



00551

UNAM
POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EL AUMENTO EN LA CAPACIDAD PARA
TOMAR AZÚCARES EN TEJIDOS DE
DEMANDA DE *Arabidopsis thaliana* COMO
SISTEMA PARA EL ANÁLISIS DE
METABOLISMO DE CARBONO

T E S I S

Que para obtener el grado de :
Maestro en Ciencias (Bioquímicas)
P R E S E N T A :

DANIEL PADILLA CHACON

Tutor: Dr. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS



México D.F.

Agosto, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Eleazar Martínez Barajas en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Eleazar Martínez Barajas

Dr. Felipe Cruz García

Dr. Omar Homero Pantoja Ayala

El jurado de Examen para obtener el Grado de la Maestría en Ciencias bioquímicas estuvo constituido por:

PRESIDENTE

Dr. Jorge Vázquez Ramos

VOCAL

Dr. Omar Homero Pantoja Ayala

SECRETARIO

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

SUPLENTE

Dr. Miguel Lara Flores

SUPLENTE

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Durante los estudios de Maestría goce de la beca otorgada por CONACYT (No de registro 167265) y del complemento de beca de DGEP-UNAM para realización de la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas mi más sincero agradecimiento por haberme permitido formar parte de su equipo de laboratorio. Además de la paciencia y confianza que siempre me ofreció.

Al Dr. Felipe Cruz García y al Dr. Omar Pantoja Ayala, por formar parte del Comité Tutorial y sus valiosos comentarios en los exámenes tutoriales.

A los miembros de jurado por la revisión crítica y acertada de la tesis.

A al Dra. Patricia Coello Coutiño por el apoyo técnico brindado para la realización de la tesis.

A la Dra. Alicia Gamboa del Buen por todas las facilidades que me ofreció para el crecimiento de la plantas.

A la Q.A. Lilia A. Bernal Gracida, mi compañera de laboratorio, por todo el apoyo técnico brindado durante toda la maestría.

A CONACYT y DGEP por la becas otorgadas.

DEDICATORIAS

A mis Padres, Rogelio y Bertha, por enseñarme valores que definen mi vida y por el apoyo que siempre he recibido de ustedes.

A mis hermanos, Javy, Tatá, Cheyenne, Vere y Oralia, porque con su ejemplo he aprendido que siempre se puede lograr todo.

A Selma, porque con tu amor, apoyo y comprensión he logrado cumplir con mis metas.

A mis Sobrinos, Jesús, Tatiali, Sergio, Paco, Mary, Liliana, Jennifer, Isaac, Nancy y Dana, porque ustedes siempre son un motivo de seguir adelante.

A mis Cuñados, Lilia, Sergio, Elisa y Roberto, por el tiempo compartido y la ayuda que siempre me han brindado.

A mis amigos del posgrado, Lilia, Javier, Ruht y Paco, por todos los buenos momentos, consejos y ayuda que me han brindado. Que nuestra amistad nos mantenga siempre juntos.

A mis amigos, Andrea, Caty, Gretel, Goyo, Selene, Martín, Carmen, Maru, Manuelita, Carlos y Javier por su amistad y apoyo para realizar mi trabajo.

ÍNDICE

	pag
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
Metabolismo de sacarosa y almidón en tejidos fotosintéticos	
<i>Síntesis de sacarosa</i>	2
<i>Síntesis de almidón</i>	2
<i>Coordinación entre síntesis de sacarosa y almidón en tejidos fotosintéticos</i>	3
<i>Mecanismos de carga y descarga del floema</i>	5
<i>Características metabólicas de tejidos demanda</i>	6
<i>Clasificación de los tejidos demanda</i>	6
Metabolismo de sacarosa y almidón en tejidos no fotosintéticos	
<i>Metabolismo de sacarosa</i>	7
<i>Síntesis de almidón en tejidos no fotosintéticos</i>	8
Transportadores de azúcares	
<i>Transportadores en plantas</i>	10
<i>Transportadores de hexosas en Saccharomyces cerevisiae</i>	12
<i>Regulación de la repartición de fotosintatos en las plantas</i>	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonación del gen del transportador HXT2

<i>Amplificación por PCR del gen que codifica para el transportador HXT2 de Saccharomyces cerevisiae</i>	16
<i>Preparación de células competentes de E. coli (DH5α)</i>	18
<i>Transformación de células DH5α por el método de heat-shock</i>	
<i>Purificación (miniprep) y análisis de los plásmidos extraídos de colonias recombinantes</i>	18
<i>Secuenciación del gen hxt2 de S. cerevisiae</i>	20

Clonación del transportador en el vector binario pBin-19 3X35S

<i>Preparación de células electrocompetentes de Agrobacterium tumefaciens LBA 4404</i>	22
<i>Transformación de A. tumefaciens LAB4404</i>	22
<i>Determinación de la presencia del gen del transportador en A. tumefaciens por PCR y Southern-blot</i>	23

Transformación de plantas de Arabidopsis thaliana

<i>Crecimiento de las plantas</i>	24
<i>Selección de probables transformantes usando antibióticos como marcadores</i>	25
<i>Pruebas para determinar la presencia del transportador HXT2 en plantas transgénicas</i>	25
<i>Determinación del gen del transportador hxt2 por PCR</i>	26
<i>Determinación del gen del transportador por Southern-blot</i>	26

Cuantificación de azúcares en plantas transgénicas de A. thaliana

<i>Preparación de extractos para medir azúcares solubles y almidón</i>	26
<i>Determinación de sacarosa por el método de antrona</i>	27
<i>Determinación de glucosa y fructosa</i>	27
<i>Cuantificación de almidón</i>	28

Medición de toma de glucosa, fructosa y sacarosa en raíces	28
Asimilación de carbono y distribución de fotosintatos	29
RESULTADOS	
Clonación del transportador	
Amplificación por PCR de la secuencia del transportador	30
Clonación en pGEM-T	31
Secuenciación del gen del transportador	32
Clonación del gen del transportador <i>hxt2</i> en el vector Binario 3X35S	33
Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	
Verificación por PCR	35
Análisis del gen <i>hxt2</i> por Souther-blot	36
Transformación de <i>A. thaliana</i>	
Escrutinio de las plantas transgénicas	37
Análisis de las plantas transgénicas	
Análisis por PCR	38
Análisis por Southern-blot	39
Análisis del fenotipo presentado en las plantas transgénicas	40
Efecto de la expresión del transportador sobre la fisiología de la planta	
Efecto sobre los niveles de azúcares (solubles y almidón)	40
Medición de toma de glucosa, fructosa y sacarosa en raíces	42
Efecto del transportador <i>Hxt2</i> sobre la distribución de fotosintatos	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVA	51
BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	pag
Figura 1. Relación entre la síntesis de almidón de triosas fosfato en el cloroplasto en tejidos fotosintéticos	4
Figura 2. Relación entre la síntesis de sacarosa y almidón en tejidos no fotosintéticos	9
Figura 3. Mapa del vector pGEM-T Easy	17
Figura 4. Mapa del vector binario Bin-19 3X35S-NOS	21
Figura 5. Amplificación del gen <i>hxt2</i> por reacción de PCR	25
Figura 6. Clonación del gen del transportador HXT2 en pGEM-T	31
Figura 7. Secuenciación del gen del transportador <i>hxt2</i>	33
Figura 8 A. Clonación del gen <i>hxt2</i> en el vector binario pBin-19 3X35S	34
Figura 8 B. Clonación del gen <i>hxt2</i> en el vector binario pBin-19 3X35S. Análisis de restricción.	35
Figura 9. Análisis por PCR de la presencia del gen <i>hxt2</i> en <i>A. tumefaciens</i>	36
Figura 10. Análisis por Southern-blot de la presencia del gen <i>hxt2</i> en <i>A. tumefaciens</i>	36
Figura 11. Escrutinio de las plantas transgénicas	37
Figura 12. Análisis por PCR de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	38

Figura 13. Análisis por Southern-blot de líneas transgénicas (L1 y L2)	39
Tabla 1. Análisis del fenotipo de plantas silvestres y de 2 líneas transformadas con el gen <i>hxt2</i> de levadura	40
Figura 14. Concentración de azúcares solubles en tallo, hoja y raíz	41
Figura 15. Concentración de almidón en tallo, hoja y raíz	42
Figura 16. Incorporación de azúcares marcados por raíces cultivadas en medio líquido e incubados con sacarosa, glucosa y fructosa	43
Figura 17. $^{14}\text{CO}_2$ respirado por raíces cultivadas en medio líquido e incubadas con sacarosa, glucosa y fructosa	44
Figura 18. Incorporación $^{14}\text{CO}_2$ en azúcares solubles de hojas y raíces	45
Figura 19. Incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ en almidón de hojas y raíces	46

ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
UDP	Uridina difosfato
NAD ⁺	Nicotina Adenina dinucleótido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
PGI	Fosfoglucoisomerasa
PGM	Fosfoglucomutasa
SPS	Sacarosa fosfato sintasa
SuSy	Sacarosa sintasa
AGPasa	ADP- glucosa pirofosforilasa
P	Fosfato
PPi	Ortofosfato
HXT2	Transportador de hexosas-2 de levadura
StSUT1	Transportador de sacarosa de <i>Solanum tuberosum-1</i>
MSF	Superfamilia de facilitadores
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RESUMEN

El 80% de los azúcares sintetizados en las hojas maduras es distribuido hacia tejidos poco o nada fotosintéticos como por ejemplo las raíces, flores, meristemas, frutos o semillas. No se conoce con detalle que factores son los responsables de definir la forma en que los azúcares serán distribuidos, sin embargo, se ha observado que factores como: estado de desarrollo, tipo de tejido que los forman, así como la forma en que son transportados estos azúcares (simplasto o apoplasto) son muy importantes. Cuando los azúcares son distribuidos vía simplasto, son importados por medio de plasmodesmos. Por otro lado, cuando los azúcares son distribuidos vía apoplasto, primero son descargados hacia el espacio intercelular donde la invertasa de la pared celular hidroliza a la sacarosa en glucosa y fructosa. La incorporación de esos azúcares hacia al interior de las células depende de la actividad de transportadores específicos localizados en la membrana plasmática. De tal forma que un elemento importante para determinar la capacidad de asimilación de azúcares en un tejido demanda puede ser la cantidad de proteínas transportadoras en la membrana. Si esto es así, la alteración en los niveles de expresión de los transportadores de azúcares puede ser un medio efectivo para modificar la distribución de fotosintatos en las plantas. Con el fin de explorar esta posibilidad, en este trabajo se construyeron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* en las que con el promotor 35S se dirigió la expresión del transportador HXT2 de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual es específico para glucosa y fructosa. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión del transportador HXT2 modificó la distribución de fotosintatos: las plantas transgénicas enviaron más fotosintatos a la raíz, una parte de los cuales se acumularon como glucosa, fructosa y almidón. Por otro lado, las raíces de las plantas transgénicas fueron de un menor tamaño que las de las plantas silvestres. Todos estos cambios sugieren que la expresión del transportador HXT2 de *S. cerevisiae* modificó la distribución de azúcares en las plantas de *A. thaliana*.

INTRODUCCIÓN

Metabolismo de sacarosa y almidón en tejidos fotosintéticos

Síntesis de sacarosa

Las plantas son organismos autótrofos capaces de realizar fotosíntesis; los productos finales de dicho proceso son carbohidratos como almidón o sacarosa. En tejidos fotosintéticos la sacarosa se sintetiza en el citosol a partir de triosas fosfato provenientes del ciclo de Calvin, las cuales son exportadas del cloroplasto vía un translocador que las intercambia con fosfato (Fig 1, reacción 1).

En el citosol las triosas fosfato son usadas para sintetizar fructosa-1,6-P₂. Después el fosfato de la posición 1 es removido por la fructosa-1,6-bifosfatasa y la fructosa-6-P es utilizada por la sacarosa-6-P sintasa para producir sacarosa-6-P. Finalmente, el P es eliminado por la sacarosa-6-P fosfatasa y la sacarosa resultante puede ser transportada a diferentes órganos de demanda o bien, es almacenada en la vacuola (Fig. 1).

Síntesis de almidón

El almidón es el otro producto de la fotosíntesis. Esta constituido por moléculas de glucosa unidas por enlaces α (1,4) y α (1,6). Forma un gránulo muy compacto, lo que permite a las células almacenar grandes cantidades de glucosa sin afectar el potencial osmótico. El almidón se sintetiza en el interior del cloroplasto a partir de triosas fosfato. Las reacciones hasta glucosa-1-P son idénticas a las que ocurren en el citosol durante la síntesis de sacarosa. Sin embargo, en ambos casos participan isoenzimas diferentes (Fig. 1) que se regulan de manera distinta. Por ejemplo, la fructosa-1,6- bifosfatasa del cloroplasto se regula por tiorredoxina y no por fructosa-2,6-P₂ y AMP como la enzima citosólica. Después la ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGasa) transforma la glucosa-1-P y ATP en ADP- glucosa y pirofosfato.

La siguiente enzima es la almidón sintasa, la cual transfiere la unidad glucosil del ADP-glucosa al extremo no reductor de un cebador (α -1,4 glucano).

Finalmente, los enlaces $\alpha(1,6)$ son introducidos por la actividad de la enzima ramificadora.

La mayor parte del almidón sintetizado en el día es degradado durante la noche (Scheiding et al., 2002) asegurando la disponibilidad de fotosintatos durante ese periodo. De hecho, mutantes de *A. thaliana* deficientes en la actividad de la phosphoglucosaisomerasa (PGI) de cloroplasto que son incapaces de sintetizar almidón crecen a la misma velocidad que las plantas silvestres si se cultivan bajo luz continua (Casper et al., 1985). Sin embargo, la velocidad de crecimiento se reduce drásticamente en la oscuridad.

Coordinación entre síntesis de sacarosa y almidón en tejidos fotosintéticos

Las concentraciones relativas de ortofosfato y de triosas fosfato son muy importantes para determinar la proporción de carbono fijado fotosintéticamente que se utiliza para sintetizar almidón o sacarosa. La actividad del translocador fosfato/triosas-P que comunica al citosol con el cloroplasto es fundamental (Fig. 1, reacción 1). Si la concentración de ortofosfato en el citosol es baja, se limita la exportación de triosas-P y se favorece la síntesis de almidón. Por otro lado, concentraciones elevadas del ortofosfato en el citosol promueven la síntesis de sacarosa.

En el cloroplasto la relación entre ortofosfato y triosas-P afecta también la actividad de otras enzimas. Una de ellas es la ADP-glucosa pirofosforilasa, la cual es estimulada por 3-PGA e inhibida por ortofosfato. Durante el día, la concentración de 3-PGA es mayor que la de ortofosfato y ello también promueve la síntesis de almidón.

La fructosa 2,6-P₂ es un inhibidor de la fructosa-1,6-bifosfatasa y niveles más elevados de este metabolito disminuyen la síntesis de sacarosa. Los niveles de fructosa-2,6-P₂ son regulados por las actividades de fructosa-6-P cinasa (responsable de la síntesis) y la fructosa-2,6-P fosfatasa (responsable de la degradación). El ortofosfato estimula a la fructosa 6-P 2-cinasa e inhibe a la fructosa-2,6-P₂ fosfatasa, mientras que las triosas inhiben a la fructosa-6-P 2-cinasa.

Se ha observado que otras enzimas también son importantes. Como se mencionó anteriormente, Casper et al (1985) obtuvieron una mutante de *A. thaliana* con deficiente actividad de PGI de cloroplasto, mostrando perturbaciones en crecimiento, fotosíntesis, respiración y sorprendentemente los niveles de almidón no mostraron cambios. En relación a esto, se obtuvo una mutante de *Clarkia xantiana* que se caracteriza por tener baja actividad de fosfoglucoisomerasa (PGI) citosólica, la cual redujo la velocidad de síntesis de la sacarosa e incrementó la velocidad de síntesis de almidón (Neuhaus *et al.*, 1989). Por otro lado, plantas transgénicas de tomate que expresan el gen de enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS) de hoja de maíz, mostraron un aumento en la concentración de sacarosa en la hojas y una reducción importante en los niveles de almidón (Worrel *et al.*, 1991). Esto sugiere que las perturbaciones en el metabolismo de sacarosa pueden llevar a cambios en el metabolismo de almidón, pero no viceversa, y que la actividad de algunas enzimas citosólicas puede ser muy importante para determinar las cantidades de sacarosa y almidón que se sintetizan.

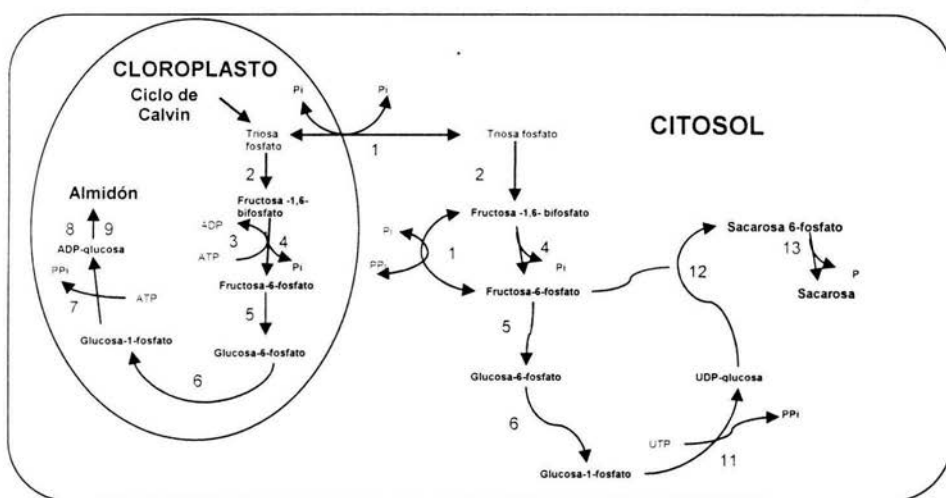


Figura 1. Relación en la síntesis de almidón en tejidos fotosintéticos. Enzimas: 1, translocador de fosfato; 2, fructosa bifosfato aldolasa; 3, 6-fosfofructocinasa; 4, fructosa-1,6-bifosfato; 5, fosfoglucoisomerasa; 6, fosfoglucomutasa; 7, ADP-glucosa pirofosforilasa; 8, almidón sintasa; 9, enzima ramificadota de almidón; 10, fosfofructofosfotransferasa dependiente de pirofosfato; 11, UDP-glucosa pirofosforilasa; 12, sacarosa-6-fosfato sintasa; 13, sacarosa fosfato fosfatasa. (Boyer, 1996).

Mecanismos de carga y descarga del floema

Los azúcares producto de la fotosíntesis de las hojas son distribuidos entre los diferentes órganos demanda a través de una red vascular denominada floema. La mayoría de las especies transportan sacarosa (Zimmermann y Ziegler, 1975), aunque también hay ejemplos de especies que translocan manitol y sorbitol así como azúcares relacionados con la rafinosa (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) (Grusak *et al.*, 1996). Sin embargo, aunque estos azúcares predominen en el floema la sacarosa siempre esta presente.

El floema de las angiospermas está formado por dos tipos de células altamente diferenciadas y relacionadas ontogenéticamente: células acompañantes (CAs) y elementos cribosos (ECs) (Sjölund, 1997; Ward *et al.*, 1998). Durante el proceso de diferenciación las células de los SEs, pierden el núcleo, vacuolas y otros organelos y forman tubos de células vivientes conectadas por placas cribosas. Las CAs se caracterizan por tener un protoplasma denso, núcleo, numerosas mitocondrias y por estar conectadas por plasmodesmos con los SEs, la funcionalidad depende de la actividad metabólica de las CAs (Lucas *et al.*, 1993).

La ruta de transporte de sacarosa desde el tejido fuente hacia el tejido de demanda no esta completamente dilucidada, pues existen diferencias importantes entre las diferentes especies de plantas. Sin embargo, se conocen algunos aspectos que aparentemente operan en la mayoría de las especies. Las plantas utilizan dos rutas (simplasto y apoplasto) para llevar la sacarosa de las células del mesófilo al complejo EC/CA. La apoplástica se caracteriza porque la sacarosa es depositada en el espacio intercelular y la incorporación al complejo EC/CA es mediada por transportadores específicos. Por su parte, la simplástica se distingue porque el transporte de azúcares hasta el complejo EC/CA se da aprovechando los plasmodesmos que comunican a las células.

La descarga del floema en los órganos de demanda también puede ser vía apoplástica ó simplástica. Varios estudios han demostrado que en raíces, meristemas y algunos frutos que almacenan polisacáridos la descarga es vía apoplástica: el complejo EC/CA libera los azúcares al apoplasto y de allí las

células los incorporan vía transportadores específicos. (Dick y ap Rees 1975; Guianquinta *et al.*, 1983; Hitz y Guianquinta, 1987).

En muchos casos el predominio de una vía depende de la etapa de desarrollo del órgano en cuestión. Oparka (1994) observó que en algunas regiones jóvenes de la raíz de *A. thaliana* la descarga es vía simplástica, mientras que en las regiones maduras es predominante la ruta apoplástica. De igual manera, en frutos de jitomate se observó que en las etapas iniciales del desarrollo del fruto 13-14 días después de la antésis (DDA) la descarga es vía simplasto y después de 23-25 DDA la vía apoplástica se vuelve predominante (Ruan y Patrick, 1995).

Características metabólicas de tejidos demanda

Clasificación de tejidos demanda

Los órganos demanda son aquellos cuya actividad fotosintética es limitada o nula, por lo que su metabolismo depende de los fotosintatos que reciben de las hojas. La siguiente clasificación de órganos demanda está basada en la capacidad para importar y asimilar los fotosintatos, así como las características físicas y estructurales de cada tejido (Zamski, 1996). Al primer grupo se le denomina de acumulación, a éste pertenecen las raíces, tallos, frutos y semillas. Algunos acumulan grandes cantidades de azúcares libres como sacarosa, glucosa, fructosa y oligofructanos; otros almacenan polisacáridos como almidón, largas cadenas de fructanos o polisacáridos de pared. Estos carbohidratos se almacenan en organelos especializados como son plástidos (almidón) y vacuolas (sacarosa, glucosa, fructosa y oligosacáridos). Las reservas de tipo polimananos, así como otros polisacáridos que son depositados en la pared celular, pueden ser usados para propósitos energéticos y estructurales después de su hidrólisis.

El segundo grupo de tejidos demanda son los órganos de consumo, cuyos representantes más importantes son los meristemas. Estos se caracterizan por demandar gran cantidad de fotosintatos que son usados para satisfacer los requerimientos energéticos y estructurales de los órganos en crecimiento.

El tercer grupo lo constituyen los órganos de secreción y se caracterizan por producir y liberar en tiempos relativamente cortos una solución que entre otras cosas contiene altas concentraciones de azúcares.

Metabolismo de sacarosa y almidón en tejidos no fotosintéticos

Metabolismo de sacarosa

Los diferentes órganos de las plantas poseen diversos requerimientos bioquímicos y metabólicos que son cubiertos con fotosintatos provenientes de las hojas. Desde el punto de vista metabólico, la hidrólisis de la sacarosa en tejidos no fotosintéticos es catalizada por dos enzimas que difieren en sus propiedades: invertasa (EC 3.4.1.26) y sacarosa sintasa (SuSy, EC 2.4.1.13). La invertasa es una hidrolasa y rompe a la sacarosa en dos monosacáridos (glucosa y fructosa). En cambio, SuSy es una glicosil transferasa, que en presencia de UDP, convierte a la sacarosa en UDP-glucosa y fructosa (Zrenner *et al.*, 1995).

Cuando la sacarosa es hidrolizada por la invertasa, los productos de la reacción requieren fosforilación, ya que las hexosas no fosforiladas son metabólicamente inactivas. La mayoría de las especies poseen tres isoformas de invertasas; una intracelular con un pH óptimo ácido que se localiza en la vacuola y responsable de la regulación de los niveles de sacarosa almacenadas en este compartimiento (Leigh *et al.*, 1979); Lingle y Dunlap, 1987). En plantas antisentido de una invertasa vacuolar ácida de fruto de jitomate, se mostró que altera la composición de los azúcares solubles y el tamaño de los frutos (Klann *et al.*, 1996). La otra invertasa es citosólica con un pH óptimo neutral, pero hasta ahora es poco claro su papel fisiológico. Por último, está la invertasa unida a la pared celular, caracterizada por un pH óptimo ácido cuya actividad es en el apoplasto y es abundante en tejidos de crecimiento (expansión y división celular) (Komor *et al.*, 1981). Probablemente por lo mismo, su expresión dependiendo del estado de desarrollo de los tejidos (Kingston *et al.*, 1999). Plantas transgénicas de zanahoria con un antisentido de la invertasa de pared celular mostraron alteraciones en el desarrollo y la repartición de fotosintatos (Tang *et al.*, 1999).

Por su parte, la actividad de SuSy está generalmente asociada con procesos anabólicos, pues la UDP-glucosa es el precursor de numerosos componentes como, por ejemplo, pared celular y el almidón. Durante la pasada década se ha propuesto que SuSy al ser responsable del rompimiento de gran parte de la sacarosa importada, controla la capacidad de los tejidos de demanda para importar azúcares (Ñ'tchobo et al., 1999; Wang et al., 1993).

Por otro lado, plantas transgénicas de maíz (Chourey y Nelson, 1976), chícharo (Craig et al., 1996), y papa (Zrenner et al., 1995) que expresaron en antisentido a la SuSy, mostraron decrementos de 70-40% en la cantidad de almidón. Se observó un decremento en la cantidad de almidón en un 40% en endospermo de maíz y un 70 % en tubérculo de papa. Estos resultados ponen de manifiesto que la actividad de SuSy juega un papel importante en el metabolismo de sacarosa hacia almidón en tejidos de demanda.

Síntesis de almidón en tejidos no fotosintéticos

A diferencia de lo que sucede en tejidos fotosintéticos, en órganos demanda el almidón es almacenado por periodos más largos. La cantidad que se puede acumular depende de la especie y constituye un reflejo de la forma en que en cada caso se regula el proceso. En general, la síntesis comienza con la descarga vía simplasto o apoplasto de la sacarosa que viaja por el floema (Oparka y Prior, 1988). En la figura 2 se muestra la vía de síntesis de almidón en tejidos demanda.

Transportadores de azúcares

Transportadores en plantas

La distribución de azúcares en las plantas involucra la participación de transportadores específicos. Recientemente, se han clonado un gran número de transportadores de monosacáridos (Rentsch *et al.*, 1998) y disacáridos (Delrot *et al.*, 2000; Limonie, 2000). En general, los transportadores de disacáridos han sido localizados en tejidos fuente, en donde se les ha atribuido funciones en carga del floema (Rentsch *et al.*, 1998). En lo que se refiere a transportadores de monosacáridos, se ha postulado que son generalmente específicos de tejidos demanda dada la necesidad de incorporar glucosa y fructosa, productos de la hidrólisis de sacarosa, por invertasas de la pared celular (Sauer *et al.*, 1994).

Los transportadores de hexosas son proteínas de membrana plasmática que funcionan como simportadores (H⁺)/hexosa (Bush, 1993) y se han clasificado como miembros de una superfamilia de facilitadores de movimiento de azúcares (MSF) (Marger y Saier, 1993). Este grupo se caracteriza por tener 12 dominios transmembranales y la presencia de varios aminoácidos conservados que están involucrados en la especificidad del azúcar.

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 26 secuencias de transportadores de monosacáridos (Lalonde *et al.*, 1999), 8 en *Ricinus communis* (Weig *et al.*, 1994), 7 en *Chenopodium rubrum* (Roitsch and Tanner, 1994), 4-5 en *Petunia hybrida* (Ylstra *et al.*, 1998), 3 en *Beta vulgaris* y, por lo menos, 2 en caña de azúcar (Bugos y Thom, 1993; Lalonde *et al.*, 1999) entre otros.

Algunos de estos genes se han analizado detalladamente y se ha observado que su expresión es diferente en distintas partes de la planta. En tabaco el transcrito del transportador de hexosas *NtMST1* está restringido a tejidos demanda (hojas jóvenes y raíces. Sauer y Stadler, 1993). En *R. communis*, el transportador de hexosas *RcSTA* se expresa en hipocótilos, raíces y hojas fuente (Weig *et al.*, 1994). En jitomate se identificó un transportador de hexosas (*LeHT2*) y dos secuencias parciales (*LeHT1* y *LeHT3*) que se expresan diferencialmente en frutos y raíces jóvenes (Gear *et al.*, 2000). En *Arabidopsis* el transportador *AtSTP1* se expresa fuertemente en hojas, aunque también en raíz, tallo, flores y

siliquis (Saber et al., 2000; Sherson et al., 2000). La expresión de *AtSTP2* está limitada a estados tempranos del desarrollo del gametofito (Truernit et al., 1999), en tanto que *AtSTP3* se expresa en hojas y sépalos (Tanner y Caspari, 1996) y *AtSTP4* se expresa en anteras y en las puntas de las raíces (Truernit et al., 1996).

Algunos transportadores de hexosas de plantas superiores han sido expresados en sistemas heterologos (levaduras) y se ha encontrado que los valores de las K_m para el transporte de glucosa o fructosa varían, en un rango de 15 a 80 μM (Sauer et al., 1990 a y b; Will et al., 1994; Truernit et al., 1996). También, se han estudiado transportadores de plantas superiores en vesículas de membrana plasmática y se han obtenido valores de K_m en el rango de μM (Verstappen et al., 1991; Tubbe y Buckhout, 1992). Por otro lado, en protoplastos de betabel y maíz, se obtuvieron valores de K_m en el rango milimolar (Lin et al., 1984; Getz et al., 1987). Dentro de los transportadores de monosacáridos de *Arabidopsis* que han sido expresados en sistemas heterologos (levaduras y *Xenopus*) se encuentra el transportador *AtSTP1*, se mostró que es un transportador de alta afinidad con una K_m para glucosa de aproximadamente 50 μM (Saber et al., 2000). También, Büttner et al., (2000) caracterizaron el primer transportador de plantas de baja afinidad (*AtSTP3*) obteniéndose una K_m para glucosa de 2mM y alta homología a los transportadores de hexosas previamente descritos en *Arabidopsis*.

Dentro de la MSF se encuentran transportadores de monosacáridos de todos los organismos y están clasificados en 17 familias diferentes. En la familia más grande se encuentran 133 proteínas que comprenden transportadores de monosacáridos de bacterias, archaea, protistas, levaduras, animales y plantas, a los que en conjunto se les llaman portadores de azúcares (SP). Los transportadores de plantas mostraron una gran homología con los transportadores de levaduras (ScHxts y ScGal2). Considerando el alto porcentaje de conservación entre los diferentes transportadores estudiados, los datos obtenidos sugieren que la afinidad por glucosa de los mismos está determinada por un pequeño número de aminoácidos (Pao et al., 1998).

Transportadores de hexosas de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae posee 20 genes que codifican para proteínas que funcionan como transportadores de hexosas, entre los que se encuentran los *hxt* (1 al 17), *gal2*, *snf3* y *rgt2*. Las proteínas HXT pertenecen a la mayor superfamilia de facilitadores (MSF) del transporte (Marger y Saier 1993) y dentro de sus características está que el transporte de sus sustratos es de forma pasiva (difusión facilitada), por lo tanto, independiente de energía y siempre siguiendo la fuerza impuesta por el gradiente de concentración (Bisson *et al.*, 1993).

Debido a que muchos transportadores de hexosas de organismos procarióticos y eucarióticos son miembros de MSF, el estudio de transportadores de hexosas de levaduras ha ayudado al entendimiento en la estructura, función y regulación de transportadores de glucosa en una amplia variedad de organismos.

El transporte de glucosa en *S. cerevisiae* es mediado por dos sistemas. El primero es un sistema represible y de alta afinidad con una K_m en alrededor de 1 a 2 mM, mientras que el segundo es un sistema constitutivo de baja afinidad con una K_m de aproximadamente entre 15 a 20mM (Bisson y Fraenkel, 1983). En levaduras existen múltiples transportadores de hexosas con diferencias en su afinidad por glucosa. La expresión diferencial de los transportadores permite a las levaduras crecer en un amplio espectro de concentraciones que van desde concentración en rango μ M hasta 2M de glucosa. De hecho, la cantidad de hexosas en el medio dicta que transportador debe expresarse (Özcan y Johnston, 1995).

Debido al gran número de genes *hxt* de funcionalidad redundante, ha sido difícil aislar una mutante de levadura defectuosa en la toma de glucosa. Una cepa con los siete genes *hxt* mutados, [*hxt1* Δ -*hxt7* Δ] es incapaz de crecer en glucosa, fructosa o manosa y no tiene flujo glicolítico (Boles y Hollenberg 1997; Liang y Gaber 1996; Reifenberger *et al.*, 1997). La introducción de uno de estos siete genes dentro de la mutante nula *hxt* es suficiente para permitir el crecimiento en glucosa. Los transportadores HXT2, HXT6 ó HXT7 permiten el crecimiento en 0.1% de glucosa, sugiriendo que ellos codifican para transportadores de alta afinidad. Por su parte, los transportadores HXT1, HXT3 ó HXT4 sólo permiten el

crecimiento a altas concentraciones de glucosa (mas de 1%) lo que sugiere que codifican para transportadores de baja afinidad (Reinfeberger *et al.*, 1997). De manera interesante, la actividad del transportador de alta afinidad HXT2 es diferente dependiendo de las condiciones de crecimiento de las células. La cinética de toma de glucosa interpretada en la gráfica de Eadie Hofstee en células HXT2⁺ creciendo a bajas concentraciones de glucosa, mostró ser no lineal con un componente de alta afinidad ($K_m = 1.5$ mM) y otro de baja afinidad ($K_m = 60$ mM). Por lo tanto, la afinidad de Hxt2 por glucosa es modulada dependiendo de las condiciones de crecimiento (Reinfeberger *et al.*, 1997).

Regulación del reparto de fotosintatos en la planta

En la mayoría de las plantas la sacarosa es el producto de la fotosíntesis y se utiliza para distribuir el carbono asimilado. Se sintetiza en el mesófilo de las células fotosintéticamente activas y se transporta vía floema a los órganos de demanda como son: hojas jóvenes, frutos y raíces (Frommer y Sonnewald, 1994).

La clasificación de un tejido como fuente o demanda no es fija, ya que durante el desarrollo algunos se convierten de importadores a exportadores. En muchos casos éste es un proceso que involucra modificaciones importantes en la expresión de muchos genes (Borgmenn *et al.*, 1994).

Existen muchas evidencias que señalan que el transporte de los fotosintatos por el floema no es un elemento que limite o regule su distribución en la planta (Wardlaw, 1990) y que, más bien, son los cambios que ocurren en los órganos lo que determina la cantidad de azúcares que reciben (Henvelink, 1995).

Con frecuencia tales cambios están asociados con modificaciones en la forma en que los azúcares son descargados del floema: en el caso del fruto de jitomate, se observa que la vía de descarga cambia de simplasto a apoplasto (Ruan y Patrick, 1995), ya se mencionó que una transición similar se ha observado en la raíces de *A. thaliana* (Imlau *et al.*, 1999), mientras que en los tubérculos de papa durante la tuberización el cambio ocurre en sentido contrario (Viola *et al.*, 2001).

Esto significa que en aquellos tejidos en donde la descarga del floema es apoplástica, la actividad de los transportadores ubicados en las membranas celulares es fundamental para determinar la cantidad de azúcares que entra. Los resultados obtenidos por Rosche *et al* (2002) apoyan esta hipótesis, pues la expresión de StSUT1 de papa en los cotiledones de chícharo incrementó la velocidad de crecimiento.

Dada la relevancia que la capacidad de importar azúcares parece tener para determinar la cantidad de azúcares que un órgano de demanda es capaz de asimilar, se propone la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

El incrementar la capacidad para tomar azúcares en órganos demanda producirá cambios muy importantes en la distribución de fotosintatos en la planta completa.

OBJETIVO

Analizar los efectos bioquímicos y fisiológicos que en *A. thaliana* produce la sobreexpresión del transportador HXT2 de levadura.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonar el gen del transportador HXT2 de *S. cerevisiae* en el vector binario pBin-19 bajo el control del promotor CaMV 3X35S.
- Transformar *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 con el vector binario pBin-19.
- Transformar plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia con *A. tumefaciens* LBA 4404 por la técnica de inmersión floral.
- Obtener semillas y seleccionar las semillas transgénicas con kanamicina.
- Obtener semillas T2.
- Realizar el análisis de las plantas transgénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonación del gen del transportador hxt2

Amplificación por PCR del gen que codifica para el transportador hxt2 de Saccharomyces cerevisiae

Para amplificar el gen del transportador *hxt2* se usó la técnica de PCR. La secuencia respectiva se obtuvo consultando la base del Nacional Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y con base en ella se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR el gen completo a partir de DNA genómico de levadura. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes: sentido 5'ATACGCCCGTCTAGACATGTCTGAATTCGCTACTAGCCGCG3' y antisentido 5'CGCGGATCCTTATTCTCGGAAACTCTTTTCTT3'. El sentido posee un sitio de restricción *Xba* I mientras que en el antisentido hay sitio *Bam*H I. El programa usado fue 94°C 30 seg, 60°C 1 min y 72°C 1.40 min por 30 ciclos en el equipo PCR Sistem 9700 Gene Amp. La mezcla para la reacción de PCR fue la siguiente: 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 500 ng DNA molde, 0.5 μM primers y 1.5 U Taq polimerasa. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1% y la banda obtenida se cortó para después purificarla con reactivos elaborados por Marligen, Bioscience. La banda (después de remover la mayor cantidad de agarosa) se colocó en un tubo eppendorft y se pesó. Posteriormente se añadieron tres volúmenes de amortiguador y el tubo se incubó a 50° C durante 10 min mezclando con vortex hasta que se disolviera totalmente el gel. Después se le añadió un volumen de isopropanol a la mezcla para precipitar el DNA y el volumen total se cargó a una columna con resina donde se une el DNA revisando que mantuviera un color amarillo que indica que el pH se encuentra a 7.5. Esto es importante porque a este pH se une el DNA a la columna. Posteriormente se centrifugó 1 min a 13,000 rpm y se realizó un lavado con etanol al 70% frío. Por último se eluyó el DNA de la resina con 50 μl de agua estéril y se cuantificó el DNA a 260 (Sambrok, 1989). El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pGEM-T (Promega; fig 3). Las cantidades usadas fueron 50 ng del vector, 3U de DNA

ligasa T4, 25 ng de producto de PCR y amortiguador de ligación 10X para un volumen final de 10 µl. La reacción de ligación se incubó toda la noche a 4°C.

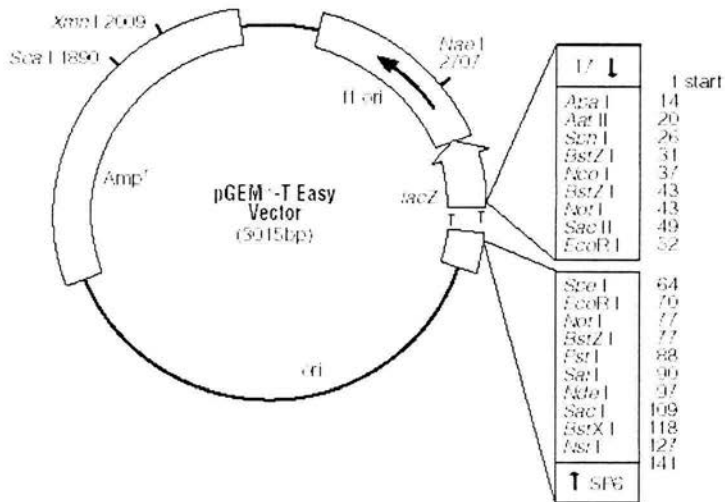


Figura 3. Mapa del vector pGEM-T Easy. El gen del transportador *hxt2* se clonó en los extremos de timinas y para el análisis de restricción se obtuvo por digestión con la enzima *EcoRI* del sitio de multiclonación.

Preparación de células competentes de *E. coli* (DH5 α)

Se siguió el método de (Cohen et al., 1972). Primero se inoculó una colonia de *Escherichia coli* cepa DH5 α en 10 ml de medio LB (triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g en 1L de agua desionizada). Se cultivó durante toda la noche en agitación constante a 250 rpm a 37°C. Se tomaron 4 ml del precultivo para inocular 200 ml de LB en un matraz de 1 L. El cultivo se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica (D.O) de 0.375 a 590 nm. Posteriormente, el cultivo se vació en un tubo estéril de polipropileno de 250 ml y se dejó en hielo de 5 a 10 minutos. Se centrifugó a 3,000 rpm durante 7 minutos a 4°C y el paquete celular se resuspendió cuidadosamente en 10 ml de solución de CaCl₂ 0.1 M frío. Las células resuspendidas se mantuvieron en hielo durante 10 min. Después se centrifugaron a 3,000 rpm durante 7 min a 4°C. Por último, el paquete celular se resuspendió en 2.5 ml de la solución de CaCl₂ 0.1 M frío y se dividió en alícuotas de 100 μ l. Las células se congelaron en N líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Transformación de células de *E. coli* DH5 α por el método de heat-shock

Para la transformación de las células de *E. coli* DH5 α se siguió el método de Sambrook, 1989. Las células competentes DH5 α (100 μ l) se mezclaron con 10 μ l de la reacción de ligación del producto de PCR para la amplificación del gen del transportador *hxt2* en el vector pGEM-T. La mezcla se incubó 30 minutos en hielo, después se puso a 42°C 50 seg, y finalmente, se dejó en hielo 2 min. Pasado ese tiempo se agregaron 450 μ l de medio SOC (medio LB más glucosa 20 mM final) y se incubó a 37°C, durante una hora, con agitación constante a 200 rpm. Posteriormente, se centrifugó durante 30 seg a 13,000 rpm, el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 100 μ l de medio LB. Este volumen se plaqueó en cajas con medio LB y ampicilina 50 μ g/ml, incubándose toda la noche a 37°C.

Purificación (miniprep) y análisis de los plásmidos extraídos de las colonias recombinantes

Para la purificación de los plásmidos se siguió el método de Sambrook, 1989. Las colonias que crecieron en medio sólido con ampicilina se picaron con un palillo estéril y se pusieron a crecer en 3 ml de medio LB con ampicilina durante toda la noche en agitación constante (250 rpm) a 37°C. Al día siguiente se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 seg a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron (agitando fuertemente) en 100 µl de solución GTE (50 mM de glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 y 10 mM de EDTA). Después, se adicionaron 200 µl de la solución de lisis (0.2 N NaOH, 1 % SDS) y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente 5 veces. Posteriormente, se agregaron 150 µl de solución 5 M de acetato de potasio fría y se agitó suavemente por 10 seg, incubándose en hielo durante 5 min. Después de ese tiempo se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se adicionó un volumen igual de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1) posteriormente, se agitó fuertemente (Vortex) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min a 4°C. Nuevamente, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Para precipitar el DNA se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío, se agitó fuertemente (vortex) y se incubó a – 80°C por 2 h. Pasado ese tiempo se centrifugó 15 min a 10,000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y el botón se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el DNA se resuspendió en 150 µl de agua estéril y se guardó a – 20°C. Los plásmidos purificados se cortaron con las enzimas *Xba* I y *Bam*H I y se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Se seleccionaron aquellos plásmidos que liberaron un inserto de 1.6 Kpb (correspondiente al tamaño esperado del transportador *hxt2*).

Secuenciación del gen *hxt2* de *S. cerevisiae*

A partir de una colonia recombinante se inició un cultivo de 3 ml en medio LB con ampicilina, del que se purificó por columna (Quiagen) el plásmido pGEM-T con el gen del transportador *hxt2* clonado (siguiendo instrucciones y usando reactivos de Quiagen). El plásmido se preparó a una concentración de 300 ng/μl. Posteriormente, se secuenció en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en un secuenciador automático ABIPRISM 310 (Perkin Elmer) usando el oligonucleótidos T7 y SP6.

Clonación del transportador en el vector binario *p-Bin 19 3X35S*

Habiendo comprobado que la secuencia amplificada y clonada correspondía al gen del transportador *hxt2* de *S. cerevisiae*, el inserto de 1.6 Kpb correspondiente del transportador se purificó y se usó para ser ligado en el vector binario Bin-19 el cual tiene 3 copias del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (3X35S) Fig 4.

Para realizar la reacción de ligación, primero se digirió el vector binario Bin-19 3X35S con la enzimas *Xba* I y *Bam*H I, inmediatamente se desfosforilaron los extremos con la fosfatasa alcalina de cordero (CIAP) y posteriormente, se agregó un volumen de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1) con el fin de eliminar la proteína presente en la mezcla. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y se agregaron 2 volúmenes de alcohol absoluto, después se guardó a -80°C durante 2 h y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y el DNA precipitado se dejó secar a temperatura ambiente para después resuspenderlo en 30 μl de agua desionizada.

La ligación del vector se realizó mezclando: 50 ng del vector binario Bin-19 3X35S digerido y desfosforilado, 150 ng de DNA del transportador *hxt2*, 3U de ligasa y 15 μ l agua desionizada para completar un volumen de 30 μ l. La mezcla se incubó a 16°C durante toda la noche y al día siguiente se transformaron bacterias competentes de *E. coli* DH5 α por el método de choque térmico. Las bacterias transformadas se pusieron a crecer en cajas con medio LB con antibiótico (Kanamicina 50 μ g/ml). Posteriormente, se purificó el plásmido de las colonias recombinantes y se hizo el análisis de restricción.

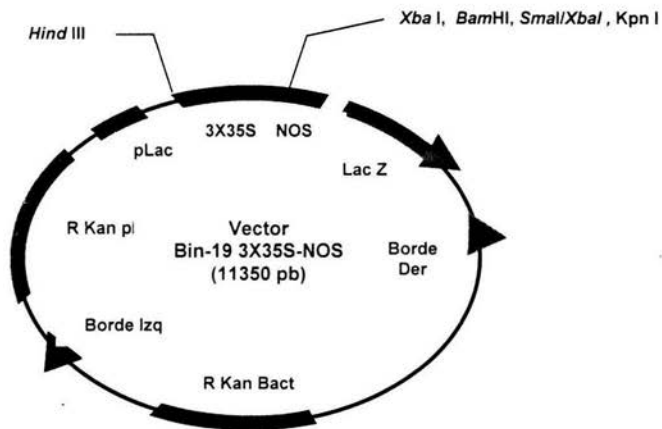


Figura 4. Mapa del vector binario Bin-19 3X35S-NOS. El gen del transportador se clonó entre los sitios *Xba I* y *BamH I* del sitio de multiclonación del vector.

Una vez comprobado que el gen del transportador estuviera clonado en el vector binario Bin-19 3X35S, se realizó una maxiprep con el fin de obtener una cantidad de plásmido suficiente para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

Preparación de células electrocompetentes de Agrobacterium tumefaciens LBA 4404

Se inoculó una asada de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 en 3.0 ml de medio LB suplementado con estreptomicina (300 µg/ml), rifampicina (100 µg/ml), se dejó en agitación constante (200rpm) a 28°C hasta que el cultivo alcanzara una D.O de 1.6 a 600 nm. Posteriormente se inocularon 100 µl del cultivo anterior en 15 ml de medio LB suplementado con los mismos antibióticos hasta que alcanzara la misma D.O de 1.6 a 600nm. A continuación se inocularon 4 ml del cultivo anterior en 50 ml de medio LB con los mismos antibióticos de selección y se incubó hasta que alcanzó una D.O de 1-1.5 a 600nm. El cultivo se transfirió a tubos Corex y se mantuvieron en hielo durante 10 min. Posteriormente, se centrifugaron las células a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C; el sobrenadante se desecho y el paquete celular se resuspendió en 25 ml de agua estéril fría (agitando suavemente) y se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 min a 4°C, desechando el sobrenadante. Para asegurar de que quedaran las células lo mejor lavadas se repitió el paso 6 veces más. Después el paquete celular de la última centrifugación se resuspendió en 2.5 ml de glicerol al 10% frío. Las células resuspendidas se centrifugaron a 4,000 rpm durante 15 min a 4°C. Finalmente, se eliminó completamente el glicerol al 10% residual y las células se resuspendieron en 2 ml de glicerol al 10% frío, los cuales se dividieron en alícuotas de 200 µl, se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C.

Transformación de células de A. tumefaciens LAB4404 por electroporación

Para transformación de *A. tumefaciens* se descongelaron 100 µl de células competentes LBA4404 y se les agregó 5 µg de vector binario Bin-19 3X35S recombinante. La mezcla se incubó en hielo por 3 min y luego se transfirió a una cubeta de electroporación fría (0.2 cm de hueco del electrodo). Se aseguró que la suspensión estuviera en el fondo de la cubeta y se electroporó por ~4.6 seg a 25mF con un voltaje de 2.5kV (Gibco BRL, Cell Porator Chamber safe). A continuación se adicionó 1 ml de medio YEP, las bacterias se resuspendieron con una micropipeta se colocó la mezcla en un tubo de 1.5 ml y se incubó a 28°C con

una agitación de 200 rpm durante 2 h. Finalmente, se tomaron 200 μ l de cada transformación y se sembraron en cajas con marcadores de selección (Kanamicina 50 μ g/ml, Rifampicina 100 μ g/ml, Streptomicina 300 μ g/ml). Se incubaron a 28°C durante dos o tres días en la oscuridad.

Determinación de la presencia del gen del transportador en *A. tumefaciens* por PCR y Southern-blot

Dado que el vector binario Bin-19 3X35S en *A. tumefaciens* se expresa en bajo número de copias, el análisis de las colonias recombinantes se hizo con las técnicas de PCR y Southern-blot.

PCR

Se aisló DNA plasmídico de las colonias recombinantes y fue usado como molde. En otra reacción se usó una asada de una colonia recombinante como molde. Como controles se usaron DNA plasmídico no recombinante y colonias no transformadas. Las condiciones de PCR fueron iguales a las usadas para amplificar la secuencia del transportador *hxt2* a partir del DNA de levaduras.

Southern- blot

Otro método usado para determinar la presencia del gen fue el de Southern-blot siguiendo el método de Sambrook, 1989. Los productos de PCR obtenidos de las reacciones anteriores (vector recombinante y colonia recombinante) se corrieron en un gel de agarosa al 1 % y después se transfirieron a una membrana de nylon (Amersham). La membrana se prehibridó dos horas a 42°C en formamida al 25%, 20mM PIPES pH 8.0, 5X SSC, 0.5% (P/V) SDS, 2X reactivo de Denhardt y 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. La membrana se hidridó toda la noche a 42°C en el mismo amortiguador conteniendo la sonda (transportador *hxt2*) marcada radiactivamente con [α -³²P] dCTP usando la técnica de random primer. Después de la hibridación, la membrana se lavó varias veces: (1) SSC 2X, 0.2% SDS a temperatura ambiente durante 15 min; (2) 0.2% SSC, 0.2% SDS a temperatura ambiente durante 15

min; (3) 0.2% SSC, 0.2 % SDS a 65° C 15 min. Después el blot se expuso a -80° C sobre película Kodak MS durante toda la noche.

Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* por el método de inmersión

Crecimiento de las plantas

Para la transformación de *A. thaliana* se siguió el método de Clough y Bent, (1998). Primero las de semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia se crecieron en macetas con tierra Metromix 200. Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento con 8 h luz y 16 h de oscuridad. Se utilizó una combinación de lámparas fluorescentes e incandescentes para obtener una intensidad de 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a una temperatura de 22° C y a una humedad de 50-60%. Se podaron los primeros brotes florales y con ello se logró la emergencia de múltiples brotes secundarios.

Al iniciar la floración las plantas se infectaron con *A. tumefaciens* cepa LBA4404 transformadas con el vector binario Bin-19 3X35S en el cual se clonó el transportador *hxt2* (Clough y Bent, 1998). Las bacterias se cultivaron en medio LB líquido con antibiótico (Kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, Rifampicina 100 $\mu\text{l/ml}$, Streptomicina 300 $\mu\text{g/ml}$) a 25-28°C con agitación constante de 200 rpm. El cultivo se inició a partir de una dilución 1:100 de un pequeño precultivo crecido bajo las mismas condiciones.

Las células fueron cosechadas por centrifugación durante 20 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente; fueron resuspendidas en medio de infiltración (5.0 % (p/v) de sacarosa) y diluidas hasta alcanzar una DO_{600} de aproximadamente 0.80. Posteriormente, se añadió 0.05 % del surfactante Silwet L-77, y a continuación las inflorescencias de las plantas se introdujeron en esta suspensión durante 3-5 seg. Las plantas fueron colocadas en sombra tapadas con plástico para conservar la humedad. Al día siguiente se regresaron a la cámara de crecimiento. Las cubiertas de plástico fueron retiradas 24 h después del tratamiento. Las plantas se dejaron crecer por cuatro o cinco semanas hasta que

las silicuas maduraron. Las semillas de cada planta fueron cosechadas independientemente y guardadas en tubos eppendorff a 4°C en un ambiente seco.

Selección de probables transformantes usando antibióticos como marcadores

Las semillas fueron desinfectadas con un tratamiento que incluyó un lavado con etanol al 95% por 30-60 seg, después se eliminó y se le agregó una mezcla de blanqueador comercial al 50% (2.6 % concentración final de hipoclorito de sodio,) y Tween 20 al 0.05 % (Clough y Bent, 1998). Después de 10 minutos, se dieron diez lavados con agua estéril. Posteriormente, se sembraron 500 semillas en caja con medio de selección (Gamborg's B-5 0.02 g/ml, (Gibco BRL); agar 0.8% y Kanamicina 50µg/ml), se colocaron dos días a 4°C y se trasladaron a un régimen de 8 h luz /16 h oscuridad con 120 µmol m⁻² s⁻¹ durante 10 días a 24°C.

Después de 10 días, las plantas que crecieron normalmente en el medio anterior y fueron transplantadas a tierra (Metromix 200, Scott®), en donde se cultivaron bajo las condiciones descritas. Estas plantas se autopolinizaron y la selección en Kanamicina se repitió hasta que todas las semillas mostraron la capacidad de crecer en presencia de éste antibiótico.

Pruebas para determinar la presencia del transportador HXT2 en las plantas transgénicas.

Para determinar la presencia del gen que codifica para el transportador HXT2 de levadura, se aisló DNA genómico a partir de hoja, usando el protocolo del Plant DNAzol (Promega). Primero (0.1 g) se molió en un mortero con nitrógeno líquido. Usando una espátula el tejido pulverizado se paso a un tubo eppendorff conteniendo 300 µl de la solución Plant DNAzol. Se mezcló con agitación suave y se incubó a 25°C con agitación suave durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionó 300 µl de cloroformo mezclando fuertemente y se incubó a 25°C 10 min. Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se colocó en un tubo limpio, donde se le añadió 225 µl de etanol absoluto y se incubó 5

minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se centrifugó a 1,000 rpm durante 4 min. Posteriormente, el DNA se lavó con 775 μ l de etanol absoluto y se centrifugó a 1,000 rpm durante 10 min. Para limpiar más la muestra de DNA se dio de un segundo lavado con 300 μ l de etanol al 70% centrifugando a 1,000 rpm durante 10 min. Por último se decantó el etanol y se resuspendió el DNA en 70 μ l de agua estéril.

Determinación del gen del transportador hxt2 por PCR

El DNA genómico de las líneas transgénicas y de las plantas silvestres purificado en el paso anterior se usó como molde para la amplificación por PCR del gen del transportador *hxt2* empleando las mismas condiciones que permitieron su amplificación a partir de DNA de levadura (ver página 16).

Determinación del gen del transportador hxt2 por Southern-blot

El DNA genómico (30 μ g) del se separaron en tres volúmenes de 20 μ l y se digirió con tres enzimas por separado: *Xba* I, *Pst* I, *Bst* I. El DNA cortado se separó en un gel de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nylon (Amersham). Se hibridó con la sonda del transportador *hxt2* usando el procedimiento descrito previamente.

Cuantificación de azúcares en plantas transgénicas de A. thaliana

Preparación de extractos para medir azúcares solubles y almidón

Para cuantificar azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón, se usaron plantas de 4 semanas de crecimiento (antes de la floración). La muestra (hojas y raíces) se pesó y se realizó un extracto con etanol al 80 % (3 ml etanol/g de tejido). El macerado se pasó a un tubo limpio y se calentó a 80°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se puso en otro tubo. Al sedimento se le agregó 1 ml de etanol al 80 %, se mezcló y se incubó a 80°C durante 30 min y se centrifugó a 2,000 rpm. El sobrenadante se mezcló con el anterior y fue usado para determinar la concentración de azúcares

solubles. El sedimento se resuspendió en 1.5 ml de agua y se calentó a 90°C durante 4 h, posteriormente se usó para determinar almidón.

Determinación de sacarosa por el método de antrona (van Handel, 1968)

Se tomaron 50 μ l de extracto etanólico y se mezclaron con 50 μ l de KOH al 30%. La mezcla se calentó a 90°C durante 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente, después se agregaron 2 ml de reactivo de antrona (50 mg de antrona/100 ml de H₂SO₄ al 70 %). La mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos y se registró la absorbencia a 620 nm. Siguiendo el mismo procedimiento se realizó una curva patrón de sacarosa. La clorofila de los tejidos fotosintéticos interfiere con el ensayo y para removerla se uso carbón activado: 1 ml de extracto con 50 mg de carbón activado. Después se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos y una vez clarificado fue usado para medir sacarosa, glucosa ó fructosa.

Determinación de glucosa y fructosa

Para evaluar el contenido de glucosa y fructosa se uso un método enzimático. Este método se basa en la fosforilación de las hexosas con la hexocinasa de levadura y la posterior detección espectrofotométrica del NADH formado por la acción de la glucosa 6-P deshidrogenasa (glu6-PDH) de *Leuconostoc mesenteroides*.

Se preparó una mezcla de reacción que contenía lo siguiente: 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 0.3 mM NAD⁺ y 1 Uml⁻¹ de hexocinasa de levadura. Se agregó la muestra y después de mezclar todos los componentes se hizo la primera lectura de la absorbencia a 340 nm. Se agregó 1U de glu-6-PDH y una vez que la lectura a 340 nm se estabilizó se registró su valor. Posteriormente se agregó 1U de fosfoglucosa isomerasa (PGI) y nuevamente se esperó que la lectura se estabilizara para registrar su valor. La diferencia entre la lectura inicial y la obtenida después de agregar glu-6-PDH fue usada para calcular la concentración de glucosa. La concentración de fructosa fue estimada a partir de la diferencia entre la lectura obtenida después de agregar glu-6-PDH y la observada después de incluir PGI.

Cuantificación de almidón

El almidón ya gelatinizado fue mezclado con amiloglicosidasa de *Rhizopus* (Sigma) disuelta a 7 mg/ml en amortiguador de acetatos 0.2 M pH 4.5. Esta solución se mezcló en proporción 1:1 con la solución de almidón gelatinizado y se incubó toda la noche a 37°C, al día siguiente se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue usado para medir glucosa con el ensayo enzimático previamente descrito.

Medición de toma de glucosa, fructosa y sacarosa en raíces

Los experimentos de toma de azúcares se realizaron de acuerdo con el procedimiento de Damon et al. (1988). Las plantas usadas en este experimento (transformadas con el gen del transportador *hxt2* y con el vector vacío) fueron seleccionadas por su capacidad para crecer en medio con Kanamicina, después de lo cual fueron cultivadas en medio líquido (medio B5) con agitación constante de 200 rpm durante dos semanas.

Las raíces de las plantas cultivadas en medio líquido se lavaron con amortiguador que contenía: 5 mM MES pH 6, 5 mM KCl, 0.5 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂ y posteriormente, se incubaron por 1 h a 25°C en las soluciones por separado: sacarosa-U-[¹⁴C] 25 mM (0.2 μCi/μmol), glucosa-U-[¹⁴C] 25 mM (0.2 μCi/μmol) y fructosa-U-[¹⁴C] 25 mM (0.2 μCi/μmol). Simultáneamente, se colocó en la parte superior de los tubos destapados un fragmento de papel filtro con una gota de KOH al 30%, esto con el fin de atrapar el ¹⁴CO₂ liberado por las raíces. Al término del experimento los papeles filtro se colocaron en otro tubo con líquido de centelleo (ASC II, Amersham Corp). Por otro lado, las raíces se lavaron cinco veces con agua fría y se homogenizaron con etanol al 80 %, posteriormente los extractos se centrifugaron a 13, 000 rpm durante 10 min y se midió la radiactividad presente en esta fracción (Contador de centelleo líquido LS 6500 Beckman-Counter)

Asimilación de carbono y distribución de fotosintatos

Para medir la incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ (Viola, 2002), se utilizaron plantas de tres semanas. El marcaje se hizo utilizando 50 μCi de $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ (25 μl), que se colocaron en tubos eppendorf dentro de bolsas de plástico que cubrían a todas las plantas, el $^{14}\text{CO}_2$ se generó agregando 200 μl de ácido láctico 3 M. Las plantas se marcaron durante una hora, al término de la cual la reacción se detuvo con 800 μl de una solución de KOH al 30 %. Se retiró la bolsa y las plantas se cosecharon después de 1 1/2 h. Se hicieron extractos de hojas y de raíz con etanol al 80 %, los extractos se calentaron 30 minutos a 80°C y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 min. Posteriormente, el precipitado se lavó una vez más y se juntaron los sobrenadantes para medir la marca incorporada en la fracción de azúcares solubles. El precipitado se trató siguiendo el método descrito para cuantificar almidón. En este caso después de la hidrólisis con amiloglucosidasa, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos y se determinó la marca en el sobrenadante. En ambos casos el análisis se hizo usando el contador de centelleo (LS 6500 Beckman-Counter) y usando líquido de centelleo ASC II (Amersham Corp).

RESULTADOS

Clonación del transportador HXT2

Amplificación por PCR del gen del transportador *hxt2*.

Usando la secuencia del gen del transportador *hxt2* de *S. cerevisiae*, se diseñaron oligonucleótidos específicos (ver materiales y métodos) para su amplificación a partir de DNA genómico. En la figura 5 se observa que los oligonucleótidos usados amplificaron un banda de 1.6 Kpb la cual es del tamaño esperado para el gen *hxt2*. Los diferentes carriles corresponden a diferentes amplificaciones. Las bandas que se observan en la imagen fueron cortadas y purificadas para clonarlas en el vector pGEM-T. Las bandas de menor intensidad que se observan abajo del gel, son amplificaciones de secuencias inespecíficas que se produjeron en la reacción de PCR.

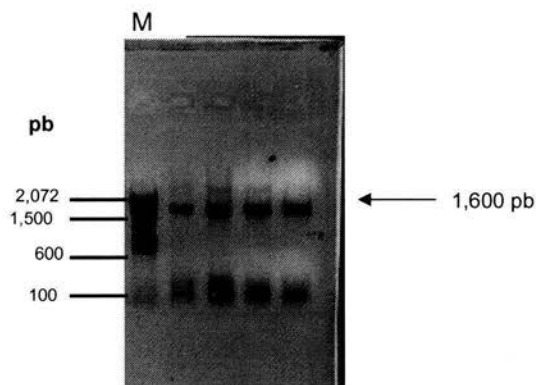


Figura 5. Amplificación del gen *hxt2* mediante una reacción de PCR usando primers específicos. El producto obtenido es una banda con el peso esperado (1.6 Kpb). M. Marcadores de peso molecular.

Clonación en pGEM-T

El producto de PCR se purificó y se clonó en el vector pGEM-T (Promega). La reacción de ligación se realizó aprovechando los extremos de timina que posee el vector (Fig. 3, materiales y métodos). Una vez que las colonias recombinantes fueron seleccionadas por su capacidad para crecer en el medio con ampicilina (50 µg/ml), se purificó el plásmido y se cortó con *Xba* I y *Bam* HI liberando el inserto que corresponde al tamaño del transportador (1.6 Kpb). Por otro lado, el vector posee sitios de corte *Eco* RI cercanos a los extremos del inserto clonado, de tal forma que se libera de forma completa (Fig. 3, materiales y métodos). La figura 6 muestra el análisis de restricción; en los carriles 2 y 3 se linearizó el vector con las enzimas *Xba* I y *Bam* HI respectivamente, sitios en donde se clonó el gen del transportador *hxt2* y que dan como producto una banda un tamaño de ~4.6 Kpb (vector y gen del transportador). En el carril 4 el plásmido se cortó con las enzimas *Xba* I y *Bam* HI cuyos sitios están presentes en los oligonucleótidos usados para amplificación original del gen del transportador *hxt2*. En el carril 5 el plásmido se cortó con la enzima *Eco*RI la cual tiene sitios que flanquean a las secuencias donde fue clonado el gen del transportador. En ambos casos se obtuvo una banda de 1.6 Kpb.

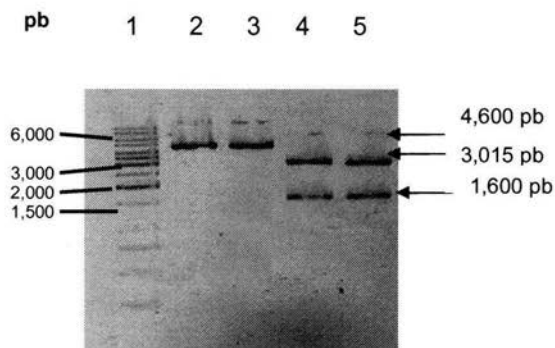


Figura 6. Clonación del gen del transportador *hxt2* en el vector pGEM-T. 1, Marcadores de peso molecular; 2., pGEM-T linearizado con *Xba* I; 3, pGEM-T linearizado con *Bam* HI; 4, digerido con *Xba* I y *Bam* HI para liberar el inserto; 5, digerido con *Eco*RI para liberar el inserto.

Secuenciación del gen del transportador *hxt2*

El DNA usado para el análisis de restricción también fue secuenciado (Fig. 7). En la imagen se observa la secuencia completa del gen *hxt2*. También se muestra los sitios de corte de las enzimas de restricción (*Xba* I y *Bam* HI) que se emplearon para clonar el gen *hxt2*.

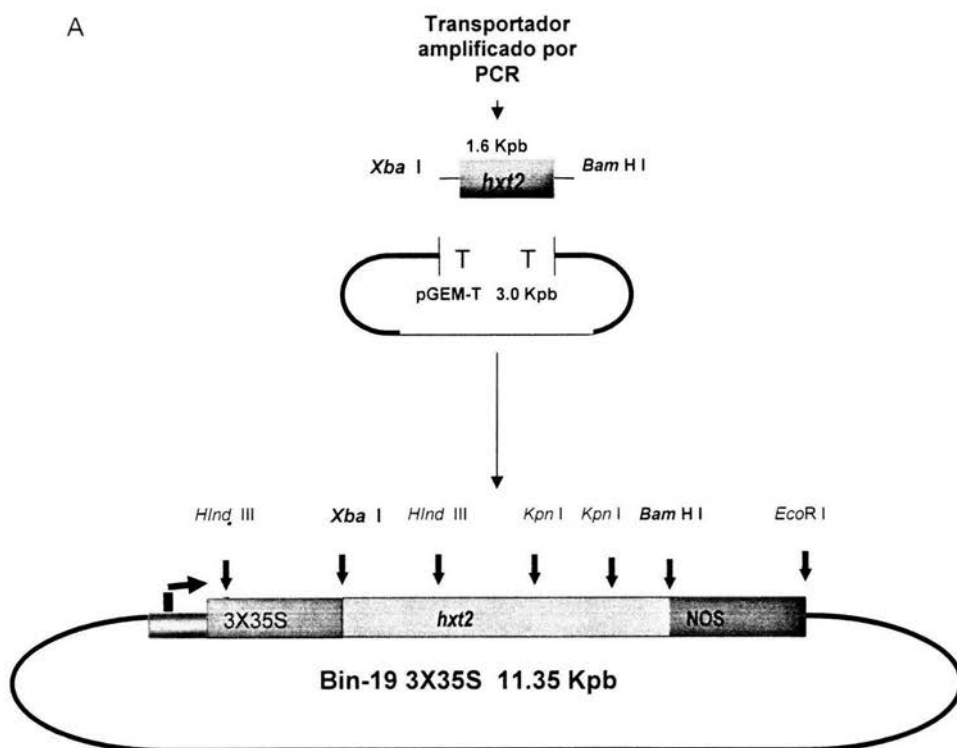


Figura 7. Secuencia del gen del transportador *hxt2*. Las flechas indican los sitios de corte de las enzimas de restricción.

Clonación del gen del transportador hxt2 en el vector binario 3X35S

Una vez que se comprobó la identidad de la secuencia del gen del transportador *hxt2* se procedió a clonarlo en el vector binario pBin-19 3X35S, el cual tiene la ventaja de poseer tres copias del promotor 35S haciendo más fuerte la expresión (Fig. 4). La figura 8A muestra el esquema de la clonación del gen del transportador *hxt2* en los vectores pGEM-T y pBin-19 3X35S con los sitios de restricción del gen *hxt2* seleccionados para el análisis de restricción en gel de agarosa. La figura 8B muestra que cuando el vector binario pBin-19 3X35S recombinante es digerido con *Kpn* I, de acuerdo con lo esperado se libera un fragmento de aproximadamente 1,000 pb. De igual forma la digestión con *Hind* III liberó un fragmento de aproximadamente 2,000 pb.

A



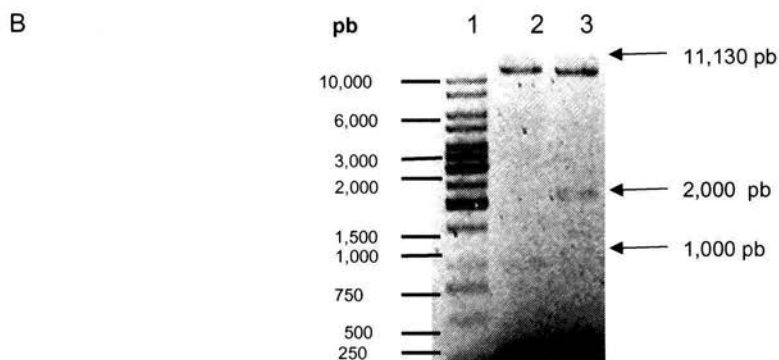


Figura 8. Clonación del gen *hxt2* en el vector binario pBin-19 3X35S. A. Esquema del procedimiento para la clonación del gen del transportador HXT2 en el vector binario pBin-19 3X35S. B. Análisis de restricción del vector Bin-19 3X35S. 1, marcadores de peso molecular; 2, vector 3X35S cortado con *Kpn* I; 3, vector 3X35S cortado con *Hind* III.

Transformación de *A. tumefaciens*

Verificación por PCR

El vector binario pBin-19 recombinante fue usado para transformar *A. tumefaciens*. Las colonias recombinantes se analizaron por PCR utilizando los mismos oligonucleótidos con las condiciones que permitieron la amplificación del gen del transportador *hxt2* a partir de DNA de levadura. En la figura 9 se observa la amplificación de una banda de 1.6 Kpb del gen *hxt2*, tanto de la reacción con molde de asada de las colonias completas recombinantes como con plásmido purificado de colonias recombinantes.

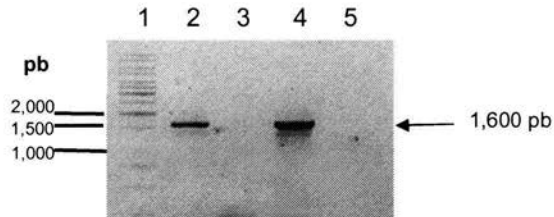


Figura 9. Análisis por PCR de la presencia del gen *hxt2* en *A. tumefaciens*. 1, marcadores de peso molecular; 2, producto de PCR de colonia recombinante; 3, producto de PCR de colonia no recombinante; 4, producto de PCR de plásmido purificado a partir de colonia recombinante; 5, producto de PCR de plásmido vacío.

Análisis del gen *hxt2* por Southern-blot

Con el fin de comprobar que la amplificación por PCR era la secuencia del gen del transportador *hxt2* en *A. tumefaciens* se realizó un análisis de Southern-blot, para lo cual los productos de PCR analizados en la figura 9 se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con la sonda de DNA del transportador marcado con [α - 32 P]. La figura 10 muestra que el patrón de hibridación de las colonias recombinantes es el mismo que cuando se utiliza el transportador y se hibrida consigo mismo.

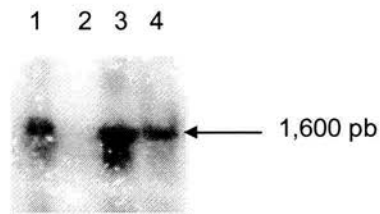


Figura 10. Análisis por Southern-blot de la presencia del gen *hxt2* en *A. tumefaciens*. 1, control positivo, transportador *hxt2* amplificado por PCR a partir de DNA de levadura; 2, control negativo, plásmido 3X35S vacío linealizado con *Hind* III; 3, producto de PCR usando como molde al vector recombinante; 4, producto de PCR usando como molde una asada de colonia recombinante completa.

Transformación de *A. thaliana***Escrutinio de las plantas transgénicas**

Una vez que se verificó que la secuencia del gen *hxt2* estuviera clonada en el vector binario Bin-19 3X35S y que la transformación de *A. tumefaciens* había ocurrido se prosiguió a la transformación de *A. thaliana*. Un total de 32 plantas de 6 semanas de edad fueron usadas para la transformación con *A. tumefaciens* (procedimiento en materiales y métodos) y se cosecharon semillas de cada planta. Posteriormente en un primer escrutinio se sembraron alrededor de 13 mil semillas en medio de selección (Kanamicina 50 µg/ml) de donde sólo se obtuvieron tres líneas. En la figura 11, las flechas indican a los cotiledones de una planta creciendo sana en el medio de selección con Kanamicina, mientras que las plantas no transgénicas mueren poco después de haber germinado.

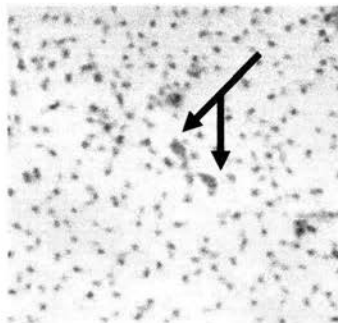


Figura 11. Escrutinio de las plantas transgénicas. En la imagen se muestra la selección de las plantas transgénicas en medio con Kanamicina 50µg/ml.

Después de que las plántulas desarrollaron la primera hoja, se transplantaron en tierra (Metromix 200, Scotts®) y se colectaron por separado las semillas de cada planta. Algunas de ellas se sembraron de nuevo en Kanamicina para obtener la T1, las que germinaron se sembraron en suelo y se repitió el ciclo hasta que todas las semillas fueron capaces de crecer en presencia de Kanamicina.

Análisis de las plantas transgénicas

Análisis por PCR

Para comprobar la presencia del gen *hxt2* se usaron plantas T2 que previamente habían sido seleccionadas por su capacidad para crecer en medio con kanamicina. Usando DNA genómico purificado de hojas de dos líneas transgénicas (ver materiales y métodos) se amplificó por PCR la secuencia del transportador *hxt2*. En la reacción de PCR se usaron los mismos oligonucleótidos y condiciones con lo que se amplificó la secuencia del gen del transportador *hxt2* a partir de DNA genómico de levadura. La figura 12 muestra que en las dos líneas analizadas se amplificó una banda que corresponde al tamaño del gen para el transportador (1.6 Kpb). En el carril 4 se cargó la mezcla de reacción de PCR en donde se usó como molde DNA de hoja de planta silvestre, y como se puede observar no hubo amplificación alguna.

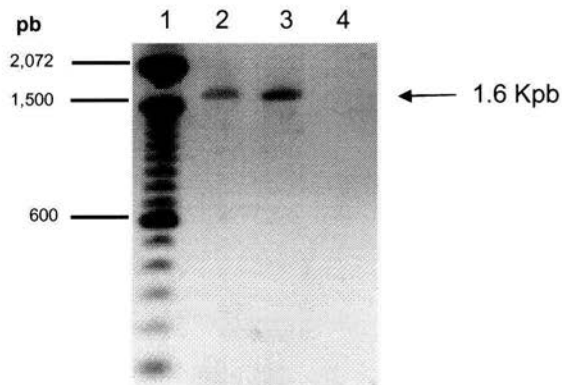


Figura 12. Análisis por PCR de plantas transgénicas de *A. thaliana*. 1, marcadores de peso molecular; 2 y 3, producto de la amplificación por PCR del transgen *hxt2* a partir de DNA genómico de las plantas L1 y L2 respectivamente; 4, control en donde para la amplificación se usó como templado DNA genómico de plantas silvestres.

Análisis por Southern-blot del gen *hxt2*

Por otro lado, el DNA genómico de las dos líneas transgénicas se digirió con las enzimas *Pst* I, *Bst*X I y *Xba* I por separado (ver materiales y métodos). Las muestras se separaron en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente, el DNA se transfirió a una membrana de nylon (Amersham) y se hibridó con el gen del transportador *hxt2* marcado con [α - 32 P]. La figura 13 muestra que el patrón de hibridación es diferente lo cual significa que las dos líneas son independientes.

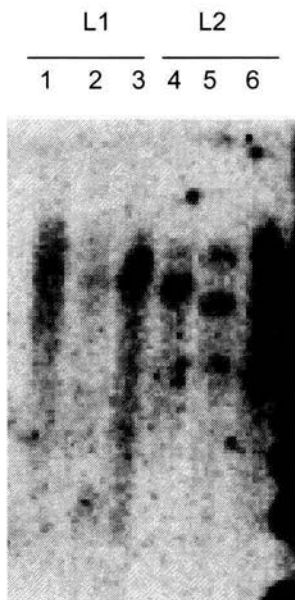


Figura 13. Análisis por Southern-blot de líneas transgénicas (L1 y L2). Los carriles 1, 2 y 3 corresponden al DNA genómico de la línea transgénica L1 digerido con *Pst* I, *Bst* X1, *Xba* I, respectivamente. Los carriles 4,5 y 6 al DNA genómico de la línea transgénica L2 digerido con *Pst* I, *Bst* X1, *Xba* I, respectivamente.

Análisis del fenotipo presentado en las plantas transgénicas.

Algunas de las plantas que se sembraron en tierra se dejaron crecer hasta antes de la floración para realizar un análisis del número y peso de las hojas, longitud y peso del tallo y raíz. Los resultados se presentan en la tabla 1. Las plantas transgénicas de la L2 presentan mayor número de hojas en la roseta y en el tallo, mientras que el número de hojas en la roseta de las plantas de la L1 es muy similar al de las plantas silvestres. Estas diferencias se reflejan en el peso total de las hojas en donde la L2 es claramente superior al de las plantas silvestres y de la L1. En cuanto a los efectos en la raíz principal, se observa que la longitud en las plantas transgénicas se ve afectada. En la L1 la reducción es ligera, mientras que en la L2 la disminución fue de 30% con respecto a las plantas silvestres. Por otro lado, de manera interesante, se observó que el peso fresco de la raíz de las plantas silvestres es el doble que el de las plantas transgénicas.

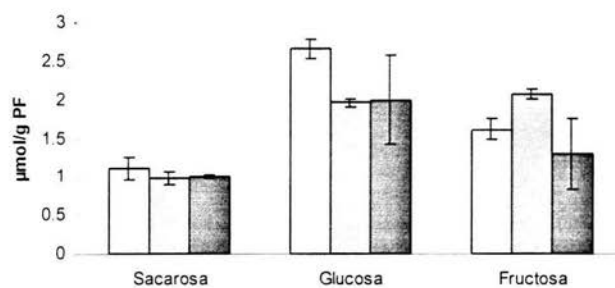
Tabla 1. Análisis del fenotipo de plantas silvestres y de 2 líneas transformadas con el gen *hxt2* de levadura. n=3. PF= peso fresco.

Tejido		Silvestre	L1	L2
Hojas	Roseta (No)	13.3 ± 2.52	8.67 ± 1.15	19.67 ± 3.21
	Tallo (No)	1.67 ± 0.58	3.0 ± 0.00	3.0 ± 0.00
	Peso del total de hojas en roseta (g) PF	0.08 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Tallo	Longitud (cm)	13.0 ± 0.00	11.5 ± 1.50	13.33 ± 0.58
	Peso con hojas (g) PF	0.16 ± 0.07	0.1 ± 0.01	0.23 ± 0.02
Raíz	Longitud de raíz principal (cm)	10.67 ± 1.50	9.67 ± 1.15	7.33 ± 1.15
	Peso (g) PF	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.0	0.02 ± 0.01

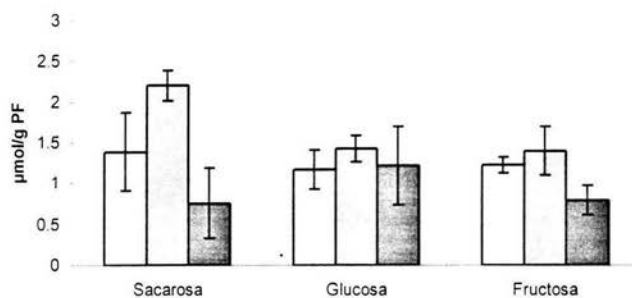
Efecto de la expresión del transportador sobre la fisiología de la planta**Efecto sobre los niveles de azúcares (solubles y almidón)**

Las plantas sembradas en maceta se dejaron crecer hasta poco antes de iniciar la floración, en este punto se midieron azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón en hojas, tallos y raíces. Los niveles de azúcares solubles en tallo y hojas no mostraron variación significativa con respecto a las de las hojas de las plantas silvestres (Figs. 14A y 14B). Sin embargo, las raíces de las líneas transgénicas mostraron mayores niveles de glucosa y fructosa (Fig. 14C).

A



B



C

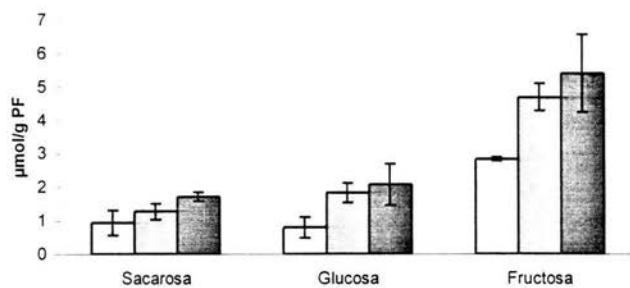


Figura 14. Concentración de azúcares solubles en tallo (A), hoja (B) y raíz (C). Plantas silvestres \square y plantas transgénicas L1 \square , L2 \blacksquare . Estos resultados son la media \pm DE ($n=3$).

En lo que se refiere a los niveles de almidón, los resultados muestran que en las hojas y tallo no hay diferencias importantes entre las plantas silvestres y plantas transgénicas. Sin embargo, en las raíces de las plantas transgénicas la cantidad de almidón fue el doble de lo observado en las plantas silvestres (Fig. 15).

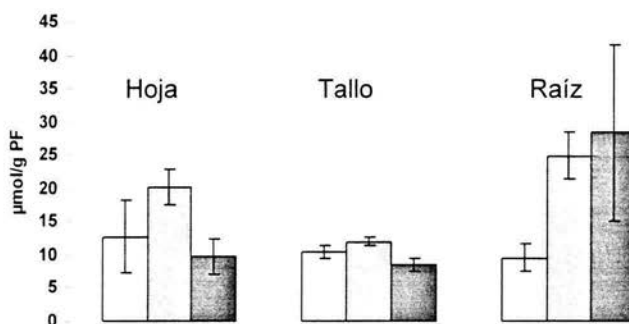
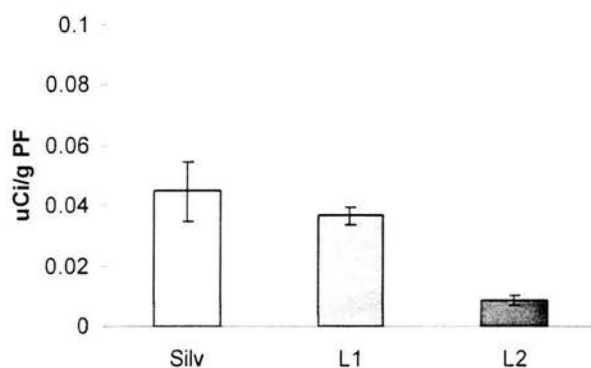


Figura 15. Concentración de almidón en hoja, tallo y raíz de plantas silvestres □ y transgénicas L1 □, L2 ■. Estos resultados son la media \pm DE ($n=3$).

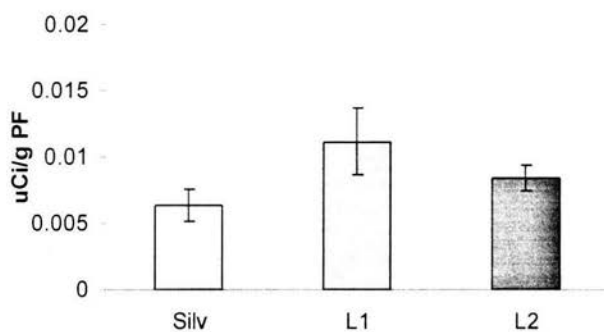
Medición de toma de glucosa, fructosa y sacarosa en raíces

Con el fin de investigar el efecto del transportador HXT2 sobre la incorporación de azúcares, se realizó un experimento en donde las raíces de plantas cultivadas en medio líquido se incubaron por 1 h a 25°C en las siguientes soluciones: sacarosa-U- ^{14}C 25 mM (0.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), glucosa-U- ^{14}C 25 mM (0.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) y fructosa-U- ^{14}C 25 mM (0.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). En este experimento se cuantificó tanto la incorporación total como la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ (ver materiales y métodos). Los resultados obtenidos muestran que en estas condiciones, las líneas transgénicas no acumulan más sacarosa, glucosa o fructosa que las plantas silvestres (Figs. 16 A, B y C). Por otro lado, cuando se midieron los niveles de la marca liberada como $^{14}\text{CO}_2$ (Fig. 17) se observó que en todos los casos las raíces de las plantas transgénicas liberan 2 veces más $^{14}\text{CO}_2$ que las plantas silvestres, lo cual implica un aumento importante en la respiración.

A



B



C

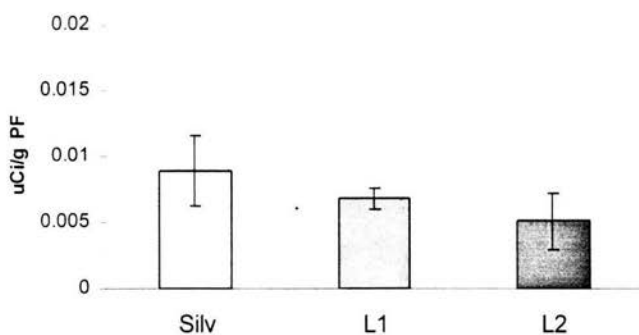
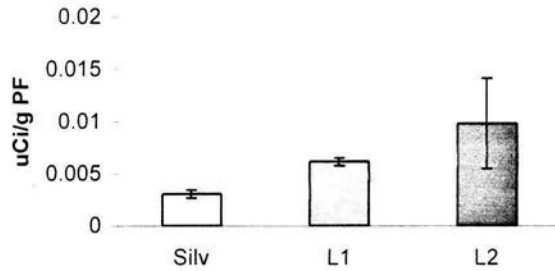
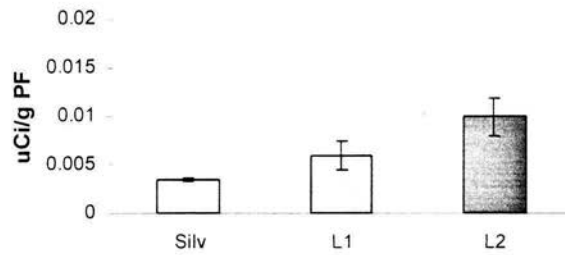


Figura 16. Incorporación de azúcares marcados por raíces cultivadas en medio líquido e incubados con: sacarosa (A), glucosa (B) y fructosa (C). Plantas silvestres □ L1, ◻ L2 ■. Estos resultados son la media \pm DE ($n=3$).

A



B



C

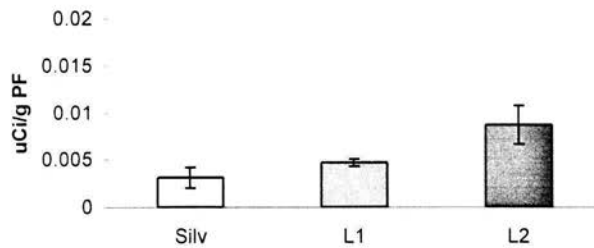
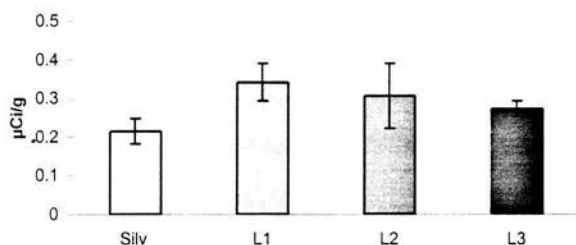


Figura 17. $^{14}\text{CO}_2$ respirado por raíces cultivadas en medio líquido e incubadas con: sacarosa (A), glucosa (B) y fructosa (C). Plantas silvestres □, L1 ◻, L2 ◼. Estos resultados son la media \pm DE ($n=3$).

Efecto del transportador *Hxt2* sobre la distribución de fotosintatos

Para investigar el efecto del transportador sobre la distribución de fotosintatos, se cultivaron plantas en tierra. Cabe mencionar que para estos experimentos se adicionó una línea transgénica más (L3). Antes del desarrollo del tallo floral, las plantas se incubaron durante 1 hora con $^{14}\text{CO}_2$. Se dejó otra hora para que la marca se distribuyera en toda la planta, después se realizaron extractos etanólicos de hojas y raíces y se cuantificó la marca en la fracciones de azúcares solubles y de almidón (ver material y métodos). En hojas dependiendo de la línea transgénica, la marca en la fracción de azúcares solubles mostró incrementos que llegaron a ser de hasta el 50% con respecto a las plantas silvestres (Fig. 18 A). Por su parte en las raíces de las plantas transgénicas la marca en la fracción de azúcares solubles llegó a ser hasta el 80 %, superior al valor observado en las plantas silvestres (Fig. 18 B).

A



B

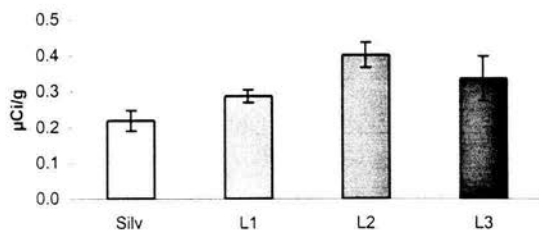
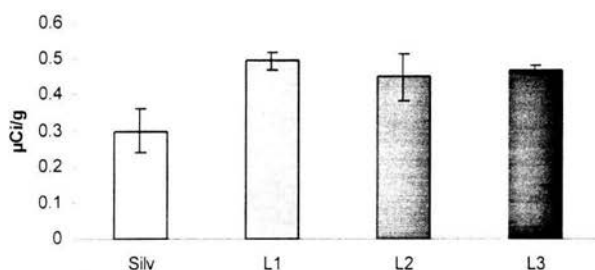


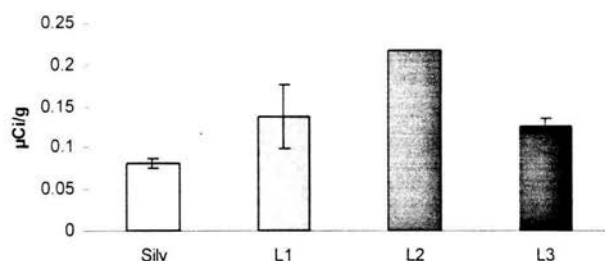
Figura 18. Incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ en azúcares solubles de hojas (A) y raíces (B). Plantas silvestres □, L1 □, L2 ■, L3 ■. Estos resultados son la media \pm DE ($n=3$).

El análisis de la fracción de almidón mostró que la marca presente en hojas (Fig. 19A) y raíces (Fig. 19B) de las plantas transgénicas aumentó considerablemente. El efecto más claro se observó en las raíces de la línea dos (L2) que presenta un valor 2.5 veces mayor al de las plantas silvestres.

A



B



Gráfica 19. Incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ en almidón de hojas (A) y raíces (B). Plantas silvestres □, L1 □, L2 ■, L3 ■. Estos resultados son la media \pm DE ($n=3$).

DISCUSIÓN

La comunicación entre los órganos fuente y demanda es importante para el adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas.

Desde el punto de vista práctico, el estudio de los factores que determinan la forma en que las plantas distribuyen los fotosintatos es también muy importante, pues podría ayudar al desarrollo de estrategias para hacer que las plantas acumulen más fotosintatos en los órganos de interés (granos, frutos, tubérculos, etc; Zamski, 1996).

La descarga de la sacarosa en los tejidos demanda puede ocurrir por vía simplástica o por vía apoplástica (Oparka, 1988), dependiendo del tejido en cuestión puede predominar una o la otra. En algunos órganos como tubérculo de papa, la ruta más importante durante todo el desarrollo es la simplástica (Viola et al., 2001), mientras que en otros como en el caso de la raíz de *Arabidopsis* o los frutos de jitomate, se da un cambio controlado por el desarrollo: en las partes más jóvenes de la raíz o en las etapas iniciales del desarrollo del fruto de jitomate predomina la vía simplástica y a medida que los tejidos maduran la ruta apoplástica se vuelve más importante (Oparka et al., 1994; Ruan y Patrick, 1995).

En aquellos tejidos en donde la vía predominante es la apoplástica la cantidad de azúcar que entra a las células está determinada por la actividad de los transportadores ubicados en la membrana plasmática. Por otro lado, la sacarosa descargada en el apoplasto es muy probable que sea hidrolizada por la invertasa de pared (Sonnewald et al., 1997). Esto sugiere que en órgano donde la descarga del floema es vía apoplasto la actividad de los transportadores sea muy importante.

Las actividades de los transportadores de monosacáridos han sido analizadas en una gran variedad de plantas. En contraste a los transportadores de monosacáridos de levaduras que funcionan como uniportadores, los de *Chlorella*, *Arabidopsis* y de otras plantas funcionan como cotransportadores con protones. (Aoshima et al., 1993; Sauer et al., 1990). Sin embargo, los genes de

transportadores de levaduras y plantas son homólogos y todos ellos codifican para proteínas de 12 regiones transmembranales (Lalonde et al., 2004).

El estudio de los transportadores de hexosas en plantas se ha visto complicado por el alto grado de redundancia, en *A. thaliana* se conocen por lo menos 26 genes (Lalonde et al., 1999) y 13 en *O. sativa* (Toyofuku et al., 2000). Esto implica que para observar cambios fenotípicos se requiere la manipulación simultánea de varios transportadores.

En este trabajo se buscó analizar la importancia de la capacidad de los órganos de demanda para asimilar azúcares como un elemento que podría regular la forma en que se distribuyen los fotosintatos en la planta. Por las facilidades que ofrece *A. thaliana* (cultivo, transformación genética e información disponible) esta especie fue escogida como modelo experimental. Sabemos que en las raíces maduras de *A. thaliana* los fotosintatos se descargan vía apoplasto (Oparka et al., 1994), lo cual sugiere que en esos tejidos la capacidad de asimilación depende de los transportadores ubicados en la membrana celular (Rentsch et al., 1998). Por otro lado, la caracterización detallada del patrón de expresión del promotor 35S indica que si bien es constitutivo, se expresa más fuertemente en la raíz (Benfley et al., 1989), motivo por el cual se decidió utilizarlo para dirigir la expresión del transportador HXT2 de *S. cerevisiae* en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Siendo éste uno de los transportadores de glucosa y fructosa que mejor se conocen (Reifenberger et al., 1997).

Pensamos que las plantas transgénicas resultantes pueden ser un modelo adecuado para estudiar los efectos bioquímicos y fisiológicos que se producen cuando algunos órganos incrementan su capacidad para asimilar hexosas.

La transformación permitió obtener 2 líneas transgénicas independientes. El rendimiento obtenido fue de 0.2%, similar al 0.5 % reportado por Clough y Bent, (1998). El análisis por Southern-blot mostró que la línea 2 probablemente tenga más copias del transgen que la línea 1 (Fig. 13). Las evaluaciones revelaron que las plantas transgénicas tenían más hojas y raíces más pequeñas (Tabla 1) y que acumulaban cantidades mayores de glucosa, fructosa y almidón en las raíces (Figs.14 C y 15). La acumulación de azúcares en la raíz es congruente con el

hecho de que las plantas transgénicas envían más fotosintatos a las raíces (Figs. 18 y 19). Sin embargo, es difícil explicar el menor crecimiento de la raíz (Tabla 1). Se ha reportado que altas concentraciones de glucosa (167 mM) puede inhibir el crecimiento de las raíces (Price et al., 2003). En las regiones jóvenes (en crecimiento) la descarga del floema es fundamentalmente vía simplasto (Oparka, 1994) y por lo mismo, es poco probable que la expresión del transportador HXT2 modifique la capacidad de asimilación de azúcares en esas regiones. Así que es posible que el metabolismo se modifique como resultado del aumento en la concentración de azúcares. En tubérculos de papa se observó que al incubarlos con concentraciones relativamente elevadas de azúcares, no se favoreció la síntesis de almidón y en lugar de ello hubo un aumento muy importante en la respiración (Geiger et al., 1998).

Por otro lado, al analizar la marca incorporada en las hojas después de la incubación con $^{14}\text{CO}_2$, se observó que las líneas transgénicas presentan valores más altos que las plantas silvestres (Fig. 18). Esto probablemente indique que en las plantas transgénicas haya un aumento en la actividad fotosintética para compensar el incremento en la demanda de azúcares.

Fue extremadamente difícil aislar las raíces de las plantas cultivadas en suelo (bajo rendimiento y grado de deterioro del material aislado) y, por ello, se decidió hacer algunos experimentos con las raíces de las plantas cultivadas en medio líquido. Si bien las condiciones de cultivo son muy distintas y, por lo mismo, los resultados pueden no ser directamente comparables con los obtenidos a partir de plantas cultivadas en suelo, la información resultante podría dar indicios de las posibles causas por las cuales las raíces de las plantas transgénicas son considerablemente más pequeñas a pesar de que aparentemente están recibiendo más fotosintatos.

Las raíces de las plantas cultivadas en medio líquido fueron incubadas en soluciones de azúcares radiactivos. Los resultados mostraron que en comparación a las raíces de las plantas silvestres, las de las plantas transgénicas liberaban más $^{14}\text{CO}_2$. Esto puede sugerir que al igual que en tubérculos de papa, el aumento en la concentración de azúcares puede estimular la respiración (Geiger et al., 1998).

Sin embargo, también es posible que al aumentar el transporte se incremente la actividad específica de las pozas internas. Llama la atención que la sacarosa también se metabolizó (Figs. 16 y 17). Esto podría ser una consecuencia de la actividad combinada de la invertasa de pared y del transportador HXT2.

Consideramos que los resultados obtenidos demuestran que el modificar la capacidad de asimilación de azúcares en los órganos de demanda puede ser un camino adecuado para cambiar la distribución de fotosintatos. Sin embargo, es muy probable que el destino de los azúcares dependa de las características metabólicas de los órganos manipulados, es decir, es probable que las pérdidas sean menores en aquellos tejidos que tengan la capacidad para sintetizar productos carbonados (síntesis de almidón en tubérculos de papa) o bien que posean una alta capacidad de almacenamiento (azúcares en algunos frutos), características que por cierto no son particularmente elevadas en raíces de *A. thaliana*.

CONCLUSIONES

- 1) Las plantas transgénicas modificaron la distribución de fotosintatos: una mayor proporción de los mismos fue enviada a las raíces.
- 2) A pesar de recibir más fotosintatos, las raíces de las plantas transgénicas crecieron menos, probablemente como resultado de un aumento significativo en la respiración.

PERSPECTIVA

La perspectiva inmediata es generar más herramientas (nuevas líneas y anticuerpos específicos para el transportador HXT2) para investigar con mayor detalle los cambios metabólicos que ocurren en los órganos de demanda cuando se incrementa la capacidad de asimilación y el flujo de hexosas.

BIBLIOGRAFÍA

Aoshima, H., Yamada, M., Sauer, N., Komor, E., Schobert, C. (1993). Heterologous expression of the H⁺/hexose cotransporter from *Chorella* in *Xenopus oocytes* and its characterization with respect to sugar specificity, pH and membrane potential. *Plant Physiol.* **141**, 293-297.

Benfey, N., Ren, L., and Chua, N.H. (1989) The CaMV 35S enhancer contains at least domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J.* **8**, 2195-2202.

Bisson, L. F., Coons, D. M., Kruckeberg, A.L. and Lewis, D.A. (1993) Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 259-308.

Bisson, L.F., and Fraenkel, D.G. (1983) Involvement of kinase in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **80**, 1730-1734.

Boles, E., Hollenberg, C.P. (1997) The molecular genetics hexose transport in yeast. *FEMS. Microbiol. Rev.* **21**, 85-111.

Borgmann K, Sinha P, Frommer WB. (1994). Characterization of the sink-to-source transition in potato tubers. *Plant Sci.* **99**: 97-108.

Boyer, C. (1996) Biochemical Genetics of Carbohydrate Metabolism in Source and Sink Tissue. P 341-367. Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships. Zamski, E., Schaffer, A.A., eds. Marcel Dekker, Inc, New York.

Bugos, R.C. and Thom, M. (1993) Glucose transporter cDNAs from sugarcane. *Plant Physiol.* **103**, 1469-1470.

Bush, D.R. (1993) Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 513-542.

Büttner, M., Truernit, E., Baier, K., Scholz-Starke, J., Sontheim, M., Lauterbach, C., Huss, V.R., and Sauer, N. (2000) AtSTP3, a green leaf-specific, low affinity monosaccharide-H⁺ symporter of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **23**, 175-184.

Casper, C., Huber, S.C., Somerville, C. (1985) Alterations in grown, photosynthesis and respiration in a starch mutant of *Arabidopsis thaliana* (L). Heynh deficient in chloroplast phosphoglucoisomerase activity. *Plant Physiol.* **79**, 1-7.

Chourey, P.S., and Nelson, S.E. (1976) The enzymatic deficiency conditioned by the *Shrunken-1* mutation in maize. *Biochem. Genet.* **14**, 1041-1055.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 2110-2114.

Clough, S.J., Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.* **16**, 735-743.

Craig, J., Dejardin, A., Handley, Hedley., Wang, T.L., Smith, A.M. (1996) A mutation that affects Sucrose Synthase in pea alters C and N metabolism of seeds and nodules. *Plant Physiol III (Suppl).* **139** (abstr).

D^e Aoust, M.a., Yelle, S., Nguyen- Quoc. (1999) Antisense inhibition of tomato fruit Sucrose Synthase decrease fruit setting and sucrose unloading capacity of young fruit. *The Plant Cell.* **11**, 2407-2448.

Damon, S., Hewitt, J., Nieder, M., Bennett, A.B. (1988) Sink metabolism in tomato fruit. II. Phloem unloading and sugar uptake. *Plant Physiol.* **87**. 731-736.

Delrot, S., Atan assova. R., Macrousset, L., (2000) Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim. Biophys. Acta.* **1465**, 285-306.

Dick, P.S., ap Rees, T. (1975) The pathway of sugar transport in roots of *Pisum sativum*. J. Exp. Bot. **26**, 305-314.

Frommer, W.B., and Sonnewald, U. (1995) Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. Journal of Experimental Botany **46**, 585-607.

Gear, M.L. McPhillips, M.L., Patrick, J.W., Mc Curdy, D.W. (2000) Hexose transporter of tomato: molecular cloning expression analysis and functional characterization. Plant Molecular Biology. **44**, 687-697.

Geigenberger, P., and Stitt, M. (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in developing potato tubers and others plant tissue. Planta **189**,329-339.

Geigenberger, P., and Stitt, M. (2000) Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis, and *AGPS* transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase. The Plant Journal **23**, 795-806.

Geingerberger, P. (2003) Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. J. Exp. Bot. **54**, 457-465.

Geiger, M., Stitt, M, Geingerberger, P. (1998) Metabolism in potato tuber slices responds differently after addition of sucrose and glucose. Planta, **206**, 245-252.

Getz, H.P., Knauer, D. and Willenbrink, J. (1987) Transport of sugar across the membrane of beetroot protoplast. Planta **171**, 185-196.

Giaquinta, R.T. (1983) Phloem loading of sucrose. *Ann Rev. Plant Physiol* **34**, 347-387.

Grusak, A., Beebe, D.U., Turgeon, R. (1996) Phloem Loading. p209-227. Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships. Zamski, E., Schaffer, A.A., eds. Marcel Dekker, Inc, New York.

Hebers, K., Sonnewald, U. (1998) Molecular determinants of sink strength. Current Opinion in Plant Biology. **1**, 207-216.

Henvelink, E. (1995) Dry matter partitioning in a tomato plant: one common assimilate pool? *J. Exp. Bot.* **46**, 1025-1033.

Hitz, W. D., Giaquinta, R. T (1987) Sucrose transport in plants. *BioEssays* **6**, 217-221.

Ho, L.C. (1988) Metabolism and compartamentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Physiol Plant Mol Biol.* **39**, 355-378.

Imlau A, Truernit E, Sauer N. (1999) Cell to cell and long distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* **11**: 306-322.

Kington-Smith, A.H., Walker, R.P., Pollock, C.J.(1999) Invertase in leaves: conundrum or control points?. *J.Exp.Bot.* **50** 735-743.

Komor, E., Thom, M., Maretzki, A. (1981) The mechanism of sugar uptake by sugarcane suspension cells. *Planta.* **153**. 181-192.

Klann, M.H., Hatt, B., Bennet, A.B. (1996) Antisense acid Invertase (TIVI) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiol.* **112**, 1321-1330.

Kunze, R., Frommer, W.B., Flügge, U.I. (2002) Metabolic Engineering of Plants: The Role of Membrane Transport. *Metabolic Engineering.* **4**, 57-66.

Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Baker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B. ,and Ward,J.M. (1999) The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell.* **11**,707-726.

Lalonde, S., Wipf, D., Frommer, W.B. (2004) Transport mechanism for organic forms of Carbon and Nitrogen between source and sink. *Annual Rev. Plant Physiol.* **55**, 345-372.

- Leigh, R.A., ap Rees, T., Fuller, W.A., Banfield. (1979)** The location of invertase activity and sucrose in vacuoles of storage roots of beetroot (*Beta vulgaris*). *Biochem. J.* **178**, 539-547.
- Lemoine, R. (2000)** Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta.* **1465**, 246, 262.
- Liang, H., and Gaber, R.F. (1996)** A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by SNF3-regulated expression of HXT6. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1953-1966.
- Lin, W., Schmitt, M.R., Hitz, W.D. and Giaquinta, R.T. (1984)** Sugar transport in isolate corn root protoplasts. *Physiol. Plant.* **76**, 639-644.
- Lingle, S.E., Dunlap, J.R. (1987)** Sucrose metabolism in netted muskmelon fruit during development. *Plant. Physiol.* **84**, 386-389.
- Lucas, W. J. Ding, B., and van der Schoot (1993)** Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* **125**, 435-476.
- Marger, M.D. and Saier, M.H (1993)** A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci* **18**, 13-20.
- Müller-Rüber, B.T., Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1992)** Inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase leads to sugar storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* **11**, 1229-1238.
- Neuhaus, H.E., Kruckeberg, A. L., Feil, R., Gottleib, L., and Stitt, M.N. (1989)** Dosage mutants of Phosphoglucosa isomerasa in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*. *Planta.* **178**,110-122.
- Neuhaus, H.E., Stitt, M. (1990)** Control analysis of photosynthate partitioning: impact of reduced activity of ADP-glucosa pyrophosphorylase or plastid phosphoglucomutase on the fluxes to starch and sucrose in *Arabidopsis*. *Planta* **182**, 445-454.

N'tchobo, H., Dali, N., Nguyen-QoucB, Foyer, C.H., Yelle, S. (1999). Starch Synthesis in tomato remains constant throughout fruit development and depends on sucrose supply and sucrose activity. *J. Exp. Bot.* **50**, 1457-1463.

Oparka, K.J., Duckett, C.M., Prior, D.A.M., and Fisher, D.B. (1994) Real time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *Plant J.* **6**, 759-766.

Oparka, K. J., Prior, D.A.M. (1988) Movement of Lucifer Yellow CH in potato storage tissues: a comparison of symplastic and apoplastic transport. *Planta* **176**, 533-540.

Özcan, S., and Johnston, M. (1995) Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1564-1574.

Pao, S.S., Paulsen, I.T., Saler, M.H. Jr. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1-34.

Price, J., Li, T.C., Kang, S.G., Na, J.K., Jang, J.C. (2003) Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plan Physiol.* **132**, 1424-1438.

Reifenberger, E., Boles, E., and Ciriacy, M. (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporter of *Sacharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem*, **245**, 324-333.

Rentsch, D., Boorer, K.J., Frommer, W.B (1998) Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *J. Membr. Biol* **162**, 177-190.

Ricardo, C.P.P., ap Rees, T (1970) Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochem.* **9**, 239-247.

Roitsch, T., Tanner, W. (1994) Expression of a sugar transporter gene family in a photoautotrophic suspension culture of *Chenopodium rubrum* L. *Planta.* **193**, 365-371.

Rosche E, Blacmore D, Tegeder M, Richardson T, Schroeder H, Higgins T CV, Frommer WB, Othter CE, Patrick JW. (2002) Seed. Specific overexpression of potato sucrose transporter increase sucrose uptake and grown rates of developing pea cotyledons. *Plant J.* **30** (2) 165-175.

Ruan Y.L., Patrick J.W. (1995) The cellular pathways of postphloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta* **196**, 434-444.

Sachs, J. (1887) Lectures on the physiology of plants, p 309, Ward, H., trans. Clarendon Press, Oxford.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) In: Nolan C (ed) molecular cloning, a Laboratory Manual, 2nd eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sauer, N., Baier, K., Gahrtz, M., Stadler, R., Stolz, J. and Truernit, E. (1994) Sugar transport across the plasma membranes of higher plants. *Plant Mol Biol.* **26**, 1671-1679.

Sauer, N., and Stadler, R. (1993) A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant J.* **4**,601-610.

Sauer, N., Caspari, T., Klebl, F. and Tanner, W. (1990 a) functional expression of the *Chlorella* hexose transporter in *Saccharomyces pombe*. *Pombe. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7949-7952.

Sauer, N., Friedlander, K., and Graml Wicke. (1990 b) Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **9**, 3045-3050.

Scheiding, A., Fröhlich, A., Schulze, S., Lloyd, J.R., and Kossmann. J. (2002) Downregulation of a chloroplast-targeted β -amilase leads to starch-excess phenotype in leaves. *The Plant Journal.* **30**, 581-591.

Sherson, S.M Hemmann, G., Wallace, G., Forbes, Germain, V., Stadler, R., Bechtold, N., Sauer, N., Smith, S.M. (2000). Monosaccharide/proton symporter AtsTP1 plays a major role in uptake and response of *Arabidopsis* seeds and seedlings to sugars. *Plant J.* **24**, 849-857.

Sjölund, R.D. (1997) The phloem sieve element: A river runs through it. *Plant Cell* **9**, 1137-1146.

Tang, G.Q, Lüscher, M., Sturm, A. (1999) Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic Carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell.* **11**, 177-189.

Tanner, W., Caspari, T. (1996) Studies of the mechanisms which regulate photosynthate partitioning. *Planta* **178**, 110-122.

Toyofuku, K., Kasahara, M., Yamaguchi, J. (2000) Characterization and expression of monosaccharide Transporter (*OsMSTs*) in Rice. *Plant Cell Physiol.* **41**, 940-947.

Truernit, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J and., Sauer, N (1996) The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis* STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitor, and pathogen challenge. *Plant Cell.* **8**, 2169-2182.

Truernit, E., Stadler, Baier, K, and., Sauer, N (1999) A male gametophyte-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Plant J.* **17**, 191-201.

Tubbe, A., and Buckhout, T.J. (1992) *In vitro* analysis of the H⁺ hexose symporter on the plasma membrane of sugarbeets (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **99**, 945-951.

Van Handel, E. (1968). Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* **22**, 280-283.

Verstappen, R., Ranostaj, S. and Rausch, T. (1991) The hexose transporter at the plasma membrane and the tonoplast of transformed plant cell: Kinetic characterization of two distinct carriers. *Biochim. Biophys. Acta* **1073**, 366-373.

Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Handcock RD, Marmioli N, Machray GC, Oparka KJ. (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* **13**: 385-398.

Wang, F., Sanz, A., Brenner, M.L., Smith, A. (1993) Sucrose Synthase, starch accumulation and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol.* **101**, 321-327.

Ward, J., Kuhn, C., Tegefer, M., and Frommer, W.B. (1998) Sucrose transport in plants. *Int. Rev. Cytol.* **178**, 41-71.

Weig, A., Franz, J., Sauer, N., and Komor, E (1994) Isolation of a family of cDNA clones from *Ricinus communis* L. with close homology to the hexose carriers. *J. Plant Physiol.* **143**, 178-183.

Will, A., Caspari, T., and Tanner, W. (1994) K_m mutants of the *Chlorella* monosaccharide/H⁺ cotransporter randomly generated by PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10163-10167.

Wordlaw IF. (1990) The control of carbon partitioning in plants. *New Phytol.* **116**, 341-381.

Worrell, A.C., Bruneau, J.M., Summerfeld, K., Boersig, M., Voelker, T. A. (1991) Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* **3**, 1121-1130.

Ylstra, B., Garrido, D., Busscher, J. and van Tunen, A.J. (1998) Hexose transport in growing petunia pollen tubes and characterization of a pollen-specific, putative monosaccharide transporter. *Plant Physiol.* **118**, 297-304.

Zamski, E (1996) Anatomical and Physiological characteristics of Sink Cells. p283-310. Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships. Zamski, E., Schaffer, A.A., eds. Marcel Dekker, Inc, New York.

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

Zimmerman, M. H., Ziegel, H. (1975) List of sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: Encyclopedia of plant physiology, Vol. 1. Transport in plants. Phloem transport, pp.480-503, Zimmerman, M. H., Milburn, J. A., eds. Springer-Verlag, New York.

Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L., Sonnewald, U. (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants. The Plant Journal. **7**, 97-107.