

REGULACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN EN LAS HOJAS

REGULATION OF STARCH DEGRADATION IN LEAVES

Lilia Bernal, Patricia Coello y J. Eleazar Martínez-Barajas*

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Bioquímica. Ciudad de México, México.

*Autor de correspondencia (emtz@unam.mx)

RESUMEN

Las hojas almacenan una proporción importante del carbono fijado por la fotosíntesis como almidón; su síntesis evita que la acumulación de azúcares altere el potencial osmótico celular e inhiba la actividad fotosintética. La degradación nocturna del almidón garantiza la disponibilidad de la materia y energía para la síntesis de sacarosa que se exporta al resto de la planta. La degradación del almidón está sujeta a un control que coordina la velocidad del proceso con la de exportación de sacarosa. En este artículo se hizo una revisión de la información que describe la manera en que el ritmo circadiano y la trehalosa 6-P se combinan para que el proceso de degradación del almidón sea efectivo y flexible.

Palabras clave: Degradación de almidón, ritmo circadiano, síntesis de sacarosa, trehalosa 6-P.

SUMMARY

Leaves store a significant proportion of the carbon fixed by photosynthesis as starch; its synthesis prevents the accumulation of sugar from altering the cell osmotic potential and inhibiting photosynthetic activity. Nocturnal degradation of starch guarantees the availability of matter and energy demanded for the synthesis of sucrose that is exported to the rest of the plant. Starch degradation is under a control that coordinates the velocity of the process with that of sucrose export. In this article a review was carried out on the information that describes how the circadian rhythm and trehalose 6-P come together to make the starch degradation an effective and flexible process.

Index words: Circadian rhythm, starch degradation, sucrose synthesis, trehalose 6-P.

INTRODUCCION

El almidón es una molécula que las plantas usan para almacenar reservas de carbono. Se acumula de manera transitoria en las hojas y su degradación permite que la actividad metabólica continúe durante la noche. En *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), la degradación del almidón es estimulada por el ritmo circadiano (Graf *et al.*,

2010) e inhibida por el nivel de trehalosa 6-fosfato (Tre 6-P), que refleja la velocidad con que se exporta la sacarosa (Figuroa y Lunn, 2016). El resultado es un mecanismo que ajusta la velocidad de degradación del almidón a la duración de la noche, evitando su agotamiento prematuro, al mismo tiempo que permite reducirla si la sacarosa no se exporta eficientemente.

DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN

El crecimiento de las plantas demanda constantemente moléculas que se sintetizan a partir de la actividad fotosintética; el almidón que las hojas almacenan durante el día es muy importante para amortiguar los efectos negativos de los periodos de oscuridad (Thalmann y Santelia, 2017). El almidón es un polímero formado por moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 que permite almacenar carbono reducido sin alterar la osmolaridad de las células o inhibir la actividad fotosintética (Pfister y Zeeman, 2016). El almidón está constituido por dos tipos de moléculas denominadas amilosa y amilopectina; la primera se distingue por ser poco ramificada y la segunda por la ramificación profusa; la proporción de ambas depende del origen botánico del almidón y determina sus propiedades.

El análisis de los gránulos de almidón revela que la amilosa y la amilopectina se acomodan de manera muy compacta para formar una estructura cristalina; esta propiedad constituye un obstáculo para la acción de las enzimas responsables de su degradación (Ritte *et al.*, 2006); sin embargo, la fosforilación en las posiciones C6 y C3 de los residuos de las moléculas de glucosa ubicadas en la superficie de los gránulos modifica el empaquetamiento e incrementa la hidrofiliidad; las enzimas glucán agua dicinasa (GWD) y fosfogluacán agua dicinasa

(PWD) catalizan la fosforilación en la posición C6 y C3, respectivamente (Ritte *et al.*, 2006). La actividad de GWD introduce una distorsión que facilita la participación de la PWD (Hejazi *et al.*, 2009). Esta circunstancia explica porqué ciertas mutaciones en GWD reducen significativamente la degradación del almidón y provocan su acumulación (Mahlow *et al.*, 2014); sin embargo, los grupos fosfato son un obstáculo para la actividad de las enzimas que llevan a cabo la degradación y deben ser removidos por las fosfatasas SEX4 (Starch excess 4) y LSF2 (like SEX4) (Ritte *et al.*, 2006). La SEX4 puede desfosforilar las posiciones C3 y C6, mientras que la LSF2 sólo remueve los grupos fosfato de la posición C3 (Hejazi *et al.*, 2010; Santelia *et al.*, 2011); después de eso, las enzimas amilolíticas pueden degradarlo.

La degradación del almidón y su transformación a sacarosa, la cual es exportada al resto de la planta, es un proceso que involucra la participación de enzimas tanto del cloroplasto como del citosol (Figura 1). La parte del proceso que ocurre en el cloroplasto se caracteriza por la producción de maltosa. Tanto las α - como las β -amilasas pueden actuar sobre los glucanos que forman el almidón. En general, las especies vegetales se caracterizan por tener múltiples genes que codifican para ambas enzimas. En el caso particular de *Arabidopsis*, su genoma contiene tres genes que codifican para la α -amilasa; sin embargo, la mutación de todos ellos no afecta la velocidad

de degradación del almidón, lo que significa que en condiciones normales no participan en el proceso (Yu *et al.*, 2005).

Las β -amilasas son exohidrolasas que actúan rompiendo los enlaces glucosídicos α -1,4 a partir del extremo no reductor; su actividad genera maltosa y glucanos pequeños. En *Arabidopsis* existen nueve genes que codifican para β -amilasas, cuatro de ellas (BAM1, BAM2, BAM3 y BAM4) se localizan en el cloroplasto (Monroe y Storm, 2018). La mutación de los genes que las codifican reduce la degradación nocturna del almidón; de ellas, BAM3 es la más importante (Fulton *et al.*, 2008). Las enzimas isoamilasa 3 (ISA3) y dextrinasa límite (LDA) son necesarias para hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1,6 que generan las ramificaciones de los glucanos. La enzima desproporcionadora 1 (DPE1) *in vitro* transfiere unidades de glucosa de la maltoheptaosa al glucógeno, lo que indica que dentro del cloroplasto participa en la síntesis de glucanos, sobre los que pueden seguir actuando las β -amilasas (Schopper *et al.*, 2015); por su parte, la enzima glucán fosforilasa cloroplástica (PHS1 o Pho1) cataliza la fosforólisis de las maltodextrinas y produce glucosa 1-P (Cuesta-Seijo *et al.*, 2017).

De acuerdo con este planteamiento, los productos de la degradación del almidón (maltosa y en menor proporción glucosa) se exportan al citoplasma por los transportadores

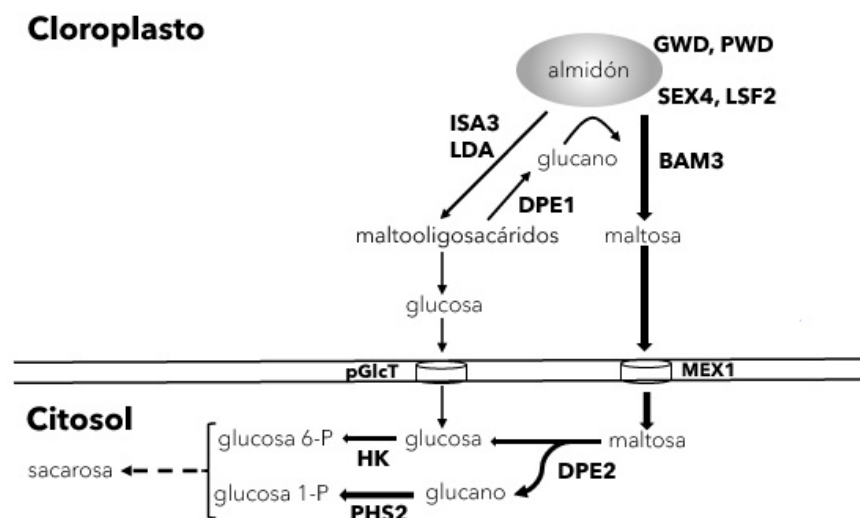


Figura 1. Degradación nocturna de almidón en hojas de *Arabidopsis*. El proceso involucra la participación de enzimas localizadas en el cloroplasto y en el citosol. La maltosa es el producto principal de la primera etapa, que en la segunda se convierte en azúcares fosforilados que pueden ser usados en la síntesis de sacarosa que se exporta al resto de la planta. GWD, glucán agua dicinasa; PWD, fosfogluán agua dicinasa; SEX4, starch excess 4; LSF2, like SEX4,2; ISA3, isoamilasa 3; LDA, dextrinasa límite; BAM1, β amilasa 1; BAM3, β amilasa 3; DPE1, enzima desproporcionadora 1; pGlcT, transportador de glucosa; MEX1, transportador de maltosa; DPE2, enzima desproporcionadora 2; PHS2, glucán fosforilasa 2; HK, hexocinasa. El grosor de las flechas indica la importancia de la reacción.

MALTOSE EXCESS PROTEIN 1 (MEX1) y PLASTID GLUCOSE TRANSPORTER (pGlcT), respectivamente (Niittylä *et al.*, 2004); ahí, la glucosa, producto de la degradación del almidón, es fosforilada y se incorpora a los procesos metabólicos que ocurren en ese compartimento; mientras tanto, las enzimas desproporcionadora 2 (DPE2) y glucán fosforilasa 2 (PHS2 o Pho2) actúan coordinadamente para metabolizar la maltosa. La enzima DPE2 tiene actividad de glucán transferasa y al transferir una molécula de glucosa de la maltosa a un glucano citosólico, libera otra molécula de glucosa. Este glucano citosólico puede ser un amortiguador importante en el metabolismo de la maltosa (Malinova y Fettke, 2017). Por su parte, la enzima PHS2 actúa sobre el glucano soluble y, mediante una reacción de fosforólisis, libera glucosa 1-P (Schopper *et al.*, 2015).

REGULACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN

La degradación nocturna del almidón que se acumula en las hojas garantiza que durante la noche haya intermediarios para procesos metabólicos y de crecimiento. El ritmo circadiano y el nivel de Tre 6-P contribuyen a que la velocidad de degradación del almidón coincida con la duración de la noche (Graf *et al.*, 2010).

Control circadiano

La degradación del almidón en tejidos fotosintéticos está sujeta a un control que garantiza que la mayor parte se use durante la noche. Ese mecanismo también afecta su síntesis y puede ajustar las velocidades de ambos procesos en función de las variaciones estacionales de la duración del día y la noche; gracias a ello, plantas de *Arabidopsis* cultivadas en fotoperiodo corto acumulan almidón más rápidamente y por la noche lo degradan a menor velocidad (Fernandez *et al.*, 2017). El reloj circadiano está formado por un conjunto de represores [LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1), PSEUDORESPONSE REGULATOR (PRR), CCA1 HIKING EXPEDITION (CHE) y LUX ARRHYTMO (LUX)] y activadores transcripcionales [BROTHER OF LUX ARRHYTMO (BOA) y REVEILLE (REV)] (Webb y Satake, 2015), cuya participación conjunta modifica la expresión genética y la estabilidad de proteínas –entre otros efectos–, para tener respuestas cíclicas en función de la duración de los periodos de luz y oscuridad.

En lo que se refiere a la degradación del almidón, LHY y CCA1 tienen un efecto muy importante, y mutaciones en los genes que los codifican hacen que el proceso se acelere y que el almidón se agote antes de que termine el periodo de oscuridad (Philippou *et al.*, 2019); sin embargo, el funcionamiento del sistema aún no está completamente claro. Se ha propuesto que la degradación nocturna del

almidón también depende de la disponibilidad de las enzimas participantes en el proceso. El hecho de que las cantidades de los mensajes que codifican a muchas de ellas se incrementen y alcancen los valores máximos antes de que inicie el periodo de oscuridad apoya esa sugerencia; no obstante, esos cambios tienen poco impacto en la cantidad de las proteínas (Skeffington *et al.*, 2014). También se ha sugerido que la degradación nocturna del almidón es promovida por la activación de las enzimas participantes, en respuesta a cambios que en el estroma de los cloroplastos promueven la alternancia de los periodos de luz y oscuridad.

Las actividades de las enzimas GWD, SEX4, BAM1, BAM3, AMY3 y LDA se incrementan cuando se ensayan en condiciones donde puentes disulfuro, que son críticos, se encuentran reducidos (Silver *et al.*, 2014); sin embargo, durante la noche el estroma se vuelve oxidante, lo que afectaría negativamente la actividad de todas ellas. Otros autores han reportado que las actividades de BAM1 y BAM3 se mantienen relativamente constantes durante el día y la noche (Monroe *et al.*, 2014). Recientemente se ha considerado que el mecanismo que regula la degradación del almidón durante la noche involucra la participación de elementos que forman parte del reloj circadiano, en coordinación con otros que evalúan la cantidad de almidón disponible (Seki *et al.*, 2017). El grado de fosforilación de la superficie de los gránulos, que define su susceptibilidad a la degradación, también podría ser clave para evaluar la cantidad de almidón presente (Fernandez *et al.*, 2017). El hecho de que la cantidad de glucosa 6-P en los gránulos se incremente durante el día, que alcance su punto más alto al atardecer, y se reduzca durante la noche a medida que el almidón se degrada (Scialdone *et al.*, 2013), son aspectos que apoyan este planteamiento.

Regulación por Tre 6-P

Otra teoría sugiere que, para establecer la velocidad nocturna de la degradación del almidón, se requieren la participación conjunta del ciclo circadiano y de un mecanismo que evalúa los niveles de sacarosa (Seki *et al.*, 2017). La Tre 6-P es una molécula descubierta hace relativamente poco tiempo; se encuentra en concentraciones muy pequeñas (en el rango de nmolar), que varían en proporción casi directa con los cambios en sacarosa (Morabito *et al.*, 2021). La Tre 6-P se sintetiza a partir de la UDP-glucosa y la glucosa 6-P en una reacción catalizada por la enzima Tre 6-P sintasa (TPS); el producto puede ser desfosforilado por la enzima Tre 6-P fosfatasa (TPP) (Gao *et al.*, 2021); es un regulador metabólico muy efectivo (Figura 2) que inhibe la degradación del almidón (Martins *et al.*, 2013).

El efecto inhibitorio de la Tre 6-P sobre la degradación del almidón es consecuencia de su acción sobre el metabolismo de la maltosa en el citosol (Martins *et al.*, 2013). De acuerdo con esta propuesta, el proceso de degradación del almidón está sometido a un doble control; por un lado, el ritmo circadiano, que establece la velocidad máxima de degradación que garantiza que las reservas de almidón no se agoten antes de que termine la noche, y por el otro, los niveles de Tre 6-P, que reducen la velocidad del proceso y la ajustan con la de exportación de sacarosa (Figura 3).

CONCLUSIONES

El almidón, que durante el día se acumula en las hojas, es fundamental para que las plantas enfrenten exitosamente los efectos negativos de la oscuridad en el proceso de la fotosíntesis. Su degradación está sometida a un control muy estricto, donde el ritmo circadiano, el grado de fosforilación de los gránulos y los niveles de Tre 6-P se combinan para crear un mecanismo efectivo y flexible. La mayoría de la información disponible proviene de estudios realizados en hojas de *Arabidopsis*; es necesario investigar si la degradación del almidón almacenado temporalmente en otros órganos (tallos y pericarpios de frutos) se regula de manera similar y si las características de este proceso se conservan en las especies cultivadas.

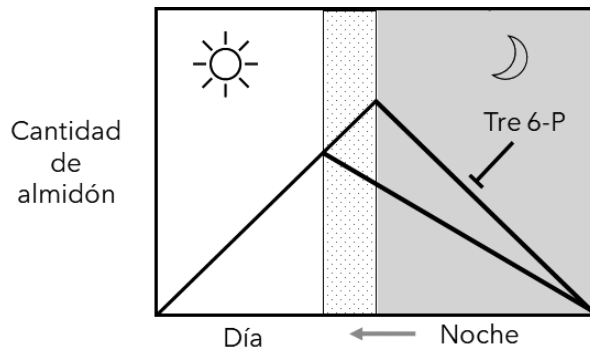


Figura 2. Control de la velocidad de degradación de almidón. La velocidad del proceso está determinada por la duración del periodo de oscuridad. Si oscurece más temprano (zona punteada y flecha gris), se reduce la velocidad del proceso. Adicionalmente, si la sacarosa no se exporta eficientemente, se favorece la síntesis de Tre 6-P, que reduce la velocidad del proceso.

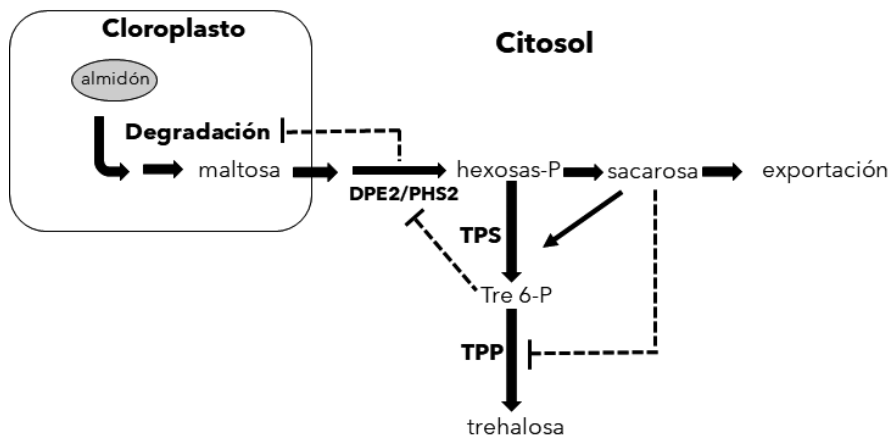


Figura 3. Regulación de la velocidad de degradación del almidón por trehalosa 6-P (Tre 6-P). En el citosol, los productos de la degradación del almidón se convierten en azúcares fosforilados que se usan en procesos metabólicos de la misma célula o se convierten en sacarosa que se exporta al resto de la planta. Si la sacarosa no se exporta eficientemente, su acumulación promueve la síntesis de Tre 6-P que inhibe el metabolismo de maltosa en el citosol y reduce la velocidad de degradación del almidón. Las líneas punteadas indican efectos inhibitorios. DPE2, enzima desproporcionadora 2; PHS2, glucán fosforilasa 2; TPS, Tre 6-P sintasa; TPP, Tre 6-P fosfatasa.

AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones realizadas en el laboratorio de los autores sobre este tema fueron financiadas con recursos otorgados por DGAPA-UNAM (proyecto PAPIIT IN226520) y por la Facultad de Química, UNAM (PAIP 5000 9127).

BIBLIOGRAFÍA

- Cuesta-Seijo J. A., C. Ruzanski, K. Krucewicz, S. Meier, P. Hägglund, B. Svensson and M. M. Palcic (2017) Functional and structural characterization of plastidic starch phosphorylase during barley endosperm development. *PLoS ONE* 12:e0175488, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175488>
- Fernandez O., H. Ishihara, G. M. George, V. Mengin, A. Flis, D. Summer, ... and M. Stitt (2017) Leaf starch turnover occurs in long days and in falling light at the end of the day. *Plant Physiology* 174:2199-2212, <https://doi.org/10.1104/pp.17.00601>
- Figueroa C. M. and J. E. Lunn (2016) A tale of two sugars: trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiology* 172:7-27, <https://doi.org/10.1104/pp.16.00417>
- Fulton D. C., M. Stettler, T. Mettler, C. K. Vaughan, J. Li, P. Francisco, ... and S. C. Zeeman (2008) β -AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β -amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. *The Plant Cell* 20:1040-1058, <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056507>
- Gao Y., X. Yang, X. Yang, T. Zhao, X. An and Z. Chen (2021) Characterization and expression pattern of the trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase gene families in *Populus*. *International Journal of Biological Macromolecules* 187:9-23, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.096>
- Graf A., A. Schlereth, M. Stitt and A. M. Smith (2010) Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:9458-9463, <https://doi.org/10.1073/pnas.091429910>
- Hejazi M., J. Fettke, O. Paris and M. Steup (2009) The two plastidial starch-related dikinases sequentially phosphorylate glucosyl residues at the surface of both the A- and B-type allomorphs of crystallized maltodextrins but the mode of action differs. *Plant Physiology* 150:962-976, <https://doi.org/10.1104/pp.109.138750>
- Hejazi M., J. Fettke, O. Kötting, S.C. Zeeman and M. Steup (2010) The laforin-like dual-specificity phosphatase SEX4 from *Arabidopsis* hydrolyzes both C6- and C3-phosphate esters introduced by starch-related dikinases and thereby affects phase transition of α -glucans. *Plant Physiology* 152:711-722, <https://doi.org/10.1104/pp.109.149914>
- Mahlow S., M. Hejazi, F. Kuhnert, A. Garz, H. Brust, O. Baumann and J. Fettke (2014) Phosphorylation of transitory starch α -glucan, water dikinase during starch turnover affects the surface properties and morphology of starch granules. *New Phytologist* 203:495-507, <https://doi.org/10.1111/nph.12801>
- Malinova I. and J. Fettke (2017) Reduced starch granule per chloroplast in the *dpe2/phs1* mutant is dependent on initiation of starch degradation. *PLoS ONE* 12:e0187985, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187985>
- Martins M. C. M., M. Hejazi, J. Fettke, M. Steup, R. Feil, U. Krause, ... and J. E. Lunn (2013) Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiology* 163:1142-1163, <https://doi.org/10.1104/pp.113.226787>
- Monroe J. D. and A. R. Storm (2018) Review: the *Arabidopsis* β -amylase (BAM) gene family: diversity of form and function. *Plant Science* 276:163-170, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.08.016>
- Monroe J. D., A. R. Storm, E. M. Badley, M. D. Lehman, S. M. Platt, L. K. Saunders, ... and C. E. Torres (2014) β -amylase1 and β -amylase3 are plastidic starch hydrolases in *Arabidopsis* that seem to be adapted for different thermal, pH, and stress conditions. *Plant Physiology* 166:1748-1763, <https://doi.org/10.1104/pp.114.246421>
- Morabito C., F. Secchi and A. Schubert (2021) Grapevine TPS (trehalose-6-phosphate synthase) family genes are differentially regulated during development, upon sugar treatment and drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 164:54-62, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.032>
- Niittylä T., G. Messerli, M. Trevisan, J. Chen, A. M. Smith and S. C. Zeeman (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 303:87-89, <https://doi.org/10.1126/science.1091811>
- Pfister B. and S. C. Zeeman (2016) Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73:2781-2807, <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2250-x>
- Philippou K., J. Ronald, A. Sánchez-Villareal, A. M. Davis and S. J. Davis (2019) Physiological and genetic dissection of sucrose inputs to the *Arabidopsis thaliana* circadian system. *Genes* 10:334, <https://doi.org/10.3390/genes10050334>
- Ritte G., M. Hyedenreich, S. Mahlow, S. Haebel, O. Kötting and M. Steup (2006) Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalyzed by distinct dikinases. *FEBS Letters* 580:4872-4876, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.085>
- Santelia D., O. Kötting, D. Seung, M. Schubert, M. Thalmann, S. Bischof, ... and S. C. Zeeman (2011) The phosphoglucan phosphatase like sex Four2 dephosphorylates starch at the C3-position in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23:4096-4111, <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092155>
- Schopper S., P. Mühlenbock, C. Sörensson, L. Hellborg, M. Lenman, S. Widell, ... and E. Andreasson (2015) *Arabidopsis* cytosolic α -glycan phosphorylase, PHS2, is important during carbohydrate imbalanced conditions. *Plant Biology* 17:74-80, <https://doi.org/10.1111/plb.12190>
- Scialdone A., S. T. Mugford, D. Feike, A. Skeffington, P. Borril, A. Graf, ... and M. Howard (2013) *Arabidopsis* plants perform arithmetic division to prevent starvation at night. *eLife* 2:e00669, <https://doi.org/10.7554/eLife.00669>
- Seki M., T. Ohara, T. J. Hearn, A. Frank, V. C. H. da Silva, C. Caldana, ... and A. Satake (2017) Adjustment of the *Arabidopsis* circadian oscillator by sugar signalling dictates the regulation of starch metabolism. *Scientific Reports* 7:8305, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08325-y>
- Silver D. M., O. Kötting and G. B. G. Moorhead (2014) Phosphoglucan phosphatase function sheds light on starch degradation. *Trends in Plant Science* 19:471-478, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.008>
- Skeffington A. W., A. Graf, Z. Duxbury, W. Gruissem and A. M. Smith (2014) Glucan, water dikinase exerts little control over starch degradation in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant Physiology* 165:866-879, <https://doi.org/10.1104/pp.114.237016>
- Thalmann M. and D. Santelia (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist* 214:943-951, <https://doi.org/10.1111/nph.14491>
- Webb A. A. R. and A. Satake (2015) Understanding circadian regulation of carbohydrate metabolism in *Arabidopsis* using mathematical models. *Plant and Cell Physiology* 56:586-593, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv033>
- Yu T. S., S. C. Zeeman, D. Thorneycroft, D.C. Fulton, H. Dunstan, W. L. Lue, ... and S. M. Smith (2005) α -amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Biological Chemistry* 280:9773-9779, <https://doi.org/10.1074/jbc.M413638200>

