



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Análisis proteómico de los cloroplastos de
Amaranthus cruentus var. *Amaranteca*”**

Tesis que presenta
Ahuitzolt de Jesús Joaquín Ramos

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., septiembre de 2014



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Análisis proteómico de los cloroplastos de *Amaranthus cruentus* var. *Amaranteca***” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Ahuizolt de Jesús Joaquín Ramos y aprobada el diecinueve de septiembre del dos mil catorce por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Directora de la tesis

Dr. Angel Arturo Guevara García
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Antonio De León Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el **Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular** de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la **Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**46564**) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 072 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 19 días del mes de septiembre del año 2014, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Angel Arturo Guevara García	Presidente	UNAM
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Sinodal	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Ahuitzolt de Jesús Joaquín Ramos

sobre la Tesis intitulada:

Análisis proteómico de los cloroplastos de Amaranthus cruentus var. Amaranteca

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa


El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 12:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 19 días del mes de septiembre de 2014.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



DEDICATORIAS

A mis padres, **Ma. Elena Tierrablanca** y **José Joaquín**, por su tiempo y dedicación a mi persona.

A mi esposa, **Reyna Jáuregui**, con quien he emprendido el más grande proyecto que tengo, mi pequeña familia.

A mi abuela, **María de la Paz Tierrablanca Medina**, quien dedicó varios años de su vida a la mía.

A mis hermanos, **Atziri** y **Andrés**, por su cariño incondicional.

Al motor de mi vida, mis hijos, **Alejandro** y **Mauricio**.

A toda mi familia en general pues son parte importante de mi mundo.

A los integrantes del laboratorio, no pongo nombres para no omitir alguno, con quienes compartí 4 años de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 46564 otorgada para estudiar el Doctorado
- Al IPICYT por el apoyo durante mi estancia en sus instalaciones.
- A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, titular del Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular del IPICYT, por la oportunidad de formar parte de su laboratorio durante 4 años y por los acertados consejos y comentarios para la elaboración de la tesis y del artículo.
- A mi comité tutorial; Dra. Lina Riego, Dr. Arturo Guevara y Dr. Antonio de León por su asesoría y acertados comentarios y sugerencias durante la realización de este proyecto y en la escritura de la tesis.
- Al Dr. José Ángel Huerta-Ocampo por la asesoría durante el análisis de los geles bidimensionales y de los datos de espectrometría de masas.
- Al técnico del Laboratorio, el M. en C. Alberto Barrera Pacheco, por su apoyo durante en el procesamiento de manchas para la espectrometría de masas y el soporte técnico durante mi estadía en el laboratorio.
- A la Dra. Araceli Patrón (DBM-IPICYT), por su apoyo técnico microscopía
- Al M. en C. Leandro Gabriel Ordoñez por su apoyo técnico.

ÍNDICE

	Página
CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE TESIS.....	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES.....	iii
ACTA DE EXAMEN.....	iv
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE	vii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Plantas C ₃ y C ₄	1
1.2. ¿Síndrome C ₄ o evolución?	4
1.3. Los complejos fotosintéticos en el cloroplasto.	7
1.4. Cloroplasto y su relación con el estrés abiótico.	9
1.5. Herramientas proteómicas para el análisis de complejos de membranas biológicas.	10
1.6. El amaranto	12
II. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo General.....	15
2.2. Objetivos particulares	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Material vegetal	16
3.2. Preparación de la muestra para el microscopio de transmisión electrónica (TEM)	16
3.3. Medición del área ocupada por los diferentes tejidos en la hoja de <i>A.</i> <i>cruentus</i>	17
3.4. Inmunolocalización de la subunidad grande de RuBisCO en cortes transversales de hojas.....	17

3.5. Aislamiento de cloroplastos	18
3.6. Análisis de complejos tilacoidales de los cloroplastos	19
3.7. Digestión en gel y análisis por espectrometría de masas	20
3.8. Búsqueda e identificación de proteínas	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Morfología de las células y cloroplastos de <i>A. cruentus</i> en plantas control y plantas sometidas a estrés salino.	23
4.2. Inmunodetección de RuBisCO en CVH y CM.	24
4.3. Integridad de las fracciones de cloroplastos aislados.	26
4.4. Perfil proteínico de los CVH y CM de plantas control y estresadas.	27
4.4.1. Análisis de complejos proteínicos tilacoidales de los cloroplastos de <i>A. cruentus</i> var. Amaranteca.	29
4.4.2. Composición de los complejos tilacoidales de los cloroplastos de plantas control y estresadas.	30
4.4.3. Similitud de las secuencias de proteínas de los complejos tilacoidales	31
4.4.3.1. El fotosistema II (PSII)	32
4.4.3.2. El fotosistema I (PSI)	34
4.4.3.3. La ATP sintetasa.	35
4.4.3.4. El citocromo b_6f (CYT b_6f)	36
4.4.3.5. Proteínas del metabolismo general.	36
4.5. Resumen de resultados.	39
VI. CONCLUSIONES.	41
VII. PERSPECTIVAS	42
VII. REFERENCIAS	43
VIII. ANEXOS.	53
Anexo I.	54
Anexo II.	55
Anexo III. Artículo	67

ABREVIATURAS

3FG	3-fosfoglicerato
Anti-IgG,	Anticuerpo secundario contra IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina.
Anti-RbcL	Anticuerpo contra la sub-unidad grande de RuBisCO
CM	Cloroplastos de las células del mesófilo
CVH	Cloroplastos de las células de la vaina del haz
CYT_{b6f}	Citocromo b _{6f} .
FG,	Fosfoglicolato
GDC	Glicina dexcarboxilasa
LHC II	Complejo cosechador de luz II
LHCI	Complejo cosechador de luz I
TEM	Microscopio de transmisión electrónica
NAD-ME	NAD-enzima málica
NADP-ME	NADP-enzima málica
OAA	Oxalacetato
OEC	Complejo evolucionador de oxígeno
PCK	PEP carboxinasa
PEP	Fosfoenol piruvato
PEP_{casa}	Fosfoenol piruvato carboxilasa
PPdK	Piruvato ortofosfodiginasa
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
RbcL	Subunidad grande de RuBisCO

RbcS	Subunidad menor de RuBisCO
RuBisCO	Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa
RuBP	Ribulosa 1,5 bifosfato

RESUMEN

Análisis proteómico de los cloroplastos de *Amaranthus cruentus* var. Amaranteca

Las mayoría de las plantas C₄ desarrollan la anatomía de Kranz, en la cual, el sistema vascular (SV) está rodeado por tejido fotosintético denominado células de la vaina del haz e inmediatas a estas se encuentran las células del mesófilo, esto implica la presencia de 2 tipos de cloroplastos, los del mesófilo (CM) involucrados en la fijación del CO₂ y los de la vaina del haz (CVH) encargados de metabolizar el CO₂. Mientras que en las plantas C₃-C₄, que también desarrollan la anatomía de Kranz, las enzimas de ambos procesos se localizan en los dos tipos de cloroplastos. El género *Amaranthus spp.* es considerado una planta C₄ del subtipo NAD-enzima málica (NAD-ME), sin embargo, la morfología de los cloroplastos de *Amaranthus cruentus* var. Amaranteca observada por microscopio de transmisión electrónica (TEM) es similar, ambos cloroplastos pose grana y cúmulos de almidón. Además por inmunohistoquímica se detectó la subunidad grande de RuBisCO (RbcL) en los 2 tipos de cloroplastos, sugiriendo que el ciclo de Calvin está activo en ambos. Por otra parte, el análisis de los complejos tilacoidales de los cloroplastos en dos dimensiones usando geles nativos (BN) en la primera dimensión seguidos de la separación desnaturalizante en segunda dimensión en SDS-PAGE (2-DE BN/SDS-PAGE) mostró que las proteínas involucradas en la actividad del PSII fueron más abundantes en CM y que un tratamiento salino provoca variación en la acumulación de las subunidades de los complejos PSI y PSII, ATP sintetasa, CYTb₆f, enzimas glicolíticas y otras enzimas involucradas en la síntesis de jasmonatos. Esto sugiere que a pesar de su morfología similar la composición de los complejos tilacoidales de los CVH y CM es diferente y que reaccionan a la presencia de sal en el suelo, incrementando la fotosíntesis y sintetizando moléculas involucradas en la respuesta de la planta a este tipo de estrés.

Palabras clave: cloroplastos, estrés abiótico, fotosíntesis, intermediarios C₃-C₄, LC-MS/MS, Metabolismo C₃, Metabolismo C₄.

ABSTRACT

Proteomic analysis of the chloroplasts from *Amaranthus cruentus* var. *Amaranteca*.

Most of the C₄ plants develop the Kranz anatomy, where the vascular system (VS) is surrounded by photosynthetic tissue named bundle sheath cells and immediate to them are located the mesophyll cells. This implies the presence of two types of chloroplasts, the mesophyll chloroplasts (MC) involved in the CO₂ fixation and bundle sheath chloroplasts (BSC) responsible for metabolizing CO₂. The C₃-C₄ intermediary plants also develop the Kranz anatomy but the enzymes of fixation and metabolizing the CO₂ are expressed in the both chloroplasts. The *Amaranthus* spp. Genus is considered as C₄ plant subtype NAD-malic enzyme (NAD-ME), however, the chloroplast morphology of *Amaranthus cruentus* var. *Amaranteca* observed by transmission electron microscopy (TEM) is quite similar, they have grana and starch cumulus. By immunohistochemical analysis it was possible to detect the RuBisCO's large subunit (RbcL) in both chloroplasts type. However, the analyses of thylakoid protein complexes in two dimensions using blue native gels as first dimension followed by denaturing electrophoresis in SDS-PAGE in the second dimension (2-DE BN/SDS-PAGE), showed that proteins involved in the PSII activity were more represented in MC. When plants were subjected to salt stress, there was a variation of PSI and PSII core proteins, ATP synthetize complex, proteins involved in the jasmonates synthesis and glycolytic pathway. This suggests that despite the similar morphology of chloroplasts the composition of BSC and MC is different and that they responded to salt in the soil by increasing the photosynthesis and synthesis of molecules involved in the responses of plant to this kind of stress.

Key words: abiotic stress, C₃ metabolism, C₄ metabolism, C₃-C₄ intermediaries, chloroplasts, LC-MS/MS, photosynthesis.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos que usan el CO_2 como fuente de carbono para sintetizar los compuestos que utilizan para su desarrollo. En este contexto se pueden encontrar plantas C_3 , que fijan el CO_2 en moléculas de 3 carbonos y plantas C_4 , donde los compuestos intermediarios son de 4 carbonos.

1.1. Plantas C_3 y C_4

En las plantas C_3 el metabolismo del CO_2 que entra a través de los estomas (Figura 1) comienza con la fijación de este, usándolo para carboxilar a la Ribulosa 1,5 bifosfato (RuBF), mediante la enzima Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) que lo integra directamente al ciclo de Calvin o

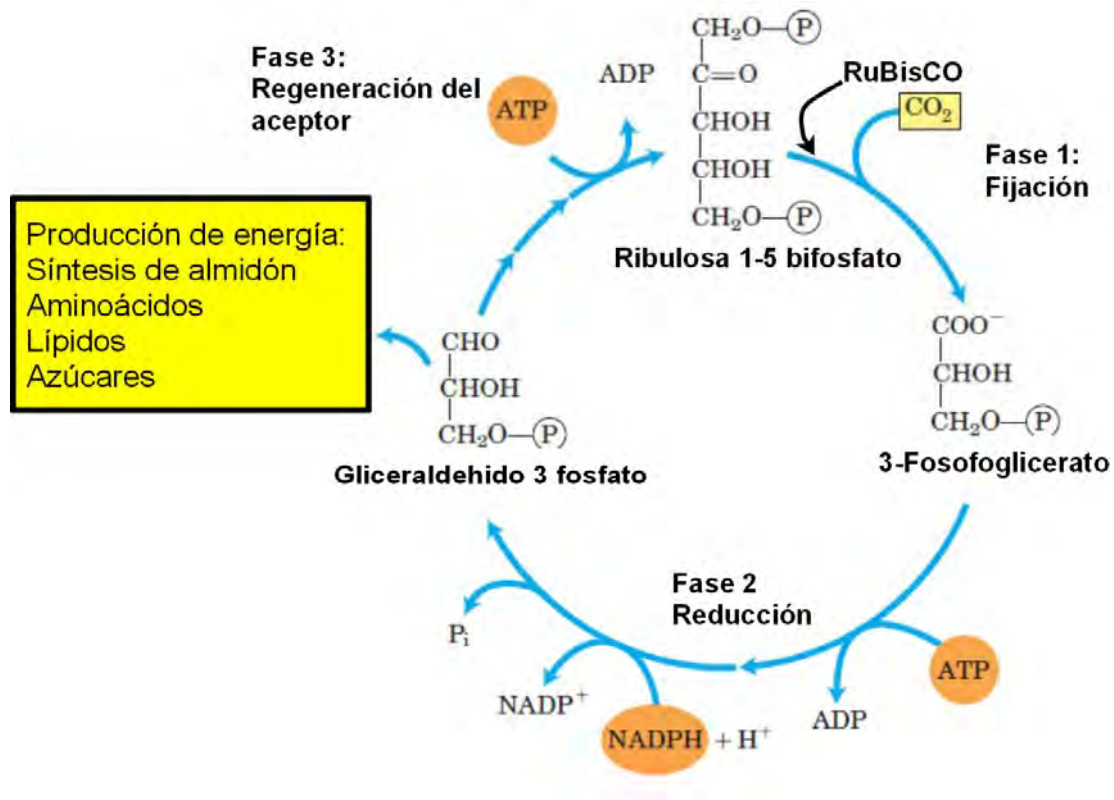


Figura 1. Ruta de incorporación del CO_2 en las plantas C_3 . La enzima RuBisCO utiliza la Ribulosa 1-5 bifosfato (RuBF) como aceptor de CO_2 y lo incorpora al ciclo de Calvin.

ciclo C_3 , generando metabolitos intermediarios para la producción de energía y síntesis de macromoléculas como lípidos, almidón y azúcares, entre otros.

La actividad de oxigenasa de la RuBisCO emplea el O_2 para oxigenar a la RuBP y produce el 3-fosfoglicerato (3FG) y el fosfoglicolato (FG). El 3FG es incorporado directamente al ciclo de Calvin, mientras que el FG es convertido a glicina en el peroxisoma y descarboxilado en la mitocondria por la glicina dextrcarboxilasa (GDC) produciendo serina que eventualmente se convierte en 3FG y se incorpora al Ciclo de Calvin. Este proceso es llamado fotorrespiración durante la cual $\frac{1}{4}$ del carbón que entra en el ciclo se pierde como CO_2 , además se requiere de energía en forma de NADPH y ATP (Sage y col., 2012).

En la mayoría de las plantas C_4 el mecanismo de asimilación del CO_2 está relacionado con la anatomía de Kranz, donde el sistema vascular está rodeado por tejido fotosintético denominado células de la vaina del haz y adyacentes a estas se encuentra otra capa de tejido, también fotosintético, conocido como células del mesófilo (Figura 2). Esta anatomía da lugar a dos tipos de cloroplastos, los de las células de la vaina del haz (CVH) y los del mesófilo (CM), diferenciados de acuerdo al tejido donde se encuentran (Nelson y Langdale, 1989).

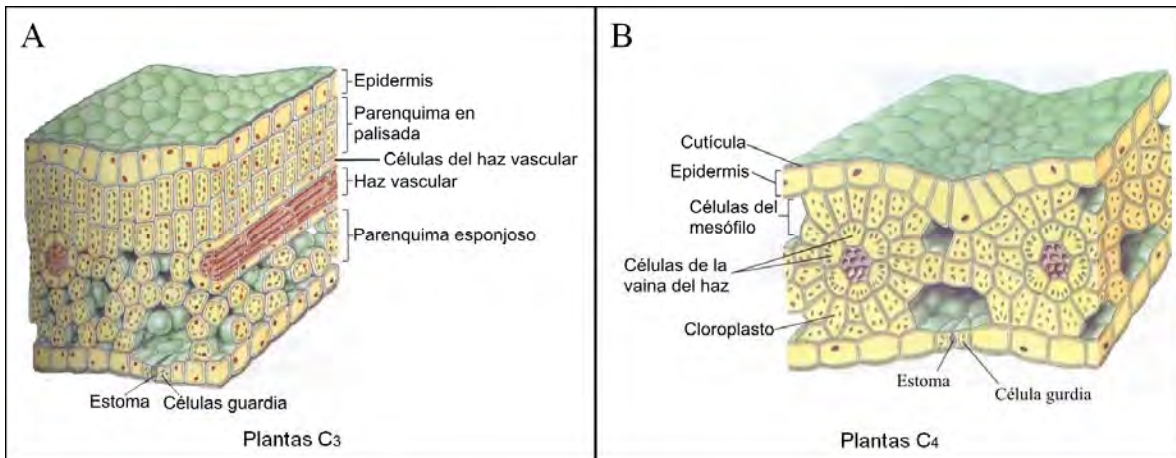


Figura 2. Esquema comparativo de la anatomía de plantas C_3 (A) y plantas C_4 (B) (Adaptado de: <http://fhs-bio-wiki.pbworks.com/w/page/12145744/CAM%20and%20C4%20plants>).

oxalacetato (OAA) que es transformado a malato o aspartato, estas últimas moléculas son transportados hacia las células de la vaina del haz, donde son descarboxiladas y el CO₂ producido es tomado por RuBisCO e incorporado al ciclo de Calvin. La descarboxilación del malato o aspartato genera piruvato que es enviado las células del mesófilo, donde la enzima piruvato ortofosfodikinasa (PPdK), dentro del estroma de los cloroplastos, se encarga de convertirlo a PEP que es el sustrato de la PEPcase usado para formar nuevamente OAA y comenzar el ciclo de asimilación C₄ (Leegood, 2002). De este modo las plantas C₄ se pueden agrupar en 3 subtipos bioquímicos de acuerdo a las principales enzimas descarboxilantes en las células de la vaina del haz, subtipo NAD-enzima málica (NAD-ME), subtipo NADP-enzima málica (NADP-ME) y el PEP carboxinasa (PCK) que en algunos casos usan una segunda descarboxilasa (Leegood, 2002). En las plantas NADP-ME los CHV carecen de grana pero contienen cúmulos de almidón y están disminuidos en la actividad del PSII, mientras que los CM carecen de almidón y es baja la actividad del PSI pero tienen bien desarrollada la grana. En las NAD-ME, ambos tipos de cloroplastos poseen grana bien desarrollada y los cúmulos de almidón son más abundantes en las células de la vaina del haz. El tercer subtipo que utiliza la PCK, la ultraestructura de los cloroplastos es muy similar a las del subtipo NAD-ME (Edwards y col., 2001; Sage, 2012).

1.2. ¿Síndrome C₄ o evolución?

El metabolismo fotosintético C₄ aparentemente apareció hace 12 millones de años, pero algunos análisis de plantas fosilizadas ubican este tipo de plantas desde hace 35 millones de años. Este metabolismo se desarrolló en respuesta a diversos factores como fueron las altas temperaturas, elevadas concentraciones de oxígeno y bajas concentraciones de CO₂ que favorecían la actividad de oxigenasa en la RuBisCO y por lo tanto la fotorespiración (Sage, 2005). Las latitudes también fueron muy importantes, pues hoy en día este tipo de plantas dominan hábitats donde la temperatura y la humedad son muy altas o en condiciones áridas (Sage, 2001).

En términos de evolución, el metabolismo C_4 apareció recientemente en las plantas terrestres de las angiospermas, durante este proceso se creó el sistema vascular, pasaron diferentes fases de adaptación. Después de engrosar el sistema vascular, duplicar genes y generar elementos regulatorios (Figura 4A y 4B), las plantas desarrollaron la anatomía proto-Kranz en donde las mitocondrias en las células de la vaina del haz se encuentran centrípetamente hacia el sistema vascular seguidas por los cloroplastos que incrementaron en cantidad y tamaño (Figura 4C), este arreglo es muy similar en las plantas que utilizan el metabolismo fotosintético C_2 , donde la GDC libera el CO_2 de la glicina formada durante la fotorespiración y se fija nuevamente por los cloroplastos que están contiguos a ellas (Figura 4D). Después, evolucionó el metabolismo C_2 , donde las células del mesófilo redujeron su tamaño y las células de la vaina del haz y sus cloroplastos se hicieron más grandes para mejorar la recuperación del CO_2 liberado en la mitocondrias. Posteriormente aparecieron los intermediarios C_3 - C_4 , donde las actividades de PEPcase, PPdK y NADP-ME son apenas 2-5 veces mayores que en las plantas C_3 (Figura 4E), mientras que en las plantas C_4 estas actividades son 10 a 50 veces más altas (Moore y col., 1988) y posiblemente también aparecieron secuencias reguladoras de los genes de PEPcase y otras enzimas involucradas en el metabolismo C_4 . Al final se optimizó la ruta de asimilación C_4 haciendo cambios en las secuencias proteínicas de regiones específicas de PEPcase y RuBisCO, resultando en una disminución a la sensibilidad a malato y en cambios de la actividad y afinidad por el sustrato, respectivamente (Sage y col., 2012).

Los 2 primeros pasos del metabolismo C_4 , la hidratación del CO_2 y la carboxilación del PEP, son las únicas constantes en todos los linajes de plantas terrestres. Mientras que la forma de concentrar el CO_2 alrededor de la RuBisCO es diferente entre cada subtipo de planta C_4 , por ejemplo, en el caso de las plantas NAD-ME se forma una capa de suberilina entre las células de la vaina del haz y las células del mesófilo evitando así una contra-difusión. Las plantas NADP-ME emplean tejidos cercanos a la capa de las células de la vaina del haz para retener el CO_2 (Leegood, 2002).

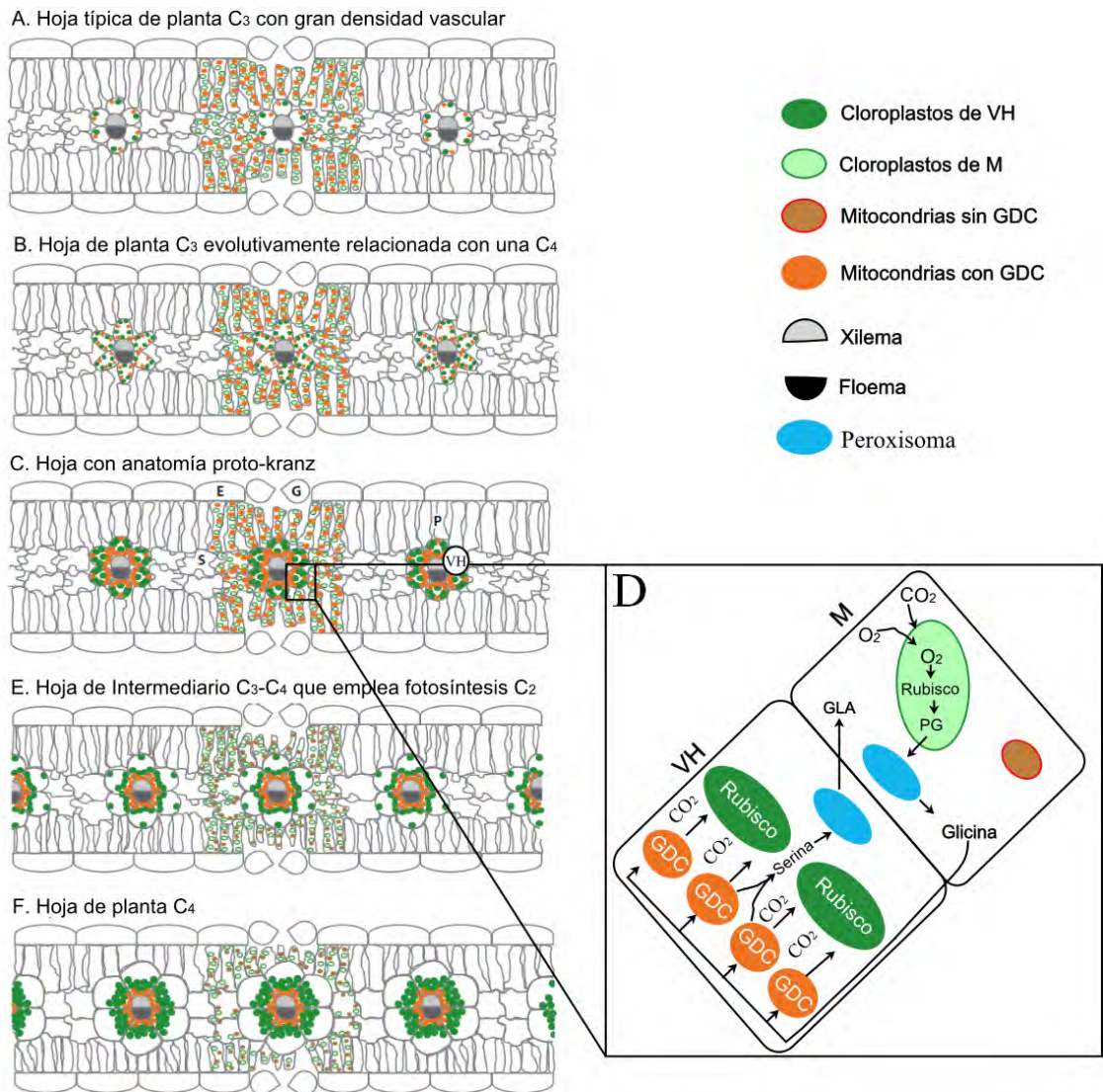


Figura 4. Esquema evolutivo de las plantas C₃ a C₄. A, anatomía típica de una planta C₃. B, anatomía de plantas C₃ evolutivamente relacionadas con plantas C₄. C, anatomía de plantas con organización proto-kranz en los tejidos fotosintéticos, aquí se comienzan a diferenciar las características anatómicas de la mayoría de las plantas C₄ (E, epidermis, G, célula guardia, S, parénquima esponjoso, P, parénquima en empalizada y VH, células de la vaina del haz). D, esquema del metabolismo C₂ en el cual el 2-Fosfoglicerato (PG) generado por la oxigenación de Ribulosa 1-5 bifosfato es convertido a glicina en el peroxisoma, después es descarboxilado por la glicina descarboxilasa (GDC) en la mitocondria de las células del mesófilo produciendo serina y el CO₂ es fijado por los cloroplastos de la vaina del haz. E, anatomía característica de las plantas intermedio C₃-C₄ que usan la fotosíntesis C₂ para optimizar la recuperación del CO₂ desprendido por la mitocondria durante la descarboxilación de la glicina. F, anatomía de Kranz en una planta C₄ (Adaptada de Sage y col. 2012).

Por otro lado se ha documentado que el reclutamiento de genes involucrados en el metabolismo C_4 fue de diferentes partes, por ejemplo para PEPcase existen al menos 3 familias de genes diferentes entre las plantas, algunas anhidrasas carbónicas fueron tomadas de los cloroplastos y otras derivan de proteínas ancladas a membrana plasmática (Sage, 2004) e incluso en los linajes *Bienertia* y *Suaeda aralocaspica* el metabolismo C_4 ocurre en una sola célula (Voznesenskaya y col., 2001; Park y col., 2010). Basado en lo anterior el metabolismo C_4 se considera más un síndrome que la evolución de una ruta bioquímica específica pues es la conjunción de diversos factores que desembocan en la adaptación de las plantas a su medioambiente (Sage, 2001).

1.3. Los complejos fotosintéticos en el cloroplasto.

Además de las enzimas involucradas en la asimilación del CO_2 atmosférico, los cloroplastos contienen complejos encargados de transformar la energía luminosa en energía química disponible para la planta. Este proceso se lleva específicamente en la membrana tilacoidal de los cloroplastos que se arregla en forma de discos aplastados conocidos como grana (Figura 6A). Estos complejos son los fotosistemas I (PSI) y II (PSII) que están asociados a los complejos cosechadores de luz I (LHCI) y II (LHCII), respectivamente, la ATP sintetasa y citocromo b_6/f (CYT b_6/f). Hacia la parte interior de la grana se encuentra el PSII-LHCII y en el perímetro se localiza la asociación PSI-LHCI mientras que la ATP sintetasa y el CYT b_6/f quedan en su mayoría segregados en el límite entre la grana y la parte laminar de la membrana tilacoidal (Daum, 2010; Ford y Holzenburg, 2013).

Los supercomplejos PSI-LHCI y PSII-LHCII utilizan la luz para generar un gradiente de electrones que está conectado por el CYT b_6/f . Los complejos PSII y el CYT b_6/f incorporan H^+ al lumen tilacoidal formando de esta manera la fuerza electroquímica utilizada por la ATP sintetasa para fosforilar el ADP con fósforo inorgánico (Pi) y producir ATP. El PSII toma los electrones que requiere de la molécula de agua, oxidándola y formando O_2 , estos electrones son transferidos al

CYT_{b6f} mediante un conjunto de quinonas (PQ) y de allí pasan al PSI que utiliza NADP⁺ como aceptor final de electrones para formar NADPH, esto se conoce como el transporte lineal de electrones, que en el caso de una planta C₄ está mejor representado en los cloroplastos de las M (Darie y col., 2006).

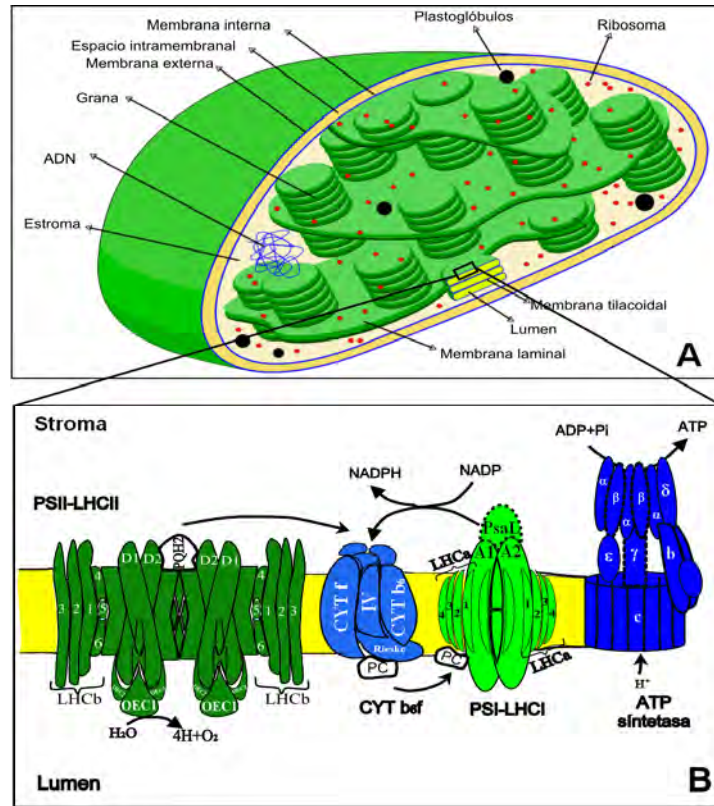


Figura 5. Esquema general de la estructura del cloroplasto. A, organización anatómica del cloroplasto (adaptado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Plantae>). B, complejos fotosintéticos que generan NADH⁺ y ATP usados primordialmente para la asimilación del CO₂. ATP sintetasa; subunidades α, β, δ, ε, γ, c y b. Citocromo b_{6f} (CYT_{b6f}); subunidad IV (IV), subunidad b₆ (CYT b₆), subunidad f (CYT f) y subunidad Rieske. Fotosistema I (PSI) subunidades; A1, A2 y L (PsaL). Fotosistema II (PSI) subunidades; D1, D2 y proteínas evolucionadoras de oxígeno (OEC). Complejo cosechador de luz I (LHCa) subunidades 1-4. Complejo cosechador de luz II (LHCb) subunidades 1-6. Proteína quinona reducida (PQH2). Plastocianina (PC). PSI-LHCI, interacción del PSI con LHCI. PSII-LHCII, interacción del PSII con el LHCII.

El PSI puede emplear un transporte cíclico de electrones, donde estos pasan del núcleo a la ferredoxina que los llevan hacia el CYT_{b6f} y son transferidos a las plastocianinas (PC) que en presencia de luz donan los electrones al núcleo P700

del PSI. Este produce también un transporte de protones hacia el lumen tilacoidal generando un gradiente de protones usado por la ATP sintetasa para producir ATP sin generar NADPH. Este tipo de transporte es muy activo en los cloroplastos de las células de la vaina del haz de plantas C₄ (Darie y col., 2006).

Una de las diferencias más notables a nivel de proteínas entre los complejos fotosintéticos de los cloroplastos de plantas C₄ es la abundancia de las proteínas del complejo evolucionador del oxígeno (OEC) del PSII involucradas en la oxidación del agua para generar el oxígeno. La presencia de estas proteínas es menos abundante en los CVH en comparación con los CM (Majeran y col., 2008; Hibberd y Covshoff, 2010). Las plantas intermedio C₃-C₄ también pueden desarrollar la anatomía de Kranz y mostrar dos capas de tejido fotosintético bien delimitadas (Ku y col., 1983; Sage y col., 2012), esto implicaría que las células de cada tejido tendrían cloroplastos separados anatómicamente y que probablemente existan diferencias funcionales de acuerdo al tipo de célula donde se encuentren, similar a los cloroplastos de las plantas C₄.

1.4. Cloroplasto y su relación con el estrés abiótico.

Además de realizar la fotosíntesis, los cloroplastos juegan un papel importante dentro de la planta ayudando a tolerar algunos tipos de estrés abiótico. Taylor y col. (2009) reportaron que del total de las proteínas encontradas en sistemas vegetales estudiados bajo condiciones de estrés abiótico, el 28% de ellas están ubicadas en los cloroplastos. Analizando los datos combinados de proteómica de tejido total y de organelos, ambos en condiciones de estrés abiótico, se han encontrado 274 proteínas únicas, de las cuales el 73% corresponden al cloroplasto, 22% a mitocondria y 5% a peroxisoma.

El estrés por sequía o por altas concentraciones de sal causa efectos muy similares en las plantas. La fotosíntesis y el crecimiento celular son los dos eventos principales en ser afectados por los diferentes tipos de estrés abióticos. El efecto sobre la planta depende de la intensidad, la duración y la tasa de progresión del estrés (Chaves y col., 2009).

A nivel transcripcional, los genes pertenecientes a las proteínas de los complejos PSI, PSII y de la ATP sintetasa se han visto afectados por la presencia de sal en el suelo. También se ha observado que las enzimas del ciclo de Calvin disminuyen su acumulación en plantas bajo estrés salino y que algunas de las subunidades del complejo de la ATP sintetasa se encontraron sobre-acumuladas en plantas estresadas por sal, sugiriendo que las plantas manipulan la concentración del ATP, limitándolo en el desarrollo y desviando la energía a procesos involucrados en la tolerancia al estrés (Sobhanian y col., 2011). De tal manera que el interés por los cambios que sufre el cloroplasto bajo condiciones estrés abiótico tiene gran importancia para entender los mecanismos mediante los cuales las plantas hacen frente a este tipo de factores medioambientales y como los complejos fotosintéticos se adaptan a estas condiciones adversas.

1.5. Herramientas proteómicas para el análisis de complejos de membranas biológicas.

Existen varias herramientas de proteómica para analizar el cambio en el perfil de proteínas en sistemas biológicos debido a estímulos específicos aplicados. Entre estas herramientas está la separación por punto isoeléctrico (IEF) seguida por la separación de acuerdo al peso molecular en geles de poliacrilamida (2-DE SDS-PAGE) que principalmente permite analizar las proteínas solubles. Sin embargo, las proteínas de membrana están generalmente sub-representadas cuando se emplea esta metodología pues debido a su naturaleza hidrofóbica son difíciles de manipular en soluciones acuosas donde generalmente no se pueden solubilizar (Reisinger y Eichacker, 2006).

Otra técnica está basada en el uso de geles azules nativos como primera dimensión seguida de una electroforesis desnaturizante en geles SDS-PAGE (2-DE BN/SDS-PAGE), técnica que se usa principalmente para analizar los complejos proteínicos, principalmente de membranas. En el 2-DE BN/SDS-PAGE, los complejos proteínicos se aíslan en su estado nativo usando detergentes que desplazan los lípidos de las membranas biológicas y mantienen intactos los

complejos, la suspensión obtenida se separa en gel de acrilamida que proporciona las condiciones adecuadas para que los complejos se mantengan intactos durante la electroforesis (Reisinger y Eichacker, 2007).

Durante la electroforesis, el azul de coomassie proporciona carga negativa a las proteínas para que puedan migrar hacia el cátodo y los complejos son separados de acuerdo a su masa molecular nativa. Después, los complejos embebidos en acrilamida son desnaturizados *in situ* y colocados en gels SDS-

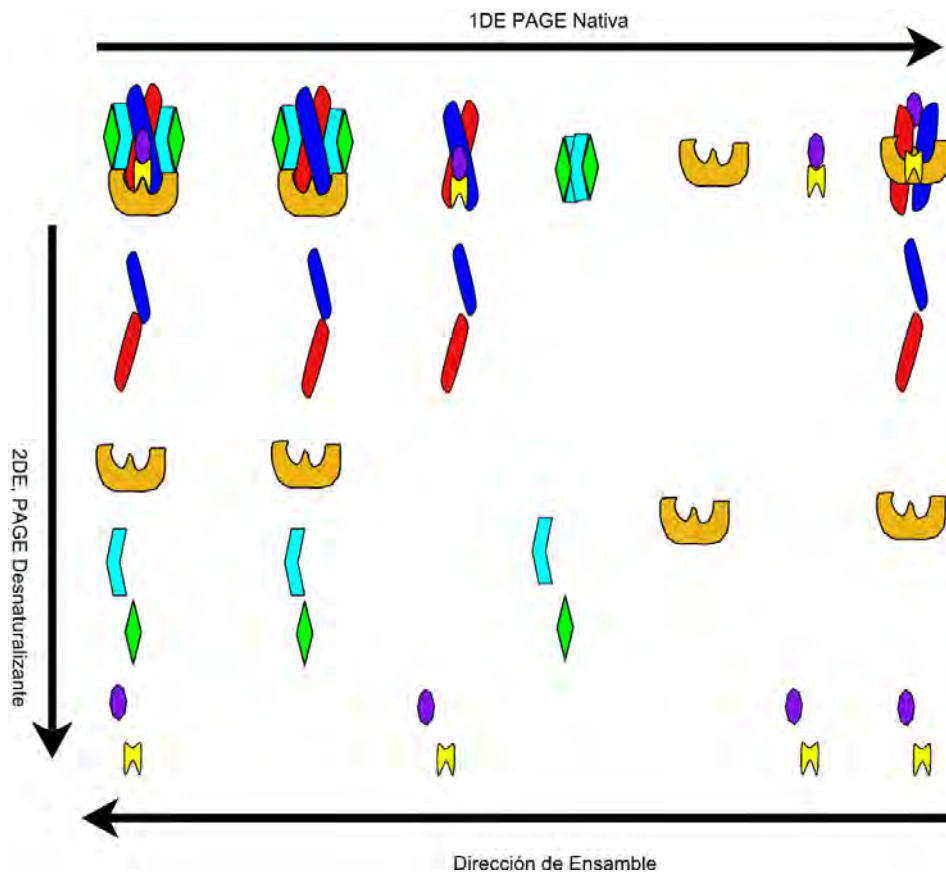


Figura 6. Diagrama esquemático del análisis de complejos proteínicos por BN 2-DE SDS-PAGE. El ensamble de los complejos se puede observar de derecha a izquierda en la primera dimensión, quedando a la izquierda los complejos completamente ensamblados y a la derecha estarían las subunidades individuales de cada complejo antes de ser ensambladas. De arriba abajo (2-DE) observamos la composición monomérica de cada complejo ensamblado o pre-ensamblado.

PAGE para llevar a cabo la segunda dimensión, donde las subunidades de los complejos se separan de acuerdo a su peso molecular dejando a la luz la

composición monomérica de ellos (Figura 6), haciendo de esta técnica una opción viable para analizar la patrón proteínico de los complejos fotosintéticos de los cloroplastos y como cambiaría este patrón de acuerdo a las condiciones medioambientales que rodeen a la planta en determinado momento (Reisinger y Eichacker, 2007; Behrens y col., 2013).

Cuando ya se han determinado las proteínas (sub-unidades) que se acumulan diferencialmente, estas se analizan por espectrometría de masas. Actualmente existen equipos de gran exactitud, alta sensibilidad y alta capacidad de procesamiento de datos y también se cuenta con motores de búsqueda que permiten analizar grandes cantidades de datos (Aebersold y Mann, 2003).

En el caso de las proteínas de los complejos tilacoidales de los cloroplastos de *A. cruentus* var *Amaranteca* se pueden usar bases de datos disponibles en internet. Este análisis es factible porque existe un alto grado de conservación en las proteínas que componen los complejos fotosintéticos de los diferentes géneros y especies de plantas (Andaluz y col., 2006; Behrens y col., 2013).

1.6. El amaranto

Las plantas del género *Amaranthus spp.* eran ampliamente cultivadas por las culturas prehispánicas como fuente de alimento y desde hace algunas décadas de vislumbró su uso como un cultivo alternativo pues resiste mejor el estrés, por sequía y por sal, que algunos cultivos comerciales como el sorgo, trigo o maíz (Kauffman y Haas, 1983).

El interés en esta planta se incrementó en los años 70s-80s, debido a que el grano tiene un excelente balance de aminoácidos esenciales y las características únicas de su almidón y aceite (Pavlik, 2012). En el siglo XXI, su interés resurgió debido a los reportes que describen la presencia de biopéptidos encriptados en las proteínas del grano con actividad antihipertensiva, cáncer preventiva y propiedades antidiabéticas (Silva-Sánchez y col., 2008; Velarde-Salcedo y col.,

2013), así como de varios metabolitos secundarios con propiedades medicinales (Barba de la Rosa y col., 2009).

Por el lado agronómico, la planta de amaranto también ha tomado gran interés como un modelo de estudio de estrés abiótico así como biótico (Huerta-Ocampo y col., 2009; Huerta-Ocampo y col. 2014, Délano-Frier y col., 2011). En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, se ha encontrado que la subunidad grande de la RuBisCO disminuye su acumulación en condiciones de sequía (Huerta-Ocampo, 2009) y algunas subunidades de complejos involucrados en la fotosíntesis decrecen su acumulación en estrés salino (Mendoza-Hernández, 2011).

El género *Amaranthus spp.* ha sido descrito como una planta C₄ del subtipo bioquímico NAD-ME, en muchas plantas de esta subclasificación los CVH son muy similares a los CM, ambos poseen grana bien desarrollada; sin embargo, las enzimas del metabolismo C₄ están confinadas a las células correspondientes de las plantas C₄ y se han reportado diferencias en el actividad de los fotosistemas, la de PSI es mayor en los CVH y la de PSII en los CM (Edwards y col., 2001).

Por otro lado, por ensayos de inmunodetección, Hong y col., (2005) reportaron que en *A. tricolor*, la enzima RuBisCO se encuentra en ambos cloroplastos y Ueno (2001) reportó que en *A. viridis* la enzima PPdK fue detectada en ambos tipos de cloroplastos. Debido a que *A. cruentus* var. *Amaranteca* se considera una planta C₄-NAD-ME, se asumió que poseía cloroplastos muy similares pero diferenciados de acuerdo a la célula donde se encuentran y que el perfil proteómico de los complejos de los cloroplastos sería modificado cuando las plantas fueran sometidas a estrés salino. Por lo tanto, en este trabajo se estudió la ultra-estructura de los CVH y CM en plantas control y en plantas sometidas a estrés salino. Se emplearon ensayos de inmunohistoquímica para detectar la presencia *in situ* de la subunidad grande de RuBisCO (RbcL) y con la técnica 2-DE BN/SDS-PAGE se analizaron los complejos de los tilacoides de ambos cloroplastos de *A. cruentus* var. *Amaranteca* en plantas control y plantas sometidas al estrés referido. Las proteínas diferenciales fueron analizadas por

nanoUPLC/MS-MS y los datos *m/z* obtenidos fueron comparados con las bases de datos *Viridiplantae* del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y del transcriptoma de amaranto (Délano-Frier y col., 2011) empleando el motor de búsqueda MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>).

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Caracterizar los cloroplastos de *Amaranthus cruentus* var. Amaranteca aislados de plantas control y plantas sometidas a estrés salino.

2.2. Objetivos particulares

- Analizar la morfología microscópica de los cloroplastos de *Amaranthus cruentus* var. Amaranteca en plantas control y plantas sometidas a estrés salino.
- Aislar los cloroplastos de las células de la vaina del haz y de las células del mesófilo en plantas control y plantas estresadas
- Analizar los complejos proteínicos de las membranas tilacoidales de los CVH y CM aislados de plantas control y plantas estresadas empleando la técnica 2-DE BN/SDS-PAGE
- Identificar las proteínas diferenciales entre cloroplastos (CVH y CM) de plantas control y plantas sometidas a estrés mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Se sembraron semillas de *Amaranthus cruentus* var. Amaranteca en charolas de germinación y una vez que se desarrollaron cuatro hojas verdaderas, las plántulas fueron trasplantadas a macetas y trasladadas a invernadero. Seis semanas después se aplicó el tratamiento durante 4 días (d) con solución nutritiva (Hidro-Environment, Mexico) conteniendo 300 mM de NaCl a razón de 150 mL/d, las plantas control se regaron con solución nutritiva. A las 24 horas (h) de la última aplicación de NaCl, se colectaron las hojas de la parte media de la planta (10-15 cm) para aislar cloroplastos y para los estudios de microscopía e inmunohistoquímica en plantas control.

3.2. Preparación de la muestra para el microscopio de transmisión electrónica (TEM)

Las hojas se fijaron por 24 en solución 3% de glutaraldehído y, 0.1 M de cacodilato pH 7.7, después se lavaron con 0.2 M de cacodilato y se llevaron a posfijación en 0.1 M de tetraóxido de ósmio conteniendo 0.1 M de cacodilato. Las muestras se deshidrataron en un gradiente progresivo de etanol: 50% de etanol, 2 veces por 10 min, 96% de etanol, 2 veces por 10 min y etanol absoluto, 2 veces por 15 min.

Antes de infiltrar las muestras se lavaron 2 veces por 30 min cada una en solución de óxido de propileno, después se incubaron en solución de resina:óxido de propileno (1:1) y después en resina pura Epon 812 tipo epoxi (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, E. U. A.) preparada justo antes de usar. La polimerización se llevó a cabo a 60°C por 36 h.

De las muestras incluidas se obtuvieron los cortes semifinos y finos con el ultramicrotomo RMC modelo Mtx (Tucson, Arizona, E. U. A.), los finos se montaron en una rejilla de un solo hoyo cubierta con membrana de polivinilo. Las

muestras montadas en las rejillas se contrastaron para observar en el TEM JEM-1010 (JEOL, Peabody, MA, E. U. A.).

3.3. Medición del área ocupada por los diferentes tejidos en la hoja de *A. cruentus*.

El área ocupada por las células del sistema vascular, de las células de la vaina del haz y de las células del mesófilo así como el tamaño de los CVH y CM se midieron de las imágenes digitales de los cortes semifinos tomadas en el microscopio Axio Imager.A2M System con ayuda del software AxioVision 4.8.2.0 (Carl Zeiss, MicroImaging GmbH, Goettingen, Alemania). Los datos se procesaron con el software estadístico GraphPad Prism, versión 5.01 (La Jolla, CA, E. U. A.), se usó el análisis comparativo t-test con $\alpha = 0.05$, para el cual se tomó un tamaño de muestra igual a 6 laminillas del problema y del control. En el caso del análisis comparativo del tamaño de los cloroplastos se utilizó una $n=70$, es decir, se midieron al menos 70 organelos de las plantas control y 70 organelo de las plantas problema.

3.4. Inmunolocalización de la subunidad grande de RuBisCO en cortes transversales de hojas

Las muestras de hojas se fijaron en solución de 4% de *p*-formaldehído y se embebieron en parafina para obtener los cortes histológicos. Estos cortes se desparafinaron en xileno durante 3 min y se rehidrataron en gradientes ascendentes de etanol empezando con xileno:etanol absoluto (1:1) durante 3 min, seguido por 2 lavados en etanol absoluto por 3 min, después la muestra se sumergió durante 3 min en cada una de las siguientes soluciones: etanol 95%, 70% y 50 %, al final la muestra se lavó con agua destilada.

Antes de la inmunodetección, se realizó una regeneración de los epítopes incubando la muestra a 37°C con solución de 0.05% tripsina en 0.1% CaCl₂ pH 8.0

durante 15 min, transcurrido el tiempo, la muestra se lavó con agua destilada y se continuó con la inmunohistoquímica.

La tinción inmunohistoquímica se realizó siguiendo el método de Walker y col. (1999) con algunas modificaciones. El tejido desparafinado y con los epítopes regenerados se incubó en solución de bloqueo (SB) (1X TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), 0.1% Tween 20, 1% BSA y 1.5% gelatina) a 37°C por 30 min, seguido de una incubación durante 2 h a 37°C con el anticuerpo primario contra RbcL (Agrisera AB, Vännas, Suecia) diluido 1:300 en SB, posteriormente el tejido se incubó 2 h a 37°C con el anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E. U. A.) diluido 1:2000 en SB.

Después de las incubaciones con los anticuerpos, la muestra se lavó con 1X TBS pH 9.5 conteniendo 0.1% de Tween-20, 2 veces por 5 min y se reveló con 100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 50 mg/L BCIP y 340 mg/L NBT. La reacción se detuvo lavando la muestra en agua destilada y después de un breve enjuague con 30% de etanol, se le fijó un cubre-objetos para preservar la muestra y observarla al microscopio. La muestra control se incubó únicamente con el anticuerpo secundario primero 2 h a 37° C, después se lavó y se agregó anti-IgG fresco y se dejó incubar 2 h más a 37° C.

3.5. Aislamiento de cloroplastos

Para el aislamiento de los cloroplastos se desarrolló un protocolo basado en algunos otros ya reportados (Boinski y col., 1993; Edwards y Black, 1971; Majeran, y col., 2005; Raghavendra y Das, 1978; Rödiger y col., 2010). Se pesaron 30 g de hojas y se hicieron cortes de 0.5 a 1 mm² que inmediatamente fueron colocados en 180 mL de regulador de aislamiento (330 mM de Sorbitol, 20 mM de Hepes, 2 mM de EDTA, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de MnCl₂ agregando 10 mM de NaHCO₃ justo antes de usar) y se molieron suavemente en mortero, evitando despedazar los fragmentos de hoja, esto liberó los CM. El macerado se filtró en 2 pliegues de gasa y después en una membrana con poro de 20 µm, obteniendo una suspensión con los CM.

A la fracción sólida se le agregó 150 mL del regulador de aislamiento y se licuó con cuchillas afiladas dando 3 pulsos de 3 s a máxima velocidad en una licuadora 5717-MX (Hamilton Beach/Proctor-Silex, Inc., México). La suspensión se filtró igual que la primera vez y se obtuvo una segunda fracción que contenía los CVH. Las 2 suspensiones se centrifugaron a 1100 x *g* durante 5 min, las pastillas se resuspendieron en 5 mL de regulador de aislamiento y se colocaron sobre un gradiente discontinuo de Percoll 80-40% formado previamente, estos gradientes fueron centrifugados a 2700 x *g* durante 15 min, después se recuperó la banda inferior que se formó (cloroplastos intactos) y se diluyó en 4 volúmenes de regulador de lavado (330 mM Sorbitol y 50 mM HEPES). La dilución se centrifugó 300 g x 3 min repitiendo este paso y la pastilla final se resuspendió en regulador de lavado.

Se cuantificó la proteína total de las suspensiones de cloroplastos empleando el kit Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, E. U. A.) y se centrifugaron a 300 x *g* por 4 min a 4°C para formar la pastilla de cloroplastos que fue almacenada a -80°C hasta ser usada. Para verificar la integridad de los cloroplastos se observó una muestra de las fracciones aisladas en el microscopio óptico por contraste de fases Axio Imager.M2, tomando fotografías con la cámara AxioCamMR3 y se midieron usando el software AxioVision 4.8.2.0 (Carl Zeiss). Los datos se procesaron con el software estadístico GraphPad Prism, versión 5.01 (La Jolla, CA 92037 USA), usando un tamaño de muestra $n=1200$ (1200 cloroplastos fueron medidos) y se empleó el método comparativo *t*-test con un intervalo de confianza del 95% ($\alpha=0.05$).

3.6. Análisis de complejos tilacoidales de los cloroplastos

Para la electroforesis en condiciones nativas se emplearon 200 μg de proteína total de cloroplasto resuspendidos en regulador ACA 750 (750 mM de ácido aminocaproico, 50 mM de Bis-Tris pH 7.0 y 0.5 mM de EDTA) con 9 mM de digitonina y 4.5 mM de dodecil-maltosido en un volumen total de reacción de 70 μL para aislar los complejos tilacoidales intactos (Reisinger y Eichacker, 2007).

Después de incubar durante 1 h en hielo y centrifugar 5 min a 12,000 x g, el sobrenadante se mezcló en un tubo nuevo con 10 mL de regulador de carga (ACA 750, 5% de Commassie R-250) y se cargó en geles de gradiente de acrilamida del 6 al 16%, aplicándose un voltaje inicial de 45V por 1 h que después se incrementó a 160-180 V por 15-16 h. Al terminar la electroforesis se cortó la línea correspondiente a cada carril (muestra) y se colocó en geles SDS-PAGE-Tricina al 12% de acrilamida (Schägger, 2006) para llevar a cabo la separación en segunda dimensión, al inicio de la electroforesis se aplicó un voltaje de 30V y luego de 45 min se incrementó a 90 V toda la noche. Los geles se hicieron por triplicado, donde cada repetición corresponde a una réplica biológica diferente.

Los geles se tiñeron con FastGel-Blue R-350 (GE-Healthcare, Piscataway, NJ, E. U. A.), después de desteñirlos se digitalizaron con el PharosFX Plus Molecular Imager (Bio-Rad) y se analizaron con el software PDQuest 2-DE v. 8.0 (Bio-Rad) de la siguiente manera: CVH_c vs CM_c; CVH_c vs CVH_s, CM_c vs CM_s, los subíndices “c” y “s” indican control y estrés, respectivamente. Las proteínas acumuladas diferencialmente, se cortaron y analizaron mediante nanoUPLC-MS/MS.

3.7. Digestión en gel y análisis por espectrometría de masas

Las proteínas acumuladas diferencialmente fueron cortadas del gel, reducidas con una solución de 25 mM de bicarbonato de amonio (BiCam) conteniendo 10 mM de DTT. La alquilación de proteínas se realizó con 55 mM de iodoacetamida disuelto en BiCam. La digestión de proteínas se llevó a cabo durante toda la noche a 37°C con tripsina grado secuenciación (Promega, Madison, WI, E. U. A.). La separación LC a nanoescala de los péptidos trípticos se realizó con el sistema UPLC nanoACQUITY (Waters, Milford, MA, E. U. A.) equipado con una precolumna Symmetry C18 (5 µm, 20 mm x 180 µm, Waters) y una columna analítica BEH130 C18 (1.7µm, 100mm x 100 µm, Waters). Los péptidos fueron separados con un gradiente lineal de 3-80% de fase móvil B (0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo) durante 30 min a un flujo de 600 nL/min, seguida

de un lavado de 2 min con 85% de fase móvil B. La columna fue re-equilibrada a las condiciones iniciales por 15 min con fase móvil A (0.1% de solución acuosa de ácido fórmico). Se mantuvo la temperatura a 35°C. Se usó [Glu1]-fibrinopeptido B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, E. U. A.) como compuesto de referencia que fue suministrado por la bomba auxiliar del nanoACQUITY UPLC a 200 nL/min con una concentración de 100 fmol/mL al aspersor de referencia del nano-lock-Spray del espectrómetro de masas.

El análisis de masas se realizó en el espectrómetro SYNAPT-HDMS cuadrupolo/tiempo de vuelo (Waters). El espectrómetro fue operado en modo V y los análisis realizados en modo positivo ESI. El analizador TOF fue calibrado externamente con [Glu¹]-Fibrinopeptido B a partir de m/z 50 a 2422. La RF aplicada al analizador de masas cuadrupolo fue ajustada de tal forma que los iones de m/z 50-2000 fueran eficientemente transmitidos. Los datos exactos fueron colectados en un modo de adquisición directa de datos alternante (DDA). En modo de baja energía los datos fueron colectados a una energía de colisión constante de 3 eV. En el modo elevado de energía, la energía de colisión se incrementó de 15 a 45 eV durante 8 segundos de integración. Los datos fueron corregidos post-adquisición con el estándar usando el ion monoisotópico doblemente protonado del [Glu¹]-Fibrinopeptido B, el espray de referencia fue muestreado cada 30 s.

3.8. Búsqueda e identificación de proteínas

Los datos MS/MS se compararon contra la base de datos de proteínas nrNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y contra la base privada del primer análisis transcriptómico a gran escala de *A. hypohcondriacus* (Délano-Frier y col., 2011), usando el motor de búsqueda MASCOT v.2.3.0 (Matrix Science, London, Reino Unido). Se usó la tripsina como proteasa específica y se permitió la omisión de un sitio de corte. La tolerancia de masa para el precursor y fragmentos de iones fue ajustada a 10 ppm y 0.1 Da, respectivamente. Se tomó a la carbamidometil cisteína como modificación fija y la oxidación de la metionina como modificación

variable. Las identificaciones se consideraron confiables cuando se obtuvieron valores de MASCOT mayores a 44 para *Viridiplantae* nrNCBI y/o mayores a 31 para la base de datos del transcriptoma de *A. hypochondriacus*, indicando la identidad u homología extensiva a $P < 0.01$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los principales resultados de este trabajo de tesis fueron incluidos en la publicación: Joaquín-Ramos, A., Huerta-Ocampo, J. A., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., Baginsky, S., Barba de la Rosa, A. P. Comparative proteomic analysis of amaranth mesophyll and bundle sheath chloroplasts and their adaptation to salt stress. *Journal of Plant Physiology*. 2014; 171: 1423-1435 (Anexo III). Los resultados que por limitaciones de espacio no pudieron ser incluidos en el artículo se resumen y discuten brevemente en esta sección.

4.1. Morfología de las células y cloroplastos de *A. cruentus* en plantas control y plantas sometidas a estrés salino.

En los cortes transversales semifinos de las hojas de *A. cruentus* var. *Amaranteca* se observó la anatomía de Kranz, tanto en plantas crecidas en condiciones control como a estrés salino (Figura 7), que es característica de muchas de las plantas C_4 y también está presente en algunos intermediarios C_3 - C_4 (Ku y col., 1983, Sage y col., 2012). Esta anatomía no es indispensable para llevar a cabo la fotosíntesis C_4 pues existen plantas que la realizan en una sola célula (Voznesenskaya y col., 2001).

La cuantificación de los efectos del estrés salino sobre el desarrollo, así como sobre la morfología de las células y los cloroplastos, se muestra en las Figuras 1 y 2 del artículo (Joaquín-Ramos y col., 2014). Brevemente, se encontraron diferencias de tamaño entre los cloroplastos de las plantas control y de las estresadas. Los CVH en las plantas control eran más grandes que los CM, mientras que el tamaño de los CVH de plantas estresadas disminuyó en referencia a las plantas control y en los CM no hubo cambio en el tamaño cuando las plantas crecieron en presencia de sal.

En plantas control y estresadas el tamaño de los CVH fue mayor que el de los CM. Esta característica es común en el caso de las plantas intermedio C_3 - C_4 porque el aumento en el tamaño de estos organelos en las CVH permite la

optimización de la reabsorción del CO₂ desprendido por las mitocondrias al descarboxilar la glicina formada a partir de 2-FG formado por la fotorespiración (Sage y col., 2012).

La salinidad en el suelo provoca que las plantas dejen de obtener agua de él, provocando un estrés hídrico, para conservar la humedad las plantas cierran sus estomas (Stepien y Johnson, 2009). Esto puede relacionarse con la disminución del área ocupada por el sistema vascular y el incremento del área ocupada por las células del mesófilo. Li y col. (2011), demostraron la disminución en la conductancia estomatal en plantas de *Suaeda salsa* bajo concentraciones de hasta 200 mM NaCl.

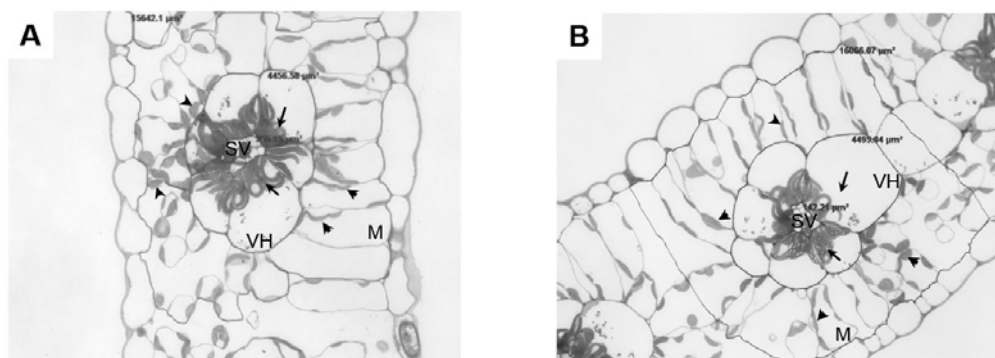


Figura 7. Análisis morfológico de las células de la vaina del haz y de mesófilo y del tamaño de cloroplastos. A) corte transversal semifino de hojas de plantas control. B) corte transversal de hojas de plantas estresadas. SV, sistema vascular. VH células de la vaina del haz. M, células del mesófilo. Las flechas indican los cloroplastos de VH (CVH) y las cabezas de flecha los cloroplastos del M (CM).

4.2. Inmunodetección de RuBisCO en CVH y CM.

Una de las enzimas más abundantes entre las plantas es la RuBisCO que en el caso de las plantas C₄ está restringida a los CVH, mientras que en plantas intermedio C₃-C₄ con anatomía de Kranz está presente en ambos cloroplastos (Sage y col., 2012). Se usó un anticuerpo contra la subunidad grande de RuBisCO

(Anti-RbcL) para detectar a esta enzima en los CVH y CM de *A. cruentus* var. Amaranteca (Figura 8A). El color índigo que se puede observar en la Figura 8A en los dos tipos de cloroplastos, indica la presencia de la subunidad grande de RuBisCO en ambos. Como control el tejido se incubó únicamente con el anticuerpo secundario, para descartar la posibilidad de que el anti-IgG de conejo se acoplara con alguna proteína de la planta, ambos, control y problema, se revelaron igual. En la laminilla control sólo observamos un color verde oscuro en los 2 cloroplastos, resultado de la degradación de la clorofila (Figura 8B).

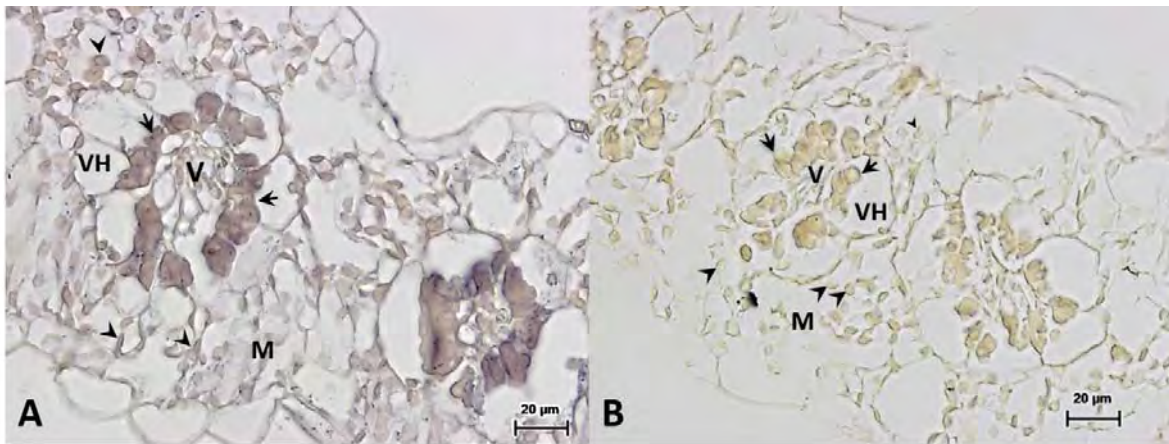


Figura 8. Microfotografías de la inmunodetección de la subunidad grande de RuBisCO (RbcL). En A se muestra el tejido incubado con el anti-RbcL como anticuerpo primario y con anti-IgG de conejo como secundario, el color índigo en ambos tipos de cloroplasto indica la presencia de la RbcL en ambos tipos. En B se muestra la laminilla control incubada únicamente con el anti-IgG. V, sistema vascular. VH señala las células de la vaina del haz, M indica las células del mesófilo, las flechas apuntan a los cloroplastos de las células de la vaina del haz y las cabezas de flecha a los cloroplastos de las células del mesófilo.

Datos similares fueron reportados por Hong y col. (2005) en *A. tricolor*, donde RuBisCO y RuBisCO activasa fueron ubicadas en los 2 cloroplastos y también se determinó que la mancha 97, identificada como fructosa bisfosfato aldolasa, una enzima clave en la síntesis de almidón (Fan y col., 2009), se acumula en cantidades similares en los dos tipos de cloroplastos.

4.3. Integridad de las fracciones de cloroplastos aislados.

Para verificar la integridad de los cloroplastos se observó una muestra al microscopio, usando contraste de fases, de cada fracción aislada de plantas control y de las sometidas a estrés salino. La presencia en un halo brillante indicó que los cloroplastos estaban intactos (Figura 9A-D) mientras que el color verde opaco en los cloroplastos de las fracciones recuperadas de la banda superior de

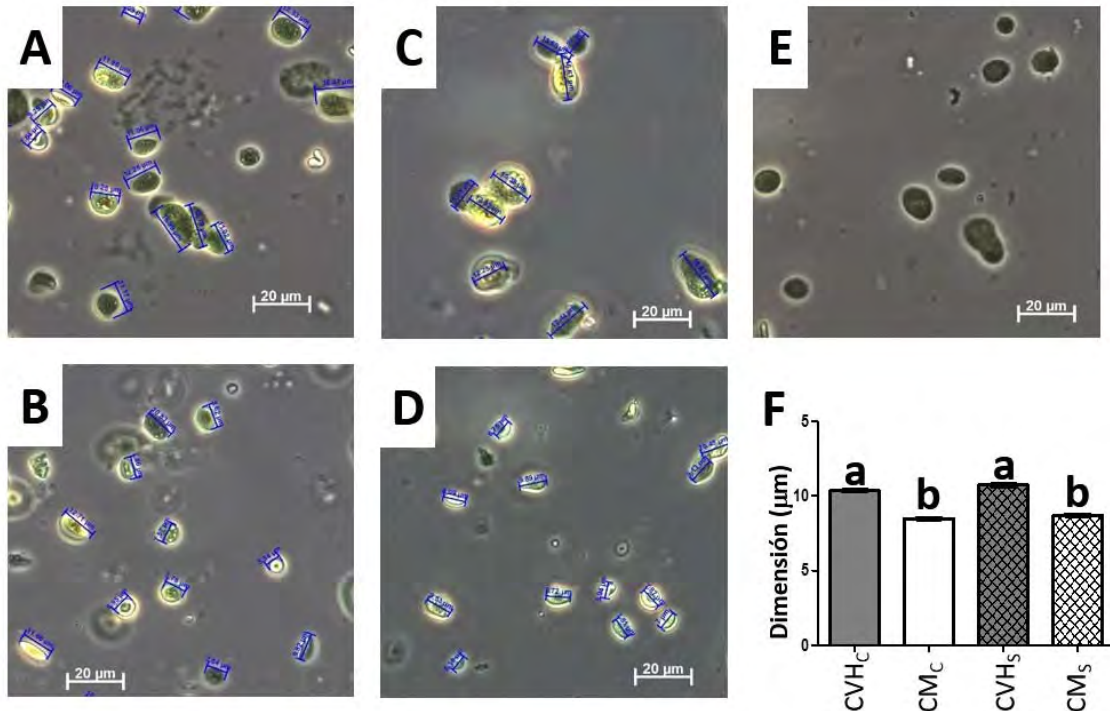


Figura 9. Microfotografías analizadas por microscopía de contraste de fases de los cloroplastos aislados. A, CVH de plantas control, B, CM de plantas control. C, CVH de plantas estresadas. D, CM de plantas estresadas. E, imagen representativa de las fracciones de cloroplastos lisados observados al microscopio. F, comparativo estadístico de la longitud de los cloroplastos aislados, donde, las letras diferentes indican diferencia significativa, medida por *t*-test con $P < 0.05$ y $n = 1200$. Los subíndices “c” y “s” indican control y estrés, respectivamente

los gradientes de Percoll indicó que estaban lisados (Figura 9E). También se midió la longitud de los cloroplastos aislados para revisar si existía alguna diferencia en el tamaño. El gráfico estadístico (Figura 9F) mostró que los CVH eran más grandes que los CM en las plantas control, pero no indicó diferencia entre los CVH

de plantas control respecto a los CVH de plantas sometidas a estrés, el mismo resultado se observó para los CM.

4.4. Perfil proteínico de los CVH y CM de plantas control y estresadas.

En la Figura 4A del artículo (Joaquín-Ramos y col., 2014) se muestra el análisis de las proteínas de los cloroplastos de *A. cruentus* var. *Amaranteca*. Primero se analizó el patrón por SDS-PAGE para localizar los marcadores de cada cloroplasto, PPdK para los del CM y RuBisCO para los CVH. El perfil en SDS-PAGE mostró solo 5 bandas diferenciales entre las condiciones control y las condiciones problema.

En la banda número 1 con una masa aproximada de 116.8 kDa, se encontraron péptidos de PPdK y de la proteína A1 del PSI (Tabla S1), esta banda fue levemente más abundante en los CVH e incrementó su abundancia en las plantas bajo estrés salino, mientras que en los CM su abundancia fue similar en las plantas control y problema. En la banda número 2 con masa de 107.8 kDa se detectaron péptidos correspondientes a la PPdK de cloroplastos de *A. hypochondriacus*. Esta proteína se acumuló más en los CVH que en los CM pero disminuyó su acumulación en ambos cloroplastos de plantas bajo estrés.

En las plantas C_4 el gen que codifica para PPdK produce 2 mensajeros, uno de ellos tiene la secuencia de un péptido señal que le permite actuar en el cloroplasto y otro actúa en el citosol (Matsuoka, 1995), además, en el cloroplasto existen otras proteínas de membrana tilacoidal con dominios de unión a piruvato, como el complejo piruvato deshidrogenasa, implicado en el metabolismo del glicolato y gioxalato (Blume y col., 2013). Durante el análisis de los datos de masas de la banda de 116.8 kDa, los péptidos que se generaron coincidieron con el dominio de proteínas que usan piruvato como sustrato.

Con una masa molecular aproximada de 89.6 kDa, en la banda 3 se identificaron péptidos con similitud a proteínas de la familia de proteínas de choque térmico 70 (HSP70) (Tabla S1). Esta proteína estuvo presente en ambos tipos de cloroplastos de las plantas control, mientras que en plantas estresadas la

abundancia se mantuvo muy similar en los CVH y apenas se detectó en los CM. La HSP70 se relaciona con el plegamiento correcto de otras proteínas y como chaperonas (Schroda y col., 1999; Al-Whaibi, 2011).

La banda 4 contenía péptidos parecidos a 2 proteínas, la subunidad α de la ATP sintetasa y la proteína A del PSI. La abundancia de esta banda con masa molecular de 71.0 kDa (Tabla S1) fue muy similar en ambos de cloroplastos de plantas control esto puede considerarse normal, pues ambos tipos de cloroplastos requieren de ATP y actividad de PSI para llevar a cabo sus funciones biológicas (Sobhanian y col., 2010). Pero en condiciones de estrés por sal decayó drásticamente en los CVH pero se mantuvo en los CM. Es podría ser debido a que el PSI está siendo afectado por el estrés, como se verá más adelante en el análisis la composición monomérica de los complejos tilacoidales bajo estrés.

En la banda número 5 se determinaron péptidos del factor de elongación Tu de cloroplasto, de la fosfoglicerato cinasa cloroplástica, de las proteínas CP43 y CP47 del fotosistema II y de la geranil-geranil hidrogenasa. Esta banda de masa molecular aproximada de 46.1 kDa fue más abundante en CVH y disminuyó cuando la planta fue estresada con NaCl.

La subunidad grande de RuBisCO (RbcL), marcador de los CVH, con masa aproximada de 57 kDa, no se pudo observar en el SDS-PAGE debido a esto se hizo una inmunodetección en gel (Figura 4B, Joaquín-Ramos y col., 2014) que mostró la presencia de RbcL en ambos tipos de cloroplasto de las plantas control y disminuyó en los dos tipos de cloroplastos de las plantas sometidas a estrés por NaCl.

La presencia de PPdK y RuBisCO también se ha descrito en géneros intermediarios C₃-C₄; sin embargo, las actividades son bajas en comparación con las de una planta considerada C₄ (Sage y col., 2012). Es muy probable que la presencia de RuBisCO en los CM permita la fotorrespiración y se genere glicina, usado para producir glutatión, este último está involucrado en la defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) lo cual sugiere que la fotorrespiración ayuda a reducir la fotoinhibición, especialmente en situaciones de estrés (Wingler y col.,

2000). Esto podría tener relación con el hecho de que muchos de los intermediarios C₃-C₄ se encuentran en ambientes extremos, principalmente secos y con altas temperaturas (Sage, 2004).

4.4.1. Análisis de complejos proteínicos tilacoidales de los cloroplastos de *A. cruentus* var. *Amaranteca*.

En lo que se refiere al análisis de complejos proteínicos tilacoidales de los cloroplastos en gel nativo de acrilamida (Figura 4C, Joaquín-Ramos y col., 2014) no se observó diferencia entre los cloroplastos de las plantas estresadas y control, pero si entre los dos tipos de cloroplastos.

En la región II se observaron 5 bandas más abundantes en los CM, en esta región (~669 kDa) se encuentran los supercomplejos PSI y PSII interactuando con LHCI y II, respectivamente. Estas interacciones se forman dentro y alrededor de la grana, donde se realiza la actividad fotosintética (Dekker y Boekema, 2005; Daum y col., 2010; Ford y Holzenburg, 2013). En la región V (~440 kDa) se observó una banda azul con mayor acumulación en los CVH, en esta región se han descrito los sub-complejos del PSI y PSII sin los LHCs. Alrededor de los 232 kDa (región VII), se observa una banda verde que es diferente en cuanto al tamaño molecular entre los CVH y los CM. El color verde indica que son proteínas que unen clorofila como los LHCs, en esa zona se ha descrito ubicado el LHCI pre-ensamblado (Behrens y col., 2013; Majeran y col., 2008). Aunque el análisis mediante microscopía electrónica mostraba que los CM y los CVH de *A. cruentus* var. *Amaranteca* podrían ser iguales, la comparación de los geles nativos mostró al menos estas 3 regiones que sugieren diferencias a nivel de complejos entre ambos cloroplastos.

En relación al género *Amaranthus* spp. existen diferencias en los datos publicados, por ejemplo; en *A. viridis* los marcadores correspondientes de cada cloroplasto coinciden con lo reportado para las plantas C₄ pero con presencia leve de la PPdK en los cloroplastos de las CVH (Ueno, 2001), mientras que en *A. tricolor* los 2 tipos de cloroplastos poseen grana y cúmulos de almidón, además se detectó a RuBisCO en ambos (Hong y col., 2005). Para el género *Amaranthus* spp.

no se ha realizado un estudio evolutivo similar a los que se han hecho con el género *Flaveria* spp., que entre sus especies cuenta con plantas C₃, C₃-C₄ y C₄ (Westhoff y Gowik, 2004). Por lo tanto, de acuerdo a los datos mostrados aquí es muy probable que el género *Amaranthus* spp. tenga intermediarios C₃-C₄ y que *A. cruentus* cv. Amaranteca se comporte como una de estos.

4.4.2. Composición de los complejos tilacoidales de los cloroplastos de plantas control y estresadas.

Después de la electroforesis nativa se cortaron las tiras correspondientes a cada muestra, se desnaturalizaron y colocaron en geles de SDS-PAGE-Tricina para llevar a cabo la segunda dimensión y determinar la composición de los complejos tilacoidales de los cloroplastos tanto en condiciones control como con estrés salino (Figura 5, Joaquín-Ramos y col., 2014). Cada juego de geles fue hecho con un experimento diferente, es decir, las 3 réplicas de los geles corresponden a 3 réplicas biológicas.

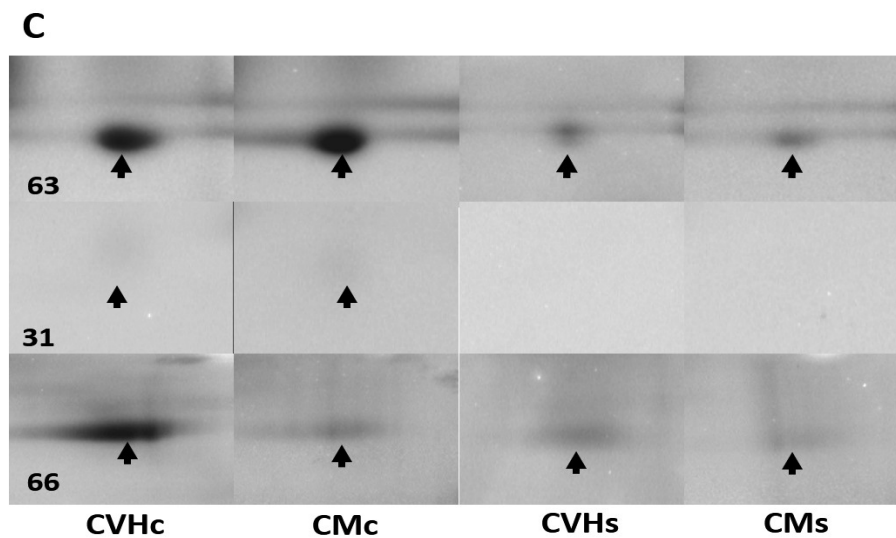


Figura 10. Segunda dimensión de proteínas de complejos tilacoidales de cloroplastos. Magnificación de algunas proteínas diferenciales, CVH, cloroplastos de la vaina del haz, CM cloroplastos del mesófilo, los subíndices “c” y “s”, indican control y estrés respectivamente. El 63 corresponde a la subunidad grande de RuBisCO (RcbL), el 31 a la subunidad pequeña de RuBisCO (RcbS) y el 66 a la ortofosfato dikinasa (PPdK.)

Alrededor de 150 manchas fueron detectadas reproduciblemente en los geles BN-2DE SDS-PAGE, de las cuales 101 fueron diferenciales sumando las condiciones control y estrés (Tabla 1, Joaquín-Ramos y col., 2014 & Tabla SII, anexo II). De estas proteínas acumuladas diferencialmente, 29 se encontraron únicamente en los CVH, 9 fueron únicas de los CM, 39 estuvieron presentes en ambos y de estas, 9 se acumularon 2 veces más en los CVH, 6 se acumularon 2 veces más en los CM y 24 fueron significativamente diferentes de acuerdo a la prueba t con $p \geq 95\%$ que usa el software y 20 estas últimas tendían a acumularse en los CM. De las 101 proteínas diferenciales, sólo 24 mostraron cambios en las plantas que fueron sometidas a estrés (Figura 11).

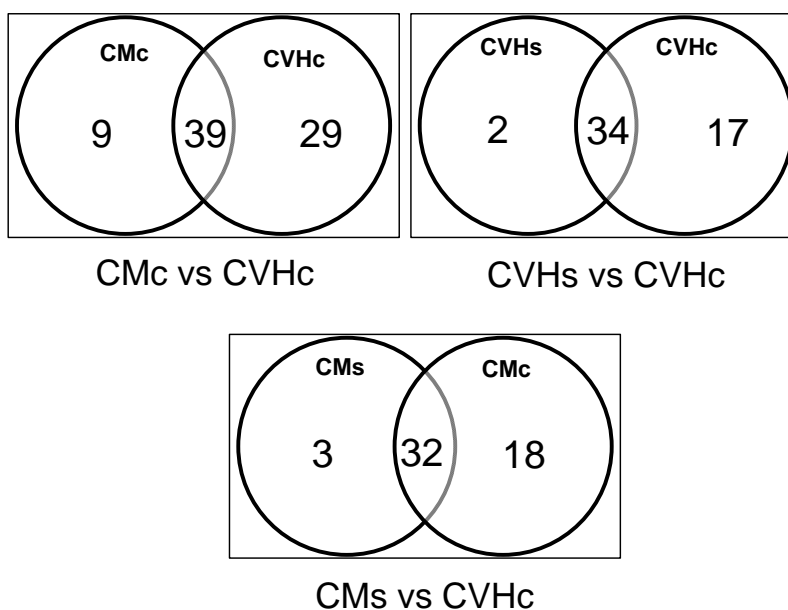


Figura 11. Distribución de las proteínas diferenciales entre los 2 tipos de cloroplastos en plantas control y plantas estresadas. Las letras “c” y “s” indican las plantas control y las plantas sometidas a estrés salino, respectivamente.

4.4.3. Similitud de las secuencias de proteínas de los complejos tilacoidales

Se realizó una búsqueda de similitud usando la base de datos no redundante *Viridiplantae* del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y una base del

transcriptoma de amaranto (Délano-Frier y col., 2011). El alto grado de conservación que existe entre las proteínas de los cloroplastos de plantas terrestres permitió usar estas bases de datos para identificar las proteínas acumuladas diferencialmente en este estudio (Andaluz y col., 2006). Se encontró homología en 74 de las 101 proteínas diferenciales (Tabla 1, Joaquín-Ramos y col., 2014 & Tabla SII, Anexo II).

4.4.3.1. El fotosistema II (PSII)

El análisis comparativo de los geles de la segunda dimensión de los cloroplastos de la plantas control mostró que las subunidades del PSII como el CYTB₅₅₉, D1, D2, CP47, CP43 se encontraron en las regiones I y II y en muchos casos acumuladas solamente en o con tendencia a acumularse en CM, estas mismas proteínas fueron localizadas también en las regiones III y IV pero con tendencia a acumularse en los CVH. Sin embargo, la OEC1 (manchas 13, 54 y 57), proteína encargada de la estabilización del O₂ durante la oxidación del H₂O para generar el gradiente de electrones en PSII, se acumuló en mayor cantidad en las regiones I y II donde se encuentra el macrocomplejo PSII-LHCII activo (Ford y Holzenburg, 2013) y con acumulación preferente hacia los CM. Esto implicaría que en los CM la actividad de PSII es mayor que en los CVH y que el flujo linear de electrones está mayormente representado en los CM, de manera similar a lo observado en plantas C₄ e intermediarias C₃-C₄ (Darie y col., 2006; Majeran y col., 2008; Majeran y van Wijk, 2009).

Por otra parte, la proteína 24 con similitud a la OEC1 se encontró en la región III en los CHV. En esta región el complejo PSII está comenzando a ensamblarse e interactuar con LHCII y quizá aún se encuentre en la zona laminal de la membrana tilacoidal, donde la actividad es probablemente más baja que dentro de la membrana que conforma la grana donde PSII y LHCII se acoplan (Ford y Holzenburg, 2013).

El análisis de los cloroplastos de plantas bajo estrés salino en la región I mostró que las proteínas CYTB₅₅₉, D1, D2, OEC, LHCb y CP24, que forma al PSII,

fueron afectadas. Las proteínas del núcleo, D1 y D2 localizadas en la misma mancha 7, no fueron detectadas en los cloroplastos CVH de plantas sometidas a estrés. El mismo comportamiento de estas proteínas se observó en los CM de plantas bajo estrés. La acumulación de CP24 (mancha 6) en los CVH disminuyó casi 3 veces en condiciones de estrés, mientras que en los CM bajo estrés salino esta proteína no se detectó. En plantas de *Arabidopsis thaliana* carentes del gen que codifica para CP24, el supercomplejo PSII-LHCII fue afectado en su macroestructura, pero esto no se vió reflejado en la morfología de la grana de los cloroplastos (Kovács y col., 2006). La mancha 55 (región I) con similitud a CP43 que está altamente relacionada con las OEC's (Bricker y Frankel, 2002) mostró tendencia a acumularse en ambos cloroplastos bajo condiciones de estrés.

En la región II, una proteína similar a D1 (mancha 11) fue detectada únicamente en los cloroplastos de plantas sometidas a estrés. Se ha descrito un mecanismo empleado para reparar a la proteína D1 del foto-daño causado por la generación de las ROS durante la actividad fotosintética (Kato y Sakamoto, 2009), este mecanismo eleva la tasa de recambio de D1 y posiblemente sea estimulado por el estrés salino en los cloroplastos de *A. cruentus*.

Las proteínas similares a D2, CYTB₅₅₉ y OEC localizadas en la región III, se acumularon en menor cantidad en los CVH de plantas sometidas a estrés salino y solamente D1 se mantuvo constante. Mientras que en la región V, todas aquellas proteínas de PSII que aparecieron en los CVH no sufrieron cambios en plantas sometidas a estrés a excepción de CYTB₅₅₉ que fue apenas estadísticamente diferente. Quizás en esta región hay una tasa alta renovación de proteínas para compensar la rápida degradación que podría estar sufriendo el aparato fotosintético a causa del estrés y la fotosíntesis.

En las plantas bajo estrés se detectaron diversos cambios en las regiones donde se encuentran los supercomplejos ensamblados en la grana y donde hay mayor actividad de estos (Dekker y Boekema, 2005; Ford y Holzenburg, 2013). Las proteínas como D1, D2 OEC1 y CP43 involucradas en la formación y la actividad de PSII, se mantuvieron constantes y algunas veces fueron sobre

acumuladas bajo estrés. Esto podría interpretarse como una respuesta de la planta para mantener la actividad de PSII mediante la protección de las principales proteínas del aparato fotosintético. De hecho, proteínas con homología a OEC fueron sobre acumulados en ambos cloroplastos bajo condiciones de estrés.

4.4.3.2. El fotosistema I (PSI)

El núcleo de PSI, formado por p700 A1, p700 A2 y la subunidad III (*psaA*, *psaB* y *psaF*, respectivamente) que permite la unión del donador de electrones y de esta manera la activación del flujo cíclico de electrones alrededor de PSI, esencial para la fotosíntesis (Munekage y col., 2004; Nelson y Yocum, 2006), se detectó en ambos cloroplastos de las plantas control pero sólo la subunidad III mostró ligera tendencia a acumularse en los CM dentro de la región III, donde probablemente esté el complejo activo. La proteína P700 A2 (*psaB*) se detectó en las regiones IV y VIII en CM y CVH, respectivamente. Se ha descrito que en plantas C₄ e intermedias C₃-C₄ existen diferencias en la cantidad y actividad de PSI entre los dos tipos de cloroplastos (Majeran y col., 2008). Sin embargo, en la región de los complejos activos no se encontró evidencia de esto e inclusive no se detectaron proteínas acumuladas diferencialmente del LHCI, estrechamente relacionado con el PSI, así que probablemente el PSI está igualmente representado en ambos cloroplastos.

En referencia al PSI en plantas sometidas a estrés, en la región I se localizó la mancha 3 con similitud a la subunidad XI codificada por *psaL* que se acumuló en los CVH y no fue detectado en los CM. Este gen es muy importante, pues las plantas de *A. thaliana* deficientes en él, son relativamente incapaces de llevar a cabo la transición del LHCII al PSI por cambios en el estado de excitación por luz (Dekker y Boekema, 2005). En la región III la subunidad p700 A1 (mancha 87) fue ligeramente sobre-acumulada en los CVH de plantas bajo estrés, mientras que en los CM no sufrió cambio significativo. Sin embargo, la subunidad VII de PSI (*psaC*) estuvo ausente en los CM de plantas sometidas a estrés, la carencia de esta subunidad se ha involucrado con un ensamble incorrecto de las subunidades A1 y

A2 del núcleo de PSI (Takahashi y col., 1991; Jagannathan y col., 2010), así que aunque el núcleo no es severamente afectado en cantidad, quizá la baja o nula presencia de la subunidad VII hace que el PSI trabaje de manera deficiente en los CM cuando las plantas están creciendo en estrés salino.

4.4.3.3. La ATP sintetasa

Se detectaron 2 subunidades de la ATP sintetasa, la subunidad β en las regiones III, IV y VII y la γ en la región VIII, estas subunidades pertenecen al sub-complejo F_1 (Choquet y Vallon, 2000). Se ha descrito al complejo F_1F_0 alrededor de los 540 kDa, donde se ubicó la subunidad β con diferencias apenas estadísticamente diferente por *t*-test. Mientras que la subunidad γ , se detectó en la región VIII en la mancha 67 con relación CM/CVH de 2.11 y en la 68 con un valor de 0.38 (CM/CVH). Esta subunidad está implicada en la actividad catalítica para la síntesis del ATP y es regulada por diferentes factores como metabolismo, medio ambiente, concentración de CO_2 , etc. (Yamori y col., 2011). Los CM están más expuestos a concentraciones altas de CO_2 y la tasa fotosintética es más alta debido a la presencia de proteínas implicadas en la evolución del oxígeno, todo esto implica un flujo mayor de e^- y H^+ , por lo tanto, la velocidad de síntesis es mayor en los CM.

También se sabe que la síntesis de ATP está involucrada en mecanismos de tolerancia a diferentes tipos de estrés biótico como sequía y salinidad, pues el estrés desencadena un gran número de cambios bioquímicos dentro de la célula (Sobhanian y col., 2010; Kosova y col., 2011), la síntesis de ATP también es regulada por cambios en la concentración de CO_2 y H^+ en la célula causados por situaciones de estrés (Saibo y col., 2009). La subunidad β de la ATP sintetasa está implicada en el control por epistasis (CES), esto significa que es necesaria para que las otras proteínas del complejo puedan ensamblarse en la membrana tilacoidal (Choquet y Vallon, 2000). La subunidad β se acumuló 2.3 veces más en los CM de plantas bajo condiciones de estrés en la región III y 1.42 más en la región VII. Mientras que la subunidad γ , necesaria para la actividad catalítica de la

ATP sintetasa, se sobre-acumuló en los CM de plantas sometidas a estrés salino. Los datos anteriores podrían sugerir que la planta está incrementando la tasa de síntesis de ATP para lidiar con el estrés al que está siendo sometida.

4.4.3.4. El citocromo b₆f (CYT b₆f)

Las proteínas CYT_{b₆}, CYT_f, subunidad IV y Rieske son los principales componentes del citocromo b₆f (CYT_{b₆f}) (Choquet y Vallon, 2000), aunque la subunidad IV se acumuló casi 2 veces más en los CVH las demás proteínas no muestran acumulación diferencial, así que probablemente la cantidad y actividad del CYT_{b₆f} es igual en ambos cloroplastos de las plantas control. Sin embargo, el análisis de la secuencia mostró que los péptidos de la subunidad IV tienen homología con los dominios de unión a quinonas, esta proteína es utilizada por el PSII para transferir los electrones al CYT b₆f (Nelson y Yocum, 2006). Estos datos, sumados a la sobre acumulación en los CM de la OEC1, sugieren que la actividad PSII es mayor en estos cloroplastos.

El CYT_{b₆f} es la conexión entre los 2 fotosistemas pues mantienen el flujo de electrones del PSII al PSI y genera el gradiente de protones usado por la ATP sintetasa (Munekage y col., 2004). Mientras que la cantidad de la subunidad IV del CYT_{b₆f} se mantiene constante en los cloroplastos sometidos a estrés, las otras 3 principales proteínas del núcleo (CYT b₆, CYT f y Rieske) mostraron tendencia a acumularse en ambos cloroplastos bajo condiciones de estrés. El complejo Rieske se encarga de mantener el flujo correcto de electrones hacia el PSI (Yamori y col., 2011), el CYT_f se considera una proteína CES (Choquet y Vallon, 2000). Todo esto sugiere un intento de la célula para mantener el funcionamiento correcto del transporte de electrones en el aparato fotosintético durante el estrés.

4.4.3.5. Proteínas del metabolismo general

Cuando las plantas se ven afectadas por diferentes tipos de estrés abiótico su metabolismo cambia para lidiar con él y la respuesta depende del tiempo y la

intensidad del estrés (Munns y Tester, 2008). La subunidad grande de RuBisCO (RbcL), que corresponde a la mancha 63 en la Figura 13, se detectó en los CVH y CM de las plantas control y disminuyó su acumulación cuando las plantas fueros sometidas a estrés salino en ambos cloroplastos, mientras que la subunidad menor de RuBisCO (RbcS, mancha 31), detectada en ambos cloroplastos de las plantas control, no fue detectada en ninguno de los cloroplastos de las plantas sometidas a estrés, mostrando que el ciclo de Calvin es una de la rutas afectadas por el estrés salino. Se cree que la disminución de las enzimas involucradas en el ciclo de Calvin, es un mecanismo para para ahorrar energía y usarla en mecanismos que le permitan sobreponerse a las condiciones de estrés abiótico (Saibo y col., 2009; Sobhanian y col., 2011).

Por otro lado, la PPdK, un marcador de CM en plantas C₄, fue detectada en ambos cloroplastos con preferencia hacia los CVH y su acumulación decreció en ambos tipos de cloroplasto cuando las plantas estaban bajo estrés salino. La PPdK usa ATP para convertir el piruvato a fosfoenol piruvato (Chastain y col., 2011) así que su decremento, igual que el de RuBisCO, puede interpretarse como una estrategia de la planta para reservar energía y hacer frente al estrés.

En plantas que crecen bajo estrés salino también se sobre-acumulan proteínas asociadas con la síntesis de oligosacáridos y metabolitos secundarios como la glicin betaina y la prolina (Kosova y col., 2011). La enzima glicolítica, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima multifuncional que tiene varias funciones en la célula, algunos reportes muestran que su sobre-expresión confiere resistencia al estrés salino (Zhang y col., 2011), otros indican que es el blanco inhibitorio del H₂O₂ generado durante situaciones de estrés abiótico (Hancock y col., 2005). En este estudio se detectó la GAPDH (manchas 41 y 48) sólo en los CVH y se observó que su acumulación fue disminuida en plantas sometidas a estrés.

La fructosa 1-6 bifosfato aldolasa (FBP) que desempeña un papel importante en la glicolisis, gluconeogénesis, síntesis de almidón y en el ciclo de Calvin, se encontró distribuida en ambos cloroplastos de las plantas control y se

sobre-acumuló en los CM de plantas bajo estrés. En otros modelos como *Arabidopsis* y algodón, la FBP es sobre-regulada a nivel de transcrito por efectos de la salinidad (Qaisar y col., 2010; Lu y col., 2012) y su decremento moderado en papa inhibe la actividad fotosintética, principalmente del PSII (Haake y col., 1998).

Las lipoxigenasas están relacionadas a la biosíntesis de jasmonatos mediante la producción de oxilipinas como intermediarios y estos compuestos también están involucrados en la senescencia de las células vegetales como consecuencia del estrés abiótico (Seltmann y col., 2010; Yan y col., 2013). Las manchas 47, 49 y 99 tuvieron similitud con lipoxigenasas y se encontraron sólo en los CVH. La mancha 99 se sobre-acumuló en los CVH de plantas estresadas y la 47 se también se detectó en los CM de las plantas bajo estrés.

En los CVH se detectó una proteasa cloroplástica de la familia FtsH en la región VIII. La FtsH desapareció en los CVH y apareció en los CM de las plantas bajo estrés. Las proteasas de esta familia han sido descritas en procesos de regulación y en ajustes de la cantidad de otras proteínas en respuesta a las condiciones de estrés abiótico. Estas proteínas junto con las serina-proteasas (Deg), han sido descritas en procesos de renovación de la proteína D1 del PSII y desensamble de RieskeFe-S (Adam, 2000).

Otras proteínas descritas en la tolerancia de las plantas al estrés salino son los antiportadores Na^+/H^+ que se han caracterizado en diferentes modelos vegetales y el incremento de su mensajero y proteína está ligado al incremento en la tolerancia de la planta a la presencia de sal en el suelo (Cosentino y col., 2010; Pons y col., 2011). Sin embargo, la proteína 42 similar a un antiportador Na^+/H^+ , fue detectada sólo en los CVH y desapareció cuando las plantas fueron sometidas a estrés salino. En plantas como *Chrysanthemum crassum* este tipo de proteínas disminuyen su cantidad cuando la concentración de ABA aumenta en la hojas (Song y col., 2012) y estas fitohormonas incrementan su concentración en las primeras etapas del estrés salino para inducir el cierre de estomas (Zörb y col., 2013).

4.5. Resumen de resultados.

La electroforesis en SDS-PAGE de las proteínas totales, las micrografías TEM y el análisis de inmunodetección en gel e *in situ* mostraron que los CVH y los CM de *A. cruentus* var. *Amaranteca* son muy similares en su morfología y su actividad fotosintética pues los marcadores PPdK y RuBisCO aparecieron en ambos cloroplastos; pero la primera dimensión en los geles nativos mostró diferencias en los complejos tilacoidales.

Al someter las plantas al estrés salino la morfología de los CVH cambio de manera notable indicando que son más sensibles al estrés salino en comparación con los CM pues estos últimos solo disminuyeron la presencia de almidón; sin embargo, los geles nativos de los complejos tilacoidales no mostraron diferencias entre los cloroplastos de las plantas control y las plantas estresadas.

En la Figura 6A (Joaquín-Ramos y col., 2014) se esquematizan las proteínas diferenciales entre los CVH y los CM de las plantas control; entre ellas destacan las subunidades del PSII, la D1, la CP43, la CP47 y el CYTb₅₅₉, todas fueron más abundantes en la región I y II de los CM. En estas regiones se acumula el súper-complejo activo PSII-LHCII, donde la presencia de las OEC 1 es muy importante, estas proteínas acumuladas mayormente en los CM están involucradas en la estabilización del oxígeno molecular a partir del cual generan el gradiente lineal de electrones. Sumado a lo anterior, los péptidos que se detectaron de la subunidad IV del CYT b_{6f}, que también fueron más abundantes en los CM, contenían dominios de unión a quinonas; estas proteínas son usadas por el PSII para la transferencia de electrones. Lo anterior indica que la actividad de PSII es mayor en los CM que en los CVH.

Cuando las plantas de *A. cruentus* var. *Amaranteca*, subunidades importantes para el funcionamiento del PSII, como la OEC 1, la D1 y la CP43 incrementaron su acumulación en ambos tipos de cloroplastos; sin embargo, el PSI podría haber sido el más afectado en los CM, pues las sub-unidades XI (*psaL*) y VII (*psaC*) relacionadas con el funcionamiento correcto del complejo, no se detectaron en los CM de plantas sometidas a estrés salino (Figura 6B, Joaquín-

Ramos y col., 2014). Por otro lado, los cloroplastos incrementaron la síntesis de las subunidades β y γ de la ATP sintetasa, involucradas en la actividad catalítica y en la construcción del complejo, respectivamente, señalando la importancia que tiene la síntesis del ATP, por parte del cloroplasto, durante el estrés salino. Además, la subunidad Rieske del CYT_{b6/f}, encargada mantener el flujo correcto de e^- entre los fotosistemas y permitir la formación del gradiente de H^+ , usado por ATP sintetasa, también incrementó en los dos tipos de cloroplastos de plantas sometidas a estrés salino, confirmando así, la importancia de la síntesis de ATP cloroplástico para la planta en esta situación de estrés.

Proteínas como RuBisCO y PPdK disminuyeron su acumulación en los 2 cloroplastos de las plantas bajo estrés salino. Otra proteína susceptible al estrés salino es la GAPDH que fue detectada únicamente en los CVH pero que desapareció cuando las plantas crecieron en presencia de sal. La proteasa cloroplástica detectada solo en los CVH de plantas control, desapareció en estos y apareció en los CM de las plantas sometidas a estrés salino, indicando que los CM serían los más afectados por la presencia de sal, pues este tipo de proteínas están relacionadas con el recambio de proteínas tilacoidales. Un dato importante fue el comportamiento de las lipoxigenasas, involucradas con la síntesis de jasmonatos, que fueron detectadas únicamente en los CVH de las plantas control; pero cuando las plantas fueren sometidas a estrés salino, una de ellas incrementó su acumulación en los CVH, otra desapareció en ellos y apareció en los CM, probablemente como señal de respuesta al estrés.

El género *Amaranthus cruentus* es considerado como una C_4 y en este estudio se logró demostrar la presencia de PPdK y Rubisco en ambos tipos de cloroplastos, proponiendo a esta planta como una intermediaría C_3 - C_4 y que a pesar de que sus cloroplastos son muy similares la técnica BN 2-DE SDS-PAGE permitió mostrar que la composición del PSII y el perfil proteínico de sus complejos tilacoidales tiene diferencias apreciables pues 29 de la 77 proteínas diferenciales de los cloroplastos control, estaban presentes únicamente en los CVH. Además, se logró detectar las respuestas de los complejos tilacoidales cuando las plantas fueron sometidas a estrés salino.

VI. CONCLUSIONES.

Estudios similares se han realizado en plantas C₄ como maíz, pero dentro del género *Amaranthus spp.* no hay reportes acerca de la composición monomérica de los complejos tilacoidales de sus cloroplastos ni de la respuesta de estos al estrés salino. Varios estudios señalan a *Amaranthus cruentus* como una planta C₄; pero los resultados de inmunodetección y la técnica 2-DE BN/SDS-PAGE apoyada en la espectrometría de masas sugieren que, al menos la variedad Amaranteca, es una planta intermediaria C₃-C₄.

Mientras que la morfología observada en las micrografías mostraba que los cloroplastos de *A. cruentus* son muy similares; la técnica 2-DE BN/SDS-PAGE y la espectrometría de masas demostraron diferencias entre los 2 tipos de cloroplastos de *A. cruentus*, destacando la mayor acumulación en los CM de proteínas involucradas en la actividad del PSII y de un antiportador Na⁺/H⁺ que probablemente está relacionado con la tolerancia de esta planta al estrés abiótico; además, se detectó también una proteasa cloroplástica que debido a su perfil de acumulación se puede considerar un factor importante para la planta en la respuesta al estrés salino.

En el contexto del estrés salino, los resultados de proteómica y espectrometría de masas demostraron la importancia de la síntesis de ATP en los cloroplastos frente al estrés citado y; que las variaciones en las enzimas glicolíticas sugieren cambios bioquímicos en la planta debido a la adaptación al estrés. Otro dato importante fueron las variaciones en las isoformas de las lipoxigenasas que hacen suponer que los jasmonatos están involucrados en la respuesta de la planta a este tipo de estrés abiótico.

VII. PERSPECTIVAS

Caracterizar las actividades de las enzimas de los metabolismos C₃ y C₄ en *Amaranthus cruentus* var. Amaranteca y compararlas con plantas C₃ como el arroz y C₄ como el maíz para determinar el grado evolución o adaptación al metabolismo C₄.

Determinar el perfil proteínico soluble en ambos tipos de cloroplastos de *A. cruentus* var. Amaranteca tanto en plantas control como en condiciones de estrés salino para determinar el grado de similitud de los perfiles proteínicos solubles y analizar la relación con el perfil de proteínas tilacoidales.

Aislar células del mesófilo y de la vaina del haz para determinar la correlación del perfil proteínico con el transcriptómico de las enzimas características del metabolismo C₄ y C₃.

Ampliar los tiempos de exposición y toma de muestra de aplicar el tratamiento con NaCl pues se ha descrito que las condiciones de estrés son un factor importante que propicia la aparición del síndrome C₄ y; probablemente al el perfil proteínico de los cloroplastos sería más parecido al de una planta C₄.

Abatir la acumulación de RuBisCo en los CM para determinar el impacto que esto tendría en la respuesta al estrés salino, pues se piensa que la fotorrespiración es una herramienta de las plantas para hacer frente a situaciones adversas.

VII. REFERENCIAS

- Adam Z. Chloroplast proteases: possible regulators of gene expression? *Biochimie* 2000;82:647-54.
- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003;422:198-207.
- Andaluz S, López-Millán A-F, las Rivas J, Aro E-M, Abadía J, Abadía A. Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency. *Photosynthesis Research* 2006;89:141-55.
- Al-Whaibi MH. Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University - Science* 2011;23:139-50.
- Barba de la Rosa AP, Fomsgaard IS, Laursen B, Mortensen AG, Olvera-Martínez L, Silva-Sánchez C, et al. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science* 2009;49:117-21.
- Behrens C, Blume C, Senkler M, Eubel H, Peterhansel C, Braun HP. The 'protein complex proteome' of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteomics* 2013;91C:73-83.
- Blume C, Behrens C, Eubel H, Braun HP, Peterhansel C. A possible role for the chloroplast pyruvate dehydrogenase complex in plant glycolate and glyoxylate metabolism. *Phytochemistry* 2013;95:168-76.
- Bricker TM, Frankel LK. The structure and function of CP47 and CP43 in Photosystem II. *Photosynthesis Research* 2002;72:131-46.
- Boinski JJ, Wang JL, Xu P, Hotchkiss T, Berry JO. Post-transcriptional control of cell type-specific gene expression in bundle sheath and mesophyll chloroplasts of *Amaranthus hypochondriacus*. *Plant Molecular Biology* 1993;22:397-410.

- Chastain C. Chapter 15 Structure, Function, and Post-translational Regulation of C₄ Pyruvate Orthophosphate Dikinase. In: Raghavendra AS, Sage RF, editors. C₄ Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms: Springer Netherlands 2011. p. 301-15.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 2009;103:551-60.
- Choquet Y, Vallon O. Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* 2000;82:615-34.
- Cosentino C, Fischer-Schliebs E, Bertl A, Thiel G, Homann U. Na⁺/H⁺ antiporters are differentially regulated in response to NaCl stress in leaves and roots of *Mesembryanthemum crystallinum*. *The New Phytologist* 2010;186:669-80.
- Daum B, Nicastro D, Austin J, 2nd, McIntosh JR, Kuhlbrandt W. Arrangement of photosystem II and ATP synthase in chloroplast membranes of spinach and pea. *The Plant Cell* 2010;22:1299-312.
- Darie CC, De Pascalis L, Mutschler B, Haehnel W. Studies of the Ndh complex and photosystem II from mesophyll and bundle sheath chloroplasts of the C₄-type plant *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology* 2006;163:800-8.
- Dekker JP, Boekema EJ. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005;1706:12-39.
- Délano-Frier J, Aviles-Arnaut H, Casarrubias-Castillo K, Casique-Arroyo G, Castrillon-Arbelaez P, Herrera-Estrella L, et al. Transcriptomic analysis of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) using 454 pyrosequencing: comparison with *A. tuberculatus*, expression profiling in stems and in response to biotic and abiotic stress. *BMC Genomics* 2011;12:363.
- Edwards GE, Black CC. Isolation of mesophyll cells and bundle sheath cells from *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. leaves and a scanning microscopy study of the internal leaf cell morphology. *Plant Physiology* 1971;47:149-56.

- Edwards GE, Franceschi VR, Ku MS, Voznesenskaya EV, Pyankov VI, Andreo CS. Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C(4) plants. *Journal of Experimental Botany* 2001;52:577-90.
- Fan W, Zhang Z, Zhang Y. Cloning and molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum*. *Plant Cell Rep* 2009;28:975-84.
- Ford RC, Holzenburg A. Organization of protein complexes and a mechanism for grana formation in photosynthetic membranes as revealed by cryo-electron microscopy. *Crystal Research and Technology* 2013:n/a-n/a.
- Haake V, Zrenner R, Sonnewald U, Stitt M. A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *The Plant Journal: for Cell And Molecular Biology* 1998;14:147-57.
- Hancock JT, Henson D, Nyirenda M, Desikan R, Harrison J, Lewis M, et al. Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe Francaise De Physiologie Vegetale* 2005;43:828-35.
- Hibberd JM, Covshoff S. The regulation of gene expression required for C₄ photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 2010;61:181-207.
- Hong J, Jiang DA, Weng XY, Wang WB, Hu DW. Leaf anatomy, chloroplast ultrastructure, and cellular localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBPCO) and RuBPCO activase in *Amaranthus tricolor* L. *Photosynthetica* 2005;43:519-28.
- Huerta-Ocampo JÁ, Briones-Cerecero EP, Mendoza-Hernández G, De León-Rodríguez A, Barba de la Rosa AP. Proteomic analysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves under drought stress. *International Journal of Plant Sciences* 2009;170:990-8.

- Huerta-Ocampo JA, Barrera-Pacheco A, Mendoza-Hernández CS, Espitia-Rangel E, Mock H-P, Barba de la Rosa AP. Salt Stress-Induced Alterations in the Root Proteome of *Amaranthus cruentus* L. *Journal of Proteome Research* 2014;13:3607-27.
- Jagannathan B, Dekat S, Golbeck JH, Lakshmi KV. The assembly of a multisubunit photosynthetic membrane protein complex: a site-specific spin labeling EPR spectroscopic study of the PsaC subunit in photosystem I. *Biochemistry* 2010;49:2398-408.
- Joaquín-Ramos AJ, Huerta-Ocampo JÁ, Barrera-Pacheco A, De León-Rodríguez A, Baginsky S, Barba de la Rosa AP. Comparative proteomic analysis of amaranth mesophyll and bundle sheath chloroplasts and their adaptation to salt stress. *Journal of Plant Physiology* 2014;171:1423-35.
- Kato Y, Sakamoto W. Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *Journal of Biochemistry*. 2009;146:463-9.
- Kauffman C., Hass P. Grain amaranth: a crop with low water requirements and high nutritional value. In: Lockeretz W. (Ed.), *Environmentally Sound Agriculture*. Praeger Publishers, New York, USA, 1983;299–314.
- Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT, Renaut J. Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics* 2011;74:1301-22.
- Kovács L, Damkjaer J, Kereiche S, Illoaia C, Ruban AV, Boekema EJ, et al. Lack of the light-harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. *The Plant Cell* 2006;18:3106-20.
- Ku MS, Monson RK, Littlejohn RO, Nakamoto H, Fisher DB, Edwards GE. Photosynthetic characteristics of C₃-C₄ intermediate *Flaveria* species I. Leaf anatomy, photosynthetic responses to O₂ and CO₂, and activities of key enzymes in the C₃ And C₄ pathways. *Plant Physiology* 1983;71:944-8.

- Leegood RC. C₄ photosynthesis: principles of CO₂ concentration and prospects for its introduction into C₃ plants. *Journal of Experimental Botany* 2002;53:581-90.
- Li W, Zhang C, Lu Q, Wen X, Lu C. The combined effect of salt stress and heat shock on proteome profiling in *Suaeda salsa*. *Journal of Plant Physiology* 2011;168:1743-52.
- Lu W, Tang X, Huo Y, Xu R, Qi S, Huang J, et al. Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. *Gene* 2012;503:65-74.
- Majeran W, Cai Y, Sun Q, van Wijk KJ. Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *The Plant Cell* 2005;17:3111-40.
- Majeran W, Zybailov B, Ytterberg AJ, Dunsmore J, Sun Q, van Wijk KJ. Consequences of C₄ differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells. *Molecular & Cellular Proteomics* 2008;7:1609-38.
- Majeran W, van Wijk KJ. Cell-type-specific differentiation of chloroplasts in C₄ plants. *Trends in Plant Science* 2009;14:100-9.
- Matsuoka M. The gene for pyruvate, orthophosphate dikinase in C₄ plants: structure, regulation and evolution. *Plant & Cell Physiology* 1995;36:937-43.
- Mendoza-Hernández, C. Análisis proteómico de la hoja de Amarantho bajo condiciones de estrés salino. Tesis, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica 2011.
- Moore Bd, Monson RK, Ku MSB, Edwards GE. Activities of principal photosynthetic and photorespiratory enzymes in leaf mesophyll and bundle sheath protoplasts from the C₃-C₄ intermediate *Flaveria ramosissima*. *Plant and Cell Physiology* 1988;29:999-1006.

- Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K, Endo T, Tasaka M, et al. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 2004;429:579-82.
- Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 2008;59:651-81.
- Nelson T, Langdale JA. Patterns of leaf development in C₄ plants. *The Plant Cell* 1989;1:3-13.
- Nelson N, Yocum CF. Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology* 2006;57:521-65.
- Park J, Okita TW, Edwards GE. Expression profiling and proteomic analysis of isolated photosynthetic cells of the non-Kranz C₄ species *Bienertia sinuspersici*. *Functional Plant Biology* 2010;37:1-13.
- Pavlik V. The revival of Amaranth as a third-millennium food. *Neuro Endocrinology Letters* 2012;33 Suppl 3:3-7.
- Pons R, Cornejo MJ, Sanz A. Differential salinity-induced variations in the activity of H⁺-pumps and Na⁺/H⁺ antiporters that are involved in cytoplasm ion homeostasis as a function of genotype and tolerance level in rice cell lines. *Plant Physiology And Biochemistry: PPB / Societe Francaise de Physiologie Vegetale* 2011;49:1399-409.
- Qaisar U, Irfan M, Meqbool A, Zahoor M, Khan MY, Rashid B, et al. Identification, sequencing and characterization of a stress induced homologue of fructose biphosphate aldolase from cotton. *Canadian Journal of Plant Science* 2010;90:41-8.
- Raghavendra AS, Das VSR. Photochemical characteristics of mesophyll and bundle sheath chloroplasts from C₄ plants. *Physiologia Plantarum* 1978;43:107-13.
- Reisinger V, Eichacker LA. Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Proteomics* 2006;6 Suppl 2:6-15.

- Reisinger V, Eichacker LA. How to analyze protein complexes by 2D blue native SDS-PAGE. *Proteomics* 2007;7 Suppl 1:6-16.
- Rödiger A, Baudisch B, Klosgen RB. Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *Journal of Plant Physiology* 2010;167:620-4.
- Sage RF. Environmental and evolutionary preconditions for the origin and diversification of the C₄ photosynthetic syndrome. *Plant Biology* 2001;3:202-13.
- Sage RF. The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytologist* 2004;161:341-70.
- Sage R. Atmospheric CO₂, Environmental stress, and the evolution of C₄ photosynthesis. In: Baldwin IT, Caldwell MM, Heldmaier G, Jackson R, Lange OL, Mooney HA, et al., editors. *A history of atmospheric CO₂ and its effects on plants, animals, and ecosystems*: Springer New York; 2005. p. 185-213.
- Sage RF, Sage TL, Kocacinar F. Photorespiration and the evolution of C₄ photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 2012;63:19-47.
- Saibo NJ, Lourenco T, Oliveira MM. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany* 2009;103:609-23.
- Silva-Sánchez C, de la Rosa AP, Leon-Galvan MF, de Lumen BO, de Leon-Rodriguez A, de Mejia EG. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56:1233-40.
- Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 2006;1:16-22.
- Schroda M, Vallon O, Wollman F-A, Beck CF. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *The Plant Cell Online* 1999;11:1165-78.

- Seltmann MA, Stingl NE, Lautenschlaeger JK, Krischke M, Mueller MJ, Berger S. Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology* 2010;152:1940-50.
- Sobhanian H, Motamed N, Jazii FR, Nakamura T, Komatsu S. Salt stress induced differential proteome and metabolome response in the shoots of *Aeluropus lagopoides* (Poaceae), a halophyte C₄ plant. *Journal of Proteome Research* 2010;9:2882-97.
- Sobhanian H, Aghaei K, Komatsu S. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: toward the creation of salt-tolerant crops? *Journal of Proteomics* 2011;74:1323-37.
- Song A, Lu J, Jiang J, Chen S, Guan Z, Fang W and Chen, F. Isolation and characterization of *Chrysanthemum crassum* SOS1, encoding a putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant Biology* 2012;14:706–713.
- Stepien P, Johnson GN. Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte Arabidopsis and the halophyte Thellungiella: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant Physiology* 2009;149:1154-65.
- Takahashi Y, Goldschmidt-Clermont M, Soen SY, Franzen LG, Rochaix JD. Directed chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: insertional inactivation of the *psaC* gene encoding the iron sulfur protein destabilizes photosystem I. *The EMBO Journal* 1991;10:2033-40.
- Taylor NL, Tan YF, Jacoby RP, Millar AH. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *Journal of Proteomics* 2009;72:367-78.
- Ueno O. Ultrastructural localization of photosynthetic and photorespiratory enzymes in epidermal, mesophyll, bundle sheath, and vascular bundle cells of the C₄ dicot *Amaranthus viridis*. *Journal of Experimental Botany* 2001;52:1003-13.

- Velarde-Salcedo AJ, Barrera-Pacheco A, Lara-Gonzalez S, Montero-Moran GM, Diaz-Gois A, Gonzalez de Mejia E, et al. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus L.*) proteins. *Food Chemistry* 2013;136:758-64.
- Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Freitag H, Edwards GE. Kranz anatomy is not essential for terrestrial C₄ plant photosynthesis. *Nature* 2001;414:543-6.
- Walker RP, Chen ZH, Tecsli LI, Famiani F, Lea PJ, Leegood RC. Phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a role in interactions of carbon and nitrogen metabolism during grape seed development. *Planta* 1999;210:9-18.
- Westhoff P, Gowik U. Evolution of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. Genes and proteins: a case study with the genus *Flaveria*. *Annals of Botany* 2004;93:13-23.
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 2000;355:1517-29.
- Yamori W, Takahashi S, Makino A, Price GD, Badger MR, von Caemmerer S. The roles of ATP synthase and the cytochrome b₆/f complexes in limiting chloroplast electron transport and determining photosynthetic capacity. *Plant Physiology* 2011;155:956-62.
- Yan Y, Borrego E, Kolomiets MV. Jasmonate biosynthesis, perception and function in plant development and stress responses, lipid metabolism, Prof. Valenzuela BR (Ed.), ISBN: 978-953-51-0944-0, InTech, DOI: 10.5772/52675. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lipid-metabolism/jasmonate-biosynthesis-perception-and-function-in-plant-development-and-stress-responses>. 2013

Zhang X-H, Rao X-L, Shi H-T, Li R-J, Lu Y-T. Overexpression of a cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene OsGAPC3 confers salt tolerance in rice. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2011;107:1-11.

Zörb C, Geilfus C-M, Mühling KH, Ludwig-Müller J. The influence of salt stress on ABA and auxin concentrations in two maize cultivars differing in salt resistance. *Journal of Plant Physiology* 2013;170:220-24.

VIII. ANEXOS

Anexo I.

Tabla Suplementaria S1. Identificación de las bandas de proteínas cloroplásticas de *Amaranthus cruentus* var. *Amaranteca* en SDS-PAGE analizadas por LC-MS/MS.

Banda ^A	Proteína ^B	Organismo ^C	Núm. De Acc. ^D	Exper. Mr. ^E	Teor. Mr/pl. ^F	Sc. ^G	Pm. ^H	Secuencia de Pep. ^I	Acc. Núm. Ah. ^J	ML / E-val. ^K
1	Pyruvate orthophosphate dikinase	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 336020527	116.8	104.5/5.39	179	4	K.NVYLETTGEAFSSPLK.Q K.IAVDLVNEGIVDTNTAVK.M K.DLASEVGMTEDEVYSR.I R.LGISYPELTEMQAR.A	isoTiG00544	3 / 0.0
	Photosystem I p700 apoprotein A1,	<i>Mollugo verticillata</i>	gi 377657613	116.8	83.1/6.67	53	1	K.EIPLPHEFILNR.D	isoTiG11681	3/4e-139
2	Pyruvate orthophosphate dikinase	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi 336020527	107.8	104.5/5.39	630	17	R.VIENDMGAALGDSSKPLLLSVR.S + Oxidation (M) R.FAYDSFR.R K.LDTELTSADLK.E K.ELAEQYK.N R.TPEDLGTMER.C + Oxidation (M) R.LWMLQCR.S + Oxidation (M) K.VMANADTPEDALTAR.N + Oxidation (M) K.MIMAVTPEQR.K + Oxidation (M) R.KAALDQLLPYQR.S K.AALDQLLPYQR.S R.AMDGLPVTIR.L + Oxidation (M) K.DLASEVGMTEDEVYSR.I + Oxidation (M) K.LSEVNPMLGFR.G + Oxidation (M) R.LGISYPELTEMQAR.A + Oxidation (M) K.VFSETGTTLTFK.V K.VGTMIEIPR.A + Oxidation (M) R.AALIADIEIAK.E	isoTiG00549	3/0.0
3	Heat shock 70 protein	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 2654208	89.6	76.1/5.19	76	3	R.DEGIDLLKDK.Q K.LSFSDLDEVILVGGSTR.I K.KQDITITGASTLPSDEVEK.M	isoTiG08553	4 / 0.0
4	ATP synthase CF1 alpha subunit protein	<i>Sesuvium portulacastrum</i>	gi 341868764	71.0	55.5/5.21	124	3	R.ERIEQYNR.E R.VINALAKPIDGR.G K.ASSVAQVVTTFQER.G	ConTiG30675	3/0.0
	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 11497525	71.0	83.0/6.74	120	2	K.DLLEAHTPPGGR.L R.DYNPEQNKDNVLAR.M	ConTiG14191	3/0.0

5	Elongation factor Tu, chloroplastic-like isoform 1	<i>Vitis vinifera</i>	gi 225452282	46.1	52.9/6.40	238	2	K.KYDEIDAAPEER.A K.ILDEAMAGDNVIGILLR.G	isoTiG00961	2/0.0
	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 1346698	46.1	45.5/5.83	207	4	R.ADLNVPLDDNQNTDDTR.I K.AQGLSVGSSLVENDK.L K.KGATTIIGGGDSVAAVEK.V K.GATTIIGGGDSVAAVEK.V	isoTiG00167	5/0.0
	Photosystem II protein CP43	<i>Mollugo verticillata</i>	gi 372000485	46.1	53.4/7.89	140	2	R.LGANVGSQAQPTGLGK.Y R.SPTGEVIFGGETMR.F + Oxidation (M)	isoTiG02218	3/0.0
	Photosystem II 47 kDa protein	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 11497552	46.1	56.1/6.16	119	1	R.VSAGLAENQSLSEAWSK.I	isoTiG08460	1/0.0
	Geranylgeranyl hydrogenase	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	gi 3202030	46.1	51.4/8.95	37	1	K.SISAGDYEYIAIAFQER.I	isoTiG14379	6/0.0

^A Número de banda indicado en la Figura 4A (Joaquín-Ramos y col., 2014).

^B Nombre de la proteína con homología a la secuencia del transcrito de *Amaranthus hypochondriacus*

^C Nombre del organismo que indicó el ortólogo más parecido obtenido por alineamiento de la secuencias del transcriptoma de *A. hypochondriacus* contra la base de datos nrNCBI usando el algoritmo BLASTX

^D Número de acceso del ortólogo más probable obtenido de acuerdo a la base de datos nrNCBI.

^E Masa experimental (kDa) de las bandas analizadas.

^F Masa teórica (kDa) / punto isoeléctrico de las proteínas identificadas.

^G Puntaje de Mascot obtenido después del análisis de los datos de masas contra la base de datos del transcriptoma de *A. hypochondriacus*. Puntajes > 31 indican identidad u homología extensiva (p<0.01).

^H Número de péptidos que se alinearon.

^I Secuencias peptídicas identificadas con MASCOT después del análisis de los datos de masas contra la base *A. hypochondriacus*.

^K Número de acceso de la base de datos del transcriptoma de *A. hypochondriacus*.

^J Marco de lectura (ML) de acuerdo a la base de datos de *A. hypochondriacus* y E-value obtenido del alineamiento de las secuencias del transcriptoma de *A. hypochondriacus* contra la base de datos nrNCBI usando BLASTX.

Anexo II.

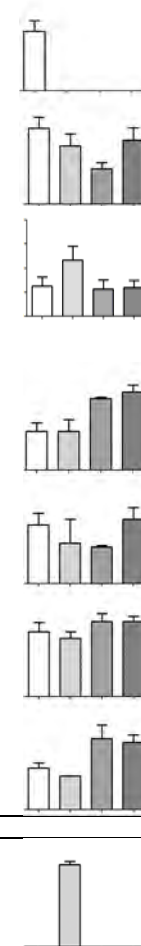
Tabla suplementaria SII. Homología y acumulación relativa de las proteínas de los cloroplastos de la vaina del haz (V) y del mesófilo (M) en plantas control y sometidas a estrés salino.

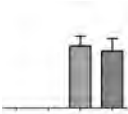
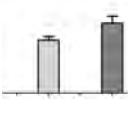
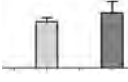
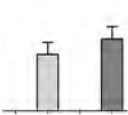
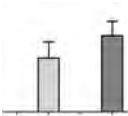

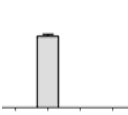

Mancha ^A	Nombre de la proteína (gene) ^B	Organismo ^C	Núm. de Acc. ^D	Teor. Mr/pI ^E	Scr ^F	PM/SC (%) ^G	Secuencia de péptidos ^H	Base de datos ^I	Núm. Ah. ^J	Acc.E-value ^K	ML ^L	Acumulación relativa ^M			
												V	M	Vs	Ms
Región I, supercomplejos PSI-LHCI, PSII-LHCII															
1	CYTb559 (<i>psbE</i>)	<i>Beta vulgaris</i>	gij7514666	13.4/ 4.78	101	3/26	R.SFADIITSIR.Y R.QGIPLITGR.F R.FDSLEQLDEFSR.S	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---				
2	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---				
3	PSI subunit (<i>psaL</i>)	<i>Spinacia Xloleracea</i>	gij3914473	22.9/9.70	56	3/-	R.TAVNPLLR.G R.TAVNPLLR.G K.VADQLQTADGWAK.F	<i>Amaranth Trans</i>	isoTIG03382	2e-117	2				
4	chl binding protein (<i>Lhca</i>)	<i>a/b Cicer arietinum</i>	502100074	29.5/ 6.32	117	5/27	K.QLSYLDGSLPGDYGFDPLGLSDPEGTGGFIEP R.W R.LQDWYNP GSMGK.Q R.LQDWYNP GSMGK.Q + Oxidation (M) K.QYFLGLEK.G K.GLGGSGEPAYPGPPFFNPLGFGK.D	<i>iridiplantae</i>	---	---	---				
5	putative chl a/b binding protein	<i>Wolffia australiana</i>	339716054	29.9/5.98	160	3/12	R.IFLPDGLLDR.S K.TGALLLDGNTLNLYFGK.N R.IINGLDLEDK.L	<i>iridiplantae</i>	---	---	---				
6	chl binding protein CP24 precursor (<i>Lhcb6</i>)	<i>a/b Vigna radiata</i>	gij8954298	27.3/6.15	88	2/10	K.TAENFANATGEQGYPGGK.F K.TPLGALGL.-	<i>iridiplantae</i>	---	---	---				
(7)	PS II (<i>psbd</i>)	<i>D2Nicotiana tabacum</i>	gij11465949	39.7/5.33	192	5/18	K.DENDLFDIMDDWLR.R Oxidation (M) R.AFNPTQAEETYSMTANR.F R.AFNPTQAEETYSMTANR.F Oxidation (M) R.AYDFVSQEIR.A R.AAEDPEFETFYTK.N K.NILLNEGIR.A	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---				

(7)	PS II D1	<i>maranthus ybridus</i>	gij131237	39.0/5.12	162	5/-	R.ESESLWGR.F R.EWELSF.R.L R.ETTENESANEGYR.F R.LIFQYASFNNSR.S R.VINTWADIINR.A	<i>Amaranth trans</i> ConTiG0936 0	0.0	5
8	Mo match	---	---	---	---	---	---	---	---	---
(53)	PS I LHC	<i>Nicotiana glabra</i>	gij493723	26.5/5.83	110	2/5	K.KYPGGAFDPLGYSK.D K.YPGGAFDPLGYSK.D	<i>Viridiplantae</i>	---	---
(54)	PSI-D2 precursor	<i>Lactuca sativa</i>	gij78675163	40.2/5.60	89	1/-	R.VFPDGEVQYLHPK.D	<i>Amaranth trans</i> isoTiG02218	0.0	2
(54)	OE1 (psbO)	<i>Salicornia veneta</i>	gij148535013	18.3/4.61	37	1/-	R.GDEEELQKENNK.N	<i>Amaranth trans</i> isoTiG08322	4e-62	2
55	PS II (psbC)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij33328112	45.9/6.37	135	2/7	R.LGANVGSQAQPTGLGK.Y R.SPTGEVIFGGETMR.F + Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---
70	chl binding protein	<i>maranthus ypochochriacus</i>	gij398599	28.7/5.68	64	2/14	K.SAPQSIWYGPDRPK.Y K.IYPGGAFDPLGLADDPDAFAELK.V	<i>iridiplantae</i>	---	---
71	PSII (psbA)	<i>maranthus ybridus</i>	gij131237	38.9/5.12	94	1/-	R.ETTENESANEGYR.F	<i>Amaranth trans</i> ConTiG0936 0	0.0	5
72	PPdk (ppdk)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	336020527	104.7/5.39	97	1/1	K.VANADTPEDALTAR.N + Oxidation (M)	<i>iridiplantae</i>	---	---

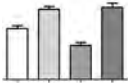
Región II, complejos PSI, LHCI, PSII, LHCI

10	LHCII a/b binding protein 36	<i>Nicotiana glabra</i>	gij115802	28.7/5.33	66	2/7	K.FGEAVWFK.A R.VGGGPLGEGLDK.I	<i>iridiplantae</i>	---	---
----	------------------------------	-------------------------	-----------	-----------	----	-----	----------------------------------	---------------------	-----	-----



11	PS D1 (psbA)	II Phaseolus vulgaris	gij112030956	39.7/5.04	38	3/--	R.ETTENESANEGYR.F R.LIFQYASFNNRS.S R.VINTWADIINR.A	maranth Trans	ConTiG09360	0.0	5	
12	PSII (psbB)	CP47 Barbarea verna	gij139388120	56.2/6.4	166	15/25	M.GLPWYR.V R.VHTVVLNDPGR.L R.QGMFVIPFMTR.L + Oxidation (M) R.QGMFVIPFMTR.L + 2 Oxidation (M) R.YQWDQGYFQQEIYR.R R.VSAGLAENQSLSEAWSK.I K.LAFYDYIGNNPAK.G K.GGLFR.A R.AGSMNDNGDGIAVGWLGHPVFR.N R.AGSMNDNGDGIAVGWLGHPVFR.N + Oxidation (M) R.ELFVR.R R.ADVPFRR.R R.RAQLGEIFELDR.A R.AQLGEIFELDR.A K.SDGVFR.S	Viridiplantae	---	---	---	
(13)	33 OEC (psbO)	kDa Salicornia europaea	gij197691939	35.2/5.57	149	5/19	K.NAPPDFQDTK.L K.DGIDYAAVTVQLPgger.V R.VPFLFTIK.Q R.GGSTGYDNAVALPAGGR.G K.IEGIWYAQLEQ.-	Viridiplantae	---	---	---	
(13)	PS II D2	Chlamydomonas reinhardtii	gij225115	40.9/5.44	11	3/11	R.AFNPTQAEETYSMTANR.F + Oxidation (M) R.AYDFVSQEIR.A R.AAEDPEFETFYTK.N	Viridiplantae	---	---	---	
14	PS II (psbB)	CP47 Spinacia oleracea	gij11497552	56.1/6.16	79	6/--	R.VSAGLAENQSLSEAWSK.I R.VSAGLAENQSLSEAWSK.I R.ELFVR.R R.ADVPFRR.R R.AQLGEIFELDR.A K.SDGVFR.S	Amaranth Trans	isoTiG08460	0.0	1	
(15)	PS II (psbC)	CP43 Carica papaya	gij171259360	50.5/6.23	257	6/16	R.DQETTGFawwagNAR.L R.LGANVGSAQGPTGLGK.Y R.SPTGEVIFGGETMR.F + Oxidation (M) R.FWDLR.A R.AAAAGFEK.G K.GIDRDLEPVLFMTPLN.- + Oxidation (M) R.DLEPVLFMTPLN.- + Oxidation (M)	Viridiplantae	---	---	---	
(15)	PS II (psbB)	CP47 Carica papaya	gij157689661	53.6/6.08	102	4/8	R.VSAGLAENQSLSEAWSK.I K.LAFYDYIGNNPAK.G K.GGLFR.A R.ADVPFRR.R	Viridiplante	---	---	---	
(26)	33 OEC (psbO) protein,	kDa Salicornia veneta	gij148535013	18.3/4.61	96	1/-	R.GGSTGYDNAVALPAGGR.G	Amaranth Trans	isoTiG08322	4e-62	2	

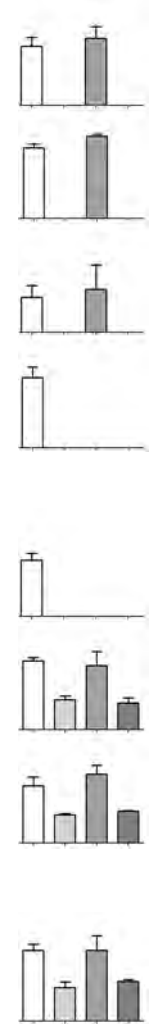
(26)	PSII (psbD)	D2Lactuca sativa	gij78675163	40.2/5.6	51	1/-	R.AFNPTQAEETYSMVTANR.F	Amaranth Trans	isoTiG02218	0.0	2	
56	PS protein (psbE)	Spinacia oleracea	gij11497544	9.4/4.83	55	2/25	R.QGIPLITGR.F R.FDSLEQLDEFGR.S	Viridiplantae	---	---	---	
57	OEC protein (psbO)	Litchi chinensis	gij326467059	35.4/5.86	169	3/18	K.FEEKDGIDYAAVTVQLPGGER.V R.GGSTGYDNAVALPAGGR.G K.TKPETGEVIGVFESLQPSDTDLGAK.V	iridiplantae	---	---	---	
73	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
74	LHCII a/b binding protein (Lhcb1.2)	Spinacia oleracea	gij133917261	28.3/5.31	82	1/-	K.QVSSGSPWYGPDR.V	Amaranth Trans	isoTiG01248	5e-34	1	
75	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
76	chl binding protein (Lhca1)	Solanum lycopersicum	gij170388	26.7/5.82	68	1/5	K.YPGGAFDPLGYSK.D	Viridiplantae	---	---	---	
77	chl binding protein (Lhca1)	Solanum lycopersicum	gij170388	26.7/5.82	82	1/5	K.YPGGAFDPLGYSK.D	Viridiplantae	---	---	---	
(78)	PS II (psbD)	Andreaea rupestris	gij314956519	32.1/5.45	100	1/4	R.AAEDPEMETFYTK.N + Oxidation (M)	Viridiplantae	---	---	---	
(78)	OEC enhan (psbO)	Spinacia oleracea	gij131386	35.2/5.58	52	1/-	R.GDEEELQKENIK.N	Amaranth Trans	ConTiG22179	0.0	2	
79	PS II (psbA)	Phaseolus vulgaris	gij112030956	39.7/5.04	89	1/-	R.ETTENESANEGYR.F	Amaranth Trans	ConTiG09360	0.0	5	

(80)	PS II CP47 (<i>psbB</i>)	<i>Nicotiana tabacum</i>	gij11465984	56.1/ 6.28	225	3/8	R.YQWDQGYFQQEYR.R R.VSAGLAENQSLSEAWSK.I K.LAFYDYIGNNPAK.G	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
(80)	chl binding protein CP43 (<i>psbC</i>)	<i>Populus deltoides</i>	gij4581045	52/ 6.68	143	3/13	R.SPTGEVIFGGETMR.F + Oxidation (M) R.SAEYMTTHAPLGSLNSVGGVATEINAVNYVSPR. S + Oxidation (M) K.GIDRDLEPVLYMTPLN.-	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
81	PS II CP43 chl approt	<i>Nandina domestica</i>	gij114329964	50.5/ 6.23	262	3/13	R.DQETTGFSAWWAGNAR.L R.SAEYMTTHAPLGSLNSVGGVATEINAVNYVSPR. S + Oxidation (M) K.GIDRDLEPVLFMTPLN.- + Oxidation (M) R.YQWDQGYFQQEYR.R	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
82	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
85	Type LHCII chl binding protein (<i>Lhcb1</i>)	<i>Vigna radiata</i>	gij8954293	27.9/ 5.29	77	1/4	K.QVSSGSPWYGPDR.V	<i>Viridiplantae</i>	---	---	--	
Región III, dímeros PSI/PSII												
18	PSI subunit VII (<i>psaC</i>)	<i>Pinus thunbergii</i>	gij7524738	9.5/ 6.69	48	2/16	K.QIASAPR.T R.SMGLAY.- + Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
19	cytochr b559 alpha subunit (<i>psbE</i>)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij33327884	8.2/ 4.75	124	3/38	-.DIITSIR.X R.QGIPLITGR.F R.FDSLEQLDEFSS.S	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
24	OEC protein (<i>psbO</i>)	<i>Oryza sativa</i>	gij739292	26.6/ 5.13	118	2/10	R.RLTFDEIQSK.T R.GGSTGYDNAVALPAGGR.G	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
25	PS II (<i>psbD</i>)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij11497520	39.7/ 5.46	74	2/8	R.AFNPTQAEETYSMTANR.F + Oxidation (M) R.AAEDPEFETFYTK.N	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	

32	Type I (26 kD) CP29 (cab29)	<i>Solanum lycopersicum</i>	gij19184	30.5/ 5.73	63	2/11	R.WAMLGAGFIPEAFNK.F K.TGALLLDGNTLNYFGK.N	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
58	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
59	Predicted: LHCI chl a/b binding protein 3 (L)	<i>Cicer arietinum</i>	gij502100074	29.4/ 6.32	116	2/14	R.RLQDWYNP GSMGK.Q + Oxidation (M) K.GLGGSGEPAYPGGPFFNPLGFGKDEK.	<i>Viridiplantae</i>	---	--	--	
60	ATP subunit (atpB)	β - <i>Anthoceros formosae</i>	gij1396041	52.9/ 4.96	64	2/5	R.SAPAFTELDTK.L K.VALVYQGMNEPPGAR.M + Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
62	LHC II chl a/b binding protein 3 (cab3)	<i>Glycine max</i>	gij115800	27.9/ 5.46	79	1/4	K.QVSSGSPWYGPDR.V	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
83	PS reaction center subunit III (psaF)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij131187	25.4/ 9.40	78	1/-	K.KYDPDSAPALAIK.A	<i>Amaranth</i>	TransisoTiG00292	2e-102	4	
84	photosystem reaction center subunit IV A (psaD)	<i>Cicer arietinum</i>	gij502114726	15.5/ 9.82	123	2/18	K.TRYPVVVR.F K.VNYANVSTNNYALDEIEEVV.-	<i>iridiplantae</i>	---	7e-43	---	
(86)	PsbB CP47 apoprot (psbB)	<i>Micranthes chliintegrifolia</i>	gij146261477	50.8/ 6.44	332	5/10	R.QGMFVIPFMTR.L + 2 Oxidation (M) R.TGKPSLDLPK.I R.YKWDQGYFQQEIYR.R R.YEWDQGYFQQEIYR.R R.YCWDQGYFQQEIYR.R R.RAQLGEIFELDR.A	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
(86)	CP 43 kDa (psbC)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij11497521	52.0/ 6.68	104	2/6	R.LGANVGSAQGP TGLGK.Y R.SPTGEVIFGGETMR.F + Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	

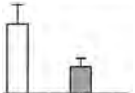




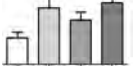

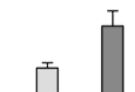
87	P700 chl a apoprot A1 (psaA)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij11497525	82.9/6.74	110	2/--	K.DLLEAHTPPGGR.L R.DYNPEQNKDNVLAR.M	<i>Amaranth Trans</i>	ConTiG1419 1	0.0	3	
Región IV, monómeros PSI/PSII												
31	RuBisCO SS (rbcS)	<i>Musa acuminata</i> AAA Group	gij76574238	20.6/9.21	72	1/8	R.QVQCISFIAFKPPGY.-	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
35	P700 chl a apoprotein A2 (psaB)	<i>Pinus thunbergii</i>	gij7524711	82.5/6.74	108	2/3	K.FSQGLAQDPTTR.R R.DYNPEQNKDNVLAR.M	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
63	RuBisCO LS (rbcL)	<i>Amaranthus tricolor</i>	gij13676410	50.9/6.51	246	4/12	R.GMEVIDTGAPLSVPVGGTTLGR.I + (M) R.IFNVLGEPVDNLGPVDTSTTSPIHR.S K.ESGVINEQNAESK.V R.IVGEEHYETAQR.V R.IVGEEHYETAQR.V R.LEDLRIPVAYVK.T K.TFQGPPHGIQVER.D R.GGLDFTKDDENVNSQPFMR.W + Oxidation (M) R.LSGGDHIHSGTVVGK.L	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	Oxidation
	ATP synthase subunit (atpB)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gij7706848	49.1/4.92	372	4/16		<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
Región V												
28	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
29	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
30	cytochr b559 (psbE)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij224159	13.8/6.04	88	1/9	R.FDSLEQLDEF SR.S	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
(33)	PsbA	<i>Amaranthus hybridus</i>	gij336306	34.7/5.05	87	1/4	R.ETTENESANEGYR.F	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	

(33)	PS II D2	<i>Andreaea rupestris</i>	gij314956519	32.1/ 5.45	83	1/4	R.AAEDPE <u>M</u> ETFYTK.N + Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---
34	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
36	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
39	PS II D2	<i>Spinacia oleracea</i>	gij11497520	39.7/ 5.46	97	1/3	R.AAEDPEFETFYTK.N	<i>Viridiplantae</i>	--	---	---
41	Chloroplast	<i>Spinacia oleracea</i>	gij20455487	42.9/ 7.61	246	4/-	R.KDSPLDVVVINDTGGVK.Q K.DSPLDVVVINDTGGVK.Q K.YDSILGTFEADV.K.A K.VIAWYDNEWGYSQR.V	<i>Amaranth Trans</i>	isoTiG13686	0.0	6
44	Chloroplast	<i>Hordeum vulgare subsp. Vulgare</i>	gij11594	56.2/ 6.06	131	2/4	R.VHTVVLNDPGR.L R.YQWDQGYFQQEYR.R	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---
61	cytochr b6/f subunit IV	<i>Spinacia oleracea</i>	gij11497557	17.5/ 6.56	55	2/10	K.KPDLNDPVLR.A K.FQNPFR.R	<i>iridiplantae</i>	---	---	---
(64)	PS II CP47	<i>Nicotiana tabacum</i>	gij11465984	56.2/ 6.28	136	1/3	R.VSAGLAENQSLSEAWSK.I	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---
(64)	PS II CP43	<i>Spinacia oleracea</i>	gij11497521	52.0/ 6.68	59	1/2	R.SPTGEVIFGGET <u>M</u> R.F + Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---
(65)	PS II CP43	<i>Nandina domestica</i>	gij114329964	50.1/ 6.23	243	3/9	R.DQETTGF AW WAGNAR.L R.SPTGEVIFGGET <u>M</u> R.F + Oxidation (M) K.GIDRDLEPVLF <u>M</u> TPLN.- + Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---
(65)	PS II CP47	<i>Nicotiana tabacum</i>	gij11465984	56.2/ 6.28	107	1/3	R.VSAGLAENQSLSEAWSK.I	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---

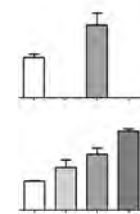


89	Rieske FeS-precursor (<i>petC</i>)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij21311	26.6/ 6.94	56	2/13	K.FICPCHGSQYNNQGR.V R.GPAPLSLALAHCDVDDGK.V	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
90	Cytochrome b6 (<i>petB</i>)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij11497556	24.3/ 8.89	77	1/6	R.LEIQAIADDITSK.Y	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
91	LHCI a/b binding protein 3 (<i>cab3</i>)	<i>Glycine max</i>	gij115800	27.9/ 5.46	86	1/4	K.QVSSGSPWYGPDR.V	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
92	apocytochrome (<i>petA</i>)	<i>Spinacia foliaracea</i>	gij552888	35.4/ 8.85	42	4/-	K.IGNLSFQSYRPNK.Q K.QNILVIGPVPGKK.Y K.KYSEITFPILSPDPATK.K K.YSEITFPILSPDPATKK.D	<i>Amaranth Trans</i>	isoTiG11438	7e-66	3	
94	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
96	PPdk	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gij336020527	10.5/ 5.39	217	4/6	K.DM̄QDIEFTVQENR.L + Oxidation (M) K.V̄MANADTPEDALTAR.N + Oxidation (M) R.KAALDQLLPYQR.S K.EAEFFSFGTNDLTQ̄M̄TFGYSR.D + Oxidation (M)	<i>Viridiplante</i>	---	---	---	
Región VI												
37	Putative OEC1 (<i>psbO</i>)	<i>Pinus strobus</i>	gij109892868	13.6/ 4.46	76	1/100	-TNAENEFVTIKK.-	<i>Viridiplantae</i>	---	1e-04	---	
38	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
88	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
95	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

Región VII													
42	Na ⁺ /H ⁺ antiporter (<i>nhaD</i>)	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	gij150247011	61.5/6.03	130	1/-	K.GLETSSVMASEQMAPR.G	2 Oxidation (M)	<i>Amaranth Trans</i>	isoTiG03996	0.0	3	
(43)	Type III chl a/b binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gij430947	29.1/8.61	48	1/4	R.LQDWYNPGSMGK.Q	+ Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
(43)	peroxisomal (S)-2-hydroxyacid oxidase (<i>gly1</i>)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gij15231850	40.4/9.16	47	1/3	K.ISMPIMVAPTAMQK.M	+ 3 Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
48	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>gapdh</i>)	<i>Marchantia polymorpha</i>	gij79677452	48.3/5	129	2/5	K.KGLTAEDVNNAFR.E K.VVAWYDNEWGYSQR.V		<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
66	PPdK (ppdk)	<i>Amaranthus hypocondriacus</i>	gij336020527	104.7/5.39	153	2/3	R.KMIMAVTPEQR.K K.VLPEIMVPLVGTPELQSHQMGVIR.D	+ 2 Oxidation (M) + Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i> 2	---	---	---	
97	probable fructose-bisphosphate aldolase 2 (<i>fbp2</i>)	<i>Vitis vinifera</i>	gij359476642	43.0/7.55	225	3/13	R.GILAMDESNATCGK.R R.YAAISQDNLVPIVEPEILLDGEHGIDR.T K.TWGGRPENVK.E R.LGANVGSAAQPTGLGK.Y R.SPTGEVIFGGETMR.F	+ Oxidation (M) + Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
(98)	ATP synthase beta subunit	<i>Muntingia calabura</i>	gij4063552	49.2/5.26	104	2/6	K.ESGVINEKNLAESK.V K.VALVYGQMNPEPPGAR.M	+ Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
(98)	PS II CP43 chl apoprotein	<i>Nandina domestica</i>	gij114329964	50.5/6.23	75	2/10	R.SAEYMTTHAPLGLSLNSVGGVATEINAVNYVSPR. S + Oxidation (M) K.GIDRDLEPVLFTPLN.-	+ Oxidation (M) + Oxidation (M)	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	
Región VIII													

45	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
46	Chloroplast ic protease (cacP)	<i>Capsicum annuum</i>	gij3808101	74.1/ 5.81	122	2/5	K.FQMEPNTGVTFDDVAGVDEAK.Q + (M) R.IVAGMEGTVMTDGK.S + 2 Oxidation (M)	Oxidation	<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	---	---	
47	Lipoxygenase (lox)	<i>Camellia sinensis</i>	gij308943877	101.6/ 6.39	146	2/-	R.LSSNDDTTNVEAK.F K.MPTEDPTEEEWK.H		<i>Amaranth Trans</i>	isoTiG01416	0.0	3	---	---	
(49)	Lipoxygenase (lox)	<i>Camellia sinensis</i>	gij308943877	101.6/ 6.39	146	2/-	R.LSSNDDTTNVEAK.F K.MPTEDPTEEEWK.H		<i>Amaranth Trans</i>	isoTiG01416	0.0	3	---	---	
(49)	Glucose-6-phosphate isomerase (gpi)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij3413511	67.6/ 5.50	82	2/-	K.EMLAGAALMDEETR.T K.EPIEPLTIEEADR.C		<i>Amaranth Trans</i>	isoTiG01415	0.0	5	---	---	
50	No match	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
51	P700 apoprot A2 (psaB)	<i>Vigna radiata</i>	gij289066819	82.5/ 6.80	109	2/3	K.DLLEAHTPPGGR.L R.DYNPEQNQDNVLAR.M		<i>iridiplantae</i>	---	---	---	---	---	
67	ATP synthase gamma chain (atpC)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij114643	40.0/ 5.95	230	2/-	K.SDPVIHTLLPLSPK.G R.MTAMSNATDNAQELK.K	2 Oxidation (M)	<i>Amaranth Trans</i>	isoTiG03656	0.0	4	---	---	
68	ATP synthase gamma chain (atpC)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij114643	40.0/ 5.95	36	1/-	R.RPAIPVDR.Y		<i>Amaranth Trans</i>	isoTiG03656	0.0	4	---	---	
69	Type I (26 kD) CP29 polypeptide (cab9)	<i>Solanum lycopersicum</i>	gij19184	30.6/5.73	112	1/5	K.TGALLLDGNTLNYFGK.N		<i>Viridiplantae</i>	---	---	---	---	---	

99	Lipoxygenase (<i>lox</i>)	<i>Camellia sinensis</i>	gij308943877	101.8/6.39	101	1/-	R.LSSNDDTTNYEAK.F	<i>Amaranth Trans</i>	isoTiG01416	0.0	3
101	OEC enhancer protein 3 (<i>psbQ</i>)	<i>Spinacia oleracea</i>	gij131397	24.8/9.75	130	2/-	R.FYLQPLPPTETAIQR.V K.YYAQTVSSLNDILAK.L	<i>Amaranth Trans</i>	isoTiG11267	3e-92	6



^A Número de mancha de acuerdo a las Figuras 5A y B (Joaquín-Ramos y col., 2014), los paréntesis indican que la proteína tuvo homología con dos secuencias de la base de datos nrNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

^B Nombre de la proteína (gen) de la base de datos nrNCBI.

^C Nombre del organismo donde se identificó la proteína

^D Número de acceso de la proteína en la base de datos nrNCBI.

^E Masa teórica (kDa)/punto isoeléctrico de la proteína identificada en la base de datos nrNCBI.

^F Puntaje de Mascot obtenido después de analizar los datos de masas contra la base de datos nrNCBI *Viridiplantae*. Puntajes para iones individuales > 44 indican identidad u homología extensiva ($p < 0.01$).

^G Número de péptidos que se alinearon/ porcentaje de cobertura de la proteína por los péptidos

^H Secuencia de los péptidos que se alinearon con la proteína.

^I Base de datos donde se alinearon los péptidos, Para la base nrNCBI *Viridiplantae* el puntaje de iones individuales que indicaba identidad u homología extensiva fue > 44 y > 33 para *AmaranthTrans* (Délano-Frier y col, et al., 2011) en ambos casos $p < 0.01$

^J Número de acceso de la base de datos *AmaranthTrans*

^K E-value obtenido después de alinear las secuencias de la base de datos del transcriptoma de *Amaranthus hypochondriacus* contra la base nrNCBI usando el algoritmo BLASTX.

^L Marco de lectura (ML) usado por Mascot para generar la proteína y alinear los péptidos generados con los datos de masas.

^M Acumulación relativa de las proteínas de los cloroplastos de la vaina del haz (V) y del mesófilo (M) de plantas de *A. cruentus* var. *Amaranteca*. Los subíndices "c" y "s" indican control y estrés, respectivamente.



Molecular Biology

Comparative proteomic analysis of amaranth mesophyll and bundle sheath chloroplasts and their adaptation to salt stress



Ahuiztolt Joaquín-Ramos^a, José Á. Huerta-Ocampo^a, Alberto Barrera-Pacheco^a, Antonio De León-Rodríguez^a, Sacha Baginsky^b, Ana P. Barba de la Rosa^{a,*}

^a IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., Camino a la Presa San José No. 2055, Lomas 4a Sección, San Luis Potosí, S.L.P., 78216, Mexico

^b Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie, Abteilung Pflanzenbiochemie, Weinbergweg 22 (Biozentrum), 06120 Halle (Saale), Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2014

Received in revised form 17 June 2014

Accepted 19 June 2014

Available online 26 June 2014

Keywords:

BN/SDS-PAGE

Bundle sheath

Chloroplasts

LC/MS-MS

Mesophyll

ABSTRACT

The effect of salt stress was analyzed in chloroplasts of *Amaranthus cruentus* var. *Amaranteca*, a plant NAD-malic enzyme (NAD-ME) type. Morphology of chloroplasts from bundle sheath (BSC) and mesophyll (MC) was observed by transmission electron microscopy (TEM). BSC and MC from control plants showed similar morphology, however under stress, changes in BSC were observed. The presence of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) was confirmed by immunohistochemical staining in both types of chloroplasts. Proteomic profiles of thylakoid protein complexes from BSC and MC, and their changes induced by salt stress were analyzed by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis followed by SDS-PAGE (2-D BN/SDS-PAGE). Differentially accumulated protein spots were analyzed by LC-MS/MS. Although *A. cruentus* photosynthetic tissue showed the Kranz anatomy, the thylakoid proteins showed some differences at photosystem structure level. Our results suggest that *A. cruentus* var. *Amaranteca* could be better classified as a C₃-C₄ photosynthetic plant.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

A renewed interest in C₄ photosynthesis research is stimulated by the fact that C₄ plants make a significant contribution to the global carbon budget, with potential use of C₄ plants as a source of biofuels (Carpita and McCann, 2008), but most important, C₄ crops such as maize and sorghum are pivotal to current and future global food security (Ghannoum, 2009). Due to these facts, ambitious projects have been proposed with the aim to increase crop yields by introducing C₄ traits into C₃ plants (Covshoff and Hibberd, 2012).

It is widely accepted that the C₄ photosynthetic pathway has evolved recently in terms of angiosperm phylogeny and that there is considerable anatomical and biochemical variation associated

with this trait (Sage et al., 2012). C₄ photosynthesis is observed as an adaptation to deleteriously high levels of photorespiration (Kadereit et al., 2012). Plants exhibiting C₄ photosynthesis are found in 17 different families of angiosperms, including monocots and dicots. At least 23 species of plants have been reported to exhibit characteristics of photosynthesis and photorespiration intermediate between C₃- and C₄-type plants (Monson and Moore, 1989), suggesting that these species could be good models to understand the paths taken during C₄ evolution. The term C₃-C₄ intermediate denotes a syndrome of physiological, anatomical, and biochemical traits that are between to the more widely occurring C₃ and C₄ syndromes (Griffiths et al., 2013). Many C₃-C₄ intermediaries grow in arid or saline zones, for example intermediate species of *Heliotropium*, *Salsola*, *Neurachne*, *Alternanthera* (*Amaranthaceae*), and *Flaveria*. In *Flaveria* all intermediaries that have been investigated, both ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) and phosphoenol pyruvate (PEP) carboxylase are not entirely compartmentalized between the mesophyll (M) and bundle-sheath cells (BS), as in fully-developed C₄ plants (Sage et al., 2012). In the *Amaranthaceae*, C₄ photosynthesis has evolved multiple times but the C₄ evolutionary lineages are unclear because the photosynthetic pathway is unknown for most species of the family.

Abbreviations: BN, blue native; BS, bundle sheath cells; BSC, bundle sheath chloroplasts; M, mesophyll cells; MC, mesophyll chloroplasts; NAD-ME, NAD-malic enzyme; PEP, phosphoenol pyruvate; PPKK, pyruvate phosphate dikinase; PSL, photosystem I; PSII, photosystem II; RuBisCO, ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase; TEM, transmission electron microscopy.

* Corresponding author. Tel.: +52 444 8342000.

E-mail address: apbarba@ipicyt.edu.mx (A.P. Barba de la Rosa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.006>

0176-1617/© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.