1C-1* (*OxSUB1C*). Se observó que a los 22 días de edad y al final del día, las plantas *OxSUB1A* incrementaron un 37% la concentración de azúcares libres, 23% la glucosa proveniente de celulosa y 88% la que proviene del almidón en comparación con Col-0. Las plantas *OxSUB1C* no incrementaron el contenido de glucosa, incluso las líneas más sobreexpresantes tuvieron rendimientos bajos. Posteriormente, se caracterizó la acumulación del almidón en una cinética diurna, se observó que en las plantas *OxSUB1A* se acumuló más almidón (80–100%) que Col-0 en todos los puntos de muestreo (0, 8, 16, 20 y 24 h). Finalmente, se siguió el desarrollo de *Arabidopsis* y se observó que en la etapa juvenil la acumulación de almidón en *OxSUB1A* es hasta de 280% más que en Col-0. Adicionalmente, se usó un texturómetro para cuantificar que las plantas *OxSUB1A* fueron significativamente más débiles que las Col-0. Para explorar el mecanismo molecular, se cuantificó la expresión de genes involucrados en la degradación del almidón (*SEX4* y *GWD1*), en la transición juvenil (*SPL3*, *SPL4* y *SPL5*) y el tiempo de floración (*FUL5* y *SOC1*) pero no se encontraron cambios en la expresión, lo que indica que la acumulación de almidón podría ser independiente de los mecanismos conocidos previamente. De esta manera, se concluyó que las plantas *OxSUB1A* al tener un tiempo de floración retardada, producen un mayor número de hojas, menor resistencia a la ruptura y acumulan mayor cantidad de almidón. Todas estas son características deseables en la biomasa vegetal utilizada como materia prima para la producción de bioetanol.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Consumo de combustible

La gran demanda de energía de la sociedad moderna a nivel mundial se cubre con el uso de combustibles fósiles como el gas, el carbón, el petróleo y sus derivados como la gasolina y el diésel (Fig. 1; BM, 2014). Lo anterior tiene como consecuencia el agotamiento de las reservas e impactos negativos en el medio ambiente como son la contaminación de las áreas de extracción, la explosión de ductos de transporte y el calentamiento global. Todas estas son razones cruciales para buscar nuevas alternativas energéticas como los biocombustibles (Henry, 2010).

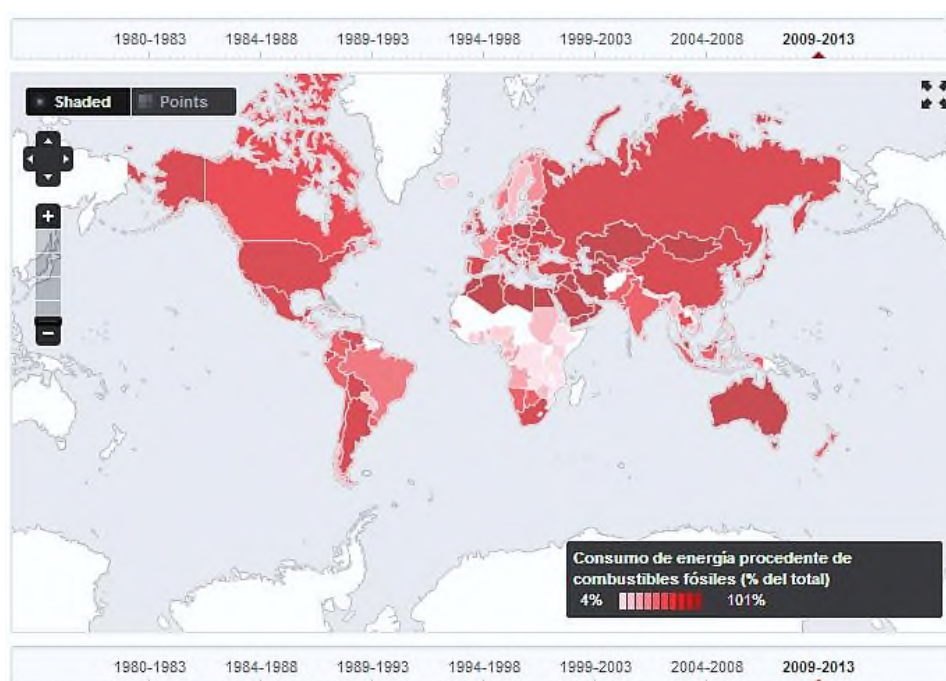


Figura 1. Consumo global de los combustibles fósiles para obtener energía. Porcentaje de consumo del sector vial en derivados del petróleo y gas natural o combustibles renovables y residuos expresados en consumo total de energía por país tomado de <http://datos.bancomundial.org>

1.2 Crisis Energética

El sistema de transporte en México depende en su totalidad del combustible fósil. Esto ha tenido como consecuencia la reducción de las reservas de petróleo en nuestro país. En 2013, México registró un nivel de reservas totales de hidrocarburos de 44,530 millones de barriles de petróleo crudo equivalente (mmbpce), disminuyendo 1.6% con respecto al año anterior. El nivel de reservas en los últimos diez años ha sufrido una reducción de 3,511 mmbpce en comparación con 2004 (Fig. 2; SENER, 2013).

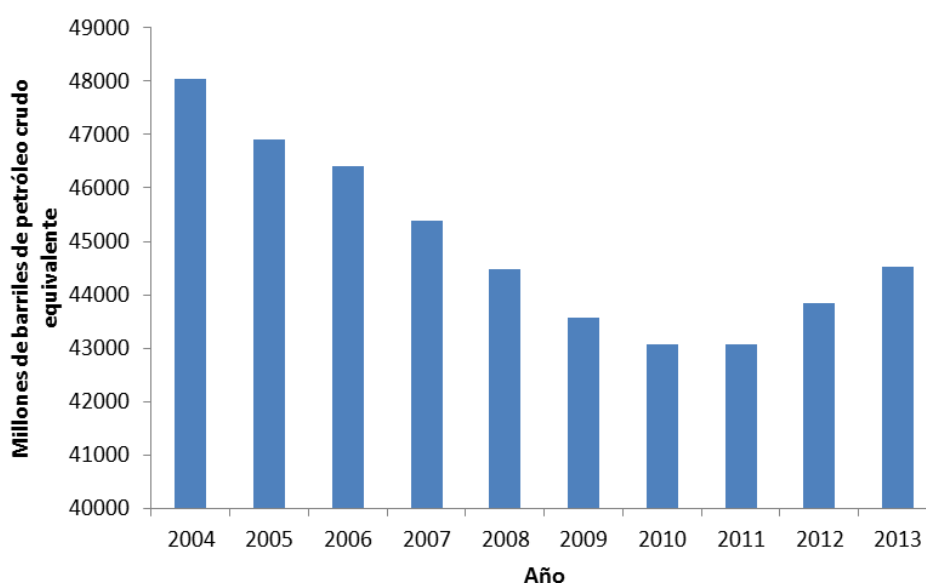


Figura 2. Reservas anuales de hidrocarburos de México. Distribución de las reservas totales de hidrocarburos por tipo de fluido, 2002-2013 (mmbpce). Tomado de sener.gob.mx.

México es uno de los diez países productores de petróleo más importantes del mundo, sin embargo, es un importador neto de productos refinados de petróleo, siendo los EUA su principal socio comercial (USEIA, 2012). La producción actual del combustible fósil proviene en su mayoría de campos en declinación, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevos yacimientos para tratar de cubrir la demanda de combustible (Fig.3).

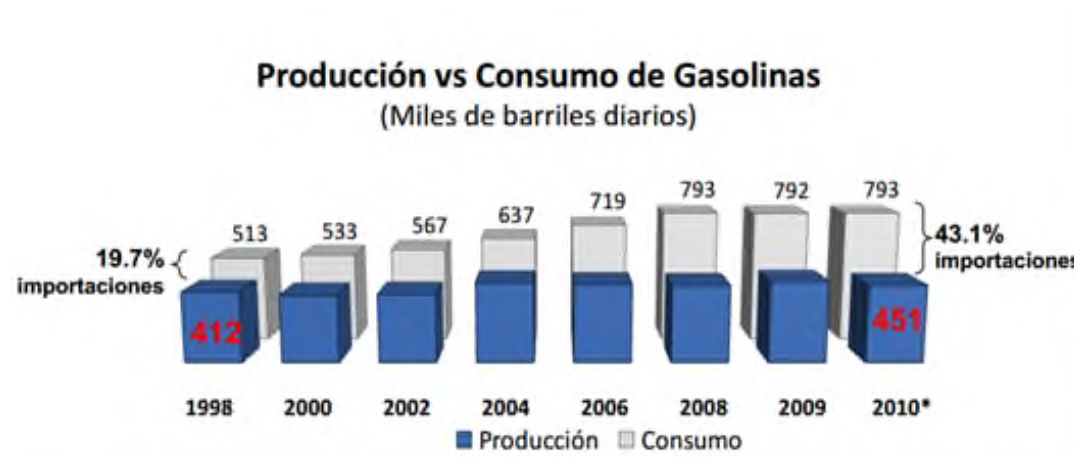


Figura 3. Aumento del consumo y de la importación de gasolina en México. (SENER, 2010).

De acuerdo a los datos de la Secretaría de Energía (SE, 2012), la demanda seguirá siendo superior a la producción y pasará de 404.7 millones de barriles (mdb) en 2011, a 610.2 mdb en 2026. Petróleos Mexicanos informó que sólo quedan 30 años de reservas en el Golfo de México al ritmo actual de explotación (USEIA, 2012), pero esto implica mayores gastos de extracción, más tiempo, tecnología de punta y en consecuencia mayor requerimiento de perforación.

De esta manera, la etapa del petróleo fácil y económico llegó a su fin en México y en el mundo (PEMEX, 2008; Valero-Padilla *et al.*, 2011; USEIA, 2012). Esta crisis energética hace necesario desarrollar investigación con el fin de producir biocombustibles y lograr que la sustitución de los combustibles a base de hidrocarburos sea un proceso sustentable (Hill *et al.*, 2006; Henry, 2010).

1.3 Biocombustibles

Los biocombustibles se producen mediante un proceso de transformación de la materia orgánica biodegradable (biomasa) que no se encuentra en estado fósil (Khanal *et al.*, 2010). La energía se obtiene de diferentes procesos como la fermentación alcohólica de azúcares (glucosa y fructosa) por levaduras y bacterias (Vázquez y Dacosta, 2007; Zamora-Hernández *et al.*, 2014), por medio de la modificación química

de los ácidos grasos (aceites vegetales o animales) o por descomposición anaeróbica por microorganismos (Li *et al.*, 2009; Vivas-Castaño, 2010).

Los biocombustibles tienen el potencial de suministrar una parte importante de las necesidades de combustibles fósiles (Chuck *et al.*, 2011). Además, se consideran renovables pues se producen utilizando como materia prima la biomasa que se puede reponer de manera continua (FAO, 2008).

Desde el punto de vista ambiental, los biocombustibles reducen la emisión de los gases de efecto invernadero que ocasionan el calentamiento global por ser procesos casi cerrados de captura de carbono (Fig. 4; FAO, 2008). En el sector de transporte se utilizan el biogás, el biodiésel y el bioetanol.

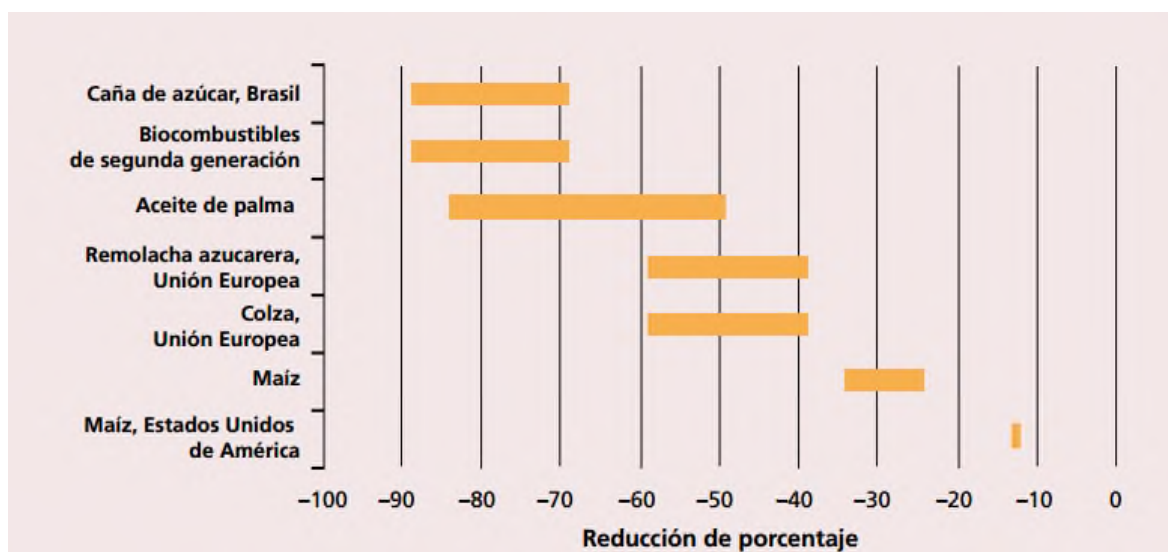


Figura 4. El efecto en la reducción de la emisión de los gases invernadero según el tipo de materia prima de biocombustible en comparación con los combustibles fósiles, no incluye los efectos ambientales (FAO 2008).

1.3.1 Biogás

El biogás es un biocombustible generado a partir de la digestión anaeróbica de diferentes residuos biológicos, principalmente de plantas (frutas) o animales (estiércol). Este proceso es relativamente lento pues se lleva a cabo en múltiples pasos mediados por diferentes microorganismos fermentadores de carbohidratos y

aminoácidos que dependen de varios factores como el pH, la temperatura, la humedad relativa y la relación carbono/nitrógeno (Naik *et al.*, 2010; Razbani *et al.*, 2011).

1.3.2 Biodiésel

El biodiésel es un biocombustible líquido compuesto de alquil-ésteres de alcoholes de cadena corta como el etanol y metanol con ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable. Las materias primas más comunes son los aceites vegetales, las grasas animales y los aceites de microalgas (Robles-Medina *et al.*, 2009). La conversión de la grasa animal (trigliceridos) a biodiesel se hace con una reacción de transesterificación por diversos medios físicos o biológicos, donde el producto es una mezcla de ésteres de metilo conocidos como biodiésel (Demirbas, 2008). El biodiésel tiene un contenido de oxígeno en peso aproximadamente de 11-15%, lo que permite mejorar el proceso de combustión y reducir las emisiones contaminantes. Es un biocombustible considerado como una fuente de energía limpia y renovable y es el más utilizado en Europa (Kuti *et al.*, 2010; Naik *et al.*, 2010).

1.3.3 Bioetanol

El bioetanol es alcohol etílico producido por la fermentación de los carbohidratos derivados de diferentes materias primas (Argueso *et al.*, 2009, Zamora-Hernández *et al.*, 2014). Las principales materias primas son las semillas de maíz (almidón), los tubérculos (almidón) y el jugo extraído a partir de la caña de azúcar (sacarosa). Recientemente, también se está usando la biomasa celulósica derivada de fuentes no alimentarias como los árboles, los residuos de pasta de fábrica de papel o los desechos agroindustriales (Doran-Peterson *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010, Naik *et al.*, 2010).

Actualmente, el bioetanol se produce, consume y exporta mayoritariamente por Brasil y EUA. Estos países representan el 87% del mercado mundial, repartido en un 25% y 62%, respectivamente. Al comparar la producción de etanol de Brasil con la de EUA, la de este último es casi tres veces mayor (UISEA, 2012). En EUA la materia prima más usada es el almidón de maíz con un rendimiento de 3800 y 4200 litros por hectárea mientras que en Brasil, es la caña de azúcar con un rendimiento de 7000

litros por hectárea (Tachinardi, 2008; AFDC, 2013). Por otra parte, la remolacha azucarera es una planta seleccionada en Europa para la producción de bioetanol por el alto contenido de sacarosa (Ossa-Basañes y Rebora, 2012).

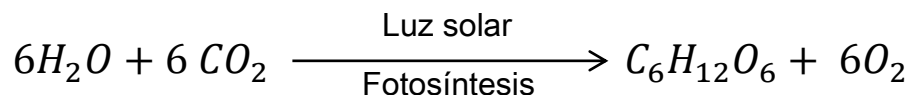
El bioetanol es el biocombustible de mayor demanda a nivel mundial con una producción de 7370 millones de litros anuales, que equivale al 87% de la producción de biocombustibles y el 82% del consumo mundial (Ferreira *et al.*, 2010; OCDE-FAO, 2013). Se clasifica de acuerdo a la materia prima que se usa para su elaboración. Así, el de primera generación se obtiene de la fermentación de plantas denominadas de consumo, por ejemplo el maíz, la caña de azúcar, los tubérculos o la remolacha, que tienen un alto contenido de almidón o azúcares fermentables naturalmente libres o que son fáciles de sacarificar, es decir, que se pueden convertir de polímeros a monómeros de carbohidratos mediante reacciones enzimáticas (Naik *et al.*, 2010; Ossa-Basañes y Rebora, 2012).

Sin embargo, la producción de bioetanol de primera generación conlleva un problema potencial de abastecimiento de alimentos, por la producción de cereales y oleaginosas que se desvían a la elaboración de biocombustibles (bioetanol y biodiesel). De esta forma, es necesario buscar nuevas alternativas para la producción de bioetanol con el fin de evitar un desabastecimiento de granos de la dieta básica (Sánchez-Cano, 2007; Naik *et al.*, 2010; FAO, 2013).

La producción de bioetanol de segunda generación se efectúa a partir de los monómeros de carbohidratos sacarificados del material lignocelulósico por medio de enzimas (Inderwildi y King, 2009; Couturier *et al.*, 2011). Se pueden emplear desechos agroindustriales como el bagazo de caña o de paja de trigo. También se buscan plantas silvestres de alta acumulación de biomasa como los pastos *Miscanthus ssp.* o *Panicum virgatum*. Estas son plantas de rápido crecimiento y con un almacenamiento energético elevado en sus componentes, principalmente carbohidratos estructurales (celulosa), de reserva (almidón) y azúcares libres (glucosa y fructosa). A estas plantas se le ha denominado “cultivos energéticos” (Álvarez-Maciel 2009; Lionetti *et al.*, 2010; Chuck *et al.*, 2011).

El bioetanol representa un ciclo cerrado de dióxido de carbono (CO₂), ya que después de su emisión como producto de combustión, se captura durante la

fotosíntesis por las plantas. Así, el CO₂ es reintegrado a la biomasa en forma de celulosa o almidón (BDB, 2008; Castillo-Vázquez *et al.*, 2011).



La biomasa vegetal utilizada en la producción de bioetanol se puede dividir en cuatro grupos: biomasa celulósica, tubérculos, jugos de frutas y de caña (Fig. 5; Zamora-Hernández *et al.*, 2014). La preparación de la biomasa requiere su selección, limpieza y reducción de tamaño de partícula mediante la molienda, húmeda o seca. Posteriormente, la biomasa se debe sacarificar para convertirse en azúcares fermentables mediante procesos enzimáticos amilolíticos (α -amilasa, amiloglucosidasa), celulolíticos (celulasas, hemicelulasas) o fisicoquímicos (calor y presión). Finalmente, estos azúcares se fermentan por levaduras (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*) o bacterias (*Zymomonas mobilis*), que sintetizan etanol. La producción de bioetanol a partir de la caña de azúcar (cultivo de zonas tropicales) y la remolacha (cultivo de zonas frías) es un proceso más sencillo, ya que al estar libre la sacarosa, se extrae por medio de la molienda y pasa directamente a la fermentación (BDB, 2008; Jutakanoke *et al.*, 2012; Zamora-Hernández *et al.* 2014).

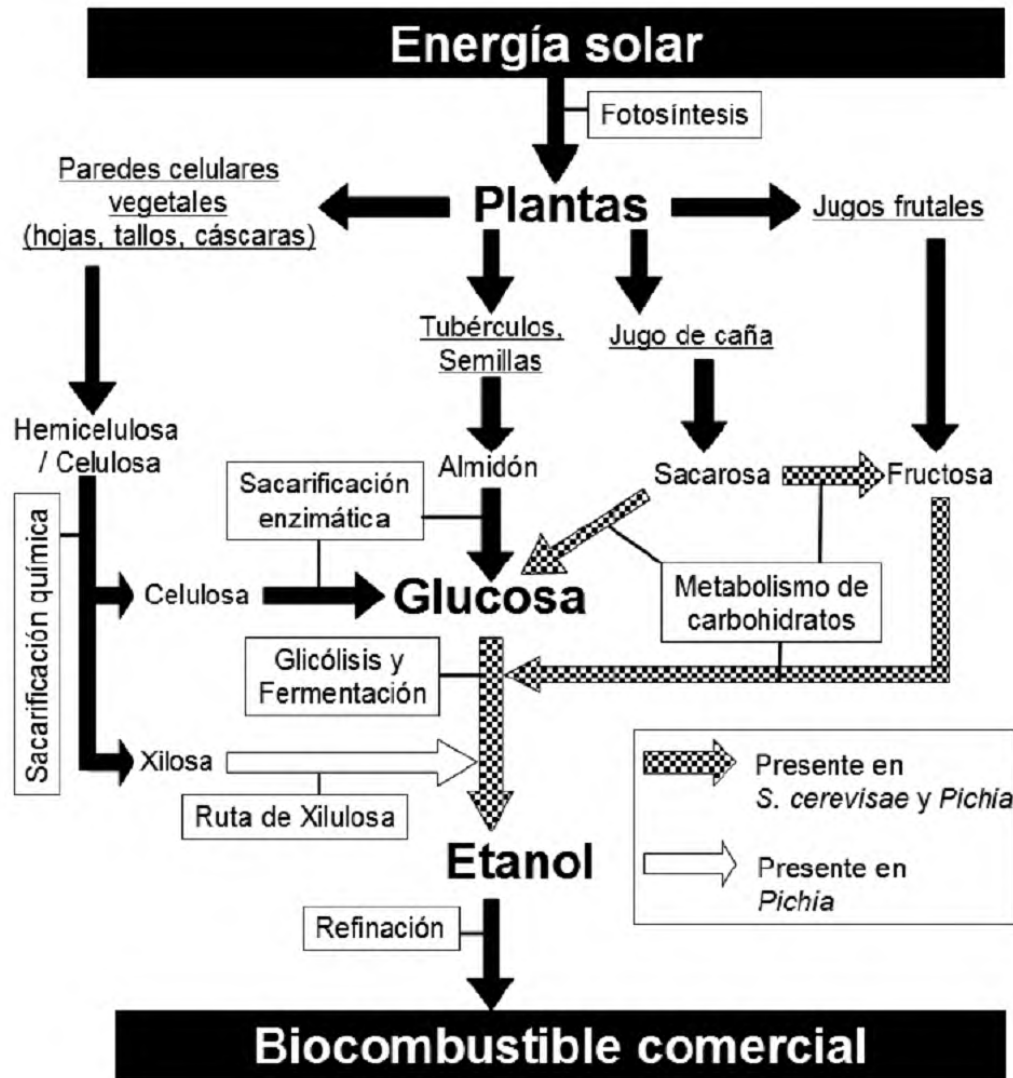


Figura 5. Biotecnología del etanol. Las plantas captan la energía solar y CO₂ durante la fotosíntesis para la producción de carbohidratos estructurales (hemicelulosa y celulosa), de reserva (almidón) y azúcares libres (sacarosa y fructosa). Estos carbohidratos poliméricos como el almidón, la celulosa y la hemicelulosa pueden ser sacarificados por enzimas o métodos fisicoquímicos para liberar monómeros de glucosa fermentables por *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia*. Sin importar la materia prima, el bioetanol se tiene que someter a un proceso de refinación donde se separa, purifica y deshidrata para usarse como biocombustible (Zamora-Hernández *et al.*, 2014).

1.4 Biomasa vegetal como materia prima

La biomasa vegetal se ha empleado durante siglos como fuente de energía. Por ejemplo, en la cocina se usa en forma de madera y ramas secas como leña combustible. Actualmente, debido a la creciente demanda de materiales renovables que sustituyan productos industriales, se le reconsidera como un posible recurso estratégico para la producción de biocombustibles (FAO, 2008; OCDE-FAO, 2013).

El almidón y la celulosa son los principales polímeros de carbohidratos en las plantas y son una de las principales fuentes para la producción de bioetanol. Cada uno tiene su dinámica de acumulación así como diferentes funciones fisiológicas (Streb y Zeeman, 2012; Bahaji *et al.*, 2013).

1.4.1 Almidón como materia prima

El almidón es un biopolímero ampliamente utilizado en la industria alimentaria, textil, papelera, farmacéutica y biotecnológica (Díaz y Carrera, 1999; Liendo *et al.*, 2011). En el área de los biocombustibles, el almidón es el carbohidrato más utilizado ya que es fácilmente sacarificable (Cortés *et al.*, 2010). Los cultivos con alto contenido de almidón para la producción de bioetanol son los cereales, como el maíz, trigo y cebada o los cultivos de raíces o tubérculos que son almacenadores de almidón como la papa o yuca (McLaren, 2005).

El almidón es el principal carbohidrato no estructural de almacenamiento y fuente de energía (Tang *et al.*, 2005; Copeland *et al.*, 2009). Se compone principalmente de amilopectina (70-80%) y de amilosa (20-30%), ambos polímeros están compuestos por D-glucosa (Copeland *et al.*, 2009; Santelia y Zeeman, 2011). La amilosa es una cadena lineal ligada por enlaces α -1,4, mientras que la amilopectina es una cadena ramificada unida por enlaces α -1,6 (Buleón *et al.*, 1998; Santelia & Zeeman, 2011).

Por su estructura semicristalina e insoluble, el almidón forma estructuras superiores denominadas gránulos que varían, según la especie vegetal, en su tamaño y forma (poligonal, esférica, lenticular), contenido, estructura y grado de cristalinidad (Fig. 6). La amilosa y la amilopectina constituyen del 95–99% del peso seco de los gránulos de almidón (Lindeboom *et al.*, 2004; Copeland *et al.*, 2009).

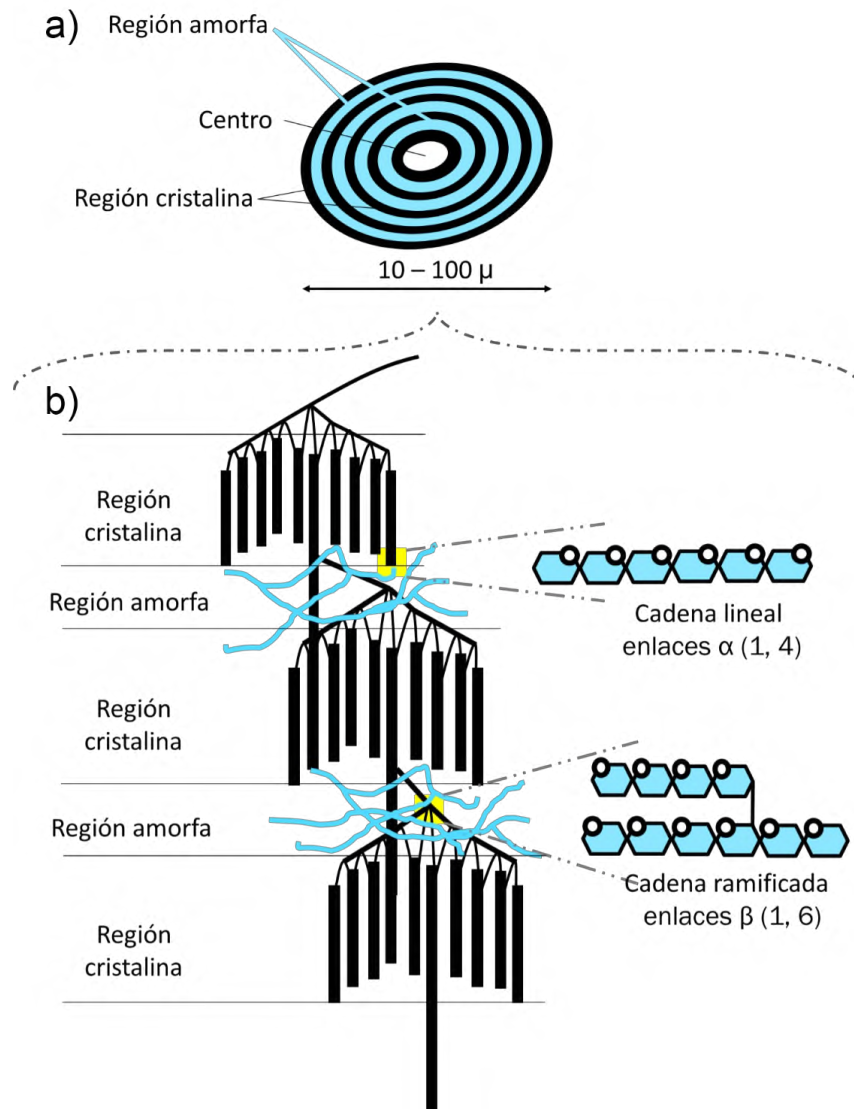


Figura 6. Conformación estructural del gránulo de almidón. a) El almidón se encuentra organizado en forma de gránulos, los cuales tienen una conformación estructural bien definida. Los gránulos de almidón poseen un tamaño (5 a 100 μm) y forma variada (redonda, helicoidal, tetraédrica o irregular), dependiendo de la fuente botánica de donde es extraído. b) El gránulo de almidón está constituido por dos biopolímeros, uno completamente lineal (amilosa) y el otro ramificado (amilopeptina), en la estructura del gránulo existen zonas o regiones amorfas y cristalinas, donde las cadenas están asociadas en forma de hélice. Adaptado de <http://braukaiser.com/wiki/index.php?title=File:Starch.gif>

1.4.2 La pared celular como materia prima

La pared celular vegetal es la principal estructura implicada en el proceso de crecimiento de las plantas y algunas de sus principales funciones son proporcionar soporte a la célula (regulando su forma y volumen) y dar protección mecánica contra patógenos (Fry, 2004; Pérez-Almeida y Carpita, 2006; Iglesias, 2008). La pared celular se compone principalmente de microfibrillas de celulosa (15-30 %), hemicelulosa (10-25%) y lignina (25-30%).

La celulosa se considera el biopolímero más abundante en el planeta, con una producción que oscila entre 10^{10} y 10^{11} toneladas anuales. Independientemente de la fuente vegetal, esta biomasa puede estar presente en hoja, fruta (algodón) o en el tallo y en las estructuras rígidas de las plantas, por ejemplo madera o lino (Lavoine *et al.*, 2012).

La celulosa es el principal polímero que conforma la pared celular de la planta, es de cadena sencilla y no ramificada, formada por la unión de muchas moléculas de glucosa con enlaces β -1,4 (Geisler *et al.*, 2008; Taylor, 2008). Es altamente cristalina y organizada en microfibrillas, copolimerizada con xilosa y hemicelulosa. Tanto la celulosa como la hemicelulosa se encuentran embebidos en una matriz de lignina, que es un polímero amorfo, complejo y formado por moléculas aromáticas (Mutwil *et al.*, 2008; Binder *et al.*, 2010; Trajano *et al.*, 2013). Las funciones fisiológicas de la pared vegetal son dar soporte y protección a la célula, pues al estar estos polímeros incrustados en un reticulado de polisacáridos y copolimerizados de lignina, le da gran rigidez a la pared celular (Leboeuf *et al.*, 2004). Por esta estructura compleja, la hidrólisis enzimática es el principal cuello de botella para la obtención de azúcares a partir de estas materias primas (Himmel *et al.* 2007; Binder *et al.*, 2010; Chuck *et al.*, 2011).

La pared vegetal tiene gran potencial para convertirse en un combustible sustentable, pero para ello, un paso importante es la remoción de material ligninoide con pretratamientos ácidos (ácido clorhídrico o ácido sulfúrico) para romper y abrir la estructura de la pared celular, lo que facilita una mayor obtención de azúcares fermentables (Lionetti *et al.* 2010; Oleskowicz-Popiel *et al.*, 2011). La combinación

adecuada del pretratamiento y las enzimas para una materia prima permite altos rendimientos de azúcares a partir de la hemicelulosa y la celulosa (Binder *et al*, 2010).

1.5 Sacarificación

La sacarificación es la hidrólisis de carbohidratos poliméricos como el almidón y la celulosa en monómeros de glucosa y otros azúcares fermentables (Fig. 7). Se puede realizar de manera fisicoquímica, con enzimas específicas o con tratamientos combinados (Chuck *et al.*, 2011).

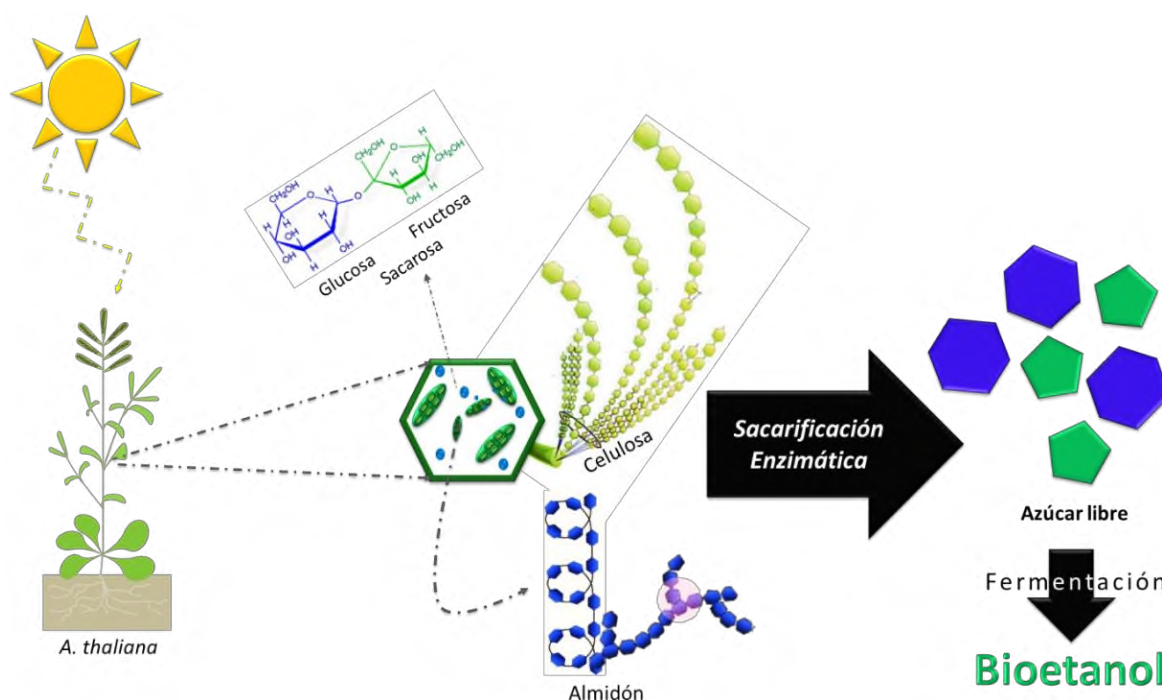


Figura 7. Sacarificación vegetal. La sacarificación es el proceso por el cual la celulosa de la pared celular vegetal y el almidón en los cloroplastos se hidrolizan hasta azúcares fermentables. Para llevar a cabo esta hidrólisis se debe conocer la complejidad de la pared celular vegetal y las dinámicas de acumulación de almidón.

No obstante, existen barreras tecnológicas en la producción del bioetanol a partir de la biomasa vegetal. Para lograr que su producción sea alta y eficiente, se utilizan métodos enzimáticos. Las enzimas implicadas en la sacarificación del almidón son

(Fig. 8), la α -amilasa que hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 y la amiloglucosidasa que es una exohidrolasa que hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 de la amilosa y la amilopectina. En la primera, la hidrólisis se hace al azar sobre varios puntos de la cadena de forma simultánea; en la segunda, se separan las unidades de glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena (Mera *et al.*, 2003; Mera y Carrera, 2005; Zousa y Magalhães, 2010).

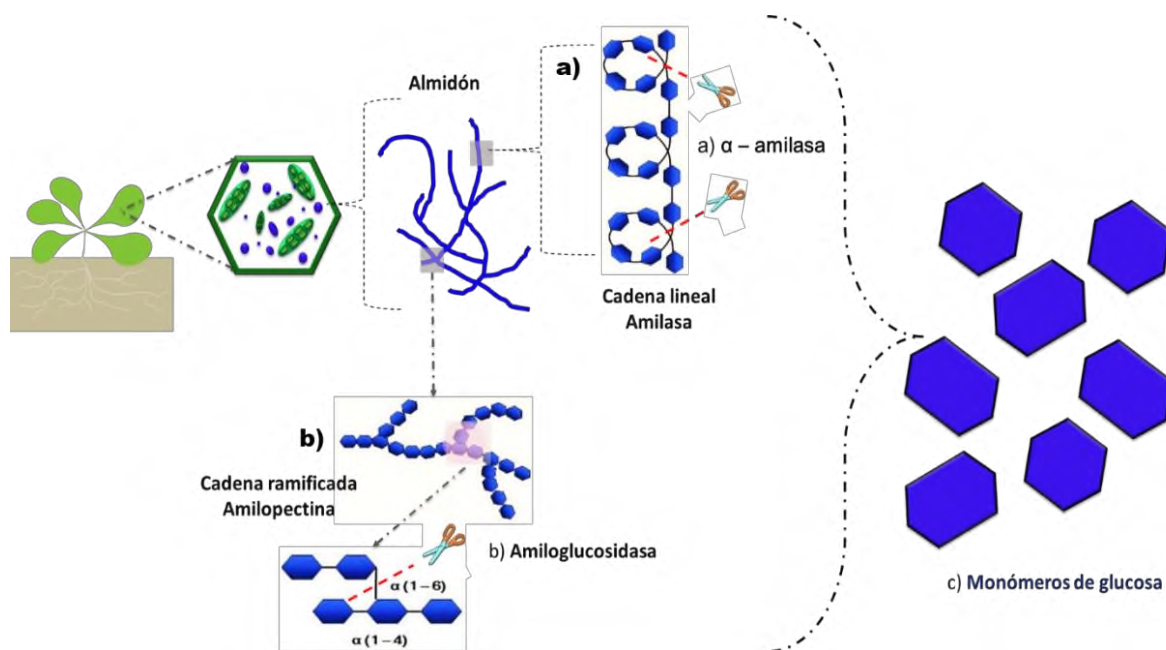


Figura 8. Sacarificación enzimática del almidón. a) la cadena de amilosa se hidroliza por la α -amilasa, cortando al azar los enlaces α -1,4; b) la amilopectina es la cadena ramificada del almidón y se hidroliza en los enlaces α -1,6 y α -1,4 por la amiloglucosidasa, en ambas hidrólisis se obtienen monómeros de glucosa. (Zeeman *et al.*, 2012; Genomasur, 2013).

Las enzimas que se necesitan para sacarificar a la celulosa son las endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Estas enzimas trabajan en conjunto para obtener monómeros de glucosa. Primero, las endoglucanasas atacan sitios internos de las regiones de baja cristalinidad de la fibra de celulosa para transformarla en cadenas de extremos libres. Después, las exoglucanasas atacan los extremos libres, removiendo unidades de moléculas de celobiosa, que son finalmente transformadas en glucosa por la acción de las β -glucosidasas (Fig. 9; Sun y Chen, 2002; Zhu *et al.*, 2009; Talebnia *et al.*, 2010).

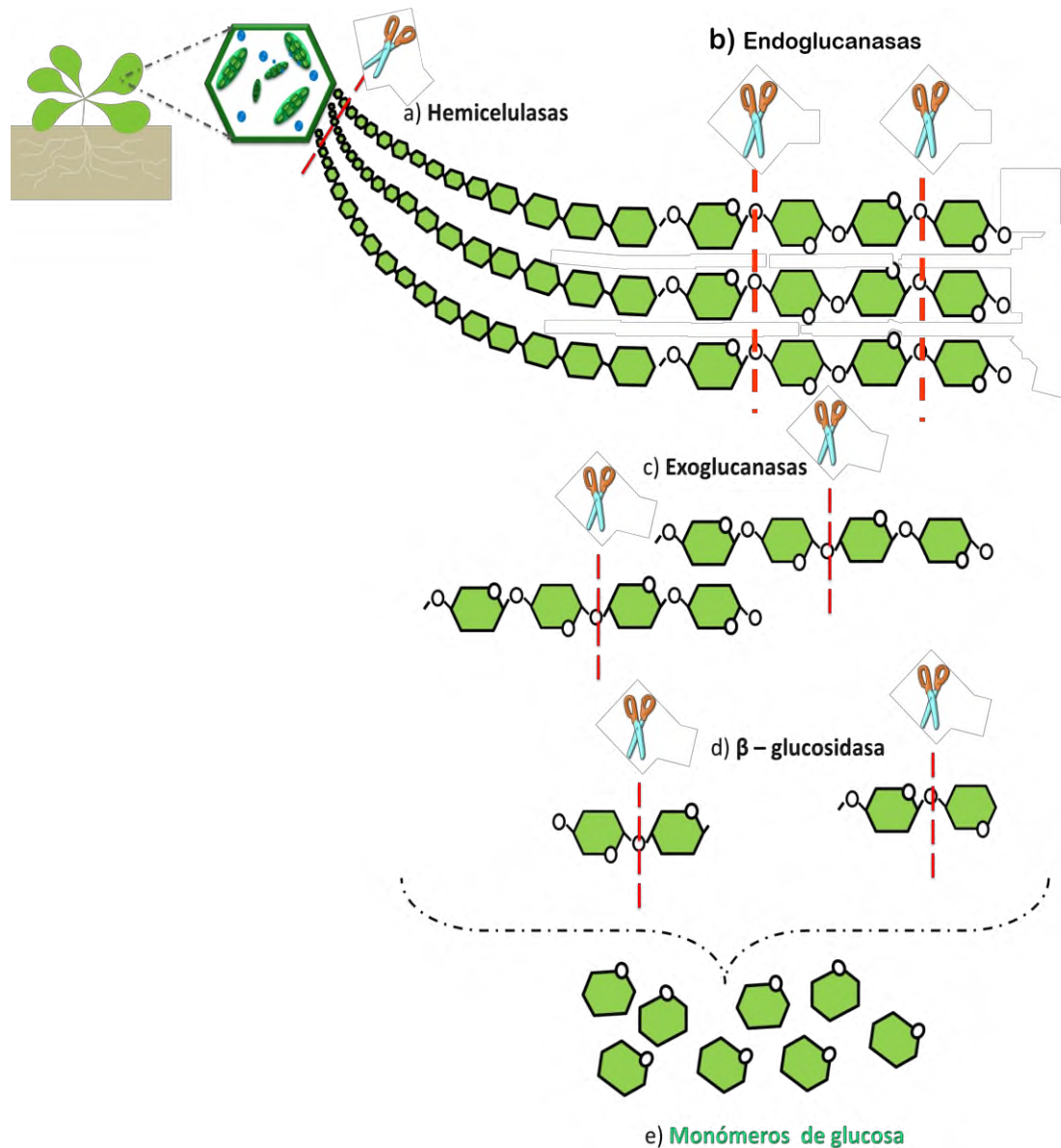


Figura 9. Sacarificación enzimática de la celulosa. En esta hidrólisis interviene un complejo de enzimas que degradan por partes la estructura de la pared celular. a) la hemicelulasa hidroliza las microfibrillas de hemicelulosa que envuelven a la celulosa en una matriz; b) las endoglucanasas rompen los enlaces glucosídicos de la celulosa para formar cadenas lineales de menor tamaño; c) las exoglucanasas atacan los extremos libres de las cadenas originados por la endoglucanasas dando dímeros de glucosa (celobiosa); d) las β -glucosidasas hidrolizan a la celobiosa para formar monómeros de glucosa.

Para mejorar a la biomasa vegetal para la producción de biocombustibles es necesario un aumento en la sacarificación, que se define como la solubilización de los depósitos de carbohidratos de la planta, principalmente del almidón, la pared celular y azúcares libres (Fig. 10; Chuck *et al.*, 2011; Chundawat *et al.*, 2011). El rendimiento de sacarificación es la cantidad de azúcares fermentables liberadas del almidón o paredes celulares después de la solubilización por unidad de biomasa vegetal (Petersen *et al.*, 2012; Nigorikawa *et al.*, 2012).

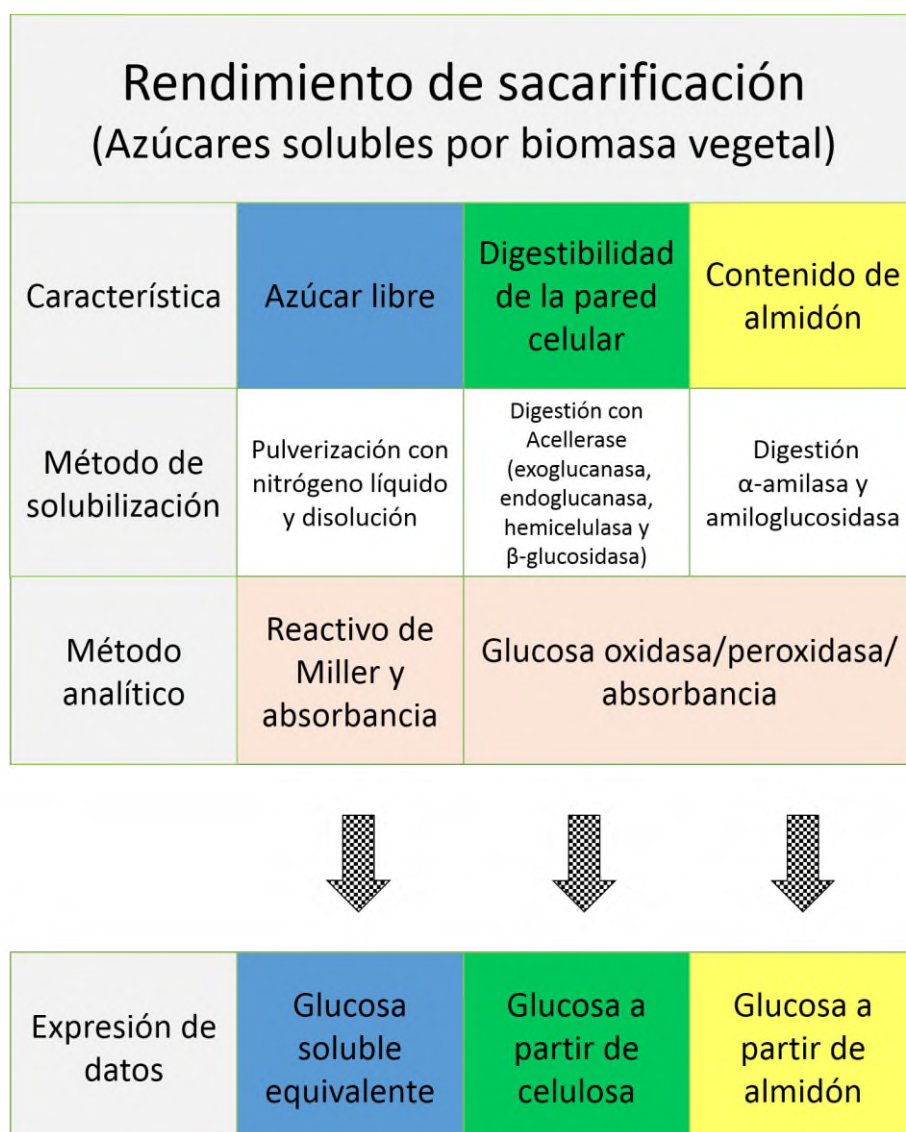


Figura 10. Rendimiento de sacarificación de los compartimentos de carbohidratos en plantas y estrategias de análisis (Nuñez *et al.*, 2015).

1.6 La biotecnología vegetal y la sacarificación.

La comprensión de la localización de carbono en las plantas es la base para el mejoramiento de la sacarificación como una característica de interés biotecnológico. Durante la evolución de las plantas silvestres, el uso de los productos fotosintéticos se priorizó para asegurar la reproducción más que para la acumulación de biomasa; ésta característica no debe dictar la arquitectura final de las plantas que se desean utilizar como materia prima para la fabricación de bioetanol (Stamm *et al.*, 2012).

Con el conocimiento actual del metabolismo del almidón (Streb y Zeeman, 2012; Bahaji *et al.*, 2013), la arquitectura de la amilopectina (Pfister *et al.*, 2014), el uso de carbohidratos en tejidos específicos (Andriotis *et al.*, 2012), las rutas de síntesis de la pared celular y su deconstrucción (Chundawat *et al.*, 2011), y las diferencias entre las plantas domésticas y silvestres (Bennett *et al.*, 2012; Slewinski, 2012), es ahora posible probar diferentes estrategias biotecnológicas para cambiar la localización de carbono y mejorar a la biomasa vegetal en el contexto de la producción de bioetanol de primera y segunda generación.

Las plantas transgénicas se han vuelto una alternativa para obtener cultivos con alto contenido de almidón y mayor rendimiento de sacarificación. Por ejemplo, diferentes plantas mutantes y transgénicas en *Brachypodium distachyon*, *Arabidopsis thaliana* y *Panicum virgatum* tienen una acumulación de 150-250% de almidón más que las silvestres, lo que resulta en una mayor liberación de glucosa en la sacarificación. Estas plantas generalmente tienen floración atrasada o ausente y sus hojas son más estrechas y numerosas con una apariencia juvenil en comparación con las silvestres (Chuck *et al.*, 2011).

En biotecnología, se han seguido diferentes estrategias para cambiar la localización de carbono y mejorar la biomasa vegetal para obtener mayores rendimientos en la sacarificación y en consecuencia, también de bioetanol de primera y segunda generación. En plantas de maíz y *Arabidopsis* hay componentes críticos de la degradación del almidón, principalmente las enzimas glucano agua diquinasas (GWD) que añaden fosfatos al almidón y la fosfatasa fosfogluconasa (SEX4) que elimina estos fosfatos. Al reducir la transcripción de estas enzimas en un 50% con construcciones inducibles con etanol, en las líneas transgénicas se aumentó el

rendimiento de la sacarificación de un 50-300% en comparación con las plantas silvestres (Weise *et al.*, 2012). Al ser una inhibición temporal, las plantas pueden ser diseñadas para que acumulen mayor cantidad de almidón en las hojas sin alterar la biomasa vegetal (Weise *et al.*, 2012).

La modificación de la pared celular podría reducir los pretratamientos y mejorar el proceso general de la sacarificación. Por ejemplo, se demostró que la reducción de lignina en plantas transgénicas de alfalfa mejoran la sacarificación. Sin embargo, estas plantas muestran disminución en su rendimiento de biomasa (Chen y Dixon, 2007).

La pectina es otro biopolímero de la pared celular, está constituido por cadenas de ácido galacturónico (AGA) unidas por enlaces α -1,4 y un grupo variado de metilésteres. La pectina actúa como fortalecedor de la pared celular, afectando la accesibilidad de las enzimas que degradan la pared celular y por lo tanto el proceso de sacarificación. En plantas de *Arabidopsis* y de tabaco se expresaron péptidos inhibidores de la síntesis de la pectina y el rendimiento de sacarificación de celulosa se aumentó de 30-150% (Lionetti *et al.*, 2010).

La sobreexpresión de exoglucanasas en el arroz produjo una sacarificación mejorada en el arroz entre 5 y 60%, pero también varios desarrollos negativos asociados con la modificación de la pared celular como lesiones en los tejidos (Nigorikawa *et al.*, 2012). Stamatiou *et al.* (2013) encontraron mutantes de *Arabidopsis* con mejoras en la liberación de azúcar por hidrólisis con ácido diluido (1 M H₂SO₄), algunas de estas mutantes tienen defectos en el metabolismo del almidón y otras en el transporte de azúcar regulado por la fitohormona auxina.

El rendimiento de la sacarificación del almidón de *P. virgatum* se incrementó con la sobreexpresión del miRNA156 (Chuck *et al.*, 2011). El miRNA156 es un gen que se sobreexpresa en la mutante *CORNGRASS1* (CG1). La expresión del miRNA156 en CG1 inhibe a los factores de transcripción *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE* (SPL) que regulan el control de la fertilidad masculina, el metabolismo del cobre y el tiempo de floración. Las plantas CG1 acumulan más biomasa y durante la etapa juvenil, también glucosa y otros azúcares en comparación con el tipo silvestre. Cuando este miRNA156 se sobreexpresó en *Arabidopsis* y arroz, el fenotipo fue muy similar al de CG1 lo que indica su conservación funcional (Chuck *et al.*, 2011).

1.7 El locus SUB1, la inundación y el almidón

Un estrés abiótico en el que el consumo de carbohidratos, su señalización y el manejo de la energía son muy importantes para la supervivencia es el estrés por inundación. Este estrés ocurre cuando hay un exceso de agua en el suelo y se impide la absorción del oxígeno por las células, lo que provoca que la planta tenga un ajuste en su metabolismo y pase de ser aeróbico a anaeróbico (Fig. 11; Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Fukao y Xiong, 2013). Las plantas deben controlar el consumo de almidón para obtener la energía necesaria y mantener los procesos celulares porque cuando el almidón se agota, se produce la muerte celular (Bailey-Serres *et al.*, 2012).

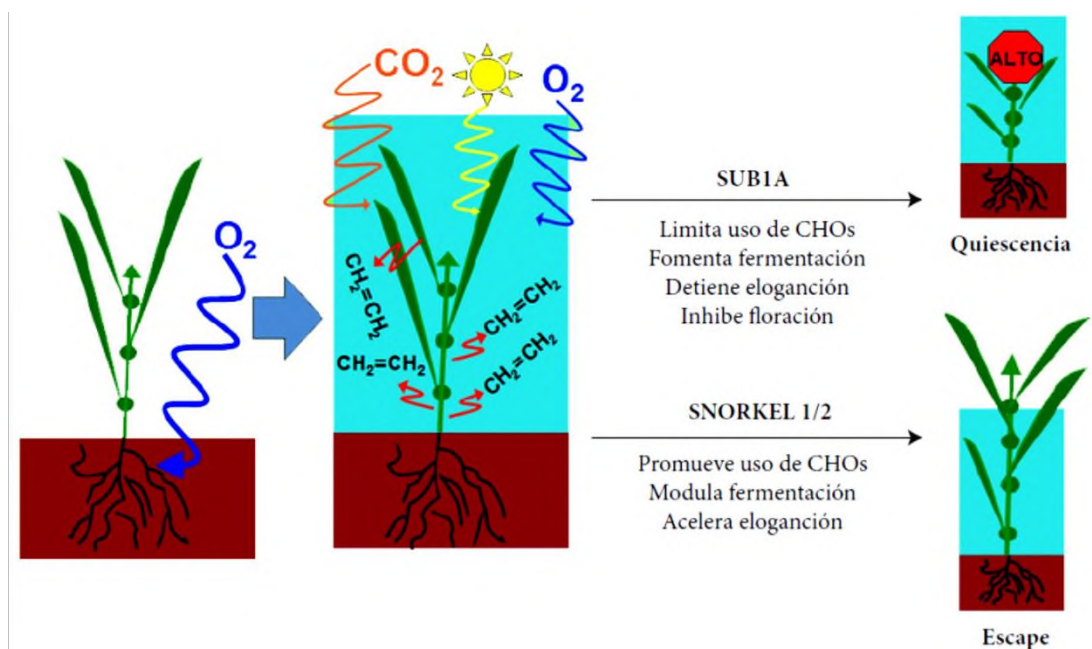


Figura 11. La respuesta al estrés por inundación en el arroz. La inundación provoca la deficiencia de oxígeno y la acumulación de etileno. Cuando la planta se somete a periodos largos de inundación, tiene dos vías para poder sobrevivir. En la quiescencia, el gen *SUB1A-1* inhibe el consumo de carbohidratos y en el escape, los genes *SNORKEL1/2* promueven el uso de carbohidratos para acelerar la elongación (Peña-Castro, 2014).

La respuesta del arroz a la inundación está mediada por el locus *SUBMERGENCE1* (*SUB1*) que se localiza cerca del centrómero del cromosoma 9 (Xu *et al.*, 2006; Septiningsih *et al.*, 2009). *SUB1* contiene tres factores de transcripción de la familia de genes llamada *FACTORES DE RESPUESTA DE ETILENO* (*ERF* por sus siglas en inglés) que son *SUB1A-1*, *SUB1B-1* y *SUB1C-1*; el principal factor genético para la tolerancia es *SUB1A-1* (Fukao *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Perata y Voesenek, 2007). Estos ERFs son del grupo VII, esta familia de genes responden a la acumulación de etileno alrededor de las plantas y actúan como factores de transcripción. *SUB1A-1* aumenta la tolerancia a la inundación al coadyuvar en la expresión de diversas características de conservación de energía como son el retraso de la floración, la limitación de la elongación y la administración del uso de carbohidratos (Xu *et al.*, 2006; Peña-Castro *et al.*, 2011). Una vez que se induce *SUB1A*, se aumenta la sensibilidad al ácido abscísico (ABA), lo que ocasiona el retraso de la elongación mientras que la concentración de almidón y azúcares libres es alta por periodos largos (Fukao *et al.*, 2006).

En un estudio anterior, se demostró que cuando los genes *SUB1A* y *SUB1C* se sobreexpresan en *Arabidopsis* (línea *OxSUB1A* y *OxSUB1C*, respectivamente), se observan cambios en el fenotipo con respecto a las plantas silvestres (Fig. 12). *OxSUB1A* es una planta homocigota de rosetas compactas, con hojas redondeadas y con peciolo más cortos en comparación con Col-0. Debido a la baja producción de semillas de *OxSUB1A*, sólo las líneas parcialmente fértiles se pueden estudiar, la línea *OxSUB1A-L5* sólo produjo semillas después de las primeras 20 flores y la línea *OxSUB1A-L12* produjo semillas en inflorescencias laterales con un desarrollo reproductivo tardío. Las plantas *OxSUB1A* tienen una floración tardía en comparación con Col-0. Las plantas *OxSUB1C* tienen rosetas con menos anomalías pero que incluyen peciolo acortado y hojas desarrolladas hacia abajo y rizadas. Debido a una severa reducción en la producción de la semilla solo existen dos líneas, *OxSUB1C-L6* y *OxSUB1C-L10* (Peña-Castro *et al.*, 2011).

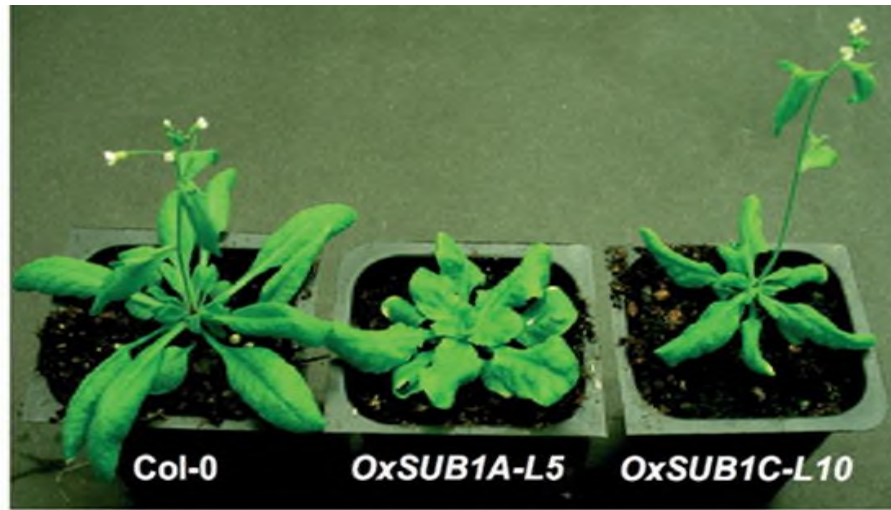


Figura 12. Fenotipos de plantas que sobreexpresan a los ERFs VII de arroz. Plantas bajo fotoperíodo de días largos de *Arabidopsis thaliana*, Col-0, silvestre (Peña-Castro *et al.*, 2011).

1.8 *Arabidopsis* y el almidón

Arabidopsis thaliana L. es una planta modelo, dicotiledónea originaria de Polonia de nombre común “Orejas de ratón” o “Crucífera de Thale”. Tiene un periodo de vida corto de 8 semanas, mide 30 cm y su genoma está completamente secuenciado (AGI, 2000).

En *Arabidopsis*, como en la mayoría de las plantas vasculares, el almidón juega un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos. Es uno de los principales productos de la fotosíntesis en los cloroplastos y sirve para amortiguar el cambio del ciclo diurno a nocturno. El almidón también se acumula en tejidos no fotosintéticos como las semillas y raíces. Este almidón de reserva se deposita en los amiloplastos de las células heterótrofas que actúan como fuente de energía a mediano y largo plazo para impulsar los procesos de crecimiento como la germinación, la floración y la aparición de brotes (Streb y Zeeman, 2012).

En *Arabidopsis*, hay células fotosintéticas que sintetizan almidón, pero no existen órganos de almacenamiento importantes de almidón comparables con las raíces de

yuca o tubérculos de papa. El almidón se acumula transitoriamente en la semilla y está casi ausente en la madurez de ésta (Andriotis *et al.*, 2012; Streb y Zeeman, 2012).

Las investigaciones sobre el metabolismo del almidón en *Arabidopsis* se iniciaron en la década de los 80 como el primer paso en ingeniería genética de plantas para obtener niveles alterados de almidón (Streb y Zeeman, 2012). Esos estudios han sido fundamentales en el establecimiento de las rutas de biosíntesis y degradación del almidón así como de los factores que determinan su estructura y propiedades (Zeeman *et al.*, 2007).

Arabidopsis es un sistema excelente para probar las estrategias de mejoramiento de la sacarificación porque el almidón aumenta en grandes cantidades en un periodo corto, puede controlarse la proporción de almidón alterando los parámetros ambientales y su genoma está totalmente secuenciado (Zeeman *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICACIÓN

En México y otros países, los combustibles fósiles se están agotando debido a la gran demanda y por las diferentes aplicaciones que tienen en procesos industriales. Esta dependencia energética absoluta de nuestro país, hace que las fluctuaciones económicas mundiales en el precio del petróleo causen desestabilizaciones sociales severas.

Por ello, es importante proponer nuevas tecnologías alternativas y sustentables para disminuir el uso de combustibles fósiles y abrir nuevos mercados energéticos soberanos, lo que traería al país cambios sustanciales en materia de energías alternas y contribuiría a mejorar las condiciones del medio ambiente.

De los biocombustibles disponibles, el bioetanol es uno de los principales, especialmente en las zonas tropicales. Su producción requiere de biomasa vegetal como materia prima que sea fácilmente sacarificable, es decir, que sea energética y económicamente factible de solubilizar hasta carbohidratos fermentables por microorganismos industriales productores de etanol.

De esta forma, se hace necesario buscar alternativas biotecnológicas para mejorar genéticamente a las plantas y optimizar el rendimiento de la sacarificación de la biomasa vegetal utilizada para la producción de bioetanol.

En esta tesis, se emplearon a las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* *OxSUB1A* y *OxSUB1C* como prototipos funcionales para explorar su potencial de ser una opción tecnológica para mejorar la sacarificación vegetal. La lógica detrás de esta propuesta es que se puede transferir, mediante la expresión de los ERFs, las características de conservación de carbono que se observan en el arroz durante la respuesta a la inundación.

3. HIPÓTESIS

La sobreexpresión del gen *SUB1A-1* en *Arabidopsis thaliana* (Col-0) ocasionará que se acumule mayor cantidad de almidón en hojas aumentando su rendimiento de sacarificación (Fig. 13).

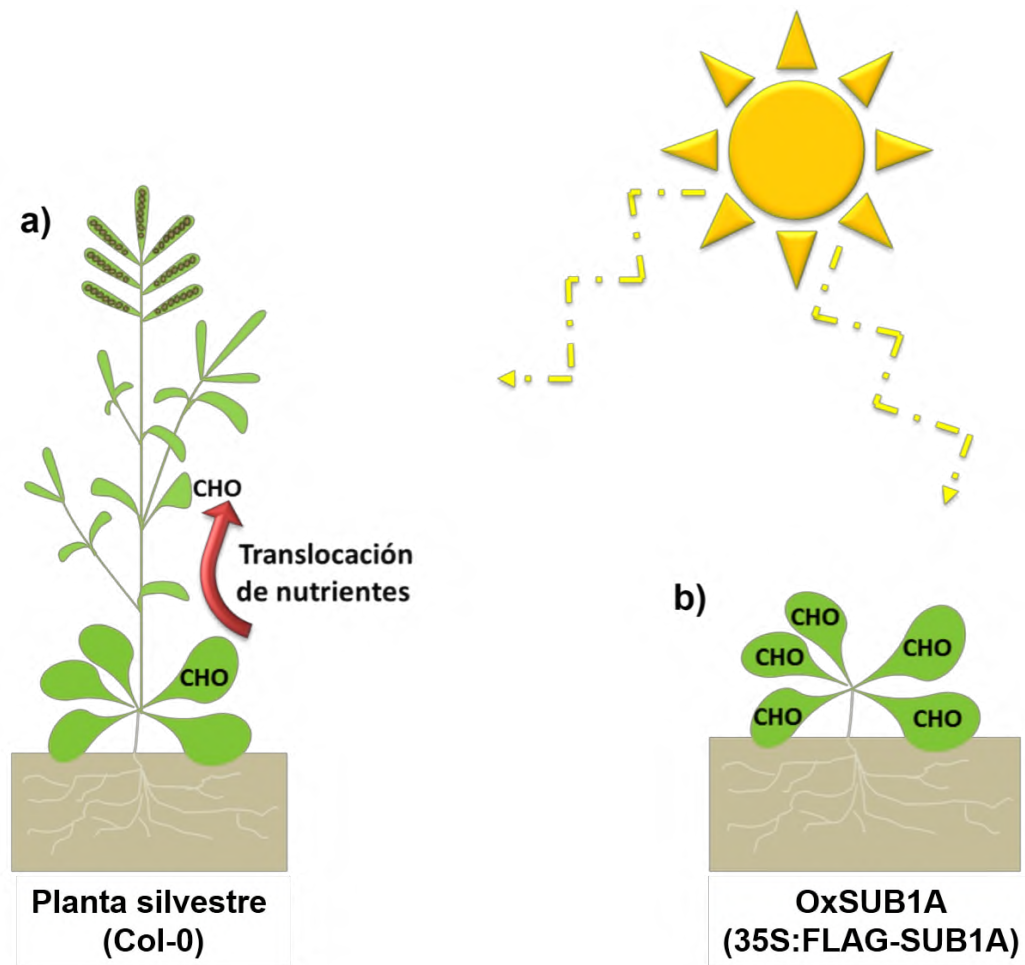


Figura 13. Posible efecto de la sobreexpresión del gen *SUB1A-1* en *Arabidopsis*. a) En las plantas silvestres el almidón se degrada para sostener la producción de flores y semillas; b) en las plantas transgénicas que expresan el gen *SUB1A-1*, los carbohidratos se acumularán en las hojas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Caracterizar el efecto de la sobreexpresión de *SUB1A-1* en el rendimiento de sacarificación de *Arabidopsis thaliana* y analizar si es una estrategia promisoría para mejorar genéticamente a la materia prima vegetal disponible para la producción de bioetanol.

4.1.1 Objetivos Específicos

1. Determinar el contenido de glucosa del genotipo silvestre (Col-0) y transgénicos (*OxSUB1A* y *OxSUB1C*) de *Arabidopsis* con tratamientos celulolíticos (Accellerase, método I) en la sacarificación al finalizar el día.
2. Evaluar el efecto de la combinación de tratamientos celulolítico y amilolítico (amilasa y amiloglucosidasa, método II) en la sacarificación de los genotipos al finalizar el día.
3. Comparar las dinámicas de acumulación de almidón, en los genotipos durante cuatro puntos diurnos y de desarrollo.
4. Obtener información biológica que indique el mecanismo de acumulación de almidón.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material Vegetal

Se utilizó a *Arabidopsis thaliana* Col-0 como el tipo silvestre. Las líneas transgénicas que se utilizaron fueron L5 y L12 para *OxSUB1A* y L6 y L10 para *OxSUB1C* (Fig. 14). Estas líneas fueron donadas por la Dra. Julia Bailey-Serres de la Universidad de California en Riverside y su caracterización fenotípica se reportó previamente por Peña-Castro *et al.* (2011).

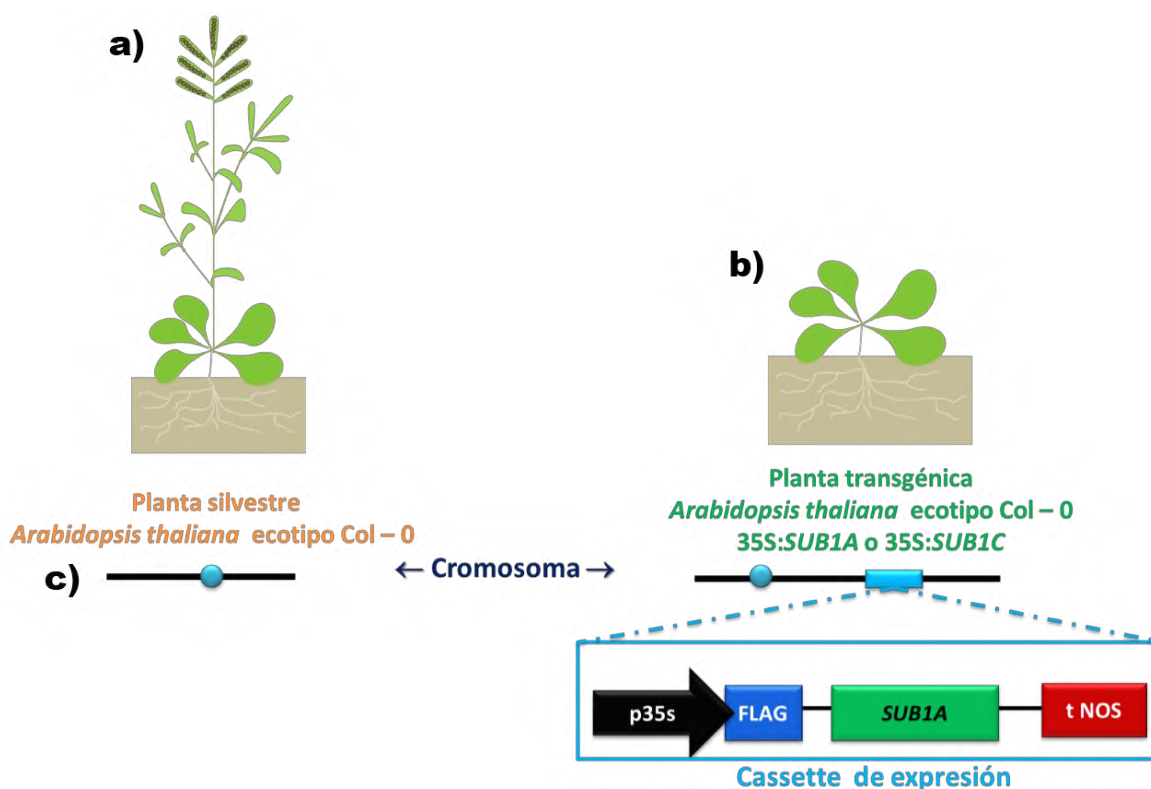


Figura 14. Esquema de diferencias de *Arabidopsis* silvestre y transgénica y el casete de expresión. a) Planta silvestre *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0; b) esquema de una planta transgénica de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 35S:SUB1A; c) cromosoma de una planta silvestre y de una transgénica, se observa que el casete de expresión de la planta transgénica está constituido por un promotor fuerte 35S, una etiqueta inmunológica FLAG N-terminal, el gen *SUB1A-1* o *SUB1C-1* y el terminador NOS.

5.2 Condiciones de crecimiento

Las semillas se desinfectaron en 1 ml de etanol al 70% por 5 min con agitación constante, seguido por un tratamiento en solución de hipoclorito de sodio al 2.7% (presentación comercial Cloralex al 50% en agua) por 2 min y 4 lavados con 1 ml de agua desionizada estéril. Las semillas se incubaron a 4°C por 4 d para romper su dormancia. Se germinaron en placas de medio MS (sacarosa 1%, sales Murashige-Skoog 0.5X, pH 5.7, agar 1%) y se dejaron crecer por 7 d. Enseguida, se transfirieron al sustrato (Sunshine Mix #3, perlita blanca en una relación 1:4 v/v), previamente esterilizado en autoclave durante 1 h. Posteriormente, el sustrato esterilizado se mezcló con 3% (w/w, 16.6 g para 4 l de mezcla) de fertilizante NPK (12:12:17) después de enfriarse (Anexo B). Las plántulas se trasplantaron en charolas de 38 pozos y se cubrieron con un domo traslúcido por 4 d para permitir la retención de agua y el crecimiento de las plántulas. A partir de que se retiró el domo, las plantas se regaron cada tercer día por absorción durante 5 min con agua potable filtrada.

Arabidopsis se creció en una cámara controlada (Conviron Adaptis CMP6010) bajo las siguientes condiciones: humedad relativa del 60%, intensidad de luz de 150 $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad. Estos parámetros se confirmaron con un registrador gráfico de humedad y temperatura (Extech Instruments, modelo RH520). Las comparaciones se realizaron estrictamente entre plantas que habían crecido en el mismo panel de la cámara para eliminar cualquier efecto diferencial de la iluminación.

5.3 Colecta de plantas

Las rosetas de *Arabidopsis* se colectaron a los 22 d de edad, es decir, un día después de la floración de Col-0. Para ello, se retiró el tallo floral y la raíz, y se colocaron en un papel aluminio (10-15 cm^2) previamente etiquetado y pesado. Se colocó la roseta, se registró su peso, se envolvió y se sumergió en nitrógeno líquido (N_2). Los tejidos se almacenaron a -80°C. Para los experimentos, las rosetas se molieron en un mortero con N_2 líquido hasta un polvo fino (Anexo C).

5.4 Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron por el método de DNS (Anexo D). Se pesaron alrededor de 100 mg de polvo de roseta sin permitir el descongelamiento con la ayuda de N₂ líquido y se registró el peso para cálculos posteriores. El polvo se suspendió en *buffer* de acetatos (acetato de sodio 0.1 M, pH 5.0, Anexo A). Se homogenizaron las muestras durante 5 min y se colectaron 100 µl, se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min. En microtubos de 1.5 ml se colocaron 100 µl de reactivo DNS y se añadieron 100 µl de muestra. Se homogenizó la mezcla utilizando el vortex a máxima velocidad, se colocó en baño de agua a ebullición durante 5 min, y posteriormente, se añadió 1 ml de agua destilada. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV/VIS a 545 nm. Antes de cada medición de azúcares reductores, se realizó una curva de calibración de concentración de glucosa g 100 ml⁻¹ vs absorbancia 545 nm, se usaron las que tuvieron un coeficiente de correlación mínimo de 0.98.

5.5 Sacarificación de la biomasa lignocelulósica

La sacarificación enzimática se realizó según lo propuesto por Chuck *et al.*, (2011) para cuantificar el rendimiento de la biomasa lignocelulósica. Se utilizó el complejo enzimático comercial Accellerase 1500 (Genencor, Cedar Rapids, EUA) que contiene una mezcla de exoglucanasa, endoglucanasa, hemicelulasa y β-glucosidasa (Anexo E). La cantidad de enzima a utilizar fue la recomendada por el fabricante (Fig. 15; 1.68 ml por cada 7 g de biomasa, 2200-2800 CMC U g⁻¹) y se agregó a la suspensión de polvo macerado preparado en la sección 5.4. Se incubó la mezcla en un agitador rotatorio a 11 rpm (HL-2000 HybriLinker, UVP) por 24 h a una temperatura de 50°C. La enzima se inactivó térmicamente a 70°C por 15 min. Se clarificó la solución con una centrifuga (Pico 21, Eppendorf) a 13,000 rpm por 5 min y se tomó una alícuota de 1 ml. El sobrenadante se utilizó inmediatamente o se almacenó hasta dos días a 4°C para posteriores determinaciones de almidón. Todos los experimentos se realizaron con al menos cinco muestras y triplicados biológicos. La determinación de glucosa derivada de la celulosa se realizó con la enzima glucosa oxidasa del kit K-TSA

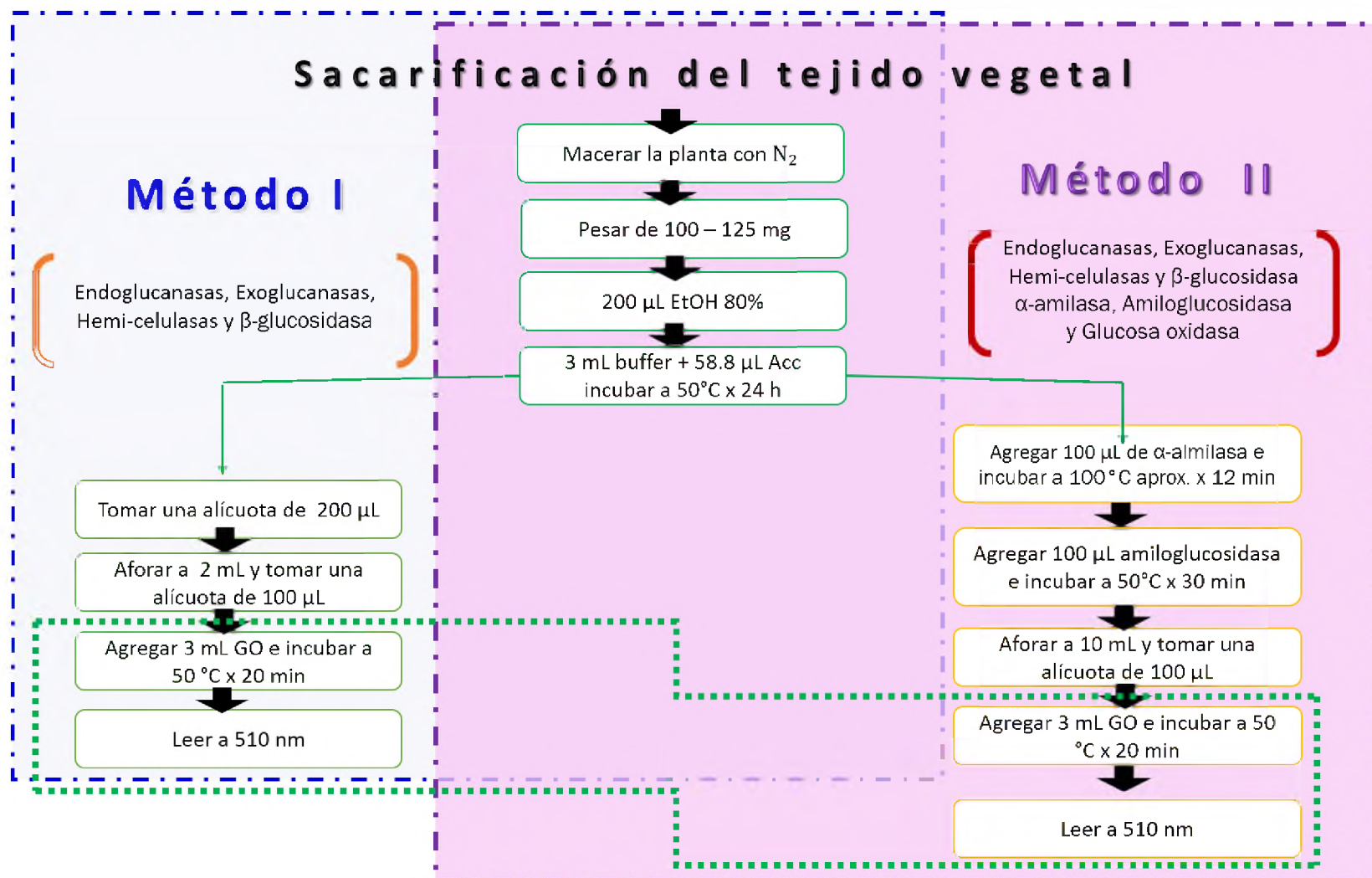


Figura 15. Diagrama de flujo de la sacarificación del tejido vegetal.

(Megazyme, Bray, Irlanda) mediante una incubación a 50°C por 20 min y la lectura espectrofotométrica a 510 nm (Anexo A).

5.6 Sacarificación de la biomasa lignocelulósica y el almidón

Para cuantificar el almidón, se realizó una sacarificación amilolítica de las muestras de la sección 5.5. Se hidrolizaron con el kit comercial de almidón K-TSA (Megazyme, Bray, Irlanda) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción enzimática se llevó a cabo en tubos de plástico de 15 ml, donde se agregaron 100 µl de α -amilasa termoestable para hidrolizar los gránulos de almidón a 100°C en un baño de agua previamente preparado por 12 min y homogenizando por vortex a los 4, 8 y 12 min. Posteriormente, se atemperaron en un baño de agua a 50°C por 12 min antes de agregar 100 µl de amiloglucosidasa, entonces, se incubaron a 50 °C por 30 min. Se aforaron las muestras a 10 ml con agua desionizada, se tomó una alícuota de 1 ml y se centrifugó a 4,300 rpm por 5 min. Por último, se tomaron duplicados de 100 µl del clarificado para la determinación de la concentración de glucosa con glucosa oxidasa. Todos los experimentos se realizaron por duplicado técnico, triplicado experimental y cinco replicas biológicas.

5.7 Fluorescencia de Clorofila

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila se determinaron utilizando un fluorómetro (OS-30p Chlorophyllly Fluorometer, OptiSciences) según las instrucciones del fabricante. Antes de la medición, las plantas fueron adaptadas durante 12 min a la oscuridad. Se trabajó con *Arabidopsis* de 27 d tanto en Col-0 como con las plantas transgénicas. Los experimentos se realizaron simultáneamente entre un sistema abierto y cerrado con domo. Se cuantificó la eficiencia del PSII (F_v/F_m), fluorescencia máxima (F_m), fluorescencia variable (F_v) y neutral (F_o), la relación de la variable neutra del incremento de florescencia (F_v/F_o).

5.8 Tinción con yodo

Para observar macroscópicamente el almidón, las plantas se cosecharon al final del día y de la noche. El protocolo que se utilizó se adaptó de los propuestos por Zeeman *et al.*, (1998), Bahaji *et al.*, (2011) y Ovecka *et al.*, (2012).

Las plantas se infiltraron inmediatamente en vacío con una solución de formaldehído al 3.7% en *buffer* de fosfatos (0.1 M, pH 6.6). La clorofila se removió con etanol caliente (75-80 °C) al 80% durante 30 min en agitación constante 3-4 rpm (Rocker Shaker, Cole-Parmer). Las muestras se rehidrataron con agua desionizada por 30 s y se tiñeron con una solución de yodo [KI 2% (w/v), I₂ 1% (w/v)] durante 30 min en oscuridad (ya que la solución de yodo es fotosensible), se enjuagaron aproximadamente por 2 h hasta que la coloración del almidón en la planta fue azul (Anexo F).

5.9 Resistencia a la fractura

Para medir la resistencia a la fractura de las plantas de *Arabidopsis* se empleó un texturometro (Brookfield CT325k) equipado con una sonda TA-FSF. Se utilizaron las 3 hojas más extendidas de plantas de 22 d. Se apilaron y colocaron en una base fija para ser perforadas evitando la vena central, la resistencia se expresó en la fuerza (Newton) aplicada para atravesar el tejido.

5.10 Microscopia electrónica de barrido de gránulos de almidón.

Para llevar a cabo el proceso de extracción del almidón se pesaron 2.5 g de hojas de *Arabidopsis* evitando el descongelamiento con N₂ líquido. Se hidrataron en 40 ml de agua destilada, posteriormente se sonicaron durante 10 min a 100% de potencia, 20% de amplitud e intensidad de 50% (sonicador UP200ST-TD, Hielscher) y se centrifugaron durante 5 min a 4,754 g (Rotina 420, Hettich). El sedimento se lavó dos veces con 50 ml de agua destilada, se filtró en una malla de 100 µm (Retsch GmbH) para eliminar los restos de planta. El filtrado se centrifugó y se filtró a través de una

membrana de 20 μm , se centrifugó y el sedimento se lavó con 20 ml de etanol puro. Las muestras de almidón de *Arabidopsis* (Col-0 y OxSUB1A) se espolvorearon sobre una cinta de cobre de doble adhesión, la cual se fijó en un pin (porta especies) de aluminio del microscopio electrónico de barrido (Helios Nanolab 600, Fei), estos se recubrieron con una capa de oro de 5 nm, se observaron al microscopio a un voltaje bajo de 5 kV y se tomaron fotografías.

5.11 Análisis cuantitativo de la expresión de genes (qPCR)

Las plántulas de *Arabidopsis* se cultivaron en agar MS 0.5x enriquecido con 1% o sin sacarosa por 7 d. Se cosecharon a las 14 h (dos h antes del final del día) en N_2 líquido. La extracción de ARN total, su purificación y controles de calidad se realizaron como se detalla en los Anexos I, J y K. Se utilizaron datos de tres microarreglos previamente reportados (Peña-Castro *et al.*, 2011) para encontrar genes involucrados en la síntesis o degradación del almidón que pudieran tener su expresión alterada por la presencia del gen *SUB1A-1* (Anexo L). Con base a este análisis, se seleccionaron los siguientes genes y sus respectivos oligonucleótidos, para medir su expresión mediante PCR cuantitativa, como se detalla en el Anexo L. Los oligonucleótidos utilizados para *TUBULIN2* (*TUB2*, At1g65480) se reportaron en Wenkel *et al.*, (2006), los de *ACTIN2* (*ACT2*, At3g18780), *GLUCAN WATER-DIKNASE 1* (*GWD1*, At1g10760) y la fosfoglucono-fosfatasa *STARCH EXCESS 4* (*SEX4*, At3g52180) se reportaron en Zeeman *et al.*, (2012); los de *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 3 - 5* (*SLP3-5*, At2g33810, At1g53160, At3g15270), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*, At2g45660) y *FRUITFUL* (*FUL5*, At5g60910) se reportaron en Wahl *et al.*, (2013).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Fenotipos de líneas transgénicas *OxSUB1A* y *OxSUB1C*

Se analizaron plantas de *Arabidopsis* silvestres (Col-0) y dos líneas transgénicas independientes sobreexpresantes del gen *SUB1A-1* y del gen *SUB1C-1*. Para el gen *SUB1A-1* las plantas fueron etiquetadas como *OxSUB1A-L5* y *OxSUB1A-L12*; para las plantas con el gen *SUB1C-1* estas se denominaron *OxSUB1C-L6* y *OxSUB1C-L10* (Fig. 16).

En comparación con Col-0, las plantas *OxSUB1A* son compactas, con peciolo cortos, hojas débiles y suaves en apariencia, semiestériles y de floración tardía. Las plantas *OxSUB1C* son muy similares a Col-0, salvo que la mayoría son estériles. Con esta información, se decidió realizar el primer análisis en plantas cercanas al tiempo de floración.

Para decidir la recolección de las plantas, se siguió el tiempo de floración por observación del brote del tallo floral. De esta forma, las líneas transgénicas de *SUB1A-1* florecieron de 5-7 d después de Col-0 (Tabla 1). Así, se tomó de referencia para la recolección de las rosetas el momento de la aparición del brote floral en Col-0 que fue a los 21 d. La lógica de esta selección fue que si las plantas utilizan los carbohidratos en el momento de transición de la etapa juvenil a la etapa madura para sostener energéticamente la etapa reproductiva (Ortiz-Marchena *et al.*, 2014), las plantas *OxSUB1A* al tener un tiempo de floración tardío, podrían contener más carbohidratos.

Tabla 1. Inicio del brote floral en plantas de *Arabidopsis* Col-0 y *OxSUB1A*

Genotipo	Edad (d)
Col-0	21 ± 0.1 ^a
<i>OxSUB1A-L5</i>	28.3 ± 0.7 ^b
<i>OxSUB1A-L12</i>	26.7 ± 1. ^b

Diferentes letras indican diferencia significativa entre los genotipos ($P < 0.01$, *t*-Student), los valores son promedios ± Desviación Estándar, $n=12-15$.



Figura 16. Diferencia de los fenotipos entre WT y las plantas transgénicas. Fenotipos de Col-0 (Silvestre) y ambas líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* *OxSUB1A* con sus dos líneas expresantes L5 y L12 que no presenta el tallo floral; *OxSUB1C* ambas líneas L6 y L10 presentan el tallo floral al igual que la silvestre.

6.2 Verificación del funcionamiento de Accellerase 1500

Para demostrar la eficiencia del coctel celulolítico Accellerase 1500 en *Arabidopsis*, los macerados de plantas transgénicas *OxSUB1A-L5* se incubaron con y sin Accellerase 1500. Las plantas hidrolizadas liberaron una mayor cantidad de carbohidratos reductores libres, incrementando su concentración en un 700% con respecto a las que no fueron hidrolizadas (Fig. 17). Así, se demostró la viabilidad del complejo enzimático Accellerase 1500 para poder utilizarlo en la sacarificación celulósica y amilolítica.

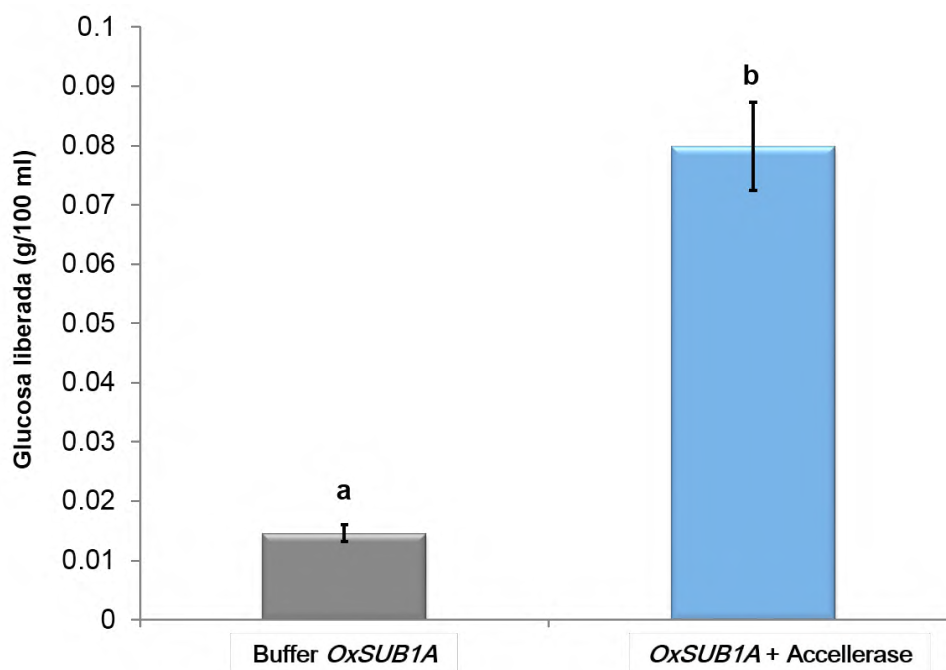


Figura 17. Contenido de carbohidratos reductores libres en plantas *OxSUB1A* sin y con Accellerase 1500. Se usaron plantas de 28 d y se cuantificó por DNS. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$, t-Student). Los valores son promedios de dos repeticiones experimentales independientes, cada una con $n = 5$ plantas. Las barras de error son $\pm$ Error Estándar.

Para observar el tiempo que le toma al complejo Accellerase 1500 llegar a la máxima capacidad de digestión, se midió el rendimiento de liberación de glucosa de

las plantas de Col-0 y *OxSUB1A-L5* durante una cinética de digestión de 36 h. Se observó que en ambos genotipos, se alcanzó a las 12 h de la digestión la máxima liberación de glucosa y permaneció estable hasta las 36 h que se estudiaron (Fig. 18). También se registró en *OxSUB1A-L5* un incremento en la glucosa liberada de 16% con respecto a Col-0. Por tal motivo, las digestiones en los siguientes ensayos con Accellerase 1500 se colectaron a las 24 h.

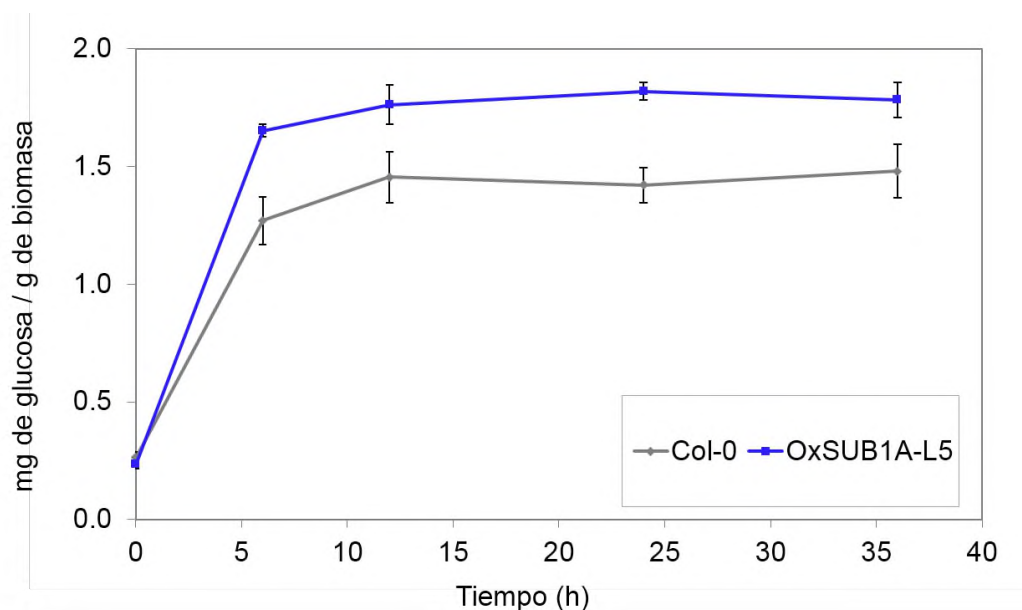


Figura 18. Cinética de sacarificación con Accellerase 1500 durante 36 h. Se usaron plantas de 22 d. Los valores son promedios de dos experimentos independientes, cada uno con $n = 5$. Las barras de error son $\pm$ Error Estándar. El contenido de glucosa se midió con glucosa oxidasa y se reporta como glucosa liberada.

6.3 Mejoramiento de la sacarificación

La determinación del rendimiento de la sacarificación del almidón y la pared celular en plantas transgénicas *OxSUB1A* y *OxSUB1C*, se realizó con el protocolo propuesto por Chuck *et al.*, (2011) donde el tejido vegetal se digiere en dos etapas en serie. En la primera reacción, se utiliza al coctel enzimático celulósico Accellerase 1500 para hidrolizar a la celulosa de la pared celular en monómeros de glucosa. La segunda reacción es amilolítica, el tejido se digiere con α -amilasa y amiloglucosidasa para

generar glucosa a partir de almidón. Ambas digestiones se expresan como glucosa liberada por peso de planta y se normalizaron para que el valor 1 fuera el de Col-0.

Para este ensayo, se colectaron las plantas a los 22 días de edad al final del día (fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad). La determinación de azúcares reductores libres se llevó a cabo previo al tratamiento enzimático. Al comparar la concentración de azúcares reductores libres en Col-0 y las plantas transgénicas, la línea *OxSUB1A-L5* mostró un 37% ($7 \pm \text{ES}$) más que Col-0, y la línea *OxSUB1A-L12* no mostró diferencia significativa. Las plantas transgénicas *OxSUB1C-L6* no tuvieron diferencia significativa con respecto al Col-0, mientras que las plantas *OxSUB1C-L10* tuvieron una disminución en el contenido de azúcares reductores libres (Fig.19).

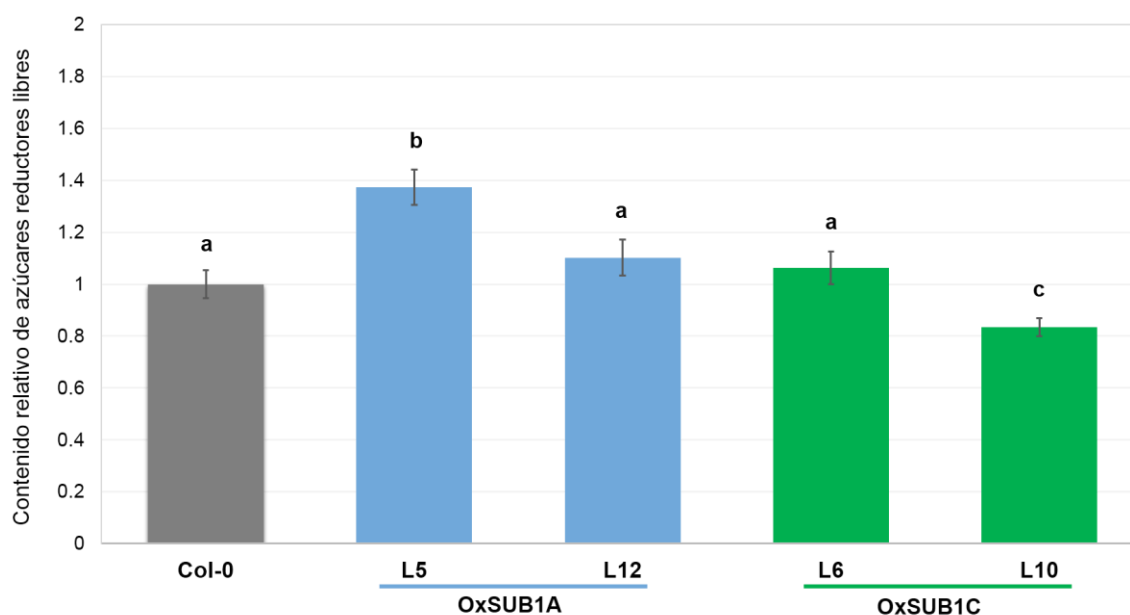


Figura 19. Contenido relativo de azúcares reductores libres, sin tratamiento enzimático de plantas se colectaron al final del fotoperiodo. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre los genotipos ($P < 0,05$, t-Student). Los valores son promedios de dos repeticiones experimentales independientes, cada una con $n = 5$ plantas. Las barras de error son $\pm$ Error Estándar. Los datos reportados se normalizaron con el valor de Col-0 ($4.0 \text{ mg de azúcares reductores g}^{-1} \text{ peso fresco}$)

En el tratamiento celulolítico, las líneas *OxSUB1A-L5* y *OxSUB1A-L12* tuvieron un rendimiento de glucosa proveniente de celulosa de un 16% (± 8 ES) y 23% (± 10 ES) más que Col-0. La línea *OxSUB1C-L6* no presentó diferencia significativa en el rendimiento celulolítico, pero en *OxSUB1C-L10* se observó una disminución de 38% en comparación con Col-0 (Fig. 20).

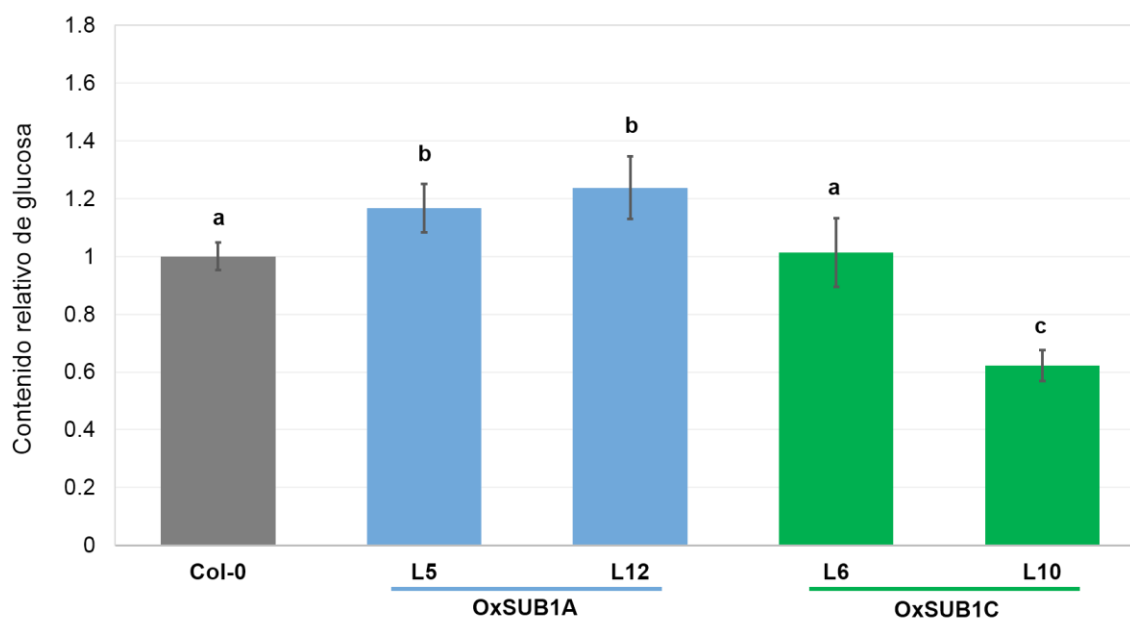


Figura 20. Rendimiento relativo de glucosa con tratamiento celulolítico. Las plantas se colectaron al final del fotoperiodo. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre los genotipos ($P < 0,05$, t -Student). Los valores son promedios de tres repeticiones experimentales independientes, cada una con $n=5$ plantas. Las barras de error son $\pm$ Error Estándar. Los datos reportados están normalizados con el valor de Col-0 (1.0 mg de glucosa g⁻¹ peso fresco).

En el tratamiento amilolítico, las plantas *OxSUB1A-L5* y *OxSUB1A-L12* tuvieron un rendimiento de glucosa proveniente del almidón, superior en un 88% (± 8 ES) y 36% (± 10 ES) respectivamente, en comparación con Col-0. Mientras que *OxSUB1C-L6* tuvieron un rendimiento del 25% más (± 10 ES), y *OxSUB1C-L10* tuvieron un decremento del 7% (± 0.5 ES; Fig. 21).

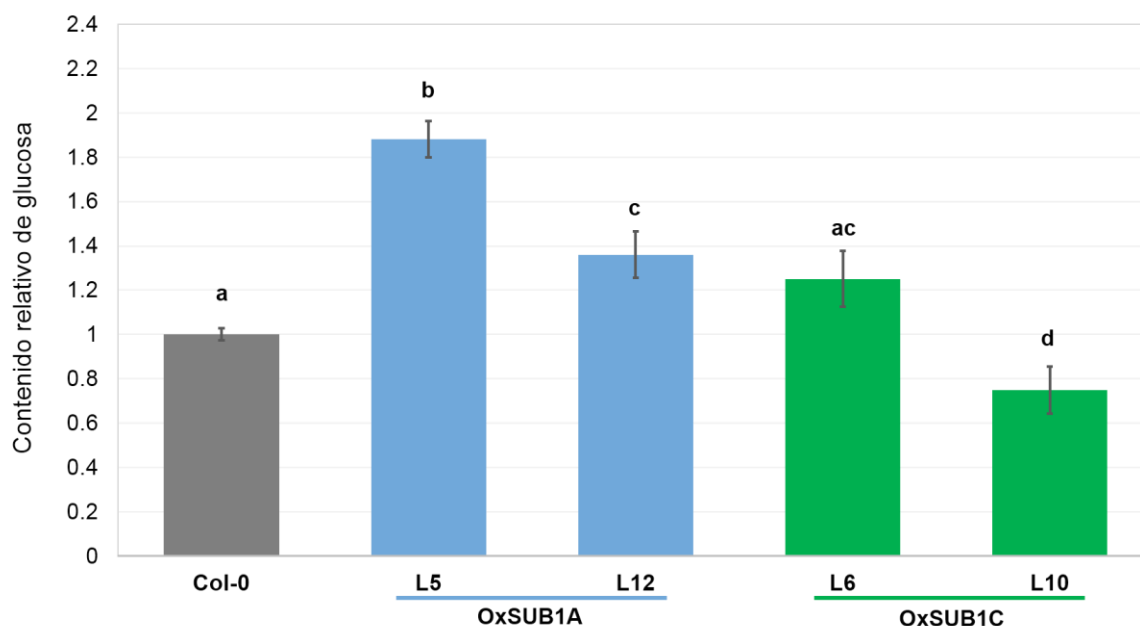


Figura 21. Sacarificación con tratamiento amilolítico. Contenido relativo de glucosa en el tratamiento combinado de plantas colectadas al final del fotoperiodo. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre los genotipos ($P < 0.05$, t -Student). Los valores son promedios de tres repeticiones experimentales independientes, cada una con $n = 5$. Los datos reportados están normalizados con el valor de Col-0 (8.5 mg de glucosa g^{-1} peso fresco).

De los experimentos anteriores, se concluyó que existe un incremento en el rendimiento del potencial de sacarificación ya que, la pared celular y el contenido de azúcares reductores libres de las plantas *OxSUB1A* fue distinto a Col-0, y que la principal mejora fue en el contenido de almidón. Lo anterior fue más significativo en *OxSUB1A-L5*, la línea de débil expresión y mejor crecimiento. Chuck *et al.*, (2011) registraron un mejoramiento de la sacarificación en el pasto *Panicum virgatum* cuando se sobreexpresa al miRNA156, que es un inhibidor de la floración, debido a que su crecimiento fue menos afectado. En el arroz, cuando el gen *SUB1A* se expresó constitutivamente bajo el control del promotor *UBIQUITINA-1*, se registró una mayor cantidad de azúcares libres en el tejido aéreo (Fukao *et al.*, 2012). Sin embargo, estas plantas transgénicas de arroz no mostraron una acumulación constitutiva de almidón.

Estas diferencias entre la acumulación del almidón por efecto de *SUB1A-1* en las plantas de arroz (monocotiledóneas) y de *Arabidopsis* (dicotiledóneas), pueden ser por las diferentes estrategias en la acumulación y localización de reservas de carbohidratos.

Una opción diferente, es que haya estrategias disímiles entre las plantas silvestres (como *Arabidopsis*) y las plantas domesticadas (como el arroz) (Streb y Zeeman, 2012; Slewinski 2012). Otro factor que hay que tomar en cuenta es que las estrategias de acumulación y localización de carbono cambien en las etapas de desarrollo (Ortiz-Marchena *et al.*, 2014).

Ejemplo de lo anterior es la mutante *sex1-1* de *Arabidopsis* con pérdida de función en los genes de degradación del almidón *GLUCAN*, *WATER DIKINASE 1* (*GWD1*) que si bien acumula almidón, tiene defectos graves en el desarrollo ya que no puede empatar de manera eficiente el crecimiento y la síntesis de carbohidratos (Paparelli *et al.*, 2013). Sin embargo, en el arroz, la mutante en este mismo gen, presenta un desarrollo normal y una acumulación elevada de almidón de hasta 400% más que la silvestre (Hirose *et al.*, 2013). Otro ejemplo de diferencias entre respuestas a un mismo gen entre especies es la sobreexpresión de miRNA156, que provocó la acumulación de almidón en *Panicum*, pero no en *Arabidopsis*, maíz o tabaco (Chuck *et al.*, 2011).

Para observar la acumulación de almidón en *OxSUB1A* y *OxSUB1C*, se utilizó la tinción de yodo en plantas de 14 d que se colectaron al final de la noche. Este punto de prueba se seleccionó para aumentar el contraste en hojas de *Arabidopsis* y analizar un punto diferente al ya estudiado enzimáticamente (fin del fotoperiodo). La tinción mostró que ambas líneas de *OxSUB1A* presentaron un color azul más fuerte que Col-0 indicando la presencia de mayor cantidad de almidón en hojas maduras al final de la noche. En *OxSUB1C*, se observó menos cantidad de pigmentación indicando poco contenido de almidón al final de la noche (Fig. 22).

En los siguientes análisis se excluyó a *OxSUB1C* por no tener diferencias significativas de acumulación con respecto a Col-0 en los ensayos realizados.

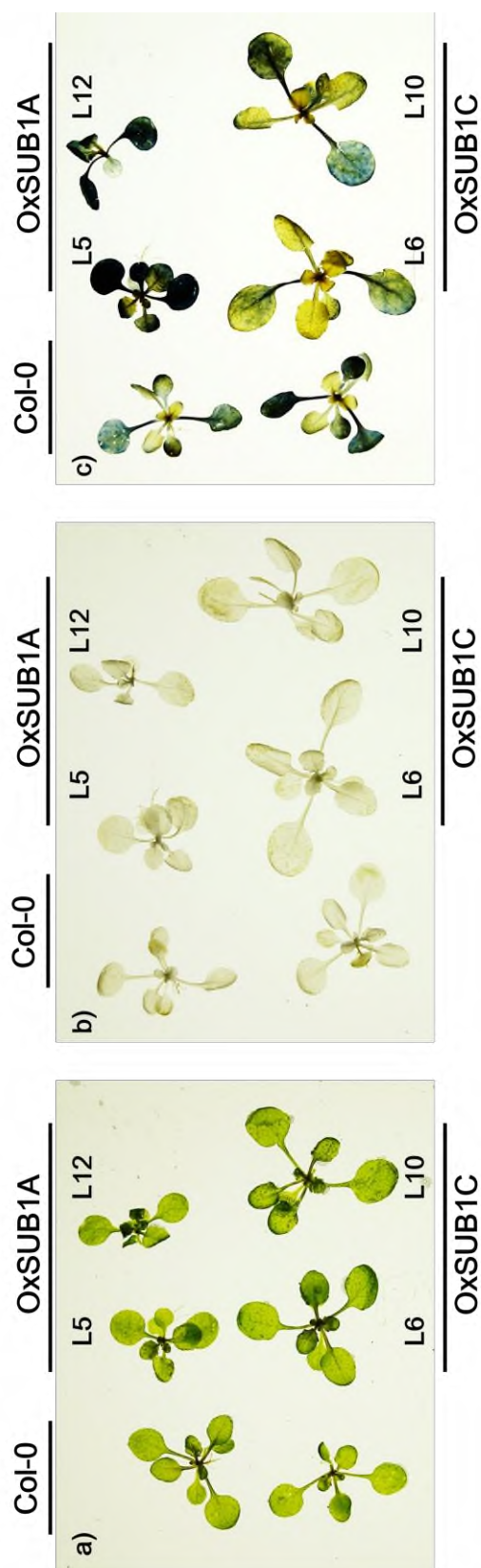


Figura 22. Tinción con yodo. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* (14 d) se recolectaron al final de la noche. a) plantas infiltradas con formaldehído con una bomba de vacío; b) plantas decoloradas por inmersión en etanol al 80% con una temperatura de 70–75 °C; c) plantas teñidas con yodo por 30 min y enjuagadas con agua desionizada. La presencia de color azul indica acumulación de almidón.

6.4 Dinámicas de acumulación de almidón diurna y en el desarrollo

La acumulación del almidón en las hojas tiene un patrón diurno con un pico al final del fotoperiodo y su consumo durante la noche (Bahaji *et al.*, 2013, Ortiz-Marchena *et al.*, 2014) por lo que se decidió cuantificar si el rendimiento de sacarificación se mantenía durante las oscilaciones diurnas en Col-0 y *OxSUB1A*. De esta forma, se colectaron plantas de 22 d, durante puntos estratégicos del ciclo diurno como son al inicio del día, mediodía, inicio de la noche, media noche e inicio del siguiente día.

Las plantas Col-0 mostraron el patrón esperado del almidón transitorio con un pico al final del fotoperiodo (Fig. 23). Las plantas transgénicas *OxSUB1A* tuvieron la misma tendencia de acumulación, sin embargo, se observó que al final del fotoperiodo en *OxSUB1A-L5*, que es la línea expresante débil, se duplicó significativamente el rendimiento en el contenido de glucosa en relación a Col-0 mientras que la expresante fuerte *OxSUB1A-L12* se observó un incremento del 13–30% más en el rendimiento de glucosa.

El desarrollo de la planta y la acumulación de almidón se coordinan genéticamente en el momento de la transición floral (Chuck *et al.*, 2011; Ortiz-Marchena *et al.*, 2014). Para determinar si el mejoramiento de la sacarificación de *SUB1A-1* depende del desarrollo, se colectaron plantas en dos puntos estratégicos del desarrollo que fueron antes de la floración de Col-0 (18 y 21d) y dos puntos después de la floración de *OxSUB1A* (27 y 31d, ver Tabla 1). El contenido de almidón en rosetas de Col-0 aumentó en su etapa juvenil, una vez que se alcanzó el tiempo de la aparición del botón floral, disminuyó hasta estabilizarse con la aparición de las hojas caulinares que ayudan con el aumento del carbono fotosintético (Early *et al.*, 2009). En *OxSUB1A* el rendimiento de sacarificación fue mayor en la etapa juvenil para *OxSUB1A-L5* (280% $\pm$ 23) y *OxSUB1A-L12* (190% $\pm$ 9), esta diferencia disminuyó al igual que en Col-0 (Fig. 24), hasta tener el mismo rendimiento de sacarificación después de su floración.

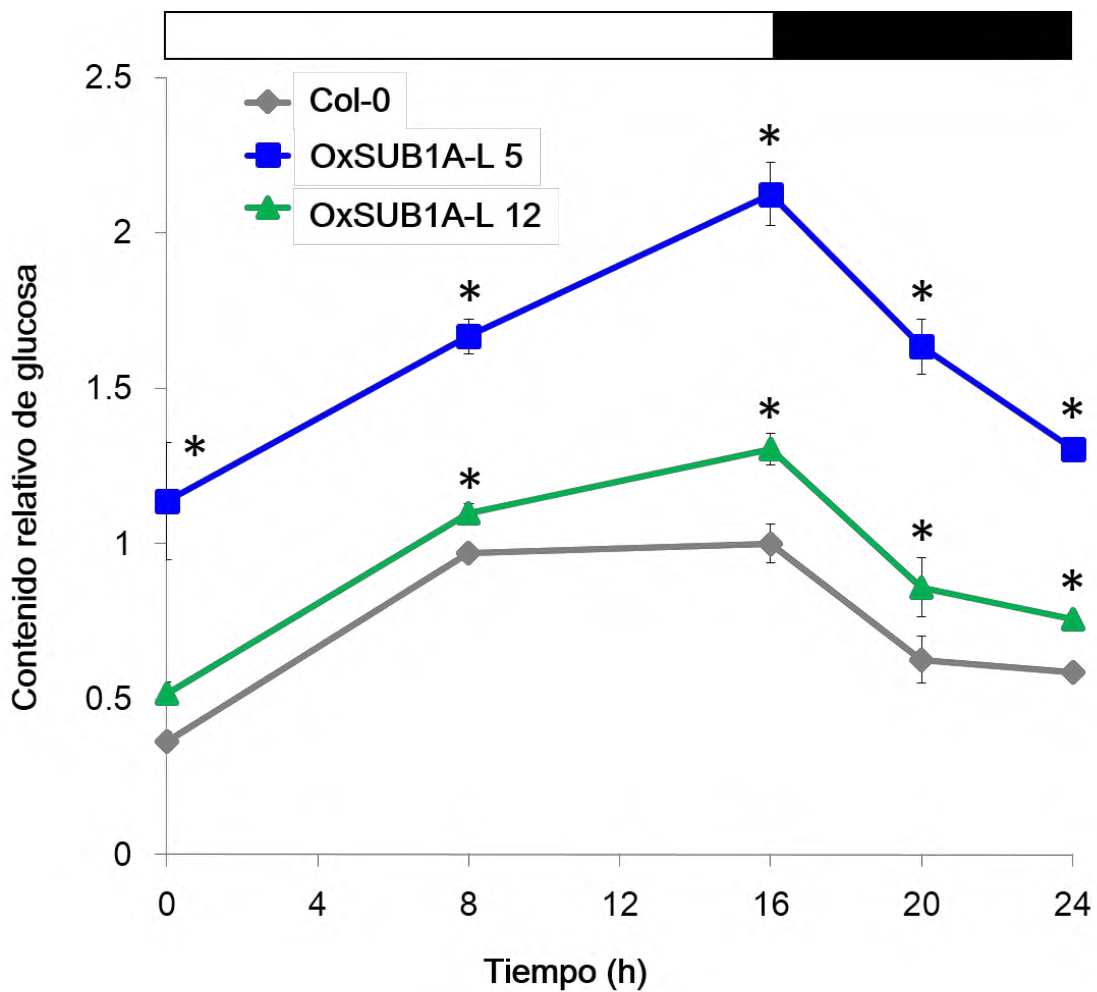


Figura 23. Oscilación diurna del rendimiento de sacarificación. La barra superior blanca indica el día y la negra la noche. El contenido de glucosa se midió con glucosa oxidasa para las dos líneas independientes de *OxSUB1A*. Los asteriscos indican una diferencia significativa con Col-0 ($P < 0.05$, *t*-Student). Los valores son promedios de tres repeticiones experimentales independientes, cada una con $n = 5$ plantas. Las barras de error son $\pm$ Error Estándar. Los datos reportados están normalizados al valor de Col-0 a las 16 h ($9.4 \text{ mg glucosa g}^{-1}$ peso fresco).

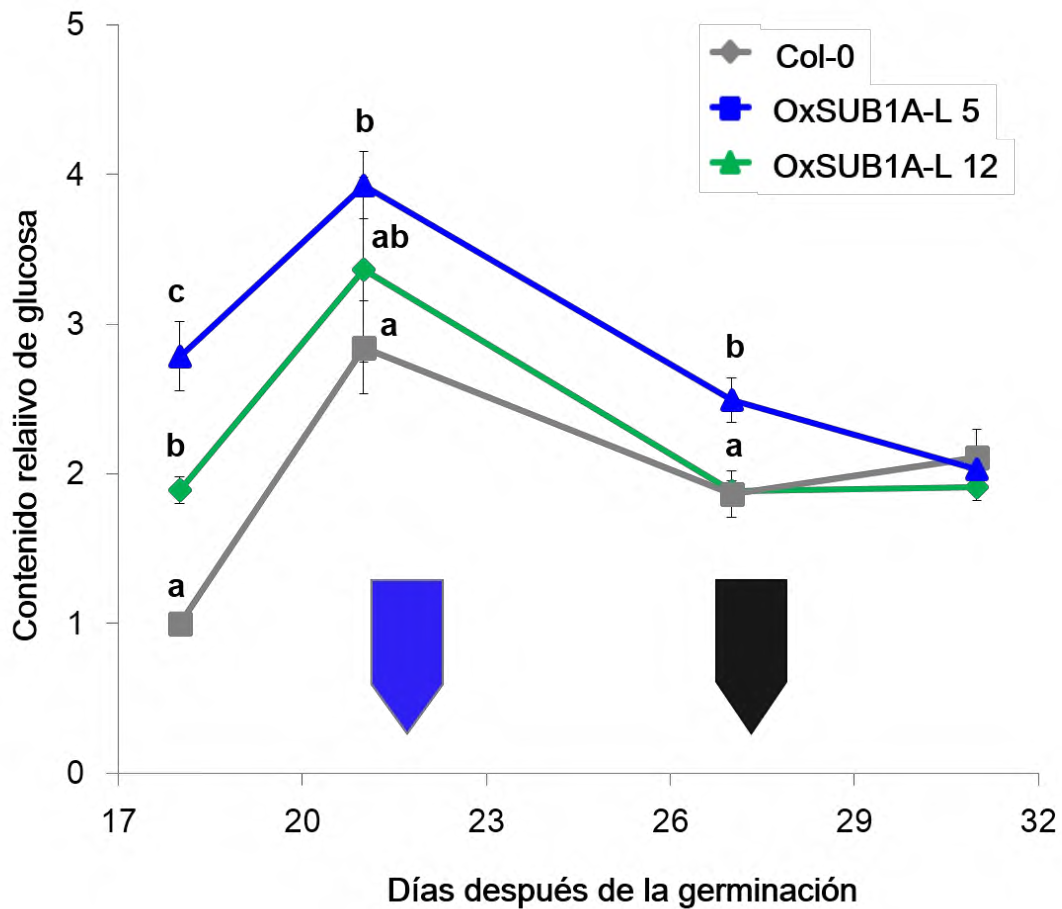


Figura 24. Acumulación del almidón a lo largo del desarrollo de plantas de *Arabidopsis* que expresan al gen *SUB1A-1*. Las plantas se cultivaron en un fotoperiodo de días largos (16 h día/ 8 h noche) y se colectaron al final del día. Las flechas indican el inicio del brote floral de Col-0 (flecha azul) y *OxSUB1A-L5* y *OxSUB1A-L12* (flecha negra). El contenido de glucosa se midió con glucosa oxidasa para ambas líneas independientes de *OxSUB1A* y Col-0. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre los genotipos ($P < 0.05$, *t*-Student). Los valores son promedios de tres repeticiones experimentales independientes, cada una con $n=5$ plantas. Las barras de error son $\pm$ Error Estándar. Los datos reportados están normalizados a valor de Col-0 de 18 d ($6.6 \text{ mg glucosa g}^{-1}$ peso fresco).

La tinción de yodo se utilizó para observar la acumulación de almidón en plantas de 14, 21 y 28 d de *OxSUB1A* y Col-0. La tinción mostró que ambas líneas de *OxSUB1A* retuvieron mayor cantidad de almidón en las hojas que Col-0 en los tiempos pre-floración (Fig. 25). Estos datos bioquímicos e histológicos indican una mayor acumulación de almidón y un mejoramiento en el rendimiento de sacarificación en las plantas *OxSUB1A* que depende del desarrollo, especialmente en las etapas previas a la floración (juveniles).

Las cinéticas de acumulación de almidón durante el día y el desarrollo apoyan la conclusión de que el almidón es el principal compartimento responsable del mejoramiento en el rendimiento de la sacarificación de las plantas *OxSUB1A*. Estos datos indican que el gen *SUB1A-1* es responsable directo de la conservación del almidón característica de la respuesta quiescente a la inundación.

Un factor de transcripción implicado en la floración tardía y manejo de consumo de almidón es *CONSTANS* (*CO*) que es responsable de la floración y de la inducción del gen de la floración *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). La transcripción de *CO* y *FT* se reprimen significativamente en las plantas de arroz y de *Arabidopsis* por el gen *SUB1A-1* lo que hace que las plantas tengan una floración tardía, incluso con un fotoperiodo inductivo de floración (Peña-Castro *et al.*, 2011).

Recientemente, Ortiz-Marchena *et al.*, (2014) estudiaron la importancia del fotoperiodo en la acumulación del almidón durante la transición floral y demostraron que *CO* controla la estructura del gránulo de almidón a través de diferentes patrones diurnos, la regulación del desarrollo y del transcrito *GRANULE BOUND STARCH SYNTHASE* (*GBSS*). De esta manera, *CO* promueve la acumulación de gránulos de almidón con una relación amilosa:amilopectina mayor que pueden ser más fácilmente digeridos creando un estado óptimo para la floración. Así, se puede hipotetizar que la regulación negativa de *CO/FT* por *SUB1A-1* permite que las plantas transgénicas *OxSUB1A* conserven una mayor cantidad de almidón.



Figura 25. Tinción de yodo de *Arabidopsis* en distintas etapas del desarrollo. Hojas de Col-0 y OxSUB1A colectadas al final del día. a) 14 d, b) 21 d y c) 28 d. La barra negra indica 1 cm.

6.5 Mecanismos moleculares de acumulación de almidón

El retraso de la floración está vinculado con el mejoramiento de la sacarificación del almidón por diferentes mecanismos independientes de CO (Streb y Zeeman, 2012; Paparelli *et al.*, 2013).

Para obtener información sobre los mecanismos que son diferentes o paralelos a la regulación de la acumulación de almidón por CO en *OxSUB1A*, se midió la fluorescencia polifásica (OJIP). Este método se utiliza para detectar a las plantas con un fotosistema mejorado que aumenta la acumulación de los carbohidratos (Gururani *et al.*, 2012; Lintala *et al.*, 2014). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los cinco genotipos analizados, en dos sistemas de estudio diferentes (uno abierto y el otro cerrado), esto indica que las plantas transgénicas *OxSUB1A* y *OxSUB1C* poseen un fotosistema idéntico al de Col-0 (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Cuantificación de la eficiencia del PSII (Fv/Fm) en un sistema cerrado, fluorescencia máxima (Fm) y neutral (Fo), y la relación de la variable neutra del incremento de fluorescencia (Fv/Fo).

Genotipo	Fv/Fm	Fm	Fo	Fv/Fo
Col-0	0.7921 ± 0.010	800.3 ± 45.93	165.7 ± 6.99	3.8315 ± 0.24
<i>OxSUB1A-L5</i>	0.8067 ± 0.008	771.8 ± 65.67	148.8 ± 13.35	4.1941 ± 0.24
<i>OxSUB1A-L12</i>	0.7865 ± 0.005	825.6 ± 60.54	175.3 ± 9.96	3.7087 ± 0.14
<i>OxSUB1C-L6</i>	0.7976 ± 0.005	894.8 ± 60.54	180.6 ± 9.98	3.9530 ± 0.14
<i>OxSUB1C-L10</i>	0.7840 ± 0.010	772.4 ± 63.05	167.8 ± 16.20	3.7232 ± 0.24

Tabla 3. Cuantificación de la eficiencia del PSII (Fv/Fm) en un sistema abierto, fluorescencia máxima (Fm) y neutral (Fo), y la relación de la variable neutra del incremento de fluorescencia (Fv/Fo).

Genotipo	Fv/Fm	Fm	Fo	Fv/Fo
Col-0	0.8034 ± 0.007	865.5 ± 52.69	169.6 ± 10.49	4.1062 ± 0.19
<i>OxSUB1A-L5</i>	0.8014 ± 0.006	880.8 ± 25.15	174.6 ± 6.61	4.0462 ± 0.15
<i>OxSUB1A-L12</i>	0.8074 ± 0.007	880.1 ± 46.41	169.0 ± 8.04	4.2089 ± 0.19
<i>OxSUB1C-L6</i>	0.8178 ± 0.004	953.0 ± 12.31	173.0 ± 6.41	4.5136 ± 0.15
<i>OxSUB1C-L10</i>	0.8162 ± 0.006	948.4 ± 22.80	173.8 ± 9.94	4.4598 ± 0.16

Se siguió en la búsqueda de los mecanismos fisiológicos responsables de la acumulación del almidón, y se decidió explorar la morfología del gránulo de almidón. La biosíntesis de esta estructura no es un proceso simple, ya que implica varios pasos que determinan su forma y tamaño (Streb y Zeeman, 2012). Estas características se han reportado alteradas en algunas mutantes con defectos en el consumo de almidón como *sex1* y *sex4* (Zeeman *et al.*, 2002), y en mutantes con defectos de síntesis como *starch synthase 2* y *3* (*ss2ss3*, Zhang *et al.*, 2008). Por ello, se aislaron los gránulos de *OxSUB1A* y se examinaron por microscopía electrónica de barrido con recubrimiento de oro (FE-SEM). De forma general, los gránulos que se observaron presentaron la misma morfología elíptica y aplanada característica de Col-0 (Figs. 26, 27, 28 y 29).

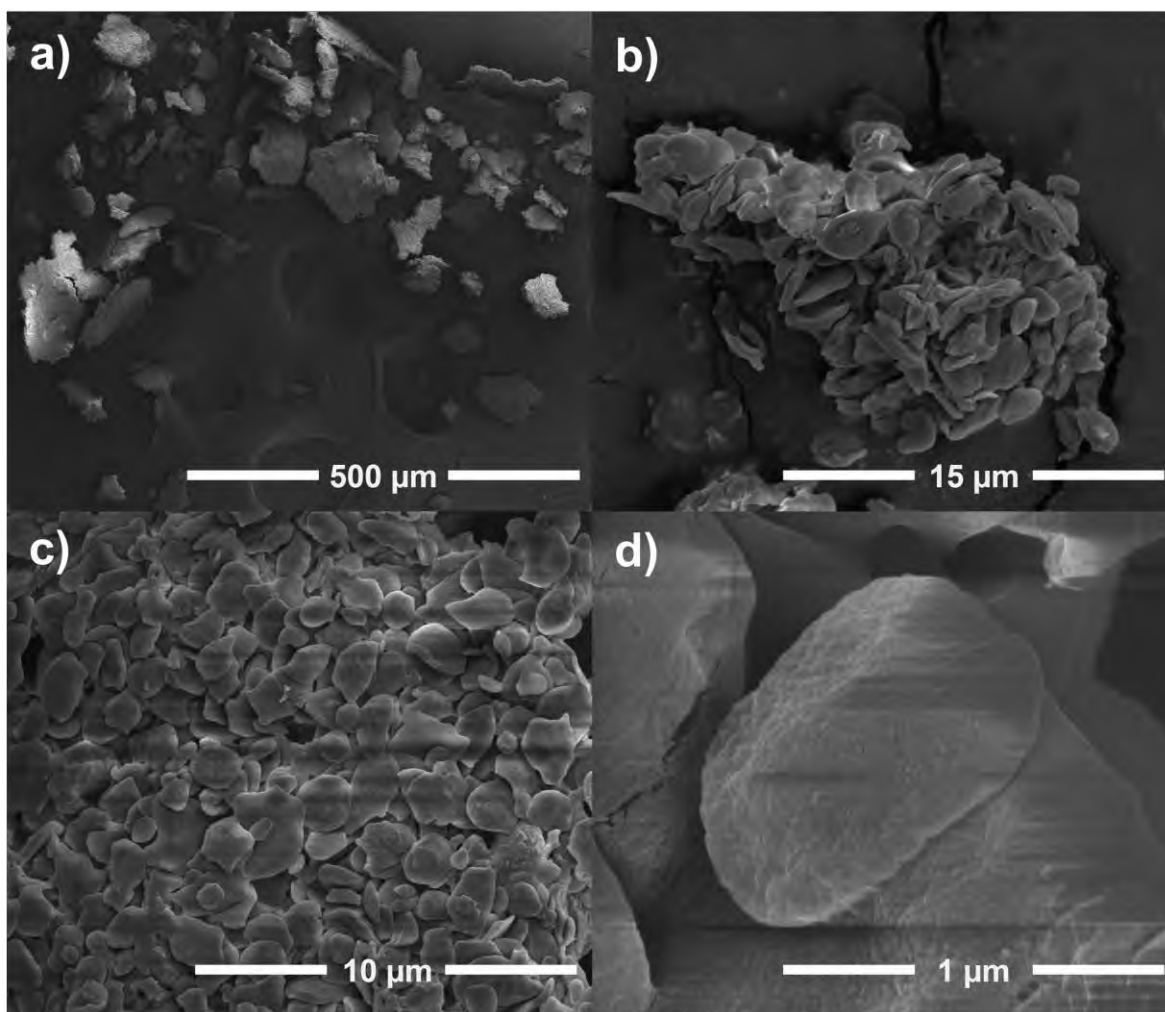


Figura 26. Morfología del gránulo de almidón de Col-0. a) aumento de; b) aumento de 5,000x; c) aumento de 5,000x; d) aumento de 65,000x. En la barra blanca se indica el tamaño del gránulo.

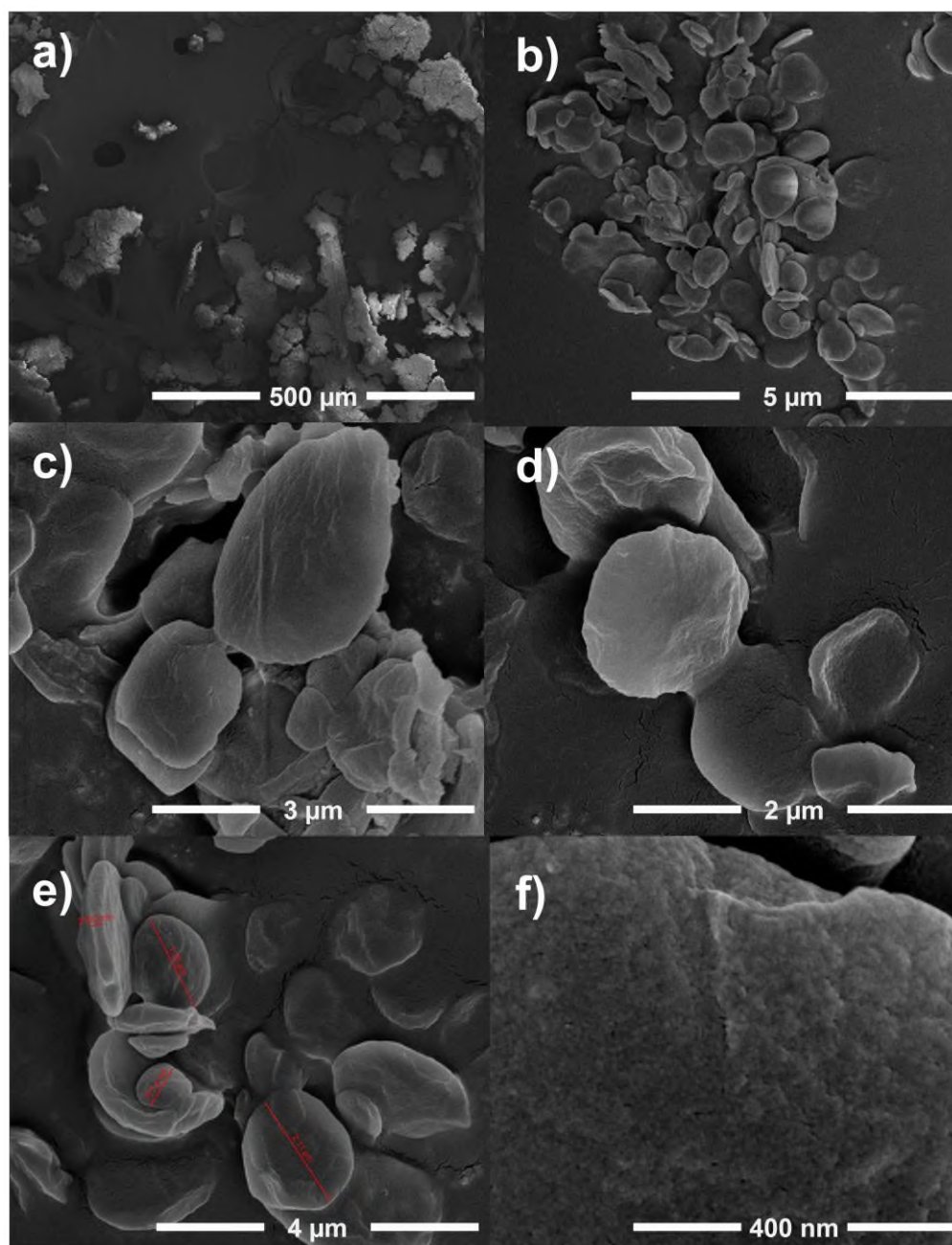


Figura 27. Morfología del gránulo de almidón de *OxSUB1A-L5*. a) aumento de 100x; b) aumento de 800x; c) aumento de 20,000x; d) aumento de 25,000x; e) aumento de 15,000x; f) aumento de 150,000x. En la barra blanca se indica el tamaño del gránulo.

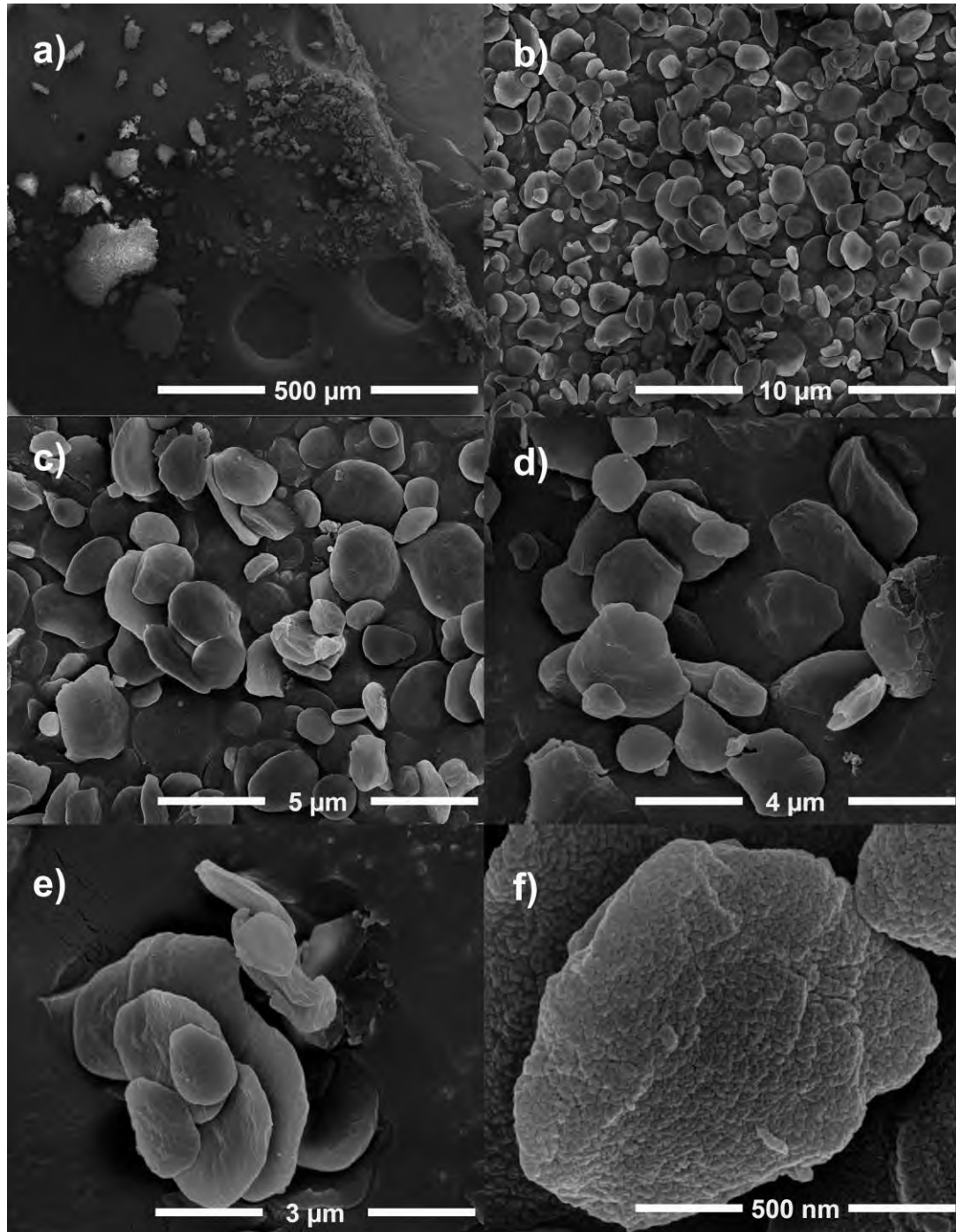


Figura 28. Morfología del gránulo de almidón de *OxSUB1A-L12*. a) aumento de 100x; b) aumento de 5,000x; c) aumento de 10,000x; d) aumento de 15,000x; e) aumento de 20,000x; f) aumento de 80,000x. En la barra blanca se indica el tamaño del gránulo.

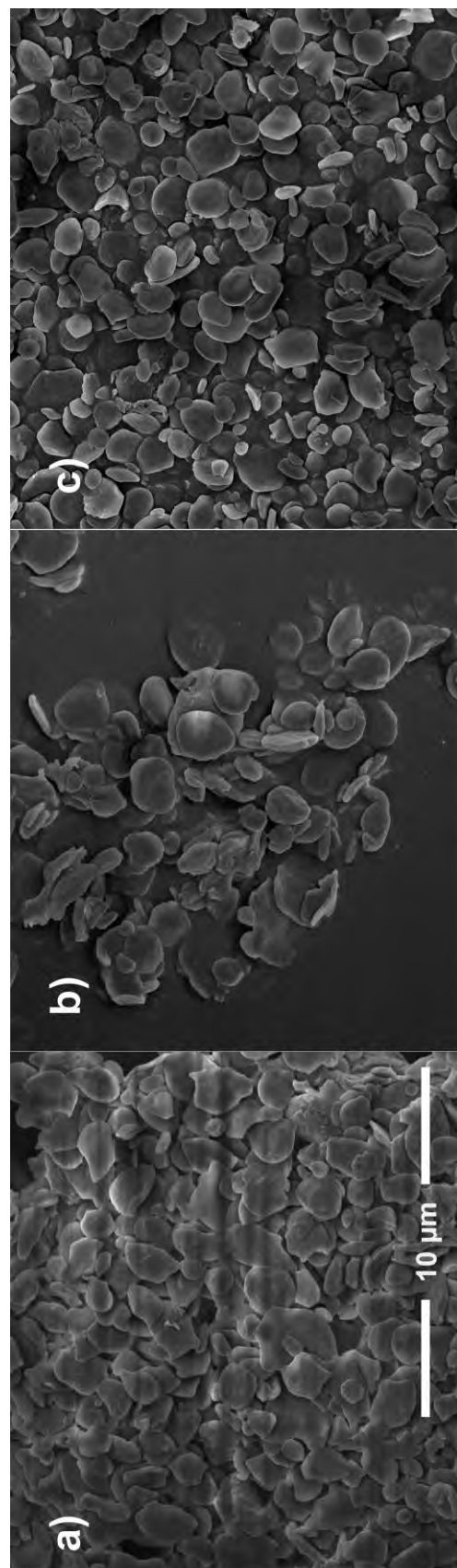


Figura 29. Morfología de los gránulos de almidón de los diferentes genotipos. La Imagen de los gránulos de almidón aislados por centrifugación de plantas de 21 d. a) granulos de Col-0; b) granulos de *OxSUB1A-L5*; c) granulos de *OxSUB1A-L12*.

Se continuó con la búsqueda para encontrar otros mecanismos moleculares probables del fenotipo hiperacumulador de almidón. Wahl *et al.*, (2013) demostraron que *CO*, al igual que los factores de transcripción *SPL3-5*, se conectan con el metabolismo de carbohidratos en la transición juvenil y promueven la floración tardía. En el caso del *Panicum*, la regulación negativa de los *SPL3-5* por miRNA156 promueve la floración tardía y mejora el rendimiento de sacarificación en ambos tratamientos celulolítico y amilolítico (Chuck *et al.*, 2011). *CO* y *SPL*/miRNA156 son vías que tienen un impacto en el tiempo de floración.

Así, se examinaron microarreglos de *OxSUB1A* vs Col-0 de plántulas de 7 d (Peña-Castro *et al.*, 2011) para buscar la expresión de transcritos ya conocidos que participan en la degradación del almidón, en la transición juvenil y el tiempo de floración (Anexo L; Streb y Zeeman, 2012) que pudieran tener algún indicio de regulación.

Se encontraron regulados negativamente a *SEX4*, *GWD1*, *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *FUL5* y *SOC1* (Tabla 4), sin embargo, los parámetros estadísticos de confianza no eran óptimos por lo que se decidió verificar su transcripción por un método independiente como PCR cuantitativa (qPCR) en plántulas de 7d que se colectaron al final del día. Se realizó la extracción de ADN genómico (gADN) como controles positivos (Fig. 30, ver anexo H), y la comprobación de la integridad de los RNAs (Fig. 31). En este experimento no se encontraron cambios en la expresión de ninguno de ellos con respecto a Col-0 (Tabla 5).

Lo anterior indica que la acumulación del almidón no tiene que ver con la regulación transcripcional de las enzimas de degradación del almidón, el mecanismo de floración mediado por *SPL* ni la maduración del meristemo floral.



Figura 30. Comprobación de ausencia de ADN genómico en muestras de RNA para qPCR. RNA sin retrotranscripción 1 (sin sacarosa) y 2 (con sacarosa en 40 ciclos de PCR); 3 ADN genómico, M: marcador de peso molecular. Se observa una banda de 600 pb correspondiente a *TUB2*.

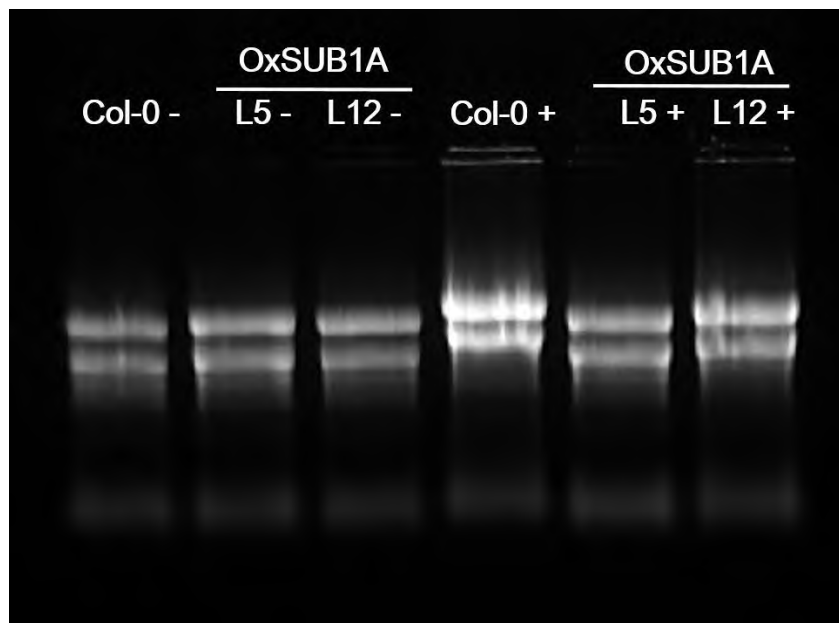


Figura 31. RNAs extraídos de Col-0 y ambas líneas de OxSUB1A con y sin sacarosa utilizadas en qPCR. La electroforesis se realizó en gel desnaturizante de agarosa al 2%. Se observa la integridad de las bandas ribosomales.

Tabla 4. Expresión medida por microarreglos previamente reportados de *OxSUB1A-L12* de enzimas de degradación y factores de transcripción que intervienen en el metabolismo del almidón en plantas de *Arabidopsis*.

Gen	Locus	Oscilación ^a	<i>OxSUB1A-L12</i> – Col ^b (expresión Log ₂ / valor P) ^c	<i>OxSUB1A1-L12</i> + MG132 - <i>OxSUB1A1-L12</i> ^{dc}	<i>OxSUB1A1-L12</i> + MG132 - Col-0 ^{ec}
<i>GWD1</i>	At1g10760	0.9666	- 0.43 / 0.014	- 1.32 / 8.65E-1	- 0.42 / 0.010
<i>SEX 4</i>	At3g52180	0.9671	- 0.66 / 0.005	- 1.82 / 1.44E-1	- 0.78 / 0.002
<i>SPL 3</i>	At2g33810	0.6753	- 0.74 / 0.118	1.77 / 2.10E-7	- 0.84 / 0.013
<i>SPL 4</i>	At1g53160	-----	0.01 / 0.968	- 0.11 / 0.313	- 0.60 / 0.071
<i>SPL 5</i>	At3g15270	0.5756	- 2.34 / 0.056	- 0.98 / 0.306	- 0.25 / 0.752
<i>SOC1</i>	At2g45660	0.7096	- 0.29 / 0.073	0.74 / 1.97E-1	- 0.91 / 0.003
<i>FUL5</i>	At5g60910	0.74639	- 1.10 / 0.1189	- 0.19 / 0.092	- 2.95 / 0.001

a) Significa el ajuste a un modelo de oscilación circadiana reportado en www.diurnal.org

b) Expresión de plantas *OxSUB1A-L12* contra Col-0 de 7d colectadas a las 8 h de un día largo.

c) Valor de significancia debe ser menor a 5×10^{-7}

d) Expresión de plantas *OxSUB1A-L12* tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132 (que estabiliza a la proteína SUB1A-1) contra plantas de *OxSUB1A-L12* no tratadas.

e) Expresión de plantas *OxSUB1A-L12* tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132 (que estabiliza a la proteína SUB1A-1) contra plantas silvestres también tratadas.

f) b,c y d son datos de expresión Log₂.

Tabla 5. PCR cuantitativo de plántulas de *Arabidopsis* de 7 d sin sacarosa, que expresan en el ecotipo Col-0 el gen *SUB1A-1* del arroz

Gen / Identificador	Genotipo	Cq $\pm$ Error estándar
ACT2, At3G18780	Col-0	27.28 $\pm$ 0.66
	OxSUB1A-L5	27.06 $\pm$ 0.23
	OxSUB1A-L12	27.50 $\pm$ 0.20
TUB2, At1g65480	Col-0	26.02 $\pm$ 0.15
	OxSUB1A-L5	25.4 $\pm$ 0.17
	OxSUB1A-L12	25.54 $\pm$ 0.08
GWD1, At1g10760	Col-0	25.88 $\pm$ 0.04
	OxSUB1A-L5	25.50 $\pm$ 0.29
	OxSUB1A-L12	25.54 $\pm$ 0.08
GWD1, At1g10760	Col-0	25.88 $\pm$ 0.04
	OxSUB1A-L5	25.50 $\pm$ 0.29
	OxSUB1A-L12	26.37 $\pm$ 0.06
SEX4, At3g52180	Col-0	30.64 $\pm$ 0.51
	OxSUB1A-L5	30.72 $\pm$ 0.36
	OxSUB1A-L12	31.54 $\pm$ 0.35
SPL3, At2g33810	Col-0	24.46 $\pm$ 0.23
	OxSUB1A-L5	23.63 $\pm$ 0.10
	OxSUB1A-L12	24.88 $\pm$ 0.04
SPL4, At1g53160	Col-0	26.96 $\pm$ 0.20
	OxSUB1A-L5	26.94 $\pm$ 0.05
	OxSUB1A-L12	26.77 $\pm$ 0.16
SPL5, At3g15270	Col-0	28.33 $\pm$ 0.38
	OxSUB1A-L5	27.25 $\pm$ 0.02
	OxSUB1A-L12	27.63 $\pm$ 0.03
SOC1, At2g45660	Col-0	38.65 $\pm$ 0.43
	OxSUB1A-L5	37.12 $\pm$ 0.26
	OxSUB1A-L12	37.57 $\pm$ 0.28
FUL5, At5g60910	Col-0	31.99 $\pm$ 0.89
	OxSUB1A-L5	33.22 $\pm$ 0.1
	OxSUB1A-L12	32.85 $\pm$ 0.32

6.6 Dureza de las hojas

Anteriormente, en el análisis del transcriptoma movilizado por *SUB1A-1* en *Arabidopsis* se encontró que se regulan 17 genes asociados con la modificación de la pared celular, incluyendo la expansina *AtEXP2* y la β -1-3 glucanasa *BGL2* (Peña-Castro *et al.*, 2011). Además de su importancia biológica, las proteínas de la pared celular son de importancia tecnológica para el desarrollo del bioetanol ya que pueden cambiar la estructura de la pared celular mejorando así la sacarificación (Strabala y MacMillan, 2013).

Núñez-López *et al.*, (2015) confirmaron la sobreexpresión de *BGL2* y *AtEXP2* en *OxSUB1A* en plántulas de 7 días de edad a las 8 h del fotoperiodo. Para saber si la expresión de estos genes está asociada con el fenotipo de pared celular modificada, se analizó la resistencia a la fractura en *OxSUB1A-L5* y *OxSUB1A-L12* con un texturómetro. Las hojas de *OxSUB1A* opusieron menor resistencia a la fractura que, solo resistieron una fuerza de 2.34 N (± 0.26 DE). Mientras que Col-0 y *OxSUB1C* resistieron más de 3.0 N (3.14 ± 0.24 DE y 2.99 ± 0.38 , respectivamente) esto indica que es necesario aplicar mayor fuerza en estos dos genotipos para generar la fractura (Fig. 32).

BGL2 pertenece a una familia de enzimas hidrolíticas que participan en la defensa contra los hongos patógenos y es importante en la maduración de la pared celular (Doxey *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2014). La respuesta del arroz durante el estrés por inundación incluye la expresión de genes asociados a estrés por patógenos y la presencia de *SUB1A-1* mejora esta inducción (Jung *et al.*, 2010). Las expansinas son proteínas de la pared celular que permiten el ablandamiento no enzimático de la celulosa y la hacen más accesible para las enzimas durante la expansión celular (Arantes y Saddler, 2010).

De esta forma, la expresión de *AtEXP2* y *BGL2* que se observa en las plantas transgénicas *OxSUB1A* se asocia a la fragilidad pues se disminuye la resistencia a la fractura y se mejora el rendimiento de la sacarificación de la materia lignocelulósica.

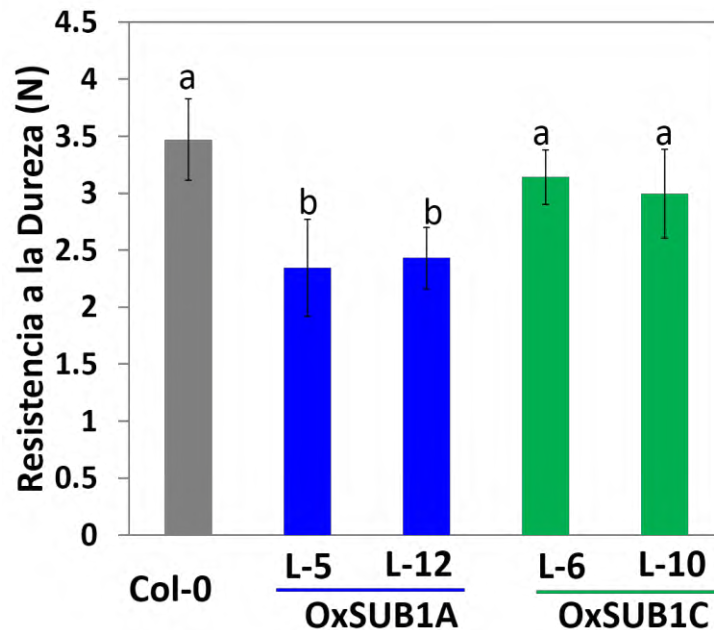


Figura 32. Resistencia de las hojas de Col-0 y plantas transgénicas de *OxSUB1A* y *OxSUB1C*. Prueba de resistencia a la perforación en plantas de 23 d. Las letras diferentes indican diferencia significativa con Col-0 ($P < 0.01$, *t*-Student). Los valores son promedios de $n = 7-13$ plantas. Las barras de error son $\pm$ desviación estándar.

6.7 Vitrificación

Las plantas son organismos susceptibles a los cambios ambientales desfavorables, esto provoca una respuesta fundamental para la supervivencia al estrés abiótico. Las acuaporinas (proteínas integrales de la membrana), regulan la permeabilidad de la membrana, el balance hídrico en las hojas, el ajuste osmótico y diversos procesos fisiológicos, como la absorción de agua mediante la raíz en la planta (Zhu *et al.*, 2014).

La vitrificación es un trastorno de los tejidos vegetales caracterizado por la alta retención de agua, causando condiciones adversas en las plantas. En *Arabidopsis* de 28 d, se observó el fenotipo de vitrificación cuando se compararon las plantas que crecieron con y sin domo durante la medición de la fotosíntesis. En las plantas con

domo, su crecimiento fue en un ambiente con grandes cantidades de agua. Ahí, las plantas Col-0, *OxSUB1A-L5* y *OxSUB1A-L12* tuvieron las hojas más alargadas, se observó también que retenían mayor cantidad de agua lo que provocó que las hojas tuvieran una apariencia traslúcida y deformada (Fig. 33 y 34). Este fenotipo se observó exacerbado en las plantas *OxSUB1A*. También se observó en las transgénicas hojas amarillas, alargadas, y de rápida deshidratación en el momento de separación de la hoja de la roseta de *Arabidopsis* (Fig. 33).

El gen *TRANSLUCENT GREEN* (*TG*) es un factor de transcripción de la familia de los *ERFs* que cuando se sobreexpresa en *Arabidopsis*, activa la expresión de genes de las acuaporinas, causando en las hojas el fenotipo de vitrificación (Zhu *et al.*, 2014). En los microarreglos de *OxSUB1A-L12*, existen varias acuaporinas reguladas positivamente (Peña-Castro *et al.*, 2011), por lo tanto se puede hipotetizar que son las responsables de este fenotipo.

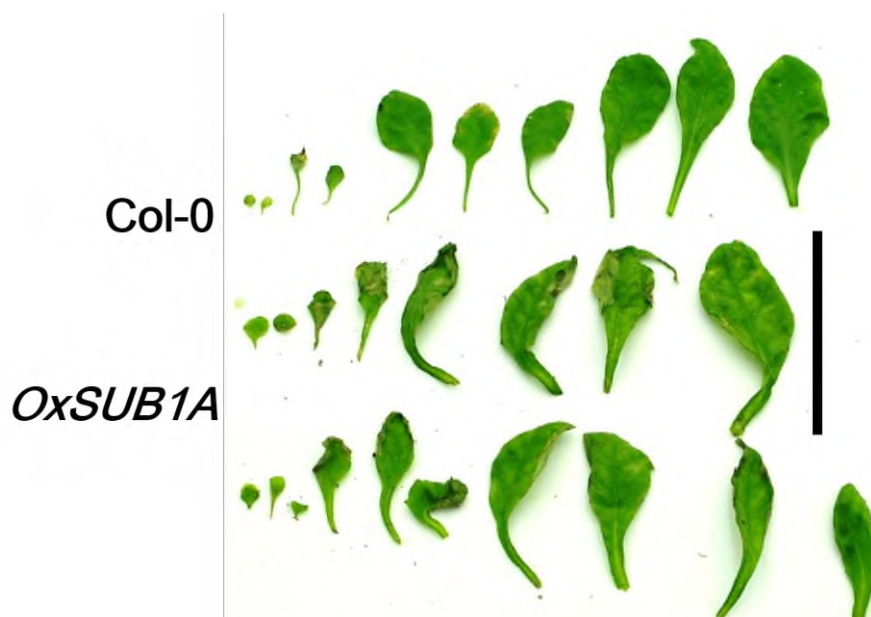


Figura 33. Hojas de *Arabidopsis* que muestran características del fenotipo de vitrificación en las hojas de Col-0 y *OxSUB1A* que crecieron en el sistema cerrado. Las hojas de *OxSUB1A-L5* y *L12* se observaron deshidratadas, amarillentas y deformadas, dando la apariencia de marchitas, cuando se desprenden de la roseta. La barra negra indica 5 cm.



Figura 34. Fenotipo de vitrificación que se observó en Col-0 y OxSUB1A en sistema cerrado. a) Col-0 las hojas se observan opacas, alargadas y con peciolo traslucidos en las zonas externas, b) en OxSUB1A se observan áreas zonas del tejido traslúcidas y con apariencia cristalina, tanto en las hojas jóvenes como en los peciolo

6.8 Penalización en el crecimiento de *OxSUB1A*

Si bien las plantas *OxSUB1A* tuvieron una mejora del rendimiento de sacarificación en todos los compartimentos cuantificados (Fig. 19, 20 y 21). Se pudo observar que conforme avanza el desarrollo, el tamaño de *OxSUB1A* no aumenta al mismo ritmo que Col-0, esta diferencia se puede observar en la Fig. 16, 22, y 25.

Cuando esta diferencia se cuantificó por peso seco, llegó a ser de hasta un 60% menor en *OxSUB1A* (Fig. 35). Este tipo de defectos son comunes en las plantas hiperacumuladoras de almidón debido a que no pueden lograr coordinar el crecimiento y la falta de movilidad de las reservas de almidón (Paparelli *et al.*, 2013) y puede ser un obstáculo para aplicar esta biotecnología en el campo de la fabricación de bioetanol.

Recientemente, se propuso resolver este problema con el uso de promotores inducibles o específicos para un tipo de tejido. Por ejemplo, Weise *et al.*, (2012) lograron obtener plantas con alto contenido de carbohidratos y con baja penalización en el crecimiento con el promotor pAlc que es inducible por etanol. Petersen *et al.*, (2012) disminuyeron los defectos del crecimiento de las mutantes de síntesis de pared celular al expresar este gen sólo en el tejido vascular.

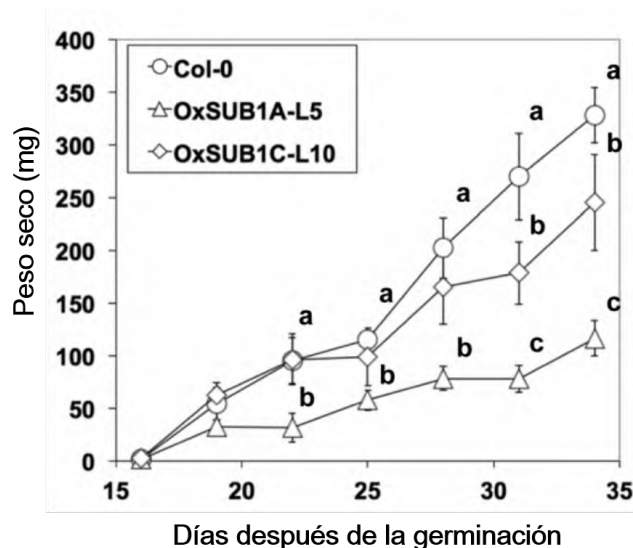


Figura 35. Peso seco de Col-0 y las líneas transgénicas *OxSUB1A* y *OxSUB1C*. Se utilizaron rosetas de *Arabidopsis*, las letras diferentes indican diferencia significativa entre las líneas transgénicas y Col-0 con el mismo punto de recolección a los 22 d (P<0.05, *t*- Student). Los valores son promedios de n=12 plantas, las barras de error son $\pm$ Desviación Estándar.

6.9 Modelo de mejoramiento de sacarificación por el gen *SUB1A-1*

Con los resultados fisiológicos, bioquímicos y moleculares que se obtuvieron en el desarrollo de esta tesis, se puede proponer un modelo mediante el cual el gen *SUB1A-1* es capaz de mejorar el rendimiento de sacarificación en *Arabidopsis* (Fig. 36).

Mientras que las plantas silvestres transitan del estado juvenil al maduro utilizando las reservas de almidón para el desarrollo de la inflorescencia y las semillas, las plantas *OxSUB1A* retienen estas reservas por tener una floración tardía al tener reprimida la ruta de floración dependiente de *CO/FT*. De esta manera, la característica de conservación del almidón que el gen *SUB1A-1* orchestra naturalmente en las plantas de arroz afectadas por la inundación, puede ser utilizada para manipular el contenido de almidón en las plantas (Fig. 37).

Simultáneamente, la inducción por *SUB1A-1* de varios genes de modificación de la pared celular ocasiona que se afecten las propiedades mecánicas de resistencia haciendo que las plantas *OxSUB1A* requieran de una menor inversión energética para deformarlas y mejorando así, el acceso de las enzimas hacia los carbohidratos de una manera más eficiente para degradarlos a azúcares libres.

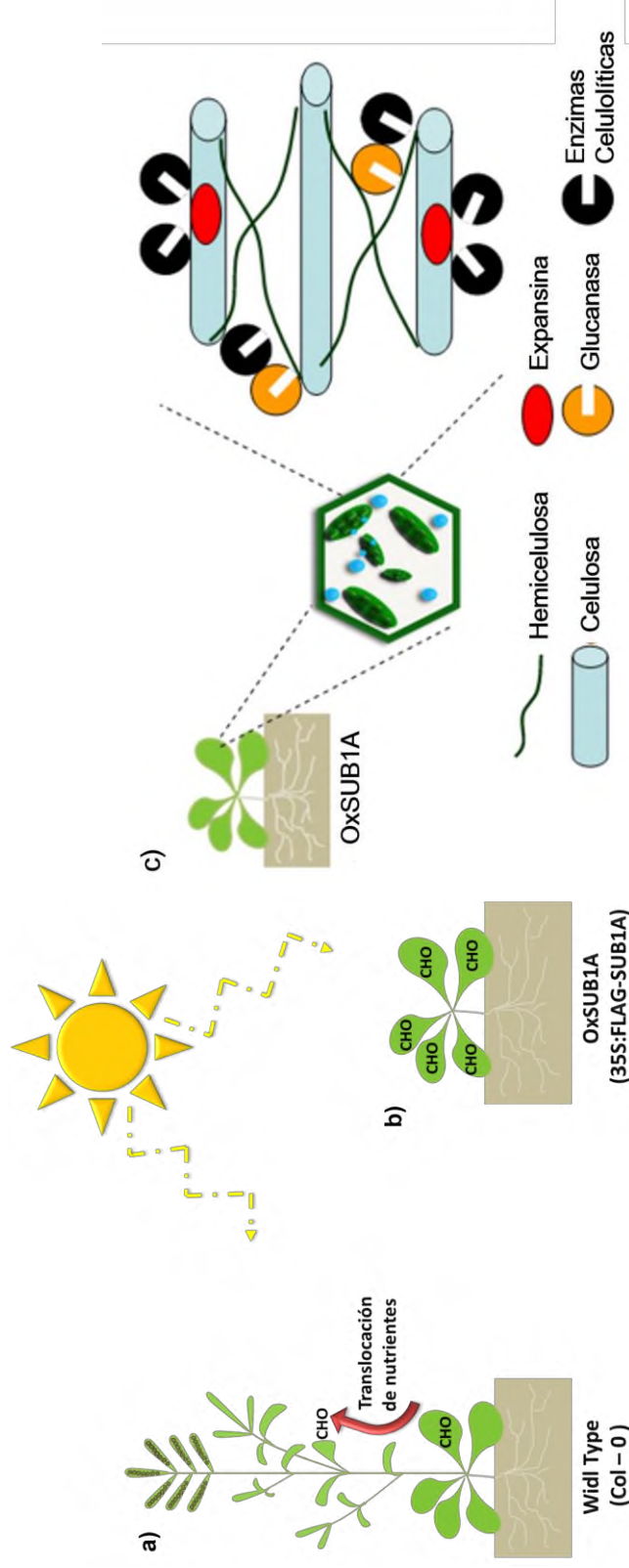


Figura 36. Modelo propuesto del rendimiento de sacarificación de *OxSUB1A-1*. a) Las plantas de *Arabidopsis* que crecen en condiciones normales utilizan los carbohidratos generados en la fotosíntesis como fuente de energía y en la traslocación de nutrientes principalmente en el desarrollo de las inflorescencias y semillas, b) *OxSUB1A* muestra una inhibición de la floración y conserva el almidón. La expresión constitutiva de este fenotipo en condiciones normales mejora la sacarificación amilolítica, c) *SUB1A-1* induce un conjunto de proteínas asociadas a la pared celular incluyendo las expansinas (*AtEXP*) y glucano-1,3-glucanasa (*BGL2*) que actúan para debilitar las microfibrillas de la pared celular y facilitar el acceso de las enzimas celulolíticas, utilizadas en la digestión de la celulosa para la producción de biocombustibles. CHO: carbohidratos solubles.

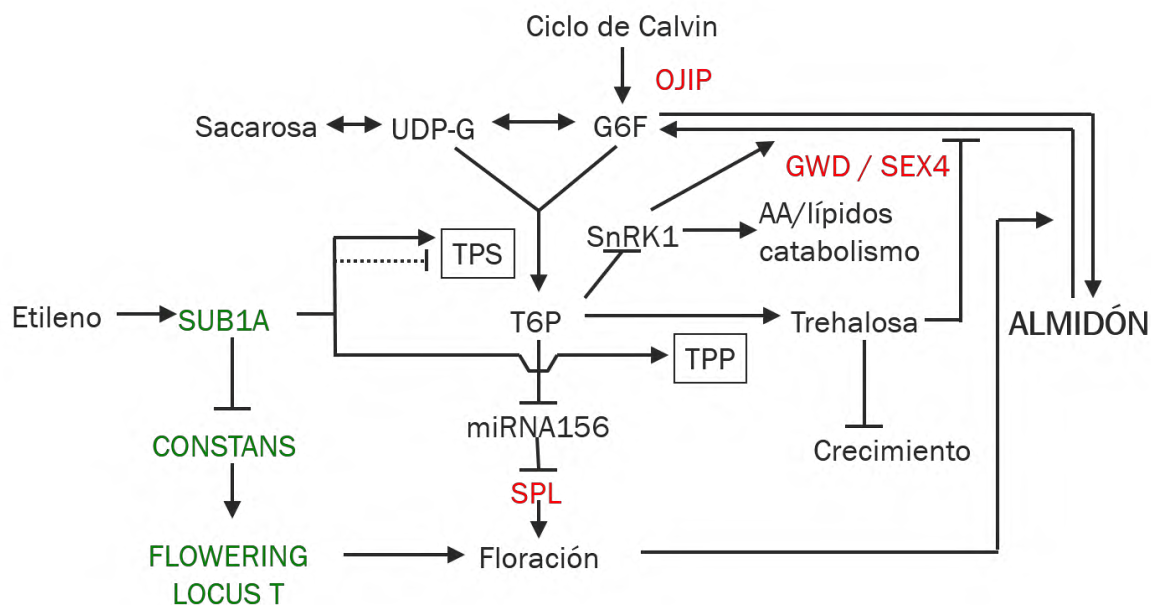


Figura 37. Diferentes mecanismos moleculares reportados en la literatura y explorados en esta tesis que intervienen en la acumulación del almidón. La biosíntesis de los carbohidratos, principalmente del almidón, se relaciona con una red de reacciones en cadena metabólicas que se llevan a cabo en el cloroplasto y en el citosol, y con la expresión de genes relacionados con el ritmo circadiano de las plantas. En conjunto, permiten el balance entre la acumulación y el consumo de almidón. Dependiendo de las necesidades de la planta puede ir de sacarosa hasta almidón o viceversa. Las rutas a seguir para cubrir estas demandas de almidón, se inician a partir de carbohidratos simples como sacarosa o desde la glucosa-6-fosfato (G6P), existen rutas alternas que tienen que ver con la expresión de genes que inducen a la floración (*SPL*) o el crecimiento, una de estas es la de la trehalosa-6-fosfato (T6P) que inhibe la expresión de *SPL*, o la ruta de la trehalosa donde el crecimiento de la planta se ve afectado. En verde, se resaltan los mecanismos donde se ha comprobado la acción de *SUB1A* y en rojo, aquellos mecanismos que se exploraron en esta tesis en los que no hubo diferencias significativas. TPS: trehalosa fosfato sintetasa, TPP: trehalosa fosfato fosfatasa.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo, se demostró que la sobreexpresión del gen *SUB1A-1* del arroz le confiere a *Arabidopsis thaliana* un fenotipo con características deseables para la producción de bioetanol.

Del análisis del proceso de sacarificación celulolítico, se concluyó que las plantas *OxSUB1A* tuvieron un incremento en su rendimiento de sacarificación hasta de un 20% más, en comparación con Col-0. En cambio las plantas *OxSUB1C* no mejoraron su rendimiento de sacarificación.

Las mediciones de la sacarificación celulolítica y amilolítica combinada indicaron que *SUB1A-1* ayudó a conservar almidón aún bajo condiciones normales de crecimiento, lo que mejoró el rendimiento hasta en un 300%. El análisis de las dinámicas de acumulación diurnas y durante el desarrollo permitió observar este mejoramiento en las etapas de desarrollo juvenil (pre-floración). Mediante las cinéticas de acumulación del almidón y de desarrollo, se demostró que el almidón es el principal compartimiento responsable del mejoramiento en el rendimiento de sacarificación de plantas *OxSUB1A*.

Se exploraron diversos mecanismos biológicos que pudieran explicar la acumulación de almidón en *OxSUB1A* tales como fotosíntesis, morfolología del gránulo de almidón y expresión génica sin encontrar diferencias significativas. Lo anterior indica que la regulación negativa de *CO/FT* que conduce a la represión de la floración, previamente reportada, es el mecanismo más probable que explica las observaciones de esta tesis

Adicionalmente, se encontró que la expresión del gen *SUB1A-1* también se asoció a la regulación de las proteínas implicadas en el ablandamiento de la pared celular, presentando menor resistencia a la deformación, lo cual también es un fenotipo de interés en las plantas que se desean utilizar como materia prima para la producción de biocombustibles

Toda esta información nos indica que la expresión del gen *SUB1A-1* es una nueva alternativa para el mejoramiento de la biomasa vegetal como materia prima para la producción de bioetanol.

8. PRESPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

México, al igual que los países industrializados, es un país que basa su economía en combustibles obtenidos a partir del petróleo y otros combustibles fósiles. Se proyecta que la demanda de esta fuente de energía se incrementará con el paso del tiempo. Por tal motivo, se hace necesario buscar estrategias que ayuden a mitigar este desabastecimiento energético. Una herramienta que puede ayudar en esta transición hacia fuentes de energía renovables es la biotecnología vegetal, mediante el mejoramiento genético de plantas como materia prima para la producción de etanol como combustible.

Las nuevas investigaciones se tienen que centrar en la relación entre el desarrollo y crecimiento del tejido vegetal con el contenido de carbohidratos o azúcares libres. Lo anterior para optimizar e implantar una estrategia biotecnológica donde se mejore el rendimiento de la sacarificación de la biomasa, basada principalmente en lo prometedora que es la expresión del gen *SUB1A-1* por la conservación del almidón y la digestibilidad de la pared celular, pero sin la penalización en el crecimiento.

Se debe explorar la posibilidad de extrapolar las características deseables que confiere el gen *SUB1A-1* y que se midieron en esta tesis, a otras dicotiledóneas y monocotiledóneas para tener cultivos con la capacidad de almacenar mayores cantidades de carbohidratos, principalmente de almidón.

Así mismo, es necesario estudiar los diferentes mecanismos moleculares que intervienen en el metabolismo de almidón, como la oscilación relacionada con el ritmo circadiano de las plantas de genes involucrados en la degradación (*GWD* y *SEX4*) y la interacción de T6P en el proceso.

La detección del fenotipo de vitrificación en las plantas *OxSUB1A* debe ser estudiada. Este fenotipo puede ayudar a descubrir el papel de las acuaporinas durante el estrés por inundación.

9. REFERENCIAS

- Álvarez-Maciel C** (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa* 359:63-89.
- Andriotis VME, Pike MJ, Schwarz SL, Rawsthorne S, Wang TL y Smith AM** (2012). Altered starch turnover in the maternal plant has major effects on *Arabidopsis* fruit growth and seed composition. *Plant Physiology* 160:1175–1186.
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796-815.
- Arantes V y Saddler JN** (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 3:4.
- Argueso JL, Carazzolle MF, Mieczkowski PA, Duarte FM, Netto OV, Missawa SK Galzerani F, Costa GG, Vidal RO, Noronha MF, Domiska M, Andrietta MG, Andrietta SR, Cunha AF, Gomes LH, Tavares FC, Alcarde AR, Dietrich FS, McCusker JH, Petes TD y Pereira GA** (2009). Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Research*, 19:2258-2270.
- Bahaji A, Li J, Sánchez-López M, Baroja-Fernández E, José Muñoz F, Ovecka M, Almagro G, Montero M, Ezquer I, Etxeberria E y Pozueta-Romero J** (2013). Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields. *Biotechnology Advances*, 32:87-106.
- Bailey-Serres J, Lee SC y Brinton E** (2012). Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant Physiology*, 160:1698–1709.
- Bailey-Serres J y Voisenek LACJ** (2008). Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology*, 59:313-339.
- Banco Mundial (BM)**. Grupo el Banco Mundial, fecha de consulta (febrero, 2015). Disponible en [datos.bancomundial.org/ indicador / IS.ROD. ENGY.ZS /countries/ 1W-MX?display=map](http://datos.bancomundial.org/indicador/IS.ROD.ENG.Y.ZS/countries/1W-MX?display=map)
- Bennett E, Roberts JA y Wagstaff C** (2012). Manipulating resource allocation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63:3391-3400.

- Binder JB y Raines RT** (2010). Fermentable sugar chemical hydrolysis of biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:4516-4521.
- Buleón A, Colonna P, Planchot V y Ball S** (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23:85-112.
- Calenge F, Saliba-Colombani V, Mahieu S, Loudet O, Daniel-Vedele F y Krapp A** (2006). Natural variation for carbohydrate content in *Arabidopsis*. Interaction with complex traits dissected by quantitative genetics. *Plant Physiology*, 141:1630-1643.
- Castillo-Vázquez NP, Siqueiros-Cendón T y Rascón-Cruz Q** (2011). Biocombustibles: estrategias limpias para combatir la crisis energética. *Tecnociencia Chihuahua*, 5:61-65.
- Chen F y Dixon R** (2007). Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology*, 25:759-761.
- Chuck GS, Tobias C, Sun L, Kraemer F, Li C, Dibble D, Arora R, Bragg NJ, Vogel PJ, Singh S, Simmons BA, Pauly M y Hake S** (2011). Overexpression of the maize *Corngrass1* microRNA prevents flowering, improves digestibility, and increases starch content of switchgrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108:17550-17555.
- Chundawat SPS, Beckham GT, Himmel ME y Dale BE** (2011). Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2:121–145.
- Cortes-Sierra S, Chavarriaga P y Lopez C** (2010). Biocombustibles y biotecnología: la yuca (*Manihot esculenta*) como modelo de investigación. *Acta Biológica Colombiana*, 15:3-24.
- Copeland L, Blazek j, Salman H y Tang MC** (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23:1527-1534.
- Coututier M, Haon M, Coutinho PM, Henrissat B, Lesage-Meessen L y Berrin JG** (2011). *Podospira anserina* hemicellulases potentiate the *Trichoderma reesei* secretome for saccharification of lignocellulosic biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:237-246.
- Demirbas A** (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49:2106–2116.

Díaz M y Carreras I (1999). Síntesis y caracterización del almidón oxidado para su posterior evaluación como agente aglutinante en tabletas. *Revista Cubana Farmacología*, 33:98-103.

Doran-Peterson J, Jangid A, Brandon SK, DeCrescenzo-Henriksen E, Dien B y Ingram LO (2009). Simultaneous saccharification and fermentation and partial saccharification and co-fermentation of lignocellulosic biomass for ethanol production. *Biofuels: Methods and Protocols*, 581:263-280.

Doxey DC, Yaish W, Moffatt B, Griffith M y McConkey BJ (2007). Functional divergence in the *Arabidopsis* β -1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1045-1055.

Early EJ, Inglad B, Winkler J y Tonsor SJ (2009). Inflorescences contribute more than rosettes to lifetime carbon gain in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 96:786–792.

FAO (2008). Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades. Capítulo 63. Efectos de los biocombustibles en el medio ambiente. Disponible en <ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100s/i0100s05.pdf>.

Ferreira V, De Oliveira-Faber M, Da Silva-Mesquita S y Pereira JN (2010). Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harboring the β -glucosidase gene. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13:1-7.

Fry S (2004). Primary cell wall metabolism: Tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*, 161:641-675.

Fukao T, Xu K, Ronald PC y Bailey-Serres J (2006). A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *The Plant Cell*, 18:2021-2034.

Fukao T y Xiong L (2013). Genetic mechanisms conferring adaptation to submergence and drought in rice: simple or complex? *Current Opinion in Plant Biology*, 16:196–204.

Fukao T, Yeung E y Bailey-Serres J (2012). The submergence tolerance gene *SUB1A* delays leaf senescence under prolonged darkness through hormonal regulation in rice. *Plant Physiology*, 160:1795-1807.

Geisler DA, Sampathkumar A, Mutwil M y Persson S (2008). Lying down the bricks: logistic aspects of cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11:647-652.

Genomasur. Libro de imágenes digitales, fecha de consulta marzo del 2013. Disponible en Genomasur.com/BCH/BCH_libro/imagenesescap_2/amilosa.JPG.

Henry RJ. (2010) Evaluation of plant biomass resources available for replacement of fossil oil. *Plant Biotechnology Journal*, 8:288–293.

Gururani MA, Upadhyaya CP, Strasser RJ, Woong YJ y Park SW (2012). Physiological and biochemical responses of transgenic potato plants with altered expression of PSII manganese stabilizing protein. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58:182–194.

Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S y Tiffany D (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103:11206-11210.

Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW y Foust TD (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels productions. *Science*, 315:804-807.

Iglesias N (2008). Actividad de glicosilasas sobre el xiloglucano de la pared celular de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología vegetal, Universidad de Santiago de Compostela.

Inderwildi O y King D (2009). Quo Vadis biofuels? *Energy & Environmental Science*, 2:343-346.

Jutakanoke R, Leepipatpiboon N, Tolieng V, Kitpreechavanich V, Srinorakutara T y Akaracharanya A (2012). Sugarcane leaves: pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, 39:283-289.

Karakashev D, Batstone DJ y Angelidaki I (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:331-338.

Kuti OA, Xiangang GW, Zhang W, Nishida K y Huang ZH (2010). Characteristics of the ignition and combustion of biodiesel fuel spray injected by a common-rail injection system for a direct-injection diesel engine. *Journal of Automobile Engineering*, 224:1581-1596.

- Lavoine N, Desloges I, Dufresne A y Bras J** (2012). Microfibrillated cellulose—Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*, 90:735-764.
- Leboeuf E, Thoiron S y Lahaye M** (2004). Physico-chemical characteristics of cell walls from *Arabidopsis thaliana* microcalli showing different adhesion strengths. *Journal of Experimental Botany*, 55:2087-2097.
- Lindeboom N, Chang PR y Tyler RT** (2004). Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. *Starch/Starke*, 56:89-99.
- Liendo J, Perdomo B y Techeira N** (2011). Uso de almidón de apio (*Arracacha xanthorrhiza* B.) en colados de durazno (*Prunus persica* L.) *Revista Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela*, 37:93-104.
- Lionetti V, Francocci F, Ferrari S, Volpi C, Bellincampi D, Galletti R, D'Ovidio R, De Lorenzo G y Cervone F** (2010). Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107:616-621.
- Lintala M, Schuckb N, Thormählend I, Jungferb A, Webere KL, Webere APM, Geigenbergerd P, Sollb J, Bölterb B y Muloa P** (2014). *Arabidopsis* tic62 trol mutant lacking thylakoid-bound ferredoxin–NADP⁺ oxidoreductase shows distinct metabolic phenotype. *Plant Molecular*, 1:47-57.
- Martins M, Hejazi M, Fettke J, Steup M, Feil R, Krause U, Arrivault S, Vosloh D, Figueroa CM, Ivakov A, Yadav PU, Piques M, Metzner D, Stitt M y Lunn JE** (2013). Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology*, 163:1142-1163.
- McLaren JS** (2005). Crop biotechnology provides an opportunity to develop a sustainable future. *Trends in Biotechnology*, 23:339-342.
- Mera I, Hoyos JL, Carrera J, Forero CL y Velasco R** (2003). Caracterización enzimática de alfa-amilasa y glucoamilasa en la hidrólisis de almidón de yuca (*Manihot sculenta*). *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 1:83-88.
- Mera I y Carrera J** (2005). Obtención de glucosa a partir de almidón de yuca *Manihot sculenta*. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 13:54-62.

Mutwil M, Debolt S y Persson S (2008). Cellulose synthesis: a complex complex. *Current Opinion in Plant Biology*, 11:252-257.

Naik S, Goud V, Rout P y Dalai K (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:578-597.

Nigorikawa M, Watabnabe A, Furukawa K, Sonoki T y Ito Y (2012). Enhanced saccharification of rice straw by overexpression of rice exo-glucanase. *Rice* 5:1-7.

Núñez-Lopez L, Cruz-Aguirre A, Barrera-Figueroa BE y Peña-Castro JM (2015). Improvement of enzymatic saccharification yield in *Arabidopsis thaliana* by ectopic expression of the rice *SUB1A-1* transcription factor. *PeerJ*, 3:e817.

Oleskowicz-Popiel P, Thomsen AB y Schmidt JE (2011). Ensiling–Wet-storage method for lignocellulosic biomass. *Biomass and Bioenergy*, 35:2087- 2092.

Ortiz-Marchena MI, Albi T, Lucas-Reina, Said FE, Romero-Campero FJ, Cano B, Ruiz MT, Romero J y Valverde F (2014). Photoperiodic control of carbon distribution during the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26:565-584.

Ossa-Basañes F y Reborá C (2012). Cultivos energéticos para biocombustibles. Trabajo de revisión bibliográfica. Universidad de Cuyo y el Instituto de energía, Argentina.

Paparelli E, Parlanti S, Gonzal S, Novi G, Mariotti L, Ceccarelli NT, van Dongen T, Kölling K, Zeeman SC y Perata F (2013). Nighttime sugar starvation orchestrates gibberellin biosynthesis and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25:3760–3769.

Park E, Díaz-Moreno S, Davis DJ, Wilkop TE, Bulone V y Drakakaki G (2014), Endosidin 7 specifically arrests late cytokinesis and inhibits callose biosynthesis revealing distinct trafficking events during cell plate maturation. *Plant Physiology*, 165:1019-1034.

PEMEX (2008). Todo sobre la reforma energética: los 25 principales desafíos de Petróleos Mexicanos. Fecha de consulta abril del 2014. www.pemex.com/index.cfm?action=content§ionID=137&catID=12240

Peña-Castro JM, Zanten MV, Lee SC, Patel MR, Voeselek LAJC, Fukaho T y Bailey-Serres J (2011). Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in

Arabidopsis uncovers flowering inhibition as a submergence tolerance mechanism. *The Plant Journal*, 67:434-446.

Peña-Castro JM (2014) Respuesta molecular de las plantas ante el estrés por inundación: lecciones aprendidas del gen *SUB1A*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 4:325–337.

Perata P y Voesenek LACJ (2007). Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends in Plant Science*, 12:43-46.

Pérez-Almeida I y Carpita N (2006). Las β -Galactosidasas y la dinámica de la pared celular. *Interciencia*, 7:476-483.

Pfister B, Lu KJ, Eicke S, Feil R, Lunn JE, Streb S y Zeeman SC (2014). Genetic evidence that chain length and branch point distributions are linked determinants of starch granule formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 165:1457–1474.

Ponnu J, Wahl V y Schmid M (2011). Threulose-6-phosphate: connecting plant metabolism and development. *Plant Physiology*, 70:1-6.

Razbani O, Mirzamohammand N y Assadi M (2011). Literature review and road map for using biogas in international combustion engines. Third international conference on applied energy, 16-18 may, 2011, Perugia, Italy.

Sánchez-Cano JE (2007). Biocombustibles la era de la nueva revolución agrícola. *Tiempo Apuntes*, 4:79-84.

Santelia D y Zeeman SC (2011). Progress in *Arabidopsis* starch research and potential biotechnological applications. *Current opinion in Biotechnology*, 22:271-280.

Secretaría de Energía (2010). Sector Energético en México. Energetica y Desarrollo Tecnológico, informe 2010.

Slewinski TL (2012). Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production. *Journal of Experimental Botany*, 63:4647–4670.

Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D y Smith SM (2002). Starch mobilization in leaves. *Journal of Experimental Botany*, 54:577-583.

Sousa P y Magalhaes P (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:850-861.

- Stamatiou G, Vidaurre DP, Shim I, Tang X, Moeder W, Bonetta D y McCourt P** (2013). Forward genetic screening for the improved production of fermentable sugars from plant biomass. *Plos One*, 8:e55616.
- Stamm P, Verma V, Ramamoorthy R y Kumar P** (2012). Manipulation of plant architecture to enhance lignocellulosic biomass. *AoB Plants*, 2012:pls026.
- Stitt M, Lunn JE y Usadel B** (2010). *Arabidopsis* and primary photosynthetic metabolism: more than the icing on the cake. *The Plant Journal*, 61:1067-1091.
- Strabala TJ y MacMillan CP** (2013). The *Arabidopsis* wood model the case for the inflorescence stem. *Plant Science*, 201:193-205.
- Streb S y Zeeman SC** (2012). Starch metabolism in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* book. *American Society of Plant Biologists*, e0160.
- Sun Y y Chen J** (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83:1-11.
- Tabka MG, Herpoël-Gimbert I, Monod F, Asther M y Sigoillot JC** (2006). Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulose xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:897-902.
- Tachinardi MH** (2008). Porque o Brasil nao agarra logo essa chance. Revista Época. revistaepoca.globo.com/Revista/Epoca/0,,EMI5865-15273.html
- Talebnia F, Karakashev D y Angelidaki I** (2010). Production of bioethanol from wheat Straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101:4744-4753.
- Tang H, Mitsunaga T y Kawamura Y** (2006). Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture. *Carbohydrate Polymers*, 63:555-560.
- Taylor NG** (2008). Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytologist*, 178:239-252.
- Trajano HL, Engles NL, Foston M, Ragauskas AJ, Tschaplinski TJ y Wyman CE** (2013). The fate of lignin during hydrothermal pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, 6:110.

- United States Energy Information Administration** (2012). *Mexico energy profile*. 2012. Actualizado por última vez en octubre del 2012 de la URL: <http://www.eia.gov/countries/analysisbriefs/Mexico/Mexico.pdf>
- Valero-Padilla J, Cortina-Villar HS y Vela-Coiffer MP** (2011). El proyecto de biocombustibles en Chiapas: experiencias de los productores de piñón (*Jatropha curcas*) en el marco de la crisis rural. *Estudios Sociales*, 19:120-144.
- Vázquez HJ y Dacosta O** (2007). Fermentación alcohólica: Una opción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 8:249-259.
- Vivas-Castaño AM** (2010). Estudio y obtención de biodiesel a partir de residuos grasos de origen bovino. Tesis de licenciatura. Departamento de Tecnología. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Wahl V, Ponnu J, Schlereth A, Arrivault S, Langenecker T, Franke A, Feil R, Lunn JE, Stitt M y Schmid M** (2013). Regulation of flowering by Trehalose-6-phosphate signaling *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339:704-708.
- Weise SE, Aung K, Jarou ZJ, Mehrshahi P, Li Z, Hardy AC, Carr DJ y Sharkey TD** (2012). Engineering starch accumulation by manipulation of phosphate metabolism of starch. *Plant Biotechnology Journal*, 10:545–554.
- Wu G y Poethig S** (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development*, 133:3539-3547.
- Xu K, Xu S, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez SH, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC y Mackill D** (2006). SUB1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature*, 442:705-708.
- Yamashita Y, Shono M, Sasaki C, and Nakamura Y.** (2010) Alkaline peroxide pretreatment of efficient enzymatic saccharification of bamboo. *Carbohydrate Polymers*, 79:914-920.
- Zamora-Hernández T, Prado-Fuentes A, Capataz-Tafur J, Barrera-Figueroa BE y Peña-Castro JM** (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educación Química*, 25:122-127.

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

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

Zeeman SC, Smith SM y Smith AM (2007). The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal*, 401:13-18.

Zhu D, Wu Z, Cao G, Li J, Wei J, Tsuge T, Gu H, Aoyama T y Qu LJ (2014). TRANSLUCENT GREEN, an ERF family transcription factor, controls water balance in *Arabidopsis* by activating the expression of aquaporin genes. *Molecular Plant*, 4:601–615.

Zhu JY, Gleisner R, Scott CT, Luo XL y Tian S (2011). High titer ethanol production from simultaneous enzymatic saccharification and fermentation of aspen at high solids: A comparison between SPORL and dilute acid pretreatments. *Bioresource Technology*, 102:8921-8929

Zhu Z, Sathitsuksanoh N, Vinzant T, Schell DJ, McMillan JD y Zhang YHP (2009). Comparative study of corn stover pretreated by dilute acid and cellulose solvent-based lingocellulose fractionation: enzymatic hydrolysis, supramolecular structure, and substrate accessibility. *Biotechnology Bioengineering*, 103:715-724.

10. ANEXOS

Anexo A. Preparación de reactivos y soluciones

1. Reactivo DNS (ácido 3, 5-dinitrosalicílico) (100 ml)

- 30 g de tartrato de sodio y potasio
- 30 ml de agua caliente
- 1.6 g de hidróxido de sodio
- 1.0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico

Procedimiento

1. Para preparar el DNS se colocan los 30 ml de agua destilada en un vaso de precipitado hasta llegar a ebullición y se disuelven los 30 g de tartrato de sodio y potasio.
2. Se agregan los 1.6 g de hidróxido de sodio hasta que todo este disuelto se agrega lentamente el gramo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (se cubre con papel aluminio ya que precipita con la luz).
3. Se disuelve todo y se afora a 100 ml de agua destilada.

2. Reactivos y soluciones del Kit de Megazyme Total Starch

Buffer de acetato de sodio pH 5.0 (Reactivo 1)

1. Agregar 5.8 ml ácido acético glacial en 900 ml de agua desionizada.
2. Ajustar el pH a 5.0 con una solución de 1 M de hidróxido de sodio (4g / 100 ml; aprox. 40 ml). Estable 2 meses a 4°C.
3. Agregar 0.74 g de cloruro de calcio dihidratado. Ajustar a 1 l con agua desionizada. Estable de 3 a 4 meses a 4-6°C.

Solución 1

Tomar 1 ml de la botella 1 (amilasa termoestable) y agregarlo en 29 ml del reactivo 1 (buffer de acetatos); estable por 3 meses a 4°C y por 3 años a -20°C.

Se puede utilizar directamente de la botella 1, estable por 4 años a 4°C (utilizado así en esta tesis).

Solución 2

Se utiliza directamente de la botella 2 (amiloglucosidasa), estable por 4 años a 4°C.

Solución 3

Diluir el contenido de la botella 3 (48 ml) en 950 ml de agua desionizada, en una probeta de 1000 ml y llevar a 1 l, estable por 4 años a 4°C.

Solución 4

Diluir la botella 4 (glucosa oxidasa) en 20 ml de la solución 3 y transferir todo de vuelta a la botella 3, homogenizando. Cubrir el bote con papel aluminio para protegerlo de la luz. El reactivo para la determinación de glucosa, es estable ~3 meses de 2-5°C o > 12 meses a -20°C. Si se almacena es preferible guardarlo en alícuotas. Debe estar congelado y descongelado solo una vez en su uso.

Solución 5 y 6

Utilizar directamente de la botella 5 (D-Glucosa) y 6 (Almidón de maíz), ambos son estables a temperatura ambiente 25°C por 4 años.

3. Buffer de fosfatos pH 6.6 (0.1 M)

- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (Sigma LifeScience, Sigma-Aldrich), **Stock A.**
- Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) (Baker Analyzed), **Stock B.**

Preparación de la solución A (200 ml)

KH_2PO_4 3.48 g

Agua desionizada..... 200 ml

Pesar en papel aluminio el KH_2PO_4 y con ayuda de un magneto homogenizar, se coloca el vaso de precipitado en una parrilla magnética con 150 ml de agua desionizada, finalmente agregarle el resto del agua y guardarlo en frasco de 250 ml.

Preparación de la solución B (200 ml)

K_2HPO_4 3.48 g

Agua desionizada..... 200 ml

Pesar en papel aluminio el K_2HPO_4 y con ayuda de un magneto disolverlo para esto se coloca el vaso de precipitado en una parrilla magnética con $\frac{3}{4}$ partes de agua desionizada, finalmente agregarle el resto del agua y guardarlo en frasco de 250 ml.

Buffer de fosfatos pH 6.6 (200 ml)

Con la ayuda de una probeta medir 12.4 ml del solución A y 7.6 ml del solución B, agregar el agua desionizada hasta alcanzar el volumen final.

4. Solución *buffer* de fosfatos más formaldehído al 3.7%

Formol tamponado pH 6.6 (formaldehído más *buffer* de fosfatos), se prepara añadiendo 5.5 ml de formaldehído al 37% en 144.5 ml de *buffer* de fosfatos pH 6.6, elaborar el mismo día de uso.

5. Solución de Lugol [KI 2% (p/v), I₂ 1% (p/v)]

- Yodo resublimado (I₂) en perlas (Química Meyer)
- Yoduro de potasio (KI) granulado (Baker Analyzed)

Preparación del Lugol

- Yodo 1 g
- Yoduro de potasio 2 g
- Agua desionizada 300 ml

Combinar poco a poco el yodo y el yoduro de potasio en 100 ml con la ayuda de un magneto giratorio, hasta alcanzar el volumen final (300 ml). Almacenar la solución en una botella de color ámbar o en su defecto, forrar un frasco con papel aluminio y mantenerlo en oscuridad a temperatura ambiente.

6. Gel de agarosa no desnaturalizante 1%

- TAE 1X
- Agarosa 1g

Pesar un gramo de agarosa (p/v) y fundirlo en TAE 1X, la mezcla se fundió en el microondas (40, 20, 15, 10 s) hasta su disolución.

7. TAE 50X (1000 ml)

- Tris base 242 g
- Ácido acético 57.1 ml
- EDTA 0.5 M 100 ml

El volumen final se ajusta a pH 8.0. De esta solución concentrada se toman alícuotas 2 ml (TAE 50X) para diluir a 1X, aforando a 100 ml de agua destilada.

8. Gel de agarosa desnaturalizante para RNA al 1%

- H₂O DEPC 72 ml
- MOPS 10x 10 ml
- Agarosa 1 g
- Formaldehído 18 ml
- MOPS 1x (para cargar el gel)

- * Pesar un gramo de agarosa, disolver y fundir en 72 ml de agua de DEPC.
- * Dejar atemperar por un momento, después agregar 10 ml de MOPS 10x.
- * Adicionar posteriormente 18 ml de formaldehído.
- * Mezclar bien y guardar a temperatura ambiente

NO adicionar el formaldehído cuando la agarosa este caliente, dejar a que se enfríe un poco y agregar (realizar este paso en la campana de extracción).

9. Buffer MOPS 10x pH 7.0 (500 ml)

- Acetato de sodio 5.44 g
- MOPS 20.60 g
- EDTA 0.5 M pH 8.0
- Hidróxido de sodio (Stock 2N)
- H₂O DEPC

- * Disolver el acetato de sodio en 370 ml H₂O DEPC.
- * Agregar el MOPS, homogenizar con un magneto.
- * Agregar 10 ml de EDTA.
- * Ajustar el pH 7.0 con hidróxido de sodio (2N).
- * Aforar a 500 ml con H₂O DEPC.

10. H₂O DEPC

- H₂O desionizada 1000 ml
- DEPC 1 ml

- * Adicionar el DEPC al agua desionizada y agitar hasta difundirlo.
- * Homogenizar con la ayuda de un magneto toda la noche.
- * Esterilizar bajo condiciones estándar (121°C por 15 min), para inactivar el DEPC.

11. Buffer de lisis (EB)

		Concentración final	Volumen final (2 ml)
EDTA	0.5 M (pH 8.0)	50 nM	200 µl
NaCl	2.5 M	500 nM	400 µl
Tris	1.0 M (pH 8.0)	100 nM	200 µl
SDS	5%	0.2%	80 µl
Agua desionizada			1200 µl

Anexo B. Condiciones de crecimiento de *A. thaliana*

A. Preparación del medio de cultivo

Procedimiento:

1. Preparar medio de cultivo semisólido MS (Murashige & Skoog Basal salt mixture, Phytotechnology Laboratories). Para 500 ml de medio se agregan 5 g de sacarosa (1%), más 1.08 g de MS (0.5 X), homogenizar, el pH 5.7 deberá ajustarse con NaOH 1.0 N antes de adicionar el agar, agregar 5 g de agar (Plant Tc, Micropropagation grade-gelidium, Phytotechnology Laboratories) al 1% al medio MS, preparar la cantidad de medio de cultivo suficiente.
2. Esterilizar el medio de cultivo bajo condiciones estándar (121°C por 15 min), con una magneto dentro del vaso de precipitado, homogenizar el medio de cultivo (cuidando de no formar burbujas en el medio). En la campana de flujo laminar verter 40 ml en cada caja Petri (12 cajas), dejar que solidifique el medio sellar la caja con cinta adherente hasta su uso.

B. Desinfección de la semilla

1. Trabajar en la campana de flujo laminar.
2. Colocar las semillas en un tubo eppendorf con 1 ml EtOH 70%, por 5 min en agitación constante (manualmente o con vortex), retirar con una micropipeta eppendorf de 1000 µl, el EtOH (teniendo cuidado de no llevarse las semillas).
3. Agregar 1 ml de hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 50% con agua desionizada por 2 min en agitación constante, retirar con cuidado la solución usando una pipeta de eppendorf de 1000 µl.
4. Lavarlas cinco veces con 1 ml de agua desionizada estéril, para eliminar el hipoclorito de sodio y retirar el agua con ayuda de una pipeta. Las semillas se dejan a 4°C por 4 d.

C. Sembrado en placa

1. Del tubo eppendorf, tomar las semillas con una pipeta Pasteur estéril con tapón de algodón y colocar de 25-30 semillas en la placa con medio MS procurando que queden separadas, las cajas se sellan hasta $\frac{3}{4}$ con microporo.
2. Colocar las cajas con las semillas, en la cámara de crecimiento a una temperatura de 23 °C por siete días hasta ser trasplantadas al sustrato.

D. Preparación de la mezcla

- a. Por cada 4 l de mezcla se necesitan 3 l de Sunshine mezcla # 3 (Sunshine) más 1l de perlita blanca.
- b. Homogenizar la mezcla y colocarla en sacos de algodón (doble saco), esterilizarla a 121°C por 60 min. Dejar atemperar, para su posterior uso.
- c. Homogenizar con el fertilizante balanceado nitrógeno, fosforo y potasio (12:12:17), agregar 16.56 gr por cada 4 l.

E. Resembrado en sustrato

1. En una bandeja colocar 4 l de la mezcla y rehidratar con 1.5 l de agua potable aproximadamente.
2. Colocar la mezcla en una charola para germinación de plástico, 4 l de la mezcla por cada una. Con la ayuda de una pinza escarbar en el sustrato y

tomar una plántula del medio MS y traspasarla al sustrato (con cuidado de no romper la raíz, si esta está entre el medio romperlo con la punta de la pinza para extraerla), con una piseta hidratar la raíz y enterrarla.

3. Una vez traspasadas, tapar todas las plántulas con un domo por 4 días y colocarlas en la cámara de crecimiento dependiendo del tiempo del experimento.

Anexo C. Crio-molienda del tejido vegetal

1. Recolectar al finalizar el día por lo menos 300-500 mg de material vegetal, tarar y etiquetar previamente el papel aluminio para colocar las muestras, congelarlas con N₂ líquido y guardarlo en el ultracongelador a -80°C (hasta su uso).
2. El material vegetal previamente etiquetado se coloca en una nevera con aproximadamente 3-4 l de N₂ líquido (sin dejar que este se consuma) para que no se descongele.
3. En un mortero con pistilo agregar unos 50-70 ml de N₂ líquido, seguidamente colocar la muestra y macerar hasta obtener un polvo fino.
4. Con la ayuda de una espátula y un tubo falcón de 15 ml (previamente sumergidos en N₂ líquido) raspar del mortero al material vegetal y colocarlo en un tubo Falcón mantener el tubo en nitrógeno o si es necesario guardarlo en el ultra-congelador hasta su uso.

Anexo D. Determinación de azúcares reductores

El ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), de color amarillo, en presencia de calor se reduce a ácido 3-amino-5 nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) por los azúcares reductores presentes (glucosa u otro azúcar reductor), el color es estable hasta por 24 h (verificado en esta tesis). La lectura se realiza a 545 nm. Este método permite medir las unidades reductoras presentes en los azúcares.

1. Se centrifugaron las muestras para retirar las células por 5 min a máxima velocidad.
2. En tubos eppendorf se colocaron 100 µl del reactivo de DNS y se añadieron 100 µl de muestra, se homogenizó utilizando el vortex.

3. Se colocaron en baño de agua a ebullición durante 5 min, después a cada una de las muestras se le añadió 1 ml de agua destilada y se colocaron en hielo.
4. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV/VIS a 545 nm.
5. Antes de cada medición de azúcares reductores se realiza una curva de calibración de concentración de glucosa vs absorbancia 545 nm.

Anexo E. Protocolo de sacarificación

Sacarificación material lignocelulósico y el almidón

A. Pretratamiento

1. Criomolienda del tejido vegetal.
2. Colocar tubos de plástico (tipo Falcon) de 15 ml con muestra pulverizada en una gradilla de plástico dentro de una nevera con N₂ líquido, con la ayuda de una espátula (sumergida en N₂ líquido) tomar la muestra y colocarla en un nuevo tubo de 15 ml (tarado) y pesar de 100-125 mg, etiquetar el tubo antes de ponerlo dentro de la nevera.
3. Agregar a cada una 200 µl de EtOH al 80% (v/v) con una pipeta de repeticiones (Pipetas eppendorf, Research plus) y homogenizar con vortex.

B. Digestión con Accellerase

4. Homogenizar la mezcla enzimática Accellerase suavemente.
5. En un matraz aforado de 100 ml, preparar una solución de Accellerase agregando 1.68 ml de Accellerase en 100 ml de *buffer* de acetatos y homogenizar.
6. Agregar en el tubo de plástico 3 ml de solución Accellerase donde está el tejido vegetal pesado e incubar a 50°C por 24 h a 11 rpm en el horno de hibridación, después de este tiempo inactivar la solución de Accellerase a 70°C por 10 min.
7. Tomar una alícuota de 200 µl en un tubo eppendorf con una micropipeta de 200 µl, centrifugar a 4300 rpm por 10 min (Microcentrifuga PICO 21, Eppendorf), agregarlo a un tubo de 15 ml y aforar a 2 ml (ir al punto 12).

C. Digestión de almidón con enzimas Megazyme

8. Procesar 20 muestras máximo.
9. A la solución restante agregar 100 µl de α-amilasa termoestable (botella 1). En una parrilla eléctrica con agua hirviendo (95-98°C) colocar los tubos falcón por 12 min sacar la gradilla del agua hirviendo y homogenizar los tubos cada 4, 8, 12 min en el vortex por 10 s.
10. Los tubos se colocan en baño de agua a 50°C, se dejan atemperar 8 min y se le agrega 100 µl α-amiloglucosidasa (botella 2), agitar en vortex por 10 s e incubar a 50°C por 30 min.
11. Aforar a 10 ml con agua desionizada y tomar 100 µl para la cuantificación de glucosa.

D. Cuantificación de glucosa

12. Homogenizar en vortex por 10 s o hasta que el sedimento se mezcle con la solución y dejar reposar 1 min (ya que la punta de la micropipeta se tapa con los pedacitos de material vegetal). Tomar una alícuota de 1 ml en un tubo Eppendorf. Centrifugar a 4300 rpm por 10 min (Microcentrifuga PICO 21, Eppendorf).
13. Transferir a tubos de 15 ml una alícuota de 100 µl de la solución centrifugada (hacer esto por duplicado).
14. Agregar 3.0 ml de glucosa oxidasa (GOPOD) a cada tubo incluyendo al control de D-glucosa y al blanco, agitar en vortex e incubar a 50°C por 20 min. El control de D-glucosa (cuatro controles) proporcionada por el kit Total Starch (Megazyme) consiste en 100 µl de solución estándar de D-glucosa (1 mg/ml) y 3.0 ml de GOPOD. El blanco consiste en 100 µl de agua desionizada y 3.0 ml de GOPOD. El control de la actividad de las enzimas esta estandarizado por el almidón de maíz (Total Starch, Megazyme). Los controles de Accellerase consisten en el blanco Accellerase que es 100 µL del *Buffer* de acetatos más Accellerase y 3 ml de GOPOD, *buffer* de acetatos y 3 ml de GOPOD, y carboximetil celulosa (CMC) en *buffer* de acetatos con y sin Accellerase y 3 ml de GOPOD.

15. Lea el blanco a 510 nm y calibrar a cero, después cada una de las muestras.

Anexo F. Tinción con yodo

1. **Infiltración.** Se coloca un tapón horadado conectado a una bomba de vacío sobre un tubo plástico de 50 ml destapado, este contiene 30 ml de formol tamponando pH 6.6 donde la planta se sumergirá y se coloca entre ella y el tapón horadado, una gasa para que no flote la planta, esto se realiza por 10 min y cada 30 s se da un pequeño golpe para eliminar las burbujas teniendo cuidado de no romper la planta. Fotografíar.
2. **Decoloración.** Colocar la planta infiltrada en nuevo tubo falcón de 50 ml con 30 ml de EtOH caliente (75-80°C) por 30 min en una plataforma de agitación.
3. Enjuagar con 40 ml de agua desionizada cada de las plantas por 30 s, fotografiar.
4. En tubos de 50 ml forrarlos con papel aluminio, agregar 30 ml de Lugol (fotosensible), sumergir la planta por 30 min.
5. Enjuagar con abundante agua desionizada hasta retirar el exceso de Lugol, fotografiar al instante.
6. Después de 2 h en el agua, volver a fotografiar, en este lapso las plantas estarán en tubos de plástico forrados con papel aluminio y suspendidos en agua desionizada.

Anexo H. Extracción de ADN

1. Macerar con nitrógeno líquido el tejido vegetal (aproximadamente 100 µl de muestra en un tubo eppendorf).
2. Agregar 500 µl de *buffer* EB (*buffer* de lisis).
3. Homogenizar por vortex 10 s.
4. Incubar a 65°C por 30 min.
5. Agregar 500 µl de solución cloroformo-álcohol-isoamílico en la siguiente proporción 24:1 (tener cuidado de no tomar el sobre nadante del frasco).
6. Homogenizar por vortex 30 s.

7. Centrifugar por 10 min a velocidad máxima 14,800 rpm. Retirar el sobrenadante en un tubo nuevo (con mucho cuidado).
8. Agregar 500 µl de isopropanol, al sobrenadante y homogenizar en vortex.
9. Incubar a temperatura ambiente por 30 min.
10. Centrifugar 15 min a 14,800 rpm.
11. Se guarda la pastilla a 4°C. (OPCIONAL)
12. Agregar a la pastilla 750 µl de etanol al 70%. (Precipitación)
13. Homogenizar en vortex por 10 s.
14. Centrifugar por 7 min a 14,800 rpm. Remover el etanol por decantación y secar por 5 min aproximadamente.
15. Agregar 30 µl de H₂O dd + RNAsa
16. Incubar a 37°C de 40 min a 1 h.

Anexo I. Extracción de RNA. Mediante TRIZOL

1. Machacar el tejido vegetal con nitrógeno líquido en un tubo eppendorf, con pistilo, (como medida de prevención contra las RNAsa).
2. Agregar 1 ml del reactivo TRIZOL y homogenizar suavemente.
3. Incubar la muestra homogenizada durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Agregar 200 µl de cloroformo, tapar perfectamente el tubo
5. Homogenizar por vortex 15 s.
6. Incubar de 3 min a temperatura ambiente (en posición vertical).
7. Centrifugar a 4°C por 15 min a 12000 g. Luego de centrifugar, la mezcla se separa en una fase inferior roja, fase de fenol-cloroformo, en una interfase y en una fase incolora superior, la cual contiene exclusivamente el ARN.
8. Transferir la fase acuosa cuidadosamente a un tubo Eppendorf nuevo.
9. Agregar 500 µl de isopropanol para precipitar el ARN de la fase acuosa
10. Incubar por 10 min a temperatura ambiente (en posición vertical).
11. Centrifugar a 4°C por 15 min a 12000 g. El ARN debe verse precipitado como un pellet parecido a un gel.
12. Remover con cuidado el sobrenadante por decantación
13. Agregar 1 ml de etanol al 75%

14. Homogenizar por vortex 5 s.
15. Centrifugar a 4°C por 5 min a 7500 g. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
16. Secar a temperatura ambiente, colocando el Eppendorf con el ARN sobre una toalla de papel estéril.
17. Agregar 30 µl de agua libre de RNAsa. Disolver el RNA por pipeteo suave.
18. Para digerir el ADN se agrega un microlitro de DNAsa por microgramo de ARN y se incuba a 37°C por 30 min en termobloque.

Anexo J. Paso 2. Purificación de la digestión con TRIZOL

1. Después de la digestión del RNA (Paso 1), la muestra se sumerge en hielo por 2 min (*quick chilling*).
2. Centrifugar a 4°C por un min a 12000 g (11200 rpm).
3. Agregar 200 µl de TRIZOL.
4. Homogenizar en vortex por 10 s.
5. Incubar por 5 min a temperatura ambiente.
6. Agregar 40 µl de cloroformo.
7. Agitar por inmersión 10 veces (vigorosamente).
8. Reposar por 3 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 4°C por 15 min a 12000 g.
10. Separar el sobrenadante en un tubo nuevo con la ayuda de una pipeta, se recupera aproximadamente 160 µl.
11. Precipitar con 200 µl de isopropanol.
12. Homogenizar por vortex 5 s.
13. Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 4°C por 10 min a 12000 g
15. Tirar el sobrenadante por decantación.
16. Agregar 1 ml de etanol al 75% a la pastilla, (etanol puro para biología molecular más agua DEPC).
17. Homogenizar por vortex 5 s.
18. Centrifugar a 4°C por 5 min a 7500 g (8800 rpm).

TODO en HIELO entre cada PASO

19. Se retira el etanol por decantación, con cuidado de no perder la pastilla.
20. Se deja secar por 20 min a temperatura ambiente, sobre una toalla de papel limpia.
(Con una punta se retira el exceso de etanol teniendo cuidado).
21. Redisolver en 20 µl de agua para RNA. (libre de RNAsa)
22. Homogenizar en vortex por 5 s.
23. Medir en el Nanodrop.

Anexo K. Paso 3. Purificación de la digestión con acetato de sodio.

Cuando el RNA en su concentración no está limpia se realiza este paso de purificación con acetato de sodio.

1. Agregar H₂O DEPC al tubo con muestra para tener un volumen final de 200 µl. (por ejemplo, si de la digestión de RNA se tiene 17.5 µL se agregarán 181.5 µl de agua de DEPC).
2. Homogenizar por vortex 5 s.
3. Agregar 20 µl de acetato de sodio 3 M.
4. Homogenizar por vortex 5 s.
5. Agregar 660 µl etanol puro.
6. Homogenizar por vortex 5 s.
7. Reposar por 2 h a -80°C.
8. Centrifugar a 4 °C por 20 min a 13000 rpm.
9. Tirar el sobrenadante por decantación.
10. Agregar 1 ml de etanol al 75%
11. Homogenizar por vortex 5 s.
12. Centrifugar a 4°C por 5 min a 7500 g.
13. Tirar el etanol por decantación
14. Secar por 20 min a temperatura ambiente, sobre una toalla de papel limpia. (Con una punta se retira el exceso de etanol teniendo cuidado).
15. Redisolver en 20 µl de agua para RNA. (libre de RNAsa).
16. Homogenizar en vortex por 5 s.
17. Medir en el Nanodrop

Anexo L. qPCR

Después de la purificación del RNA se preparó un *mix* sin oligonucleótidos, de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se utilizó la enzima Verso SYBR Green 1-Step aRT-PCR (Thermo Scientific, AB-4105/SMP).

Se utilizaron un tubo eppendorf del 2 ml para hacer la mezcla de la SYBR Green, 9 tubos de 500 µl para los oligonucleótidos a utilizar y 36 tubos para PCR para los genotipos a utilizar (Col-0, OxSUB1A-L5 y OxSUB1A-L12).

Preparación de la mezcla de reacción (Mix; tubo de 2 ml)

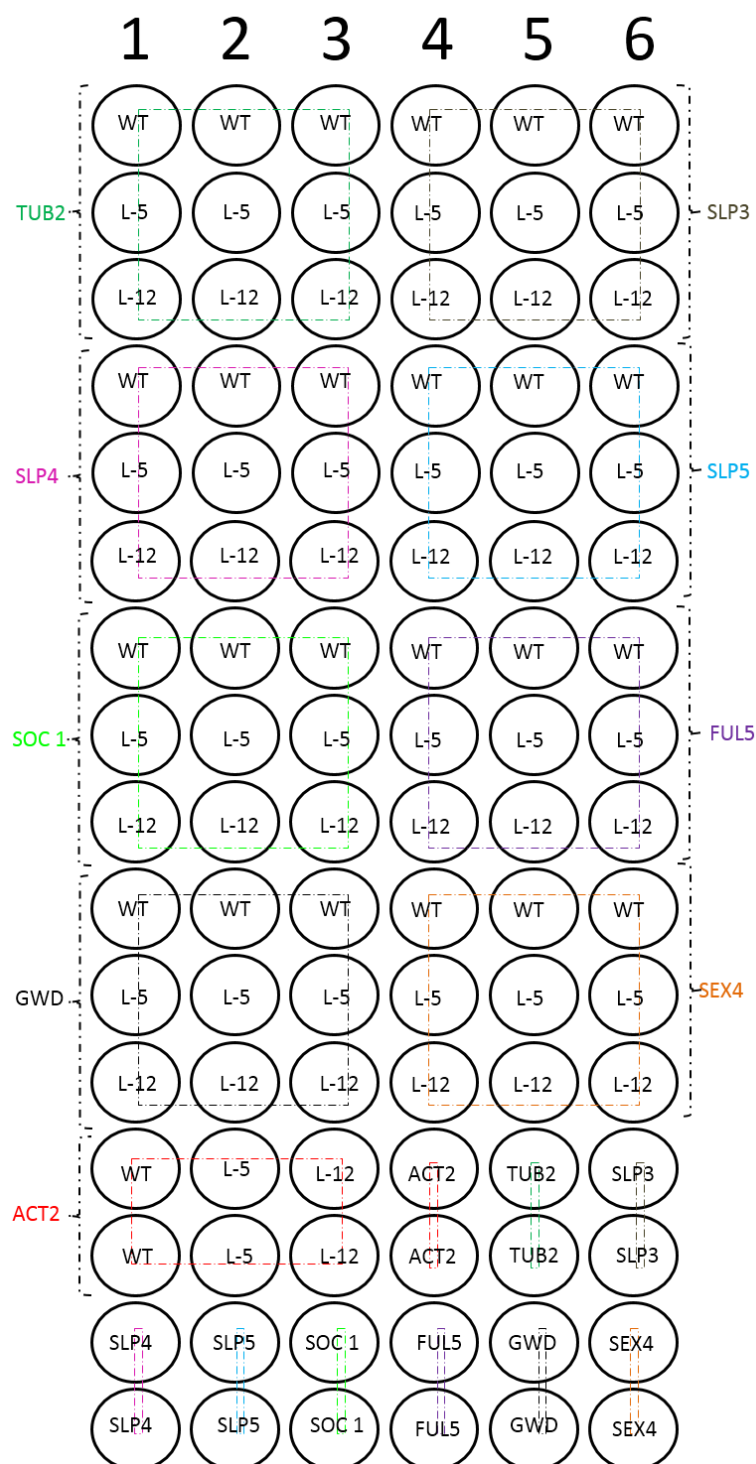
	Volumen Rx (25 µl)	105 Rx	Homogenizar la mezcla por inversión durante 3 min
Verso Enzyme Mix	0.25 µl	21 µl	
SYBR PRO Mix	12.5µl	1050 µl	
RT Enhancer	1.25 µl	105 µl	
Forward primer	1.75 µl	16.8 µl	
Reverse primer	1.75 µl	16.8 µl	
Molde (cDNA)	1 µl	---	
Agua libre de DNAsa	Llegar a los 25 µl	525 µl	

Alicuotar en los tubos de 500 µl (previamente etiquetados con el nombre de cada primer) 194.4 µl del *mix*. Seguido agregar 16.8 µl de cada primer Forward y Reverse, homogenizar por inmersión durante 10 s. Posteriormente se agregaron 57 µl en cada tubo para PCR etiquetado con el genotipo correspondiente y se le agregó 3 µl de cDNA.

Programa de los ciclos de la qPCR

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Síntesis de cADN	50°C	15 min	1 ciclo
Inicio de activación	95°C	15 min	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	15 s	40 ciclos
Alineación	60°C	30 s	
Extensión (incluir paso de captura)	72°C	30 s	

En la placa para qPCR se cargaron 20 μ l de cada muestra, esto se realizó por triplicados técnicos. El llenado de la placa se hizo de acuerdo como se muestra en la siguiente figura.



Anexo M. Tablas de Microarreglos

Tabla 6. Genes involucrados en la variación natural de contenido de carbohidratos en *Arabidopsis* (Calegen *et al.*, 2006) y su expresión en plantas de *OxSUB1A-L12*.

Proteína	Locus	Oscilación	<i>OxSUB1A-L12</i> – Col	<i>OxSUB1A-L12</i> + MG132 – <i>OxSUB1A-L12</i>	<i>OxSUB1A-L12</i> + MG132 – Col-0
APL2	At1g27680	0.947696	- 0.0951	- 1.17323	- 0.0344
CHO kinase	At1g66430	0.922567	- 0.1505	- 0.99377	- 0.1741
GBS1	At1g32900	0.978505	- 0.06369	0.18146	0.12271
G hexokinase	At1g47840	0.691097	- 0.5108	0.01346	- 0.4777
BAM7	At2g45880	0.60418	- 0.3672	- 0.04385	- 0.2039
AGL3	At3g45940	0.57233	0.73259	- 0.46946	- 2.7087
GB:X65549	At3g08580	0.86788	0.06698	- 0.06881	- 0.0762
PHS2	At3g46970	0.949151	- 0.3068	- 2.88447	- 0.5141
UTP Glc 1	At3g03250	0.794352	0.09757	- 1.13845	0.14658
AGT1	At4g32400	0.882502	0.64837	- 0.34286	0.49563
BAM5 RAM1	At4g15210	0.4023183	1.1523	- 0.12729	- 1.7409
BAM2	At4g00490	0.909803	- 0.454	- 1.23238	- 0.5626
Suc synthase	At4g02280	0.825832	0.43894	- 0.45355	0.35343
CHO kinase	At4g10260	0.531589	- 0.1634	0.18417	0.6712
Fru-1-6-bisph	At5g64380	0.926758	- 0.1389	- 0.18295	- 0.6964
Suc transpor	At5g43610	0.724226	0.60102	0.16951	- 0.6071
BAM 8	At5g45300	0.601254	- 0.2413	- 0.34316	- 0.1634
β-1 subunit	At5g39790	0.896661	0.30829	- 0.69095	0.1317

Tabla 7. Genes involucrados en el metabolismo de la trehalosa en *Arabidopsis thaliana* (Ponnu *et al.*, 2011) y su expresión en plantas de *OxSUB1A-L12*.

Class	Proteína	Locus	Oscilación	OxSUB1A-L12 – Col
ITPSs	TPS1	At1g78580	0.915802	- 0.4766
	TPS2	At1g16980	0.633878	- 0.4768
	TPS3	At1g17000	0.657266	2.32665
	TPS4	At4g27550	0.439084	0.56772
IITPSs	TPS5	At4g17770	0.974773	- 0.1717
	TPS6	At1g68020	0.948711	- 0.0668
	TPS7	At1g06410	0.898582	0.1188
	TPS8	At1g70290	0.861808	- 0.3995
	TPS9	At1g23870	0.969791	0.548
	TPS10	At1g60740	0.910269	- 0.1717
	TPS11	At2g18700	0.784771	- 0.0081
ITPPs	TPP1/TPPC	At1g22210	0.690633	0.45
	TPP2/TPPD	At1g35910	0.617312	- 1.1414
	TPP3/TPPB	At1g78090	0.59543	- 0.4273
	TPP4/TPPE	At2g22190	0.896572	- 0.1419
	TPP5/TPPF	At4g12430		- 0.8269
	TPP6/TPPG	At4g22590		- 0.4479
	TPP7/TPPH	At4g39770	0.923282	0.08756
IITPPs	TPP8/TPPI	At5g10100	0.774198	- 1.7461
	TPP9/TPPA	At5g51460	0.955257	0.4411
	TPP10/TPPJ	At5g65140	0.751198	- 0.517
Trehalose	TRE 1	At4g24040	0.6857515	0.38511

Tabla 8. Genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis del almidón en *Arabidopsis* (Zeeman *et al.*, 2012) y su expresión en plantas de *OxSUB1A-L12*.

Proteína	Locus	Oscilación	<i>OxSUB1A-L12</i> – Col	<i>OxSUB1A1-L12</i> + MG132 - <i>OxSUB1A1-L12</i>	<i>OxSUB1A1-L12</i> + MG132 - Col- 0
PGI1	At4g24620	0.783128	- 0.0209	- 0.90284	- 0.0461
PGM	At5g51820	0.577814	- 0.3143	- 1.86935	- 0.2879
APS1, ADG1	At5g48300	0.925851	- 0.4163	- 0.82556	0.11853
APS2	At1g05610	0.557952	0.02885	0.05919	0.05262
APL1, ADG2	At5g19220		- 0.5363	- 1.12179	- 0.2776
APL2	At1g27680	0.947696	- 0.0951	- 1.17324	- 0.0344
APL3	At4g39210	0.836319	- 0.793	- 0.89680	- 1.4311
APL4	At2g21590	0.832965	- 0.6892	- 0.46675	-1.5734
GBSS	At1g32900	0.978505	- 0.6369	0.18146	0.12271
SS1, SSI	At5g24300	0.845517	- 0.2174	- 1.66825	- 0.3652
SS2, SSII	At3g01180	0.906772	- 0.3369	- 1.34610	- 0.2161
SS3, SSIII	At1g11720	0.732550	- 0.5987	- 2.13963	- 0.5548
SS4, SSIV	At4g18240	0.976078	- 0.3366	- 0.93493	- 0.218
BE1	At3g20440	0.875459	0.16015	- 1.02500	- 0.6018
BE2	At5g03650	0.847576	- 0.1575	- 1.00042	- 0.3173
BE3	At2g36390	0.975114	- 0.2949	- 1.13917	- 0.0822
ISA1	At2g39930	0.922547	- 0.4415	- 1.34786	- 0.3973
ISA2, DBE1	At1g03310	0.964047	- 0.5162	- 3.04303	- 0.8513
SS2, SSII	At3g01180	0.906772	- 0.3369	- 1.34610	- 0.2161

Tabla 9. Genes que codifican proteínas implicadas en la degradación de almidón y genes relacionados (Zeeman *et al.*, 2012) y su expresión en plantas de *OxSUB1A-L12*.

Proteína	Locus	Oscilación	<i>OxSUB1A-L12</i> – Col	<i>OxSUB1A1-L12</i> + MG132 – <i>OxSUB1A1-L12</i>	<i>OxSUB1A1-L12</i> + MG132 – Col-0
GWD1, SEX1	At1g10760	0.966609	- 0.4373	- 1.32826	- 0.4256
GWD2	At4g24450	0.593843	0.12634	0.28054	0.60589
PWD, GWD3	At5g26570	0.972600	- 0.2031	- 1.65289	- 0.3482
SEX4	At3g52180	0.967124	- 0.6687	- 1.82935	- 0.7828
LSF2	At3g10940	0.945114	- 0.4174	- 2.08234	0.01793
LSF1	At3g01510	0.966979	- 0.1641	- 1.29979	0.23051
BMY7/TR-BMY	At3g23920	0.949620	- 0.1338	0.57549	0.35941
BMY9	At4g00490	0.909803	- 0.454	- 1.23239	- 0.5626
BMY8/ctBMY	At4g17090	0.818381	- 0.376	- 1.14334	- 0.6738
BAM4	At5g55700	0.540247	- 0.3121	1.17816	- 0.1945
BMY1/RAM1	At4g15210	0.403183	1.1523	- 0.12725	- 1.7409
BAM6	At2g32290	0.921152	- 1.1182	- 0.11433	- 0.9958
BAM7	At2g45880	0.60418	- 0.3672	- 0.04386	- 0.2039
BAM8	At5g45300	0.601254	- 0.2413	- 0.34316	- 0.1634
BMY3	At5g18670	0.977863	- 0.5225	2.01309	- 0.3746
AMY1	At4g25000	0.547299	1.42409	0.23402	0.22026
AMY2	At1g76130	0.761632	0.48895	0.87852	0.87466
AMY3	At1g69830	0.989064	- 0.0651	- 1.46088	- 0.1022
ISA3	At4g09020	0.978598	- 0.2411	- 1.55238	- 0.3968
LDA, PU1	At5g04360	0.879106	- 0.6027	- 1.39353	- 0.6108
PHS1	At3g29320	0.988556	- 0.336	- 2.14273	- 0.1761
PHS2	At3g46970	0.949151	- 0.3068	- 2.88447	- 0.5141
DPE1	At5g64860	0.956478	- 0.4044	- 0.98602	- 0.6168
DPE2	At2g40840	0.984557	- 0.4291	- 2.74355	- 0.3557

Tabla 10. Genes que codifican el transporte de carbohidratos en el interior del plásmido (Zeeman *et al.*, 2012) y su expresión en plantas de *OxSUB1A*-L12

Proteína	Locus	Oscilación	<i>OxSUB1A</i>- L12 – Col	<i>OxSUB1A</i>- L12 + MG132 - <i>OxSUB1A</i>- L12	<i>OxSUB1A</i>- L12 + MG132 - Col-0
MEX1	At5g17520	0.967802	- 0.058	- 1.07905	- 0.1952
PGlcT, GLT1	At5g16150	0.892451	0.12719	- 0.52841	- 0.0549
GPT1	At5g54800	0.886389	0.13751	- 0.93244	0.1538
GTP2	At1g61800	0.752858	1.13233	1.34835	0.49323