



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Expresión del transportador Hxt2 de *Saccharomyces cerevisiae* en plantas de *Arabidopsis thaliana* y Jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) como modelo para el estudio del metabolismo de carbono

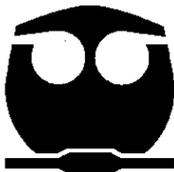
T E S I S

Que para obtener el grado de :
Doctor en Ciencias (Bioquímicas)

P R E S E N T A :

DANIEL PADILLA CHACÓN

Tutor: Dr. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS



México D.F.

Julio, 2010



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 Tutorial que asesoró de desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Eleazar Martínez Barajas
Dra. Patricia León Mejía
Dra. Sobeida Sánchez Nieto

El jurado de Examen para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas estuvo constituido por:

Dra. Estela Sánchez Quintanar
Dra. Alicia González Manjarrez
Dra. Patricia León Mejía
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Dra. Irma Bernal

Durante los estudios de Doctorado goce de la beca de CONACyY (No. De registro 167265) y del complemento de beca de DGEP-UNAM.

Agradecimientos

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas mi más sincero agradecimiento por permitirme ser parte de su equipo de laboratorio, así como por la amistad, apoyo y confianza que siempre me brindó.

A la Dra. Patricia León Mejía y a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por ser parte de mi comité tutorial durante el doctorado, por contar siempre con su apoyo y sugerencias para la realización del proyecto.

A el Dr. Felipe Cruz García y al el Dr. Omar Pantoja Ayala por ser parte de mi comité tutorial durante la maestría.

A los miembros del jurado por las críticas y sugerencias en la revisión de la tesis.

A la Dra. Patricia Coello Coutiño por su disposición para apoyarme en el avance del proyecto.

A la Dra. Elizabeth Córdoba por su tiempo y apoyo para realizar parte importante de este trabajo.

Muy especialmente al Dr. Axel Tiessen Favier por brindarme su amistad, apoyo y sugerencias para concluir este proyecto.

A CONACYT y DGEP por las becas otorgadas.

Dedicatorias

A mis Padres, Rogelio y Bertha por mostrarme su apoyo incondicional para cumplir mis metas.

A mis hermanos Javier, Bertha, Rogelio, Verenice y Oralia, porque con su ejemplo siempre tuve el entusiasmo de realizar este trabajo.

A mi sobrinos Sofía, Dana, Nancy, Tatiali, Jeny, Liliana, Mary, Paco, Isaac, Sergio y Jesús porque ustedes son y serán el motivo para que siga adelante.

A Prisci por el cariño y tiempo que compartimos que fue la motivación para llegar al final de este trabajo.

A mis cuñados Lilia, Elisa y Roberto por todos los momentos compartidos.

A mis amigos del posgrado Lilia, Javier, Ruth y Victor gracias por compartir los buenos y malos momentos que hizo que nuestra amistad sea para siempre.

A todos los integrantes del laboratorio 102 por contar con su ayuda para que avanzara en este proyecto.

A todo el Departamento de Bioquímica que siempre me abrió sus puertas y me brindó el apoyo para concluir este proyecto.

A el laboratorio de Metabolómica y Fisiología Vegetal del Cinvestav-Irapuato por contar con su amistad y apoyo cuando trabajé en el laboratorio.

Índice

Resumen	I
Tabla de Abreviaturas	III
1. Introducción	
1.1 Metabolismo de sacarosa y almidón	1
1.2 Síntesis de almidón	4
1.3 Anatomía del floema	5
1.4 Carga del floema	8
1.5 Descarga del floema	9
1.6 Transportadores de azúcares en plantas	11
1.7 Cambios en las rutas de descarga de fotosintatos	14
1.8 Regulación en la descarga la vía simplasto	15
1.9 Regulación en la descarga vía apoplasto	16
1.10 Mecanismos de señalización por azúcares	18
1.11 El fruto de jitomate	22
1.12 <i>A. thaliana</i> y jitomate como modelos de estudio	26
1.13 Hipótesis	27
1.14 Objetivo general	27
1.15 Objetivos específicos	27
2 .Materiales y métodos	
2.1 Construcción para la obtención de plantas transgénicas	28
2.1.1 Amplificación por PCR	28
2.1.2 Clonación en pBin193X35S	30
2.1.3 Clonación en pZY101.1	31
2.1.4 Transfromación de <i>A. tumefaciens</i>	32
2.2 Transformación de <i>A. thaliana</i>	32
2.2.1 Material Biológico y crecimiento de las plantas	32
2.2.2 Selección de transformantes con antibióticos	33
2.2.3 Pruebas para determinar la presencia de <i>hxt2</i>	34
2.2.4 Determinación del transgen por PCR	35
2.2.5 Determinación del transgén por Southern-blot	35
2.2.6 Determinación del RNA por Northern-blot	35
2.2.7 Obtención de anticuerpos	36
2.2.8 Detección de la proteína Rubisco	39
2.2.9 Condiciones de crecimiento de las plantas	39
2.2.10 Determinación de los niveles de azúcares solubles	40
2.2.11 Análisis de toma de 3-O-metil-[U- ¹⁴ C] glucosa <i>in vitro</i>	41
2.2.12 Actividades enzimáticas de Glucocinasa y Fructocinasa	42
2.2.13 Determinación de longitud de raíz, peso fresco y geminación	42
2.2.14 Análisis estadístico	43
2.2.15 Experimento de microarreglos	43
2.3 Transformación de Jitomate	44
2.3.1 Material Biológico	44
2.3.2 Selección con BASTA	45
2.3.3 Producción de plantas transgénicas	45

2.3.4	Determinación del transgen por PCR	47
2.3.5	Determinación de azúcares soluble y Brix	48
2.3.6	Análisis de toma de [U- ¹⁴ C]-glucosa	48
3. Resultados		
A. thaliana		
3.1	Clonación del transportador Hxt2 y Transformación de <i>A.thaliana</i>	49
3.2	Análisis de las plantas transgénicas	50
3.2.1	Identificación del gen <i>hxt2</i> por PCR, Southern-blot y niveles de transcrito por Northern.blot	50
3.2.2	Obtención de anticuerpos e identificación del transportador Hxt2 por Western-blot.	52
3.2.3	Determinación de la incorporación de 3-O-metil-[U- ¹⁴ C] glucosa	54
3.2.4	Análisis fenotípico	56
3.2.4.1	Efecto en las plantas a diferentes a concentraciones de glucosa	56
3.2.4.2	Cinética de germinación a diferentes concentraciones de glucosa	57
3.3	Efecto del transportador Hxt2 en los niveles de azúcares y peso fresco	58
3.4	Análisis en los cambios transcripcionales	61
Jitomate		
3.5	Transformación de jitomate	65
3.6	Identificación de las plantas transgénicas por PCR	68
3.7	Medición en la toma de [U- ¹⁴ C]-glucosa en pericaripos	70
3.8	Análisis de los niveles de glucosa y fructosa	71
4. Discusión		73
5. Conclusiones		85
6. Perspectivas		86
7. Bibliografía		87
8. Anexos. Publicaciones		100

Resumen

Las plantas superiores están formadas por un mosaico de tejidos con diferentes características fisiológicas. La comunicación entre ellos involucra un mecanismo complejo que regula la cantidad de sacarosa que exportan los tejidos fotosintéticos (órganos fuente) a los tejidos dependientes de fotosintatos (órganos demanda). Es muy probable que la cantidad de azúcares disponibles sea insuficiente para satisfacer las necesidades de todos los órganos que los demandan, pero las características del sistema que controla su distribución garantizan que su uso sea eficiente. La lista de factores que contribuyen a regular la distribución de fotosintatos es larga, pero un aspecto poco explorado es la contribución de transportadores de hexosas, los cuales son los responsables de introducir a la célula la glucosa y fructosa que se producen cuando la sacarosa que viaja por el floema es liberada en apoplasto y una fracción importante de la misma es hidrolizada por la invertasa asociada a la pared celular.

Con el propósito analizar la importancia del transporte de hexosas en el desarrollo de tejidos de demanda, elaboramos plantas transgénicas que expresaran el transportador de glucosa Hxt2 de *Saccharomyces cerevisiae* en dos modelos experimentales: *Arabidopsis thaliana* bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S y jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), donde la expresión se dirigió por el promotor tejido específico 2A11. A pesar de que comprobamos que la proteína expresada es funcional, en ninguno de los sistemas pudimos observar que la expresión del transportador de levadura modificara en algún sentido el crecimiento y/o desarrollo de las plantas. Sin embargo, cuando las plantas transgénicas de *A. thaliana* se cultivaron en medios con alta concentración de glucosa, observamos que la presencia del transportador Hxt2 les confiere la capacidad para crecer a concentraciones de glucosa que son inhibitorias para las plantas silvestres.

El análisis del efecto de una concentración elevada de glucosa en el medio de cultivo sobre el perfil global de transcripción mostró que la respuesta de las plantas que expresan el transportador Hxt2 es diferente a la de las plantas silvestres. Sin embargo, los niveles de los transcritos de *APL3*, *Hxk1* y *STP1*, cuya expresión está controlada por vías de señalización dependientes

de los niveles de glucosa, no fueron afectados. Estos resultados sugieren que además de las vías de transducción de señales ya establecidas, la actividad de los transportadores de hexosas podría constituir un elemento adicional para evaluar la disponibilidad de glucosa y contribuir a la versatilidad con que las plantas responden a cambios en el ambiente.

1. *Introducción*

1.1 **Metabolismo de sacarosa y almidón**

Las plantas superiores son organismos autótrofos que obtienen su energía durante la fotosíntesis y la fijación de CO₂ atmosférico. En este proceso el CO₂ pasa por los estomas y difunde hasta las células fotosintéticas. Posteriormente llega al estroma de los cloroplastos en donde la enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) lo incorpora a la ribulosa-1,5-bisfosfato. La participación de esta enzima y de otras que forman el Ciclo de Calvin permite que con el CO₂ fijado se generen triosas fosfato que posteriormente son usadas en la síntesis de almidón dentro del cloroplasto o de sacarosa en el citosol (Figura 1, Paso 3). El transporte de triosas-P al citosol es a través de un translocador que las intercambia con Pi, por lo que las concentraciones relativas de Pi y de triosas fosfato son muy importantes para determinar la proporción del carbono fijado fotosintéticamente que se utiliza para sintetizar almidón o sacarosa. (Figura 1, Paso 6) (Stitt and Quick 1989; Preiss 1988).

La actividad de la fructosa 1,6-bifosfatasa citosólica (FBP-asa), que produce fructosa-6-fosfato (Fru-6-P) a partir de fructosa-1,6-bifosfato (Fru-1,6-P₂) (Figura 1, paso 8), es un punto importante para el control de la síntesis de sacarosa. La actividad de la FBP-asa citosólica es inhibida por el compuesto Fru-2,6-P₂, el cual se sintetiza a partir de Fru-6-P por la enzima bifuncional fructosa-6-fosfato, 2-cinasa y fructosa-2,6-bifosfatasa (F2KP) (Figura 1, Paso 16). Cuando la tasa fotosintética es alta, las concentraciones de triosa-P y ácido 3-fosfoglicérico (3PGA) en el citosol se incrementan al mismo tiempo que disminuye la concentración de Pi. En este escenario la actividad de cinasa de la F2KP se inhibe y se activa la actividad de fosfatasa. Como consecuencia, el nivel de la Fru-2,6-P₂ se reduce, desaparece la inhibición sobre la FBP-asa citosólica y se incrementa la cantidad de Fru-6-P, lo que a su vez redundará en un aumento importante en la cantidad de sacarosa sintetizada (Figura 1, Paso 15).

La importancia de la Fru-2,6-P₂ como un regulador de la distribución de carbono fotosintético se ha puesto de manifiesto con diferentes estrategias: en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* la expresión de la F2KP de hígado de rata incrementó el nivel de Fru-2,6-P₂, e inhibió la síntesis de sacarosa (Scott and kruger 1995; Nielsen et al., 2004). Por otro lado, en plantas de papa donde se redujo el nivel de expresión de la enzima F2KP se observó que niveles de Fru-2,6-P₂ disminuyeron y la cantidad de sacarosa aumentará 4 y 2 veces en hojas y tubérculos, respectivamente (Rung et al., 2004). Esta regulación permite que se coordine la síntesis de sacarosa para satisfacer las necesidades metabólicas de las células fotosintéticas y de los tejidos de demanda que carecen de capacidad fotosintética (Gerhardt and Held 1984; Stitt et al., 1988; Neuhaus et al., 1989).

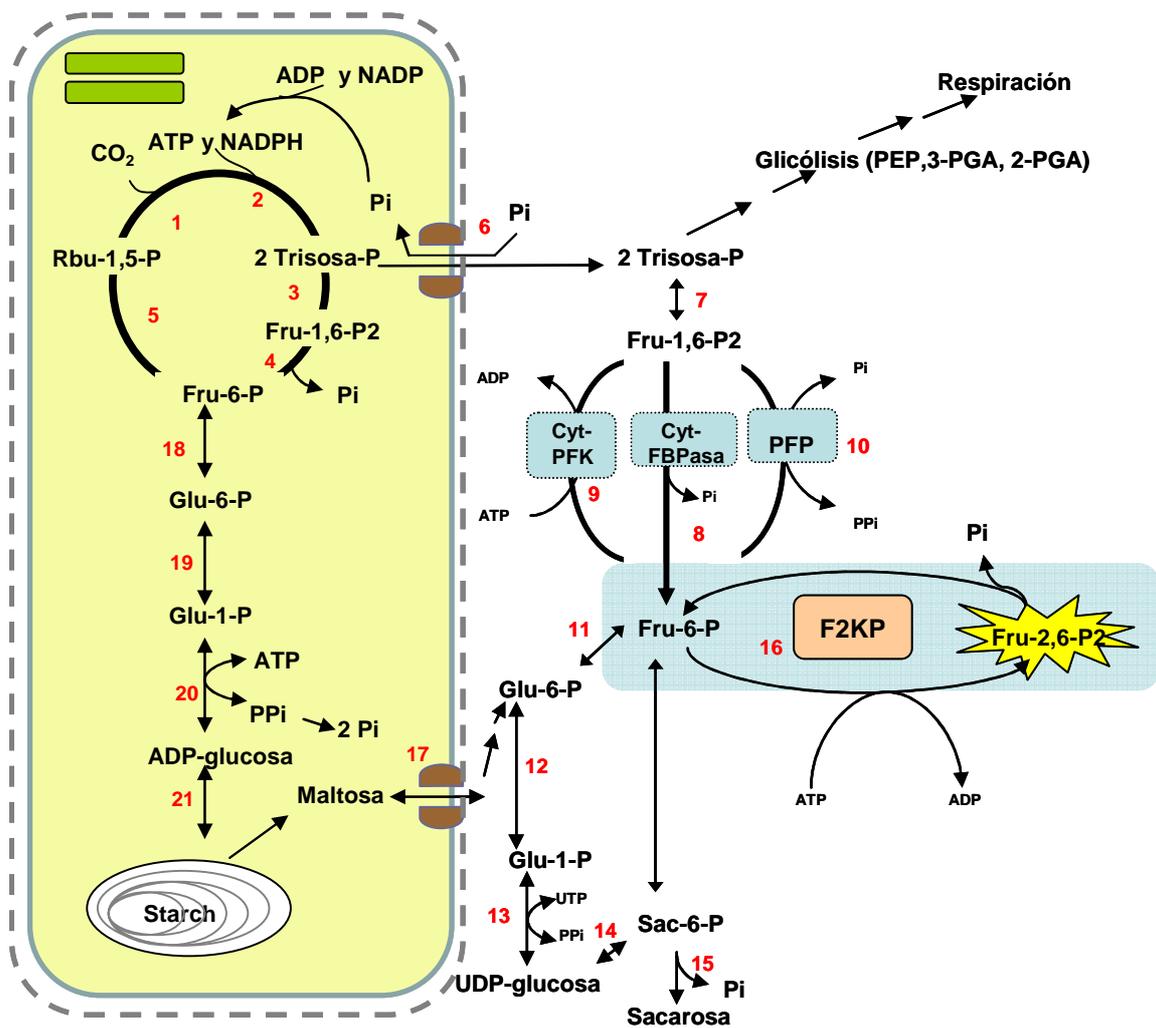


Figura 1. Síntesis de almidón y sacarosa. Las reacciones se muestran con el número correspondiente de cada enzima: 1, Rubisco; 2, PGK cloroplástica y TPI cloroplástica; 3, Fru-1-6-P2 aldolasa cloroplástica; 4, FBPasa cloroplástica; 5, transcetolasa; sedoheptulosa-1,7-bisfosfato aldolasa; sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa; fosfopentosepimerasa, fosforiboisomerasa y fosforibulocinasa; 6, transportador triosa fosfato; 7, Fru-1-6-P2 aldolasa citosólica; 8, FBPasa citosólica; 9, fosfofructocinasa citosólica; 10, PFP; 11 PGI citosólica; 12, PGM citosólica; 13, UGPasa; 14, SPS; 15, sacarosa fosfatasa; 16, F2KP; 17, transportador de maltosa; 18, PGI cloroplástica; 19, PGM cloroplástica; 20, AGPasa; 21, almidón sintasa y enzima ramificadora. Tomado de Nielsen et al., 2004.

El estudio sobre la relación que existe entre la síntesis de almidón y de azúcares solubles se ha realizado en plantas transgénicas que presentan cambios en la actividad de fosfoglucoisomerasa (PGI) del cloroplasto y del citosol. En la mutante de *A. thaliana*, la cual es deficiente en la síntesis de almidón por la reducción en la actividad de PGI del cloroplasto (Figura1, Paso 18) se realizaron experimentos donde se analizaron los cambios en las concentraciones de azúcares solubles y de almidón bajo diferentes condiciones de fotoperiodo. En luz continua, la mutante no presentó cambios en los niveles de azúcares solubles en comparación con las plantas silvestres. Sin embargo, cuando se cambiaron las condiciones a 12h luz y 12h oscuridad, los niveles de azúcares solubles en la mutante se incrementaron varias veces con respecto a las plantas silvestres, si el periodo de luz se reducía a periodos cortos, la mutante reducía la fotosíntesis, respiración y crecimiento (Caspar et al., 1985). Por otro lado, en una mutante de *Clarkia xantiana* que tiene baja actividad de la PGI citosólica en hoja se redujo la síntesis de la sacarosa y se incrementó la de almidón (Neuhaus et al., 1989). Ambos estudios mostraron que los niveles de sacarosa y de almidón son alterados por modificaciones en la síntesis de almidón en el cloroplasto, mientras que el efecto es mínimo si la alteración es en la síntesis de sacarosa en el citosol.

1.2 Síntesis de almidón

El almidón es un polímero constituido por moléculas de α -D-Glucosa unidas por enlaces α (1,4) y α (1,6). En la molécula, se distinguen dos tipos de polímeros; el primero es amilosa que se caracteriza por ser polímero no ramificado de largas cadenas de unidades de α -D-Glucosa unidas por enlaces α (1,4). Estas cadenas adoptan una disposición helicoidal por seis moléculas por vuelta y tienen masas moleculares relativas que oscilan entre unos pocos miles y 500.000 de Daltons. El segundo es la amilopectina, el cual es un polímero muy ramificado formado por moléculas α -D-Glucosa. Los sucesivos restos de glucosa a lo largo de las cadenas están unidos por enlaces α (1,4), y los puntos de ramificación que se encuentran espaciados por un número de restos de glucosa que oscilan entre 24 y 30,

consisten en enlaces α (1,6). Su masa molecular puede alcanzar hasta un millón de Daltons (Guan and Keeling, 1998).

En su síntesis, la almidón sintasa transfiere la unidad glucosil del ADP-glucosa al extremo no reductor de un cebador (α -1,4 glucano), además, la almidón sintasa y la enzima ramificadora al introducir enlaces α (1,6), forman en conjunto un gránulo muy compacto capaz de almacenar grandes cantidades de glucosa sin afectar el potencial osmótico (Huber 1989). La mayor parte del almidón que se sintetiza durante el día en las hojas maduras es degradado durante la noche (Schneider et al., 2002), esto asegura la disponibilidad de fotosintatos durante el periodo nocturno. La regulación por los ciclos de luz se debe en gran medida a la actividad de la AGPasa que transforma a la glucosa-1P en ADP-glucosa y es inhibida por el Pi y activada por el 3-PGA (Preiss 1988). Además, se ha demostrado que el estado redox en plastidios también es importante para regular su actividad, la cual se incrementa en un medio reductor provocando que se incrementen los niveles de almidón (Tiessen et al. 2002; Geigenberger et al. 2005; Michalska et al. 2009).

1.3 Anatomía del floema

El floema de las plantas superiores es un tejido especializado en transportar azúcares de los órganos fotosintéticos (tejidos fuente) a aquellos cuyo crecimiento y desarrollo depende de forma parcial o total de los fotosintatos (tejidos demanda). El floema está formado por dos tipos celulares relacionados ontogenéticamente: elementos cribosos (ECs) y células acompañantes (CAs). Los ECs son células altamente modificadas; durante la maduración pierden el núcleo, mitocondrias y poseen abundantes perforaciones en las paredes celulares (tubos cribosos) por donde viajan los azúcares (Lucas 1995). Las CAs se caracterizan por tener un protoplasma denso, núcleo y numerosas mitocondrias, gracias a los plasmodesmos que las conectan con los ECs, las CAs pueden complementar los procesos metabólicos que ocurren en los ECs (Oparka and Cruz 2000) (Figura 2).

En muchas especies existe un poro único que conecta a los ECs con las CAs (Behnke 1989; Blackman et al., 1998; Nelson 1998; van Bel et al., 2004) y se ha reportado que la calosa que está presente en las entradas de los plasmodesmos contribuye a la formación de una estructura con una arquitectura muy particular a la que se le denomina unidad de poro del plasmodemata (PPU) (van Bel 1996). Al proceso por el cual la sacarosa producida en las células del mesófilo llega al complejo EC/CAs es conocido como carga del floema. Por su parte, el término descarga del floema hace referencia al proceso en el que los azúcares que viajan por el floema son depositados en el tejido demanda (Patrick 1997).

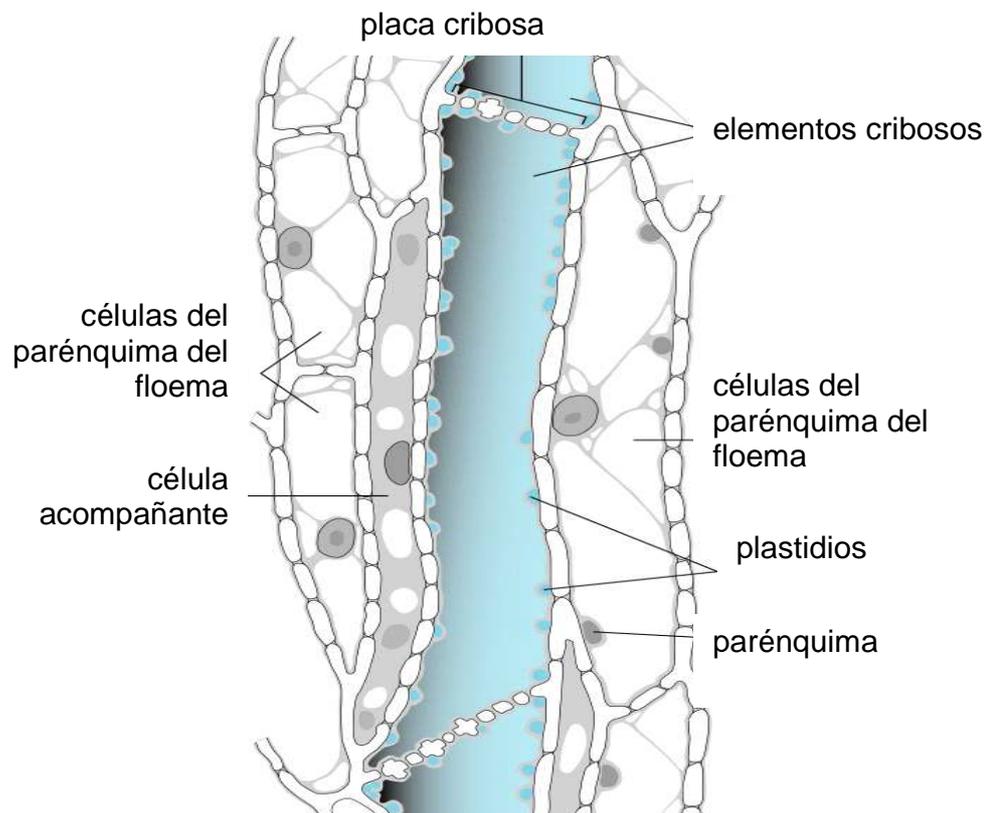


Figura 2. Esquema de complejo formado por las células acompañantes (CAs) y elementos cribosos (ECs) de *Nicotiana tabacum*. En la imagen se muestra las diferentes estructuras entre los tipos celulares que forman el floema. <http://www.studentsguide.in/biology/morphology-anatomy-flowering-plants/complex-tissues-phloem.html>

Tanto la carga como la descarga del floema pueden ocurrir por dos rutas; la primera se conoce como simplasto y se caracteriza porque los solutos entran o salen del floema a través de los plasmodesmos que conectan las células del floema con las de los tejidos que producen o demandan azúcares (Figura 3). La otra ruta se conoce como apoplástica, en ésta los azúcares que entran o salen del floema son incorporados o liberados del espacio intercelular. Las células de órganos de demanda con este tipo de descarga requieren de transportadores ubicados en la membrana plasmática para incorporar los fotosintatos que reciben. Su actividad puede ser descrita en términos de la ecuación de Michaelis-Menten, con un componente saturable por el soluto y otro componente no saturable obedeciendo en una cinética de primer orden:

$$R_v = [V_{\max} C / (K_m + C)] + kC$$

Donde R_v es la velocidad de descarga, V_{\max} es la máxima velocidad, K_m es la constante Michaelis-Menten, C , concentración del soluto y k es la constante de velocidad de primer orden. Para el transporte acoplado a protón, la velocidad máxima será influenciada por un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana (Lalonde et al., 2004). El movimiento de la sacarosa hacia el tejido que lo demanda se explica por la hipótesis de Münch (Münch 1930) que se resumen en la siguiente ecuación:

$$J_v = L_p (P_{EC \text{ fuente}} - P_{EC \text{ demanda}})$$

De acuerdo con este planteamiento, el flujo de los solutos (J_v) a través de los elementos cribosos (ECs) es dirigido por el gradiente de presiones hidrostáticas (P) que existe entre los EC de los tejidos fuente y demanda modulados por la conductividad hidráulica (L_p), lo que permite la importación de los fotosintatos hacia el interior de las células.

1.4 Carga del floema

La vía que sigue la sacarosa para cargar el floema depende de la especie, por ejemplo, en la familia Cucurbitaceae existe una amplia red de plasmodesmos que conectan al complejo EC/AC con las células del mesófilo (Gamalei 1989), de tal manera que la mayor parte de la sacarosa es cargada por vía simplasto. En otras especies que pertenecen tanto a monocotiledóneas (van Bel et al., 2002) como dicotiledóneas (Giaquinta 1979; Turgeon 1989) la carga del floema es vía apoplasto. Esta conclusión se basa en estudios *in vitro* midiendo el efecto del ácido p-cloromercuribenzeno sulfonato (PCMBs) que al inhibir la actividad de los transportadores de sacarosa impide la carga del floema.

Los transportadores de sacarosa se clasifican dentro de la familia de transportadores SUTs que a su vez forma parte de la superfamilia de transportadores MSF. Diferentes miembros de esta familia han sido detectados en las membranas plasmática de los complejos EC/CAs, presentes en hojas de *Arabidopsis* (Truernit and Sauer 1995), *Plantago mayor* (Stadler et al., 1995), papa (Riesmeier et al., 1993; Kuhn et al., 1997; Weise et al., 2000) y tomate (Barker, et al., 2000). La disminución de la expresión de los transportadores de SUT en papa (Riesmeier et al., 1994; Kuhn et al., 1996; Lemoine et al., 1996) y tabaco (Burkle et al., 1998), así como la eliminación del transportador SUT2 en *Arabidopsis* (Gottwald et al., 2000) han confirmado que, en esos casos, la carga del floema es independiente de los plasmodesmos. Sin embargo, las rutas simplástica y apoplástica pueden coexistir (van Bel et al., 2002; van Bel et al., 2004). En cotiledones de Ricino (*Ricinus communis*) la vía simplástica es la más importante, pero se ha demostrado que la vía apoplástica puede volverse importante si cambian las condiciones osmóticas de las células (Orlich et al., 1998).

1.5 Descarga del floema

La sacarosa puede descargarse por medio de los plasmodesmos que comunican al floema con el parénquima de tejido demanda. Este mecanismo que permite movilizar grandes cantidades de sacarosa está presente en ápices de raíz de *Arabidopsis*, hojas en expansión y tubérculos de papa (Fisher and Oparka 1996; Patrick and Offler 1996; Patrick 1997) (Figura 3).

Cuando la sacarosa se libera al espacio apoplástico que se encuentra entre el complejo ECs/CAs y las células del parénquima del tejido demanda (vía apoplástica), el transporte de la sacarosa al interior de las células involucra la participación de transportadores que se encuentran en las membranas plasmáticas. Algunos de estos son transportadores activos del tipo symporter (H^+ /Sacarosa) como el transportador AtSUC3 que se expresa fuertemente en tejidos demanda y en el floema de *A. thaliana* (Meyer et al., 2004) y, por otro lado, el transportador RcSCR1 que se expresa en hipocótilos de *Ricinus communis* participando en la recuperación de sacarosa descargada en el tejido de demanda (Eisenbarth and Weig 2005).

Si bien la sacarosa liberada al espacio apoplástico es asimilada por transportadores de disacáridos, también existe la posibilidad de que pueda ser hidrolizada por una invertasa asociada a la pared celular (Sonnewald et al., 1994) y al igual que la asimilación de la sacarosa, la glucosa y la fructosa resultantes requieren de transportadores específicos que poseen un mecanismo symporter H^+ /hexosa (Williams et al., 2000; Williams and Amanda 2004) (Figura 3). De forma interesante se observó en frutos de manzana en desarrollo que un posible transportador de monosacáridos se coexpresa una H^+ -ATPasa donde se sugiere que su actividad es la responsable de crear el gradiente de protones necesario para que el transportador de hexosas funcione durante el desarrollo del fruto (Zhang et al. 2004; Wu et al., 2004; Zhang et al. 2006).

Independientemente de la vía de descarga predominante, la cantidad de azúcares descargados está influenciada por la capacidad de los órganos de demanda para remover los azúcares liberados. Su uso para la síntesis de almidón

y lípidos puede contribuir a crear un gradiente de concentración que favorece la descarga de sacarosa. La hidrólisis de la sacarosa así como la capacidad para compartimentalizar los fotosintatos son elementos que pueden contribuir a crear gradientes de concentración que favorecen la descarga de sacarosa (Patrick 1997). Se ha reportado que la sacarosa liberada al espacio apoplástico también puede transportarse al interior de las células de demanda por un mecanismo de difusión facilitada aprovechando la existencia de un gradiente de concentración. Aparentemente, este mecanismo está presente en las células de semillas en desarrollo de chícharo, donde son muy permeables a la sacarosa y la mayor parte la sacarosa asimilada es por medio de proteínas de membrana que funcionan como facilitadores de sacarosa (PsSUF). Sin embargo, se desconoce el mecanismo de regulación de estas proteínas (Zhou et al., 2009).

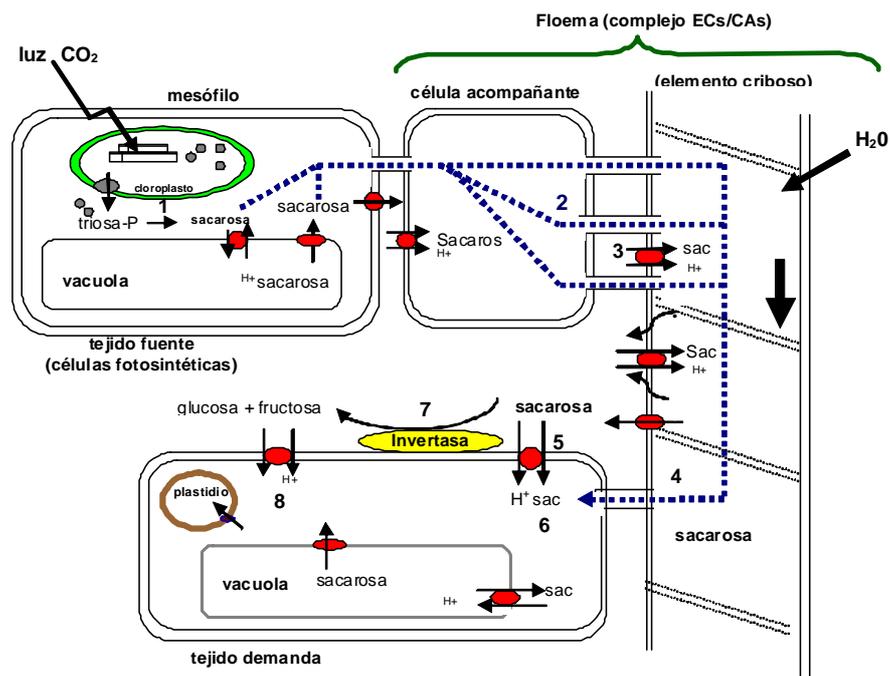


Figura 3. Ruta de fotosintatos desde el tejido fuente hacia el tejido demanda. 1, En las hojas se realiza la fotosíntesis y síntesis de sacarosa; 2,4, mecanismos de carga y descarga del floema vía simplasto, la sacarosa (sac) viaja a través de los conductos llamados plasmodesmata. 3,5, mecanismos de carga y descarga vía apoplasto, la sacarosa es liberada al apoplasto y transportadores (H^+ /sacarosa), 6, cargan y descargan la sacarosa del floema, 7, o puede ser hidrolizada por una invertasa de pared, 8, los productos glucosa y fructosa son incorporados por transportadores de hexosa (H^+ /hexosa). Modificado de Lalonde et al. 1999.

1.6 Transportadores de azúcares en la descarga del floema

Varios de los transportadores de monosacáridos han sido clonados y su expresión en sistemas heterólogos como levadura u oocitos de *Xenopus* ha permitido caracterizar su función (Tang et al., 1999). Los transportadores de monosacáridos de plantas que se han caracterizado hasta la fecha son dependientes de energía (H^+ /Simporter) (Bush 1993). Su alto grado de homología en la secuencia de aminoácidos y el poseer una estructura con doce regiones transmembranales, ha permitido clasificarlos como miembros de una superfamilia de facilitadores de azúcares MFS. En *Arabidopsis* se realizó un árbol filogenético con base a su secuencia de aminoácidos y a su localización subcelular (Figura 4) y se clasificaron como: los transportadores de glucosa vacuolares (AtVGT), los transportadores de monosacárido de tonoplasto (AtTMT), los transportadores de glucosa de platidio (AtpGlcT), los transportadores de inositol (AtINT), los transportadores de respuesta temprana a deshidratación (AtERD6), transportadores de Polioliol (AtPLT) y las proteínas transportadores de azúcares (AtSTPs). De estos últimos se han identificado 26 secuencias en *A. thaliana* que se expresan en la membrana plasmática (Lalonde et al. 1999; Buttner and Sauer 2000; Buttner 2007) y con excepción de *AtSTP3* que se expresa en hojas verdes (Buttner et al. 2000), los genes de los otros AtSTPs se expresan en tejidos demanda (Sherson et al. 2000; Stadler et al., 1999; Sherson et al., 2000; Scholz-Starke et al., 2003; Stadler et al., 2003; Schneidereit et al., 2005). *AtSTP2*, *AtSTP6* y *AtSTP9* son expresados en diferentes estados de desarrollo de los granos de polen. *AtSTP11* se expresa exclusivamente en el tubo polínico (Stadler, et al., 1999; Sherson et al., 2000; Scholz-Starke et al., 2003; Sauer et al., 2004; Schneidereit et al., 2005) ; mientras que *AtSTP4* lo hace en anteras y en la punta de la raíz (Truernit et al., 1996).

AtSTP1 es un transportador activo durante la germinación y se ha estimado que es responsable de la toma del 60% de la glucosa en la etapa de plántula *Arabidopsis* (Sherson et al., 2000).

Dentro de la caracterización cinética de los AtSTPs se ha encontrado que la mayoría poseen valores de K_m para glucosa en el rango de 10 -100 μM , excepto AtSTP3 que posee una K_m de $\sim 2\text{mM}$ para glucosa (Sherson et al., 2000). Esto demuestra que en los tejidos existe un amplio rango de concentraciones de azúcares donde puede expresarse los transportadores de hexosas adecuados a condiciones específicas.

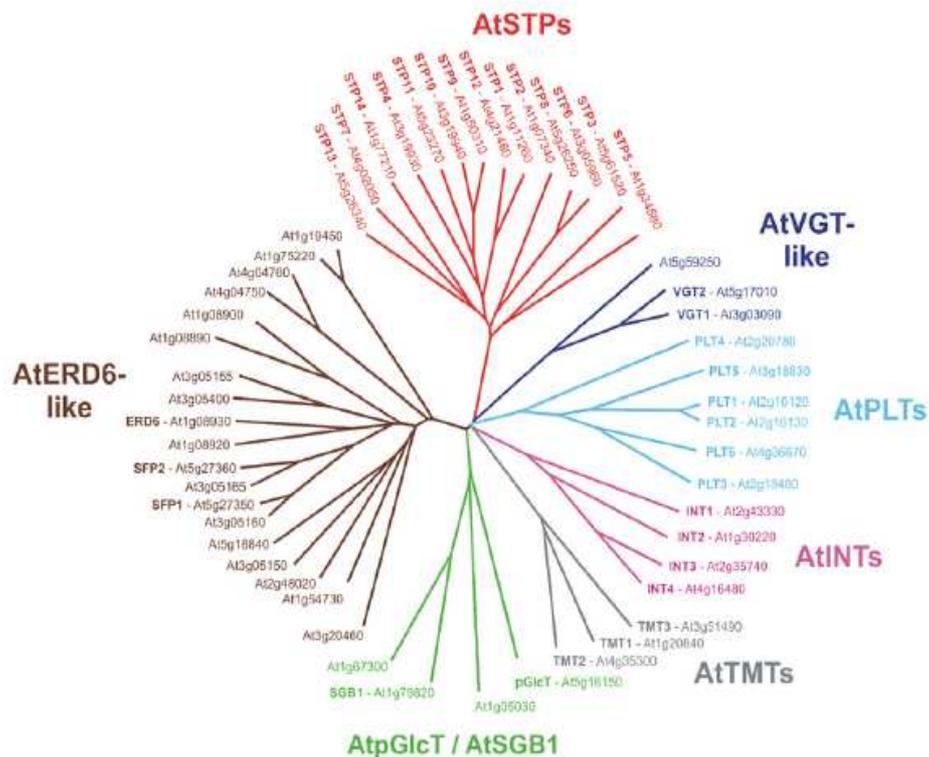


Figura 4. Árbol filogenético de transportadores de monosacáridos en *Arabidopsis*. El alineamiento se realizó con la secuencia completa de aminoácidos usando el algoritmo Clustal X y el árbol filogenético se construyó usando el software TreeView 1.6. Imagen tomada de Büttner, 2007.

En otras especies de plantas también se han reportado múltiples secuencias de transportadores de monosacáridos, en *Racinus communis* se han identificado 8 (Weig et al., 1994), 7 en *Chenopodium rubrum* (Roitsch and Tanner 1994), 3 en *Beta vulgaris* (Lalonde et al., 1999), 6 en arroz (Wang et al., 2008) y 3 en tomate (Gear et al., 2000). En todos los casos se ha observado que se expresan con mayor abundancia en los tejidos de demanda. Así como la expresión heteróloga de los transportadores ha sido muy útil para elucidar sus características funcionales, la modificación de su nivel de expresión en plantas ha sido una herramienta muy usada para estudiar su papel fisiológico. En *Arabidopsis* se aisló una mutante que no expresa el transportador AtSTP1. La mutante crece y se desarrolla normalmente, pero la toma de glucosa durante el establecimiento de plántula es reducida, sugiriendo que AtSTP1 está involucrado en la toma de monosacáridos extracelulares en la etapa de embrión y plántula (Sherson et al., 2000).

En plantas de tabaco se expresó en sentido y en antisentido al transportador de hexosas VvHT1 proveniente de uva. En ambos casos se afectó la expresión de algunos transportadores pertenecientes a la familia MTS y el crecimiento se redujo (Leggewie et al., 2003). Además de esto, el hecho de que los transportadores de hexosas pertenezcan a familias génicas y que varios miembros tengan patrones de expresión similares, genera redundancia, pues cambios en la expresión de alguno de ellos podrían ser compensados por alguno de los miembros de la familia.

En lo que se refiere a la sobre-expresión de transportadores de disacáridos, se han obtenido plantas transgénicas que sobre-expresan transportadores de sacarosa de otras especies; por ejemplo el transportador de sacarosa de papa StSUT1 se sobre-expresó en el parénquima de cotiledones de chícharo bajo el control del promotor de vicilina, el resultado observado fue que el transporte se incrementó casi dos veces y la capacidad de almacenamiento también aumentó (Rosche et al., 2002). En otro trabajo, se analizó la sobre-expresión en tubérculos de papa del transportador de sacarosa SoSUT1 de espinaca, provocando una

disminución en los niveles de sacarosa en la hoja y un ligero aumento en los niveles de almidón en el tubérculo observándose poco impacto en el metabolismo y morfología de hojas y tubérculo (Leggewie et al., 2003). Estos resultados ponen de manifiesto el papel fisiológico de los transportadores de hexosas y disacáridos y el impacto que tienen en el metabolismo.

1.7 Cambios de las rutas de descarga de fotosintatos

Se ha reportado que la vía de descarga del floema durante el desarrollo puede modificarse y esto puede ser importante para adecuar la distribución de fotosintatos a las necesidades de los tejidos de demanda (Zhang et al., 2006). El colorante 5-(6) carboxifluoresceína (CF) es impermeable a membranas y se ha usado con éxito para monitorear en tiempo real la descarga del floema en raíces de *Arabidopsis*. Los resultados mostraron que mientras en la punta de la raíz predomina la descarga vía simplasto, en las regiones maduras la ruta apoplástica es la más importante (Oparka et al., 1994; Imlau et al., 1999). En frutos de jitomate (Ruan and Patrick 1995) y tubérculo de papa (Viola et al. 2001) también se han reportado cambios ligados con el desarrollo. En las primeras etapas del desarrollo del fruto de jitomate la descarga del floema es por vía simplasto, cuando alcanza la etapa verde maduro, el plasmodesmata comienza a desaparecer y la descarga vía apoplasto se vuelve predominante (Ruan and Patrick 1995). En el tubérculo de papa sucede lo contrario, durante las etapas iniciales de su desarrollo, el plasmodesmata es cerrado y la descarga desde el complejo ECs/CAs es vía apoplasto (Viola et al., 2001). A medida que el tubérculo se expande, comienzan a aparecer plasmodesmos que comunican al floema con las células del tubérculo, de tal forma que durante el periodo de máxima acumulación de almidón la descarga del floema es fundamentalmente vía simplasto (Viola et al., 2001). En hojas de tabaco también se ha observado una transición similar: en las primeras etapas del desarrollo la descarga de fotosintatos es vía simplasto y conforme se acerca al momento en que se convierte en hoja fuente la ruta de

descarga cambia a aploplástica (Oparka and Cruz 2000). Se ha sugerido que la vía de descarga predominante es una adaptación a los procesos que tienen lugar en los diferentes órganos. La presencia de plasmodesmos facilita el movimiento de grandes cantidades de fotosintatos requeridos para la síntesis de almidón o para el crecimiento, mientras que la ausencia de los mismos es necesaria para que los tejidos acumulen cantidades importantes de sustancias osmóticamente activas (sacarosa, hexosas y ácidos orgánicos). La ruta de descarga apoplástica tiene la ventaja adicional de impedir el paso de virus y parásitos que se distribuyen por el tejido vascular (Dawson et al., 1994).

1.8 Regulación en la descarga vía simplasto.

Existen reportes que sugieren que la sacarosa podría influir sobre la cantidad de plasmodesmos que se forman (Bret-Harte and Silk 1994; Schulz 1994; Ding 1997) y se ha observado que la velocidad de descarga responde a la osmolaridad de las células del tejido de demanda (Wolswinkel and Ammerlaan 1983; Wang and Fisher 1995; Williams et al., 1991; Schulz 1995; Patrick and Offler 1996). Por lo cual se considera que el flujo depende de la actividad metabólica de los tejidos de demanda (Zhang et al., 2006) y/o de la capacidad para compartimentalizar los distintos azúcares en el interior de las células. Es por eso que algunas enzimas que participan en el metabolismo de la sacarosa, son también piezas clave durante la asimilación de fotosintatos. Por ejemplo, en papa (Zrenner et al., 1995) y tomate (D'Aoust et al., 1999) cuando se redujo la actividad de la sacarosa sintasa (Susy), el peso seco del tubérculo disminuyó en un 50% y en la importación de sacarosa por el fruto de tomate en un 90%. Otra enzima clave es la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), su papel en el metabolismo de almidón para mantener un balance osmótico se puso de manifiesto en experimentos con la cubierta de semillas de chícharo. El estudio consistió en realizar una mutación en el locus *rb* que modificó la forma de la semilla seca y

redujo el contenido de almidón en el embrión, los resultados mostraron que disminuyó la actividad de la AGPasa, así como los niveles de almidón y aminoácidos. Por su parte, la sacarosa se incrementó provocando cambios en el balance nutrimental en la semilla. Sin embargo, la osmolaridad no se afectó sugiriendo un proceso regulatorio como respuesta compensatoria (Rochat et al., 1995). Otro modelo de estudio que ha ayudado a entender el mecanismo que regula el cierre del plasmodesmata inducido por los cambios en la turgencia son en las fibras de algodón, éstas presentan una rápida elongación debido el aumento en la osmolaridad de las células inducidos por la actividad de un transportador de sacarosa que regula la entrada de sacarosa de manera reversible al plasmodesmata, y se ha sugerido que la turgencia celular es un elemento por medio del cual el ambiente puede influir en la descarga del floema (Ruan and Patrick 1995; Itaya et al., 2000; Baluska et al., 2001). En otros estudios, se ha observado que las hormonas están relacionadas con el transporte de solutos por el plasmodesmata, como las auxinas que facilitan la conducción de metabolitos hacia el interior de la células (Patrick and Offler 1996). Por otro lado, se ha estudiado que la concentración intracelular de calcio juega un papel importante en el paso de solutos a través del plasmodesmata; por ejemplo, por medio de técnicas electrofisiológicas se indujo que la concentración de calcio intracelular aumentara en células en suspensión de maíz, cuyo efecto provoco el cierre del plasmodesmata y de esa manera se regulara la entrada de solutos al interior de la células (Holdaway-Clarke et al., 2000).

Estos resultados muestran que si bien el plasmodesmata puede transportar grandes cantidades de fotosintatos, el funcionamiento está sometido a un control muy estricto, el cual permite que la distribución de fotosintatos se ajuste dependiendo de la actividad metabólica de cada tejido de la planta.

1.9 Regulación en la descarga vía apoplasto

La asimilación de azúcares en los tejidos demanda donde la vía de descarga es apoplástica depende de la actividad de transportadores de sacarosa y hexosas presentes en la membrana plasmática. En estas circunstancias, la actividad de la invertasa asociada a la pared celular es muy importante pues su actividad puede modificar la composición de los azúcares solubles que pueden ser asimilados, así como influir en el potencial osmótico, el crecimiento celular y en la respuesta a varios tipos de estreses (Roitsch and González 2004). Aproximadamente, en 50 especies de plantas se han reportado más de 300 secuencias génicas de invertasas (Roitsch and Tanner 1994; Tymowska-Lalanne and Kreis 1998; Roitsch et al., 2000) las cuales se clasifican en tres tipos dependiendo de su punto isoeléctrico (pI) y de su localización celular; en asociada a la pared celular o extracelular, citoplásmicas y vacuolares.

Las invertasas extracelulares tienen un pH óptimo entre 3.0-5.0 (Eschrich 1980). La invertasas citoplasmáticas o también conocidas como alcalinas presenta un pH óptimo entre 6.0 y 8.0. La actividad de éstas es baja y pocas veces se ha clonado o caracterizado, por lo que su papel fisiológico es poco conocido (Vaughn et al. 2002). Por último, la invertasa vacuolar o también conocida como invertasa ácida, presenta un pH óptimo entre 5.0-5.5. Es responsable de mantener los niveles de sacarosa en la vacuola y participa en su movilización para procesos metabólicos (Husain 2001).

La actividad de la invertasa extracelular se incrementa en tejidos donde la expansión celular es alta (Roitsch et al., 2000). Su presencia es importante para crear y mantener grandes diferencias entre las concentraciones de sacarosa del floema y la de células de los tejidos demanda. Al mismo tiempo, evita que los transportadores de sacarosa (SUTs) localizados en la membranas del complejo ECs/CAs recarguen al floema (Eschrich 1980). Varios estudios han demostrado la importancia de la invertasa de pared en la fisiología de las plantas. La represión

por antisentido en plantas de zanahoria causa una marcada disminución en el crecimiento de la raíz y un aumento en el número de hojas (Tang et al., 1999). En plantas de maíz se disminuyó la actividad de esta enzima en el tapetum y como resultado se produjeron granos de polen con morfología alterada y se redujó el porcentaje de germinación (Goetz et al., 2001). Las hormonas que incrementan la demanda de carbohidratos, también afectan la expresión génica de las invertasas (Roitsch and Gonzalez 2004). En maíz, el ácido indol 3-acético (IAA) promueve la transcripción de la invertasa ácida y vacuolar (Ivr2) y facilita la elongación y curvatura del tallo (Long et al., 2002). Durante la senescencia de las hojas, los niveles de citocininas disminuyen al mismo tiempo que los nutrientes se movilizan hacia el resto de la planta, si se aplica citocininas a las hojas se detiene la senescencia de la hoja (Lara et al., 2004). Sin embargo, en plantas transgénicas de tabaco que expresan a la invertasa de pared celular bajo el promotor inducible SAG12 (específico del proceso de senescencia), se observó que el incremento en la expresión de la invertasa también aumenta la expresión de los transportadores de hexosas y retrasa el proceso de senescencia (Gan and Amasino 1995). En el mismo trabajo, se observó que si los niveles de invertasa disminuyen, la aplicación de citocininas es incapaz de detener la senescencia de las hojas.

1.10 Mecanismos de señalización por azúcares

Los carbohidratos en las plantas cumplen diversas funciones, son fuente de energía y precursores para la síntesis de otras moléculas (Sheen et al., 1999; Koch 2004; Smeekens 2000) y, al mismo tiempo, regulan la expresión de diversos genes y modifican numerosos procesos celulares (Jang and Sheen 1997; Rolland et al., 2002; Koch 2004; Gibson 2005; Dekkers et al., 2008). Los efectos producidos por azúcares son numerosos y pueden afectar procesos como la germinación, el desarrollo, la morfogénesis de las hojas, formación de raíces, floración, embriogénesis y respuesta a patógenos (Koch 2004; Mishra et al.

2009), sugiriendo que existe una coordinación entre desarrollo y disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, el estudio del papel de los azúcares como reguladores de procesos es complicado por la dificultad para separar sus diferentes funciones y porque sus efectos varía en distintos órganos. Esto lleva a que con frecuencia se obtengan resultados contradictorios. A pesar de que la glucosa es necesaria para el crecimiento, la germinación en semillas de *Arabidopsis* se retrasa cuando la concentración de glucosa es mayor a 300 mM (To et al., 2002; Price et al., 2004; Dekkers et al., 2008; Ullah et al., 2002). Altas concentraciones de glucosa también impiden la expansión de cotiledones y el desarrollo de las plántulas (Nemeth et al., 1998; Arenas-Huertero et al., 2000; Laby et al., 2000; Gibson 2005; Jang and Sheen 1997; Zhou et al., 1998); así como la inhibición del desarrollo de cloroplastos (To et al., 2003), y la acumulación de antocianinas en los cotiledones (Lu and Rausher 2003). Por otro lado, concentraciones equimolares de sorbitol o manitol no tienen el mismo efecto que la glucosa, indicando que estas respuestas no se deben al potencial osmótico (Price et al. 2004; Dekkers et al. 2008).

Se han identificado y caracterizado varias mutantes afectadas en la percepción de azúcares. Se les ha clasificado en aquellas que muestran hipersensibilidad o insensibilidad a glucosa (Jang and Sheen 1997; Zhou et al., 1998; Rolland et al., 2002) o a sacarosa (Pego et al., 2000) y representan una valiosa herramienta para el estudio en las vías de señalización por azúcares. Su análisis genético ha mostrado que la función de los azúcares como reguladores del crecimiento involucra la participación del ácido abscísico (ABA) y de azúcares (Gazzarrini and McCourt 2001; Finkelstein et al., 2002; Leon and Sheen 2003; Rook et al. 2006; Dekkers et al., 2008). Los escrutinios en plantas de *Arabidopsis* ha permitido identificar cuatro mutantes que responden a azúcares; la mutante sacarosa desacoplada (*sun*), mutante de inducción de sacarosa impedida (*isi*), la mutante insensible a glucosa (*gin*) y la mutante insensible a azúcar (*sis*), identificadas también como mutantes deficientes en la producción de ABA

(*aba/isi4/gin1/sis4*, *aba3/gin5*) e insensibles a ABA y a glucosa (*abi4/sun6/isi3/gin6/sis5*) (Arenas-Huertero et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001). La expresión de muchos genes está co-regulada por azúcares y ABA. En un estudio se estimó que el 14 % de los genes regulados por ABA también son inducidos en respuesta a glucosa (Li et al., 2006), incluyendo a *ApL3* (subunidad larga de la ADP-glucosapirifosforilasa), la cual está involucrada en la síntesis de almidón (Rook and Bevan 2003).

Respecto al mecanismo que permite a los azúcares actuar como reguladores del crecimiento y del desarrollo, diversas mutantes de *Arabidopsis* cuyo fenotipo es de sensibilidad e insensibilidad a azúcares (Moore et al. 2003) ha revelado que la regulación de expresión de genes está relacionados con procesos como el desarrollo a nivel de plántula, raíz, tallo, inflorescencia y desarrollo de la semilla (Smeekens, 2000; Gibson, 2005; Rolland et al., 2006), lo que sugiere que participan varias vías metabólicas en la percepción de azúcares, metabolitos y niveles de energía (Corruzzi and Zhuo, 2001; Halford and Hey. 2009; Halford and Paul 2003; Rolland et al., 2006).

La mutante *Arabidopsis* glucosa insensible2 (*gin-2*) con mutación en la secuencia del gen de la hexocinasa-1 (AtHXK1) ha sido de gran ayuda para el estudio de la señalización por azúcares, su fenotipo es de insensibilidad a elevadas concentraciones de glucosa y se le ha atribuido el papel de sensor de los niveles de azúcares. Sin embargo, se ha establecido por diversos experimentos que la función de señalización es independiente de la función catalítica (Moore et al., 2003; Towle 2005).

Por otro lado, se ha demostrado que HXK1 se puede localizar con varios organelos, HXK1 forma un complejo con una H⁺-ATPasa vacuolar (VHA-B1) y la unidad regulatoria 19S del proteosoma RPT5B, ambas proteína junto con la HXK1 modulan la regulación de genes blanco no relacionados con el metabolismo (Cho et al., 2006). También HXK1 se ha localizado en plastidios (Graham, Williams et

al. 2007), asociada a la membrana de la mitocondria (Granot 2007; Damari-Weissler et al., 2007) y a la F-actina del citoesqueleto (Balasubramanian et al., 2007), lo que hace suponer que podría participar en otros procesos.

En otros estudios, se han utilizado azúcares no metabolizables o parcialmente metabolizables y se ha concluido que el mecanismo de transducción de señales dependiente de azúcares no siempre requiere que éstas sean metabolizadas. Por ejemplo, la expresión de la invertasa y de la sacarosa sintasa es inducida por glucosa 6-deoxiglucosa, análogo de la glucosa que no puede ser fosforilada y que a su vez no reprime la expresión de genes fotosintéticos como lo hace la glucosa (Jang and Sheen 1997; Roitsch and Gonzalez 2004). De manera similar, 3-*O*-metilglucosa que no es metabolizable y 2-deoxiglucosa que es fosforilada por la hexocinasa pero no metabolizada en la vía glicolítica, pueden ser percibidas como señales (Jang and Sheen 1997). Además del mecanismo en donde la HXK participa como mediador en la regulación de la expresión de muchos genes que se estimulan por glucosa, es posible que existan otros azúcares que puedan participar en otros mecanismos. Por ejemplo, el gen que codifica para el translocador de triosas fosfato en tabaco se reprime por glucosa, pero se activa por fructosa (Knight and Gray 1994).

De acuerdo con lo anterior, se ha establecido que en plantas existen por lo menos tres vías que permiten a los azúcares actuar como reguladores del crecimiento y del desarrollo. La primera que es dependiente de hexocinasa, aunque la actividad catalítica *per se* parece que no siempre es crucial para el funcionamiento de esta ruta. Dentro de los genes que se regulan por esta vía se encuentran *CAB1*, *PC*, *PLD* y *rbsc* (Xiao et al., 2000).

La segunda vía es dependiente de la actividad catalítica de HXK. Esta vía puede depender de los niveles de un metabolito desconocido que podría generarse a partir del metabolismo de la glucosa. *PR1* y *PR5* (genes de respuesta a patógenos) son ejemplos de genes cuya expresión es regulada por este

mecanismo. La tercera ruta es independiente de AtHXT1. Los componentes de este mecanismo de transducción son desconocidos, aunque se ha establecido que el efecto de los azúcares sobre la expresión de AGPasa, *AS1*, *CHS* y *PAL1* es dependiente de este mecanismo (Xiao et al. 2000).

Además de los mecanismos descritos, es probable que las células vegetales dispongan de otros como los que funcionan en levaduras, donde la presencia de las proteínas de membrana homólogas a transportadores de hexosas catalíticamente inactivas conocidas como Rgt2 y SNF3 cuya función es la de percibir en el medio altas y bajas concentraciones de glucosa respectivamente (Özcan et al., 1996; Özcan et al 1998. Por otro lado, en *A. thaliana*, se han identificado 26 secuencias que podrían codificar para transportadores de monosacáridos (Lalonde et al., 1999; Roitsch 1999; Sheen et al., 1999) pero sólo en pocos casos se ha comprobado la funcionalidad de las mismas, por lo que la posibilidad de que algunas de ellas pudieran funcionar como sensores y contribuir a la generación de respuestas vía un mecanismo en el que la HXK podría no participar es algo que debe ser explorado (Xiao et al., 2000).

1. 11 El fruto de jitomate.

El estudio de la formación y desarrollo del fruto de jitomate ha recibido mucho interés, pues además de su gran importancia económica, es un buen modelo para el estudio de los factores bioquímico, fisiológico y metabólico (Sterrett et al., 2005). Se ha establecido que las etapas tempranas del desarrollo del fruto de jitomate tienen gran influencia sobre la etapa de maduración y se ha observado que genes que afectan el tamaño y la composición de los frutos que con frecuencia también están involucrados en el metabolismo, transporte y distribución de fotosintatos (Hewitt and Stevens 1981; Hewitt et al., 1982; Robinson et al., 1988; Yelle et al., 1988; Yelle et al., 1991; Ho 1996). El desarrollo del fruto de jitomate puede dividirse en tres etapas. La primera etapa que dura

aproximadamente 45 días, se caracteriza por la división celular que ocurre en pericarpio, epidermis, región locular y ovario, así como el posterior alargamiento de estas células, gracias a lo cual, su volumen puede aumentar hasta 10 veces. La segunda fase, comprende el periodo entre los 45 - 65 días después de la polinización y en ella el fruto alcanza su tamaño máximo. Esta etapa termina cuando comienza el proceso de maduración del fruto (Yelle et al., 1988). La última etapa es la de maduración, comprende el periodo que va de los 65-90 días posteriores a la antesis y en ella el fruto acumula la mayor cantidad de los azúcares y ácidos orgánicos presentes en el fruto maduro y tienen lugar cambios importantes en su coloración, textura y aroma (Figura 5).

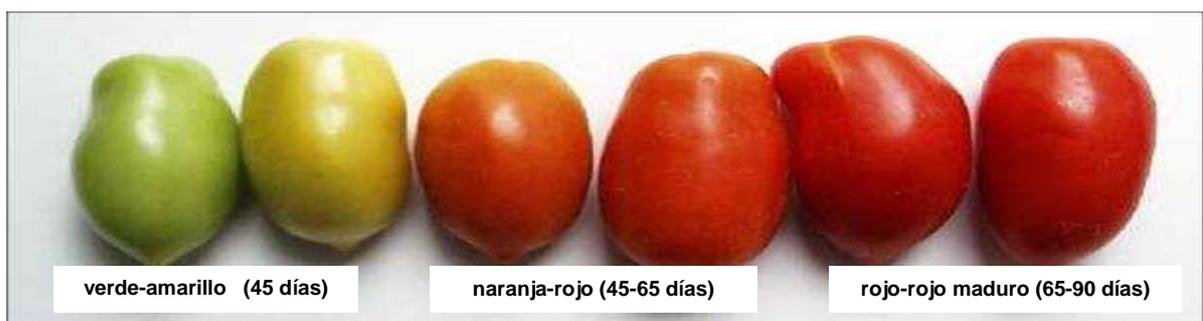


Figura 5. Etapas de maduración del fruto de jitomate. Imagen tomada de <http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort410/tomat/to00001.htm>

En ese sentido el tamaño final del fruto depende de la producción de células durante las dos primeras semanas después de la polinización (Zhang et al. 2006), mientras que la concentración de azúcares y ácidos orgánicos en los frutos maduros esta determinada por la asimilación de fotosintatos durante la fase de maduración. Por su hábito de crecimiento las plantas de jitomate pueden clasificarse en determinadas e indeterminadas. Las determinadas crecen un metro de altura y producen de 3-9 racimos en un periodo de 3 a 4 meses, mientras que las indeterminadas pueden crecer hasta nueve metros de altura, y cultivadas en invernadero en un periodo de 10-11 meses pueden llegar a producir hasta 35

racimos. La distribución de materia seca es diferente en cada caso. Por ejemplo, las plantas de hábito determinado pueden acumular hasta 445 g de materia seca y su índice de cosecha (porcentaje de materia seca acumulada en el fruto) puede alcanzar 55% (Robinson et al., 1988; Paterson et al., 1991). En contraste, las de hábito indeterminado pueden acumular hasta 1250 g de materia seca con un índice de cosecha de 69% (Hewitt, et al 1988). De los metabolitos solubles que acumulan los frutos maduros de las variedades comerciales de jitomate, los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) representan el 33%, los ácidos orgánicos el 13% y los aminoácidos un 15% (Hewitt and Stevens 1981; Hewitt et al., 1982). La proporción entre sacarosa y hexosas en los frutos maduros varía de acuerdo al genotipo. Por ejemplo, en la mayoría de las variedades comerciales predominan las hexosas (Ho 1996; Kortstee et al., 2007). En contraste, en tomate cherry (*L. esculentum* var. *cerasiforme*), predomina la sacarosa que puede llegar a representar a el 3% y al 5% de la materia seca de los frutos maduros (Robinson, Hewitt et al. 1988). Algo similar sucede en genotipos silvestres (*L. hirsutum*, *L. chmielewskii* y *L. peruvianum*), donde la cantidad de sacarosa puede llegar al 70-90% de los sólidos solubles del fruto maduro (Yelle et al., 1988; Paterson et al., 1991). Se ha investigado el papel de las actividades de la invertasa y la sacarosa sintasa (Susy) sobre el metabolismo de carbono y la composición del fruto. Se han encontrado dos isoformas de la invertasa: la asociada a la pared celular, la cual hidroliza la sacarosa que se descarga del floema en el apoplasto y la que se encuentra en la vacuola, la cual es importante para determinar el balance entre sacarosa y hexosas en el organelo (Proels and Roitsch 2009). La actividad de la sacarosa sintasa aumenta en la fase inicial del desarrollo y se le ha asociado con la acumulación de almidón que se observa en esa etapa (Worrell et al., 1991; Nguyen-Quoc and Foyer 2001). Otros trabajos han puesto de manifiesto la importancia de las actividades de fructocinasa (Kanayama et al., 1998),

hexocinasa (Menu et al., 2004) y fructosa 1,6 bifosfatasa (Obiadalla-Ali et al., 2004) sobre la cantidad de carbono que importa el fruto.

En la etapas iniciales del desarrollo, la descarga de fotosintatos es vía simplasto y a medida que el fruto madura la ruta de descarga cambia y en el periodo de maduración (donde se acumula la mayor parte de los azúcares y ácidos orgánicos presentes en el fruto) la vía apoplástica es la mas importante (Ruan and Patrick 1995; Zhang et al., 2006). La presencia de la invertasa asociada a la pared celular cuya actividad es suficiente para hidrolizar la mayor parte de la sacarosa liberada al apoplasto, sugiere que la actividad de los transportadores de hexosas también debe ser importante para determinar la composición de azúcares en el fruto maduro. En este sentido es interesante destacar que el contenido de azúcares y ácidos orgánicos en frutos de jitomate es independiente de la cantidad de azúcares exportados desde las hojas, pero se correlaciona positivamente con la actividad de transporte de hexosas (Kortstee et al. 2007).

Se han usado diferentes estrategias para incrementar el rendimiento de las variedades comerciales. Una de ellas es la introgresión de características presentes en variedades silvestres (Eshed and Zamir 1995). Por ejemplo la cruce entre *Solunum lycopersicum* y *Solunum habrochaites* donde resultó en una línea de tomate que acumula mayor cantidad de almidón en las fases iniciales del desarrollo del fruto. Este cambio se debió a la presencia de un alelo para AGPasa derivado de *S. habrochaites* (Petreikov et al., 2006). Otro caso fue el de la Introgresión de una isoforma de la invertasa asociada a la pared celular de *S. pennellii* LA0716 en *S. lycopersicum* donde se incrementó la producción de frutos como la del contenido de sólidos solubles (Baxter et al., 2005). Estos resultados reflejan el potencial que tiene la manipulación de la fuerza de demanda para incrementar la calidad de los frutos en variedades comerciales (Kortstee et al. 2007).

1.12 *Arabidopsis* y Jitomate como modelos de estudio

El conocimiento acumulado a lo largo de muchos años así como la gran cantidad de recursos disponibles para la investigación en *A. thaliana* han convertido a esta planta en el modelo favorito de muchos investigadores; por lo que no es sorprendente que mucho de lo que se conoce acerca del metabolismo y señalización por azúcares provenga de estudios realizados con esta especie (Smeekens 2000). Gracias a ellos se dispone de un panorama que aun cuando no es completo, si da una buena idea acerca de los mecanismos por medio de los cuales los azúcares al regular la expresión de genes influyen sobre diferentes procesos de desarrollo, de sus conexiones con señales hormonales y de la importancia que diversos factores físicos y nutrimentales (Smeekens 2000; Leon and Sheen 2003; Rolland et al. 2006). Sin embargo, el papel de los transportadores de hexosas como componentes de los mecanismos de señalización por azúcares es un aspecto que ha recibido poca atención. Por otro lado, el hecho de que la actividad de los transportadores de hexosas parezca crítica para determinar la cantidad de azúcares y ácidos orgánicos que se acumularan en los frutos maduros, convierten a estas especies (*Arabidopsis* y jitomate) en dos modelos complementarios para investigar como la asimilación de hexosas afecta diferentes aspectos de la fisiología de las plantas.

1.13 Hipótesis

En órganos de demanda donde la descarga del floema es vía apoplasto, la expresión del transportador de hexosas Hxt2 de *Saccharomyces cerevisiae* incrementará la asimilación de hexosas. Esta situación modificará la distribución de fotosintatos y alterará el metabolismo de los órganos de demanda.

1.14 Objetivo general

- Analizar los efectos por la expresión del transportador HXT2 sobre el metabolismo de carbono.

1.15 Objetivos específicos

- Obtener plantas transgénicas de *A. thaliana* y jitomate.
- Comprobar que sean plantas transgénicas por PCR y Southern-blot.
- Obtener anticuerpos contra el transportador HXT2.
- Medir la expresión del transportador HXT2 por Western-blot en frutos de jitomate y en tejidos demanda de *A. thaliana*.
- Identificar la distribución celular del transportador HXT2.
- Analizar el efecto de la expresión del transportador HXT2 mediante la medición de toma de azúcares marcados con ^{14}C y sobre la acumulación de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, almidón y hexosas fosfato) y ácidos orgánicos (malato y citrato) en frutos de jitomate durante el desarrollo en plántulas y tejidos de demanda de *A. thaliana*.
- Analizar si la expresión del transportador HXT2 modifica el fenotipo en plántulas de *A. thaliana* y jitomate.
- Estudiar si la expresión del transportador HXT2 modifica el metabolismo de carbono.
- Analizar si la expresión del transportador HXT2 mejora la calidad de los frutos de jitomate.
- Analizar el efecto de la expresión del transportador HXT2 sobre la productividad de las plantas de jitomate.

2. Materiales y métodos

2.1 Construcción para la obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana* y Jitomate

2.1.1 Amplificación por PCR del promotor 2A11 y del gen que codifica para el transportador *hxt2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para obtener las plantas transgénicas de jitomate se amplificó por PCR la secuencia del promotor 2A11 y del gen del transportador *hxt2*. En el caso de las plantas transgénicas de *A. thaliana* se eligió el promotor 35S del Virus del Mosaico de Coliflor (CaMV 35S), por lo que sólo se amplificó sólo la secuencia del transportador *hxt2* debido a que el promotor se encontraba la secuencia en el vector binario pBin-19. Todas las secuencias se amplificaron usando la técnica de PCR y las secuencias respectivas se obtuvieron consultando la base del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y con base en ellas se diseñaron oligonucleótidos específicos. Para el promotor 2A11 se amplificó a partir de DNA genómico de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y para la secuencia del transportador *hxt2* se amplificó a partir de DNA genómico de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes: promotor 2A11, sentido 5' CCCCAGCTCTCGAGCCCTTTAAAAAGTATACTC3' y antisentido 5'ATAAGATTGCGGCCGCAATGGTTTTGGATTAATTGCTAATT3' para el transportador *hxt2* sentido, 5'ATAAGATTGCGGCCGCATGTCTGAATTCGCTACTAGCCGCG3' y antisentido 5'CGCGGATCCTTATTCCTCGGAACTCTTTTTCTT3'. El oligonucleótido en sentido del promotor posee un sitio *Sst* I, mientras que en la antisentido posee un sitio *Not* I. En el caso de los oligonucleótidos usados para amplificar el transportador *hxt2*, el oligonucleótido en sentido posee un sitio *Not* I en el sentido y en la antisentido *Bam* HI. Para la obtención de las plantas transgénicas de *A. thaliana* las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas fueron las mismas, con la diferencia que el oligonucleótido en sentido posee un sitio *Xba* I. El programa usado en todos los casos 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 μ M oligonucleótidos y 1.5 U *taq* polimerasa (Invitrogen). Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% y la banda obtenida se cortó para después purificarla con reactivos elaborados por Marligen, Bioscience. Los productos de PCR obtenidos se usaron para clonarlos en el vector pGEM-T (Promega). 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 μ l. La reacción de ligación se incubó toda la noche a 4°C.

Para todas las secuencias amplificadas por PCR se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α por el método de choque térmico por separado (Sambrook, 1989). Las células DH5 α (100 μ l) se mezclaron 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 incubó 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. En este volumen se plaquearon las cajas con medio LB y ampicilina 50 μ g/ml, incubándose toda la noche a 37°C.

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 μ l de solución GTE (50 mM de glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 y 10 mM de EDTA). Después, se adicionaron 200 μ l de la solución de lisis (0.2 N NaOH, 1 % SDS) y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente 5 veces. Posteriormente, se agregaron 150 μ l de solución 5M 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, alcohol isoamílico (25:24:1) y posteriormente se agitó fuertemente (Vortex), por último 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 1.3 Kpb correspondiente al tamaño de Promotor 2A11 y 1.6 Kpb correspondiente al tamaño esperado y que corresponde al del transportador *hxt2*.

A partir de las colonias recombinantes se iniciaron los cultivos en 3 ml en medio LB con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), del que se purificaron por columna (Qiagen) los plásmidos pGEM-T con el promotor 2A11 y otras por separado del gen del transportador *hxt2* clonado (siguiendo instrucciones y usando reactivos de Qiagen). Los plásmidos se prepararon a una concentración de 300 $\text{ng}/\mu\text{l}$ y posteriormente se secuenciaron en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en un secuenciador automático ABIPRISM 310 (Perkin Elmer) usando el oligonucleótido T7.

2.1.2 Clonación del transportador *hxt2* en el vector binario p-Bin19 3X35S

Se comprobó que la secuencia amplificada y clonada correspondía al 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 pBin-19 el cual tiene 3 copias del promotor 35S (3X35S). Para realizar la reacción de ligación, primero se digirió el vector binario Bin-19 3X35S con las enzimas *Xba* I y *Bam*H I y el proceso de ligación se realizó bajo el mismo procedimiento anterior.

Una vez comprobado que el gen del transportador estuviera clonado en el vector binario pBin19 3X35S, se realizó una maxiprep con el fin de obtener una cantidad de plásmido suficiente para transformar células competentes de *A. tumefaciens* LBA4404.

2.1.3 Clonación del transportador *hxt2* en el vector binario pZY.101.1

Se comprobó por análisis de restricción que la secuencia del promotor 2A11 y del transportador *hxt2* correspondían a los tamaños de 1.3 Kpb y 1.6 Kpb respectivamente. Ambos fragmentos se clonaron en el vector Bluescript® +/- phagemid. Para realizar la reacción de ligación, primero se digirió el vector con las enzimas *Sst* I y *Not*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 Bluescript® +/- phagemid digerido y desfosforilado, 150 ng de DNA del promotor 2A11, 3U de ligasa y 15 µl agua desionizada para completar un volumen de 30 µl. La mezcla se incubó a 16°C durante toda la noche y al día siguiente se transformaron bacterias competentes de *E. coli* DH5α por el método de choque térmico (Sambrook, 1989). Las bacterias transformadas se pusieron a crecer en cajas con medio LB con antibiótico (Kanamicina 50 µg/ml). Posteriormente, se purificó el plásmido de las colonias recombinantes, se hizo el análisis de restricción y se realizó el mismo procedimiento para clonar el transportador *hxt2*, ahora cortando el plásmido en los sitios *Not* I y *Bam* HI. Una vez comprobado que el promotor 2A11 y el gen del transportador *hxt2* estuvieran clonados en el vector Bluescript® +/- phagemid se realizó la clonación del cassette completo (promotor y transportador) el vector Binario pZY 101.1 digiriendo con *Sst* I y *Bam*HI, las condiciones de ligación se realizaron igual que en los casos anteriores y se transformaron células competentes DH5α con el marcador de selección streptomycin (50µg /ml). Posteriormente se cultivaron células transformantes con el fin de obtener una

cantidad de plásmido suficiente para transformar células competentes de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 por electroporación.

Para transformar a las plantas de jitomate se siguió el método reportado por Ellul et al., 2003. Se utilizaron cotiledones provenientes de semillas de jitomate de una variedad comercial (Marmande V.R). Los tejidos transformados se seleccionaron por su capacidad de crecer en presencia del herbicida BASTA.

2.1.4 Transformación de células de *A. tumefaciens* LAB4404 por electroporación

Para transformación de *A. tumefaciens* se descongelaron células competentes LBA4404 y se les agregó 5 µg de vectores binarios pZY101.1 y Bin-19 3X35S recombinantes por separado. Las mezclas se incubaron en hielo por 3 min y luego se transfirieron 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 2h. Finalmente, se tomaron 200 µl de cada transformación y se plaquearon en cajas con marcadores de selección incubando a 28°C durante dos o tres días en oscuridad. 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.

2.2 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

2.2.1 Material biológico y crecimiento de las plantas

Para la transformación de *A. thaliana* se siguió el método de Clough and Bent, (1998). Primero las semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia se pusieron a germinar en macetas con tierra Metromix 200, después se colocaron a 4°C durante dos días en oscuridad y se colocaron en una cámara de crecimiento con 8 h luz y 16 h de oscuridad. Las condiciones de crecimiento fue luz con una

combinación de lámparas fluorescentes e incandescentes para obtener una intensidad de $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de 22°C y a una humedad de 50-60%, pasados ocho días se transplantaron una o dos plantas por maceta. Una vez que crecieron los primeros brotes florales se podaron y con ello se logró la emergencia de múltiples brotes secundarios.

Al iniciar la floración, las plantas se transformaron utilizando el método de inmersión (Clough y Bent, 1998). De acuerdo al procedimiento, las bacterias transformadas de *A. tumefaciens* se cultivaron en medio LB líquido con antibiótico (Kanamicina $50 \mu\text{g/ml}$, Rifampicina $100 \mu\text{l/ml}$, Streptomina $300 \mu\text{g/ml}$) a $25\text{-}28^\circ\text{C}$ 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 se cosecharon por centrifugación durante 20 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente; se resuspendieron en medio de infiltración (5.0 % (p/v) de sacarosa) y diluidas hasta alcanzar una OD_{600} de aproximadamente 0.80. Posteriormente, se añadió 0.05 % del surfactante Silwet L-77, y a continuación las inflorescencias de las 45 plantas se introdujeron en esta suspensión durante 3-5 seg. Las plantas se colocaron en sombra tapadas con plástico para conservar la humedad y al día siguiente se regresaron a la cámara de crecimiento. Las cubiertas de plástico fueron retiradas 24h después del tratamiento y 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 eppendorf de 1.5 ml a 4°C en un ambiente seco.

2.2.2 Selección de probables transformantes usando antibióticos como marcadores

Las semillas fueron colectadas y desinfectadas con un tratamiento que incluyó un lavado con etanol al 95% por 30-60 seg, después se eliminó la solución etanólica 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 ~1500 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 a 24°C. Después de 10 días, seis plantas que crecieron normalmente en el medio anterior fueron transplantadas a tierra (Metromix 200, Scott®), en donde se cultivaron bajo las condiciones descritas anteriormente. 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. Las plantas se segregaron hasta la T5 germinando el 100% en presencia de Kanamicina 50µg/ml).

2.2.3 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 el tejido (0.1 g) se molió en un mortero con nitrógeno líquido, usando una espátula el tejido pulverizado se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml 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 µl de etanol absoluto y se centrifugó a 1,000 rpm durante 10 min. Para limpiar más la muestra de DNA se dio un segundo lavado con 300 µl 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 µl de agua estéril.

2.2.4 Determinación del gen del transportador *hxt2* por PCR

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

2.2.5 Determinación del gen del transportador *hxt2* por Southern-blot

Aproximadamente 15 µg de DNA genómico de todas las líneas transgénicas y silvestre se digirieron con la enzima *EcoRI*. El DNA genómico se separó por electroforesis en gel de agarosa 0.8% (w/v) a 60 V durante 2h y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond N⁺ (Amersham Life Science) de acuerdo al método descrito por Sambrook et al., 1989. El DNA se hibrido con la sonda específica marcada utilizando Random primer [³²P] para el gen *hxt2*. La hibridación se realizó con alta astringencia en amortiguador de fosfatos/SDS (250 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM EDTA, 3.5% SDS) a 62°C durante toda la noche. La membrana primero fue lavada a temperatura ambiente durante 10 min con SSC/SDS 2X, después con SSC/SDS 0.2X durante el mismo tiempo y un último lavado con SSC/SDS 0.2X a 62°C. La membrana se expuso a una película Kodak XAR films y se guardó a -70°C durante dos semanas.

2.2.6 Determinación del RNA mensajero del gen *hxt2*, *Apl3*, *Hxk1* y *STP1* por Northern-blot

El RNA se purificó de material congelado correspondiente plántulas de *A. thaliana* cultivadas en medio líquido (Gamborg`s et al., 1968) con sacarosa al 1% en agitación continua a 125 rpm, 25°C y fotoperiodo de 16h luz 8h de oscuridad. Para la determinación de los niveles del transcrito de los genes *Apl3*, *HxK1*, *STP1* las plantas se cultivaron en medio líquido (Gamborg`s et al., 1968) en agitación 125 rpm durante 12 días en oscuridad, posteriormente se cambiaron a medio sin fuente de carbono durante 2 días, por último se transfirieron a diferentes medios; control sin glucosa, 3% de glucosa y 3% de manitol durante 6 horas. El RNA total se aisló con el reactivo de Trizol (Invitrogen), 20 µg de muestras de líneas

transgénicas y silvestre se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond N⁺ (American Life Science) de acuerdo con Sambrook et al., 1989. El DNA se hibridó con Random primer [³²P] con la sonda específica para el gen *hxt2* y los genes *ApI3*, *HxK1*, *STP1*. La hibridación se realizó con alta astringencia en amortiguador de fosfatos/SDS (250 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM EDTA, 3.5% SDS) a 62°C durante toda la noche. La membrana se lavó a temperatura ambiente con SSC/SDS 2X y 0.2X durante 10 min cada uno y 0.2X SSC/SDS 10 min a 65°C. La membrana se expuso a una película Kodak XAR films y se guardó a -70°C durante dos semanas.

2.2.7 Obtención de anticuerpos policlonales contra el transportador Hxt2

Con el fin de obtener anticuerpos contra el transportador Hxt2 se seleccionó una región inmunogénica e hidrofílica del transportador Hxt2 de 50 aminoácidos con el programa CLC. Combined Work-Bench. Version 3.5.1 donde los resultados obtenidos mostraron la siguiente secuencia ATSRVESGSQQTSIHSTPIVQ KLETDESPIQTKSEYTNAELPA.

Para obtener la proteína recombinante en *E. coli*, inicialmente se diseñaron oligos que amplifican la región de 150 pb con la secuencia del sentido 5' CGCGGATCC GCTACTAGCCGCGTTGAAAGT 3' y el antisentido 5' CGCGGATCCGCTACT AGCCGCGTTGAAAGT 3', los oligos se diseñaron con sitios de restricción por *Bam* HI y *EcoR* I respectivamente. La secuencia se amplificó por PCR a partir de DNA plasmídico donde la secuencia del transportador *hxt2* se clonó previamente en el vector pGMTeasy. El producto de PCR de 150 pb se clonó de igual forma en el vector pGEM-T easy, posteriormente se analizó con enzimas de restricción y se mandó secuenciar al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

A partir de un cultivo de bacterias se obtuvo cantidad necesaria de DNA para realizar la clonación en el vector de expresión pGEX-4T-2 que contiene la secuencia de la glutation S-transferasa (GST) y el promotor inducible de la Beta-galactosidasa. Las bacterias que se transformaron fueron de *E. coli* (cepa BL21) por choque térmico. Se seleccionaron las colonias resistentes a kanamicina (50 µg

/ml), y posteriormente se purificó el plásmido por miniprep y se analizó por restricción.

La proteína recombinante se expresó en medio de cultivo 2xyTA (triptona al 1.6 %, extracto de levadura 1% y NaCl al 0.5%) se dejó en agitación a 200 rpm hasta que alcanzara una DO de 0.7 a 595 nm, la inducción de la proteína se realizó añadiendo IPTG a una concentración final de 0.1 mM durante 3h antes de purificar la proteína. Posteriormente el cultivo se centrifugó a una velocidad de 7000xg durante 10 min, se lavó el pellet con PBS 1X, para después sonicar las bacterias a 30 MHz por 4 veces. Se volvió a centrifugar y a la fase soluble del sonificado se le agregó 2 ml de la resina glutatión-sefarosa 4B donde la proteína de fusión junto a la proteína recombinante se unieron a la resina. Para separar la proteína de fusión de la proteína recombinante se cortó con la proteasa trombina, la reacción se llevó a cabo con 50 Unidades por cada ml de volumen de la solución de la proteína recombinante obtenida. Se verificó por SDS-PAGE que la proteína recombinante estuviera pura y posteriormente se inmunizó a los conejos mezclando la proteína recombinante con hemocianina de cangrejo (sigma) preparada a una concentración de 2 mg/ml, esta solución se le adicionó adyubante completo de Freud (Sigma) en una proporción 1:1 en para después inmunizar conejos por vía subcutánea. Se obtuvo el suero preinmune y después de una cuarta inmunización se sangró al conejo. La preparación del suero se realizó centrifugando la sangre coagulada a 3000 g y el sobrenadante se le agregó sulfato de amonio saturado a 0.5 volúmenes del volumen original de suero. Después de centrifugar se resuspendió el precipitado en PBS 1X y se almacenó a 4°C.

Los extractos de proteína recombinante se obtuvieron de cultivos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) cepa AH109 y de plantas de *Arabidopsis* transgénicas y silvestres, para el caso de levadura los cultivos se realizaron en medio YPD (peptona 2 %, extracto de levadura 1% y glucosa al 0.1%) en glucosa a 100 mM y para la inducción del transportador hxt2 se obtuvo cambiando a 5 mM de glucosa una vez que alcanzó una DO de 0.5 a 595 nm.

En lo que se refiere a las plantas de *Arabidopsis* se realizó germinando las semillas en frascos estériles en medio líquido en medio Gamborg's B5 con sacarosa al 1% y con agitación a 250 rpm, y después de 12 días se obtuvo tejido suficiente para extraer la proteína total. El cocktail para extraer la proteína total para las levaduras como para las plantas de *Arabidopsis* se preparó de la siguiente manera: Tris-HCl pH 7.5 50mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, Beta-mercaptoetanol 15 mM, y PMSF 1mM). Para la extracción de las fracciones microsomales se centrifugó el primer sobrenadante a 85, 000 g durante 1h, posteriormente al precipitado se disolvió en amortiguador y se cuantificó la cantidad de proteína. La transferencia de las proteínas se realizó cuantificando la proteína por el método de Bradford (1956), se cargó 5µg de proteína correspondiente a cada tratamiento y se realizó un SDS-PAGE de acuerdo al método de Laemmli (1970) a un porcentaje de acrilamida del 12%. El gel se tiñó con Coomassie azul brillante R-250 al 0.1% disuelto en methanol:ácido acético:agua (45:10:45, v:v) y desteñado con methanol: ácido acético: agua (30:5:65, v:v). Simultáneamente se corrió otro gel para hacer el Western-blot, la transferencia se hizo en una membrana de nitrocelulosa H-bond (Amersham). El título se determinó utilizando diferentes diluciones en la solución de Bloqueo (leche descremada en polvo al 5% en PBS 1X) los títulos usados fueron 1: 100, 1:500 y 1:1000. Inicialmente la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS1X durante 2h, posteriormente se le agregó el primer anticuerpo al título correspondiente y se dejó a 4°C en agitación toda la noche, al día siguiente se realizaron 2 lavados de 15 min con PBS 1X y Tween al 0.3%, después se agregó el segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina o con peroxidada de rábano (Amersham), por último la membrana se lavó 3 veces con PBS 1X –Tween. Para revelar con fosfatasa alcalina se realizó con BCIP 17 mg/ml en DMSO y nBT 33 mg/ml en DMSO al 70%, para la peroxidada se realizó como indica el protocolo del fabricante. Los westerns-blot realizados con los anticuerpos donados por la Dra. Bisson de la Universidad de California se probaron como lo recomendó un título de 1: 500.

2.2.8 Detección de Rubisco por Western-blot

Se realizó un extracto total de proteína de 50 plántulas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y transgénicas cultivadas durante 5 días en medio líquido con medio Gambor's B5 suplementado con sacarosa al 1%, y cambiadas a medio con glucosa al 1% y al 3% por separado durante de 5 días bajo las mismas condiciones de crecimiento. El extracto de proteína total se obtuvo a 4°C con un amortiguador que contenía (Tris-HCl pH 5 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, Beta mercaptoetanol 15 mM, PMSF 1 mM).

Se usaron anticuerpos contra la subunidad pequeña de la Rubisco como control de carga. La dilución de los anticuerpos fue de 1: 1000. La membrana se lavó con PBS 1X como en el procedimiento de la sección anterior. Por último se reveló la membrana con el segundo anticuerpo (anticonejo) acoplado a la actividad de la fosfatasa alcalina.

2.2.9 Condiciones de crecimiento de las plantas

Se colocaron aproximadamente 50 semillas de plantas de *Arabidopsis* silvestres y transgénicas previamente esterilizadas en matraces de 125 ml con 50 ml de medio Gamborg's B5 (Sigma) suplementado con 1% de sacarosa. Se colocaron en agitación en fotoperiodo (16h luz y 8h oscuridad a 25°C) en un agitador a 125 rpm. Para los experimentos de inducción las plantas se cultivaron durante 12 días y luego fueron transferidas a medio sin azúcar durante 48 horas en oscuridad, posteriormente se indujo con glucosa al 3% durante 6 h y controles (medio sin glucosa, y manitol al 3%). Se congeló el material a -70°C y se realizó el Northern-blot con las muestras correspondiente a cada tratamiento. El RNA total se aisló con el reactivo de Trizol (Invitrogen), 20 µg de muestras de líneas transgénicas y silvestre se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond N⁺ (American Life Science) de acuerdo con Sambrook et al., 1989. La hibridación se realizó con alta astringencia en amortiguador de fosfatos/SDS (250 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM EDTA, 3.5% SDS) a 62°C durante toda la noche. La membrana se lavó a temperatura

ambiente con SSC/SDS 2X y 0.2X durante 10 min cada uno y 0.2X SSC/SDS 10 min a 65°C. La membrana se expuso a una película Kodak XAR films y se guardó a -70°C durante dos semanas.

2.2.10 Determinación de los niveles de azúcares solubles

Se determinó los niveles de azúcares en plantas de *A. thaliana* silvestres y transgénicas cultivadas durante 5 días en medio líquido y en placa con medio Gambor's B5 suplementado con sacarosa al 1%, posteriormente se cambió la mitad de los frascos en medio con glucosa al 1% y la otra mitad al 3% durante de 5 días bajo las mismas condiciones de crecimiento. La determinación de azúcares se realizó en plantas individuales en 8 repeticiones donde se lavaron y se homogenizaron el 100 µl de etanol al 80%. Los extractos se calentaron a 80°C durante 30 min y centrifugados a 4000 g durante 5 min. La fracción insoluble se resuspendió de nuevo con etanol al 80% repitiendo el mismo procedimiento y al final se juntaron ambos sobrenadantes. La concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón se evaluó con un método enzimático en microplaca de 96 pozos. Este método se basa en la fosforilación de las hexosas con la hexocinasa de levadura y la posterior detección espectrofotométrica del NADPH formado por la acción de la glucosa 6-P deshidrogenasa (glu6-PDH) de levadura grado II.

Se preparó una mezcla de reacción que contenía lo siguiente: Hepes 100 mM pH 7, MgCl₂ 3mM, 0.3 µM NADP, y 0.66 µM ATP y 1 µl de Uml⁻¹ de glu6-PDH de levadura (Sigma). Se agregó 20 µl la muestra y después de mezclar todos los componentes se agregó Uml⁻¹ de hexocinasa de levadura y se hizo la primera lectura de la absorbencia a 340 nm en lector de microplaca Synergy2, se estabilizó la lectura y se registró su valor. Posteriormente se agregó 1U de fosfoglucosa isomerasa (PGI) (Sigma) y nuevamente se esperó que la lectura se estabilizara para registrar su valor. Por último agregó Uml⁻¹ de Invertasa de levadura grado VII (sigma). 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. La concentración sacarosa se calculó con la diferencia entre la lectura estimada al agregar la PGI y con la lectura obtenida con la Invertasa.

Para la determinación de almidón, la fracción insoluble se lavó con etanol al 80%, se y se resuspendió en 100 μ l de agua, se calentó 4 h a 90°C y colocó en hielo, posteriormente se agregó un volumen igual de acetato de sodio 50 μ M, por último se agregó 20 μ l la mezcla de enzimas que degradan el almidón: 59.9 U/ mg amiloglucosidasa, Tipo VI-B 25 U/mg α -amilasa, 55U/mg α -amilasa de Bacillus. Se incubó a 37°C toda la noche y al día siguiente se centrifugó a 500 rpm 5 min y se determinó la glucosa libre en 10 μ l del sobrenadante con el mismo procedimiento para determinar glucosa. Las hexosas fosfato se determinaron preparando 300 μ l por muestra de una mezcla de reacción que contenía 50 mM HEPES pH 7 y 5 mM de $MgCl_2$, 0.3 μ M NADP. Se agregó 30 μ l de muestra se midió las lecturas a 340 nm como blanco en el lector de microplaca, posteriormente se agregó 1 μ l de la mezcla de enzimas (Uml^{-1} de glu6-PDH, 1 μ l de Uml^{-1} PGM, 1 μ l de Uml^{-1} PGI). Se dejó que se estabilizara las lecturas y la concentración se estimó con la diferencia de las lecturas antes y después de agregar la mezcla de enzimas.

2.2.11 Análisis de la toma de glucosa *In vitro*

Para el experimento de toma de azúcares se utilizaron plántulas de 7 días cultivadas en medio Gamborg's B5 suplementado con sacarosa al 1%: El procedimiento usado se realizó de acuerdo al reportado por Damon et al. (1988). Las plántulas fueron lavadas con amortiguador de lavado que contenía 5 mM Mes (pH 6), 5 mM KCl, 0.5 mM NaCl, 0.1 mM $MgCl_2$, and 0.1 mM $CaCl_2$. Posteriormente las plántulas se colocaron en viales con 1.5 ml del mismo amortiguador con una concentración de glucosa 25 mM y 3-O-metil-[U- ^{14}C] glucosa (0.5 μ Ci μ mol $^{-1}$, Amersham Corp) e incubados por 1 h a 25°C y 125 rpm. Después el material se lavó 4 veces con 10 ml de amortiguador, se secó y se homogenizaron en 300 μ l de etanol al 80% dos veces juntando el sobrenadante. La radioactividad incorporada se midió mezclando 100 μ l del extracto etanólico con 1.4 ml de líquido de centelleo ASCII (Amersham Corp. Las cuentas obtenidas

en las muestras se midieron en un contador de centelleo (Beckman-Coulter model LS 6500).

2.2.12 Actividades enzimáticas de Glucocinasa y Fructocinasa

La actividad enzimática de glucocinasa se realizó en un medio de reacción con un volumen de 1 ml que contenía 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 0.3 mM NAD⁺, 1 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 5 mM glucosa y 1.2 unidades de Glc6-P dehidrogenasa (*Leuconostoc mesenteroides*). La reacción fue iniciada con enzima y la reducción de NAD⁺ se monitoreó espectrofotométricamente en ensayo continuo a A340 a 25°C. El efecto de Glc-6-P sobre la actividad de Glucocinasa (GK) así como la fosforilación de fructosa y manosa se investigó en una mezcla de reacción de 1 ml conteniendo 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM ATP, 1.5 mM MgCl₂, 0.15 mM NADH, 0.5 mM fosfoenolpiruvato, 3.12 unidades de piruvato cinasa y 15.36 unidades de lactato deshidrogenasa. La mezcla de reacción de fructocinasa (FK) contenía 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 0.3 mM NAD⁺, 1 mM ATP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM fructosa and 1.2 unidades Glc6-P dehidrogenasa (*Leuconostoc mesenteroides*) y 0.8 unidades por ml de fosfoglucosa isomerasa en un volumen final de 1 ml. La reacción fue iniciada adicionando fructocinasa y la reducción de NAD⁺ se monitoreó espectrofotométricamente a A 340 a 25°C.

2.2.13 Determinación de la Longitud de la raíz primaria y peso fresco y cinética de germinación

La longitud de la raíz primaria se midió con una regla en 15 plántulas silvestres y transgénicas de 7d en medio Gamborg's B5 a pH 5.6 con glucosa al 1%, 3% y 6% por separado en placas verticales y en condiciones de fotoperiodo 8h luz 16h oscuridad a 22 C. Los ensayos de germinación se realizaron con semillas de las líneas transgénicas (L1, L2 y L6) y Wt, se colocaron en cajas petri con medio Gamborg's mas agar al 0.9% y suplementado al 1% y 3% de glucosa. Las condiciones de fotoperiodo fueron 8h luz y 16 oscuridades a 24°C. Se estableció como inicio de la germinación el momento en que la radícula emergía.

Los experimentos se realizaron por cada 12 horas por triplicado con 100 semillas en cada ensayo.

2.2.14 Análisis estadístico

Los resultados de este trabajo son presentados como la media de las mediciones de un conjunto de tejidos obtenidos de diferentes plántulas o frutos de jitomate (X_i) donde son repetidos n veces en el valor de la media. La desviación estándar se calculo con la siguiente ecuación:

Error estándar SD= Error estándar del promedio: $s_M = s/\sqrt{N}$

Estos valores se encuentran en las gráficas (como barras de error verticales) (donde n es el número de réplicas medidas). El término significativo es usado cuando de acuerdo a la prueba de t-student da un valor menor 0.05 ($P \leq 0.05$).

2.2.15 Experimentos de Microarreglos

Los experimentos con microarreglos se realizaron con plantas cultivadas en medio líquido Gamborg's más sacarosa al 3% durante 12 días en un agitador a 125 rpm, posteriormente se transfirieron a medio sin fuente de carbono durante 2 días y por últimos se transfirieron a 3% glucosa por 6h y 12h. Se purificó el RNA total con el reactivo de Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo incluido.

Los dos diferentes puntos (6h y 12h) fueron usados con el fin de detectar genes regulados de manera significativa. Los microarreglos se realizaron a partir de 10 μ g de cDNA marcado con dUTP-Cy3 or dUTP-Cy5 usando el kit CyScribe First-Strand cDNA labeling (Amersham). La incorporación del fluoróforo se analizó por absorbancia a 555 nm por Cy3 y a 655 para Cy5. El chip 22K (ATv3.4.2.Z) *Arabidopsis* microarray (Arizona University) se hibridó con cantidades iguales de cDNA marcado usando la solución HybIT2 (TeleChem International INC). El arreglo se incubó por 14 h a 42°C y lavado tres veces con 1X SCC, 0.05 % SDS a temperatura ambiente. La imagen adquirida y la cuantificación de los arreglos se realizó con el escaner ScanArray 4000 con el software de Packard BioChips.

Todas las imágenes se capturaron usando 65% PMT, 70 to 75% de intensidad de láser y 10 μm resolución a 50% velocidad de escaneo. Para cada punto se calculó la media de la densidad de Cy3 Cy5 y el valor de la media del fondo de Cy3 and Cy5 calculados con ArrayPro Analyzer software de Media Cybernetics. El análisis de los microarreglos se realizó con el software genArise, desarrollado en la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. <http://www.ifc.unam.mx/genarise/>).

La significancia estadística se determinó por un análisis de varianza de ANOVA usando Excell y R (cran.R-project.org). Los valores se compararon usando Comparción multiple de Tukey's con un valor de $p < 0.05$. Los datos se representan la media \pm error estándar. Los paquetes y limma de R se usaron para el análisis de los microarreglos. La normalización de los datos se realizó con el método cuantitativo y de modelaje lmFit first, y con el eBayes fit. La lista de genes con cambios significativos en aumento y disminución de expresión se construyó usando un valor de significancia de $p < 0.01$ y log2 con un valor de cambio de > 1 . Con el fin de hacer más astringente la selección, los datos de los microarreglos se sometieron a otra prueba T en Excell usando los valores de intensidad neta. Genes con bajos valores de expresión se seleccionaron con < 30 de valor de intensidad bajo todas las condiciones. Los genes se seccionaron con este criterio y finalmente marcados con valor de significancia de baja o alta expresión.

2.3 Transformación de jitomate

2.3.1 Material Biológico

Semillas de jitomate (*Solanum lycopersicom* L. Miller cv Marmande), se esterilizaron en la superficie con alcohol al 70% durante 10 seg y se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril. Posteriormente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial con 6 % de ingrediente activo) al 50% (v/v) más 5 gotas de tween 20 (surfactante) y 15 gotas de microdín (solución de plata coloidal estable) por cada 250 ml y se dejaron en agitación suave durante 15 min. Se enjuagaron con agua desionizada estéril tres veces y se colocaron en una solución de agromicina 500 (1g/l (bactericida) durante

15 min. Finalmente las semillas se enjuagaron con agua desionizada estéril cuatro veces durante 4-5 cada lavado. Se pusieron a germinar en medio Murashige and Skoog (MS) con un fotoperiodo 16-h luz 8-h oscuridad a 26°C durante 8-10 días.

2.3.2 Selección de probables transformantes usando herbicida BASTA (Glufosinato de amonio) como marcador

Con el fin de realizar el escrutinio de las plantas transgénicas de jitomate se identificó la concentración adecuada a la cual se seleccionarían los explantes transformados. Se probaron diferentes concentraciones de BASTA PESTANAL® $C_5H_{14}N_2O_4P$ con 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l en medio de inducción de organogénesis ó brotes 2iP (Medio 2-Z). Se esterilizaron 100 semillas silvestres y se colocaron en condiciones de germinación bajo las condiciones antes mencionadas. Se cortaron las hojas cotiledonares y se separaron en 200 explantes en 20 frascos preparados por cada concentración. Una vez determinada la concentración adecuada para la selección de los probables explantes transformados se colocaron en medio de inducción, proliferación y enraizamiento cuya composición es la siguiente para el medio de proliferación: sales MS, Vit Nitsch, Glicina 0.02 mg/ml, Zeatina 0.02 mg/ml, sacarosa 2% (2-Z). El medio de enraizamiento es el mismo que el anterior con la diferencia que las vitaminas son B5 y la sacarosa es al 3%. Posteriormente una vez que llegaron a la etapa de crecimiento de plántula se colocaron en maceta para la identificación por PCR.

2.3.3 Producción de plantas transgénicas de jitomate

Para transformar plantas de jitomate se siguió el método reportado por Ellul et al., 2003. Se utilizaron hojas cotiledonares de 100 plántulas de 7-10 días provenientes de semillas de jitomate de una variedad comercial (Marmande V.R). Con una navaja nueva y estéril se cortaron los extremos y se dividieron en dos segmentos horizontales de aproximadamente 0.5 a 0.8 cm². Posteriormente se colocaron con el haz en contacto al medio y se preincubaron durante 24 h al mismo fotoperiodo a 26°C en la placa alimentadora que contenía células de

tabaco con una D.O de 0.5-0.6 a 600 nm sobre medio MS. Sobre las células se colocó papel filtro Watman del número 1 de 7 cm de diámetro.

Al día siguiente se retiraron los explantes del medio se pusieron en contacto con *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 transformada con la construcción en el vector binario pZY101.1 que contiene la secuencia del promotor 2 A11 y la de transportador *hxt2*. El cultivo de *A. tumefaciens* se realizó en medio YM con los antibióticos correspondientes (Kanamicina 50 µg/ml, Rifampicina 100 µg/ml, Streptomycin 300 µg/ml) a una D.O de 0.4- 0.5 y acetoricirgona (10mM en DMSO) por cada 50 ml de medio. Se centrifugó a 8 000 rpm durante 10 min, se decantó y se resuspendió la pastilla suavemente en 50 ml de 0.2 % de MS.

Se dejó a los explantes durante 15 min con agitación ocasional, posteriormente se decantó todo el medio retirando el exceso de medio y se colocaron los explantes en las placas alimentadoras con el envés hacia arriba. Se incubó en oscuridad a 18°C durante tres días.

De acuerdo a los resultados observados en los explantes a diferentes concentraciones de BASTA se determinó que a 1 mg/l es la concentración que permitió la selección de las posibles transformantes. Se realizó en el primer subcultivo con 1mg/l de Basta y 1.33 mg/l de cefotaxime con Phytagar de Gibco al 0.8% se pasaron los explantes al mismo medio 2-Z, los explantes presentaron un crecimiento claro y con crecimiento de hojas pequeñas. Posteriormente los explantes se pasaron a medio de proliferación con la hormona Zip a la mitad de la concentración 1mg/l a las dos semanas algunos brotes tenían hojas lo suficientemente grandes para pasarlos a medio de enraizamiento. El resto de los explantes se pasaron a medio de proliferación para esperar que las hojas salientes tuvieran el crecimiento suficiente para pasarlas a medio de enraizamiento en las próximas semanas. Algunos de los explantes con la parte aérea ya formada, comenzaron a crecer las raíces a las dos semanas aproximadamente. Sin embargo, la mayoría no presentaba este crecimiento, finalmente se obtuvieron un total de 10 plantas en suelo. La forma en que se pusieron en maceta fue sacar a la planta del medio de enraizamiento con una espátula sin dañar a las raíces, después se eliminó el exceso de medio de cultivo, se enjuagaron las raíces con

agua destilada y se colocó en maceta con tierra agromix 200 previamente humedecida con solución de Hogland 1X, por último se colocó un vaso transparente tapando a la planta con el fin de mantener la humedad, a los cinco días se le hicieron perforaciones al vaso para que la planta se fuera habituando a la nueva condición de humedad.

Durante el mes siguiente el total de los explantes estaban en diferentes etapas de crecimiento, algunos cayos verdes se dejaron en medio de inducción, otros más diferenciados se pasaron a medio de proliferación y algunos a medio de enraizamiento. Los que presentaban oxidación total murieron a los pocos días. Después de cinco días en luz artificial se pasaron al invernadero donde crecieron normalmente. Al final del mes siguiente se contaron el total de las plantas que sobrevivieron y se identificó por PCR con el fin de demostrar cuales eran transgénicas. Después de tres semanas los explantes presentaron un crecimiento claro y con algunos crecimientos de hojas pequeñas.

2.3.4 Determinación del gen del transportador *hxt2* por PCR

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 y usando una espátula el tejido pulverizado se pasó a un tubo eppendorf 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 µl 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 µl 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 µl de agua estéril.

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 de un fragmento de 150 pb hacia la región 5' del gen del transportador *hxt2* empleando las mismas condiciones que permitieron su amplificación a partir de DNA de levadura sólo que disminuyendo a 1 min el tiempo de alineamiento de los oligonucleótidos.

2.3.5 Determinación de azúcares solubles y grados Brix en los frutos de jitomate

Tejido de frutos de etapa de verde maduro, amarillo y rojo de la plantas de las tres líneas transgénicas y silvestre se homogenizaron con una navaja de rasurar el jugo resultante se midió en un refractómetro portátil (Bellingham and Stanley Ltd, Kent, U.K). Los niveles de glucosa y fructosa se determinaron enzimáticamente a partir de 10 µl de la dilución 1:10 del jugo obtenido con el protocolo mencionado anteriormente.

2.3.6 Análisis de la toma de [U-¹⁴C] - glucosa *In vitro* en frutos verde maduro de jitomate.

Para el experimento de toma de azúcares se utilizaron discos de pericarpio de jitomate en la etapa de verde maduro de plantas silvestres y transgénicas. El procedimiento usado se realizó de acuerdo al reportado por Damon et al. (1988). El tejido de pericarpio se lavó con amortiguador que contenía 5 mM Mes (pH 6), 5 mM KCl, 0.5 mM NaCl, 0.1 mM MgCl₂, and 0.1 mM CaCl₂. Posteriormente los discos se colocaron en viales con 1.5 ml del mismo amortiguador con una concentración de glucosa 25 mM y [U-¹⁴C] glucose (0.1 µCi µmol⁻¹, Amersham Corp) e incubados por 1 h a 25°C y 125 rpm. Después el material se lavó 4 veces con 10 ml de amortiguador, se secó el material y se homogenizaron en 300 µl de etanol al 80% dos veces juntando el sobrenadante. La radioactividad incorporada se midió mezclando 100 µl del extracto etanólico con 1.4 ml de líquido de centelleo ASCII (Amersham Corp). Las cuentas obtenidas en las muestras se midieron en un contador de centelleo (Beckman-Coulter model LS 6500).

3. Resultados

Arabidopsis thaliana

3.1 Clonación del transportador *hxt2* y transformación de *Arabidopsis thaliana*

La obtención de las plantas transgénicas se obtuvo a partir de la construcción mostrada en la figura 6A. Las secuencias se amplificaron por PCR y se analizaron por análisis de restricción y secuenciación (ver materiales y métodos). Posteriormente se transformaron a las bacterias con esta construcción en *A. tumefaciens* cepa LBA4404 con las que se transformaron a las plantas de *Arabidopsis*. Antes de transformar a las plantas se verificó la orientación de la secuencia del gen *hxt2* en el vector binario pBIN19 3X35S. En un cultivo de *A. tumefaciens* se purificó DNA plasmídico donde se realizó un análisis de restricción con las enzimas con *Hind* III y *Kpn* I (Figura 6B). La intensidad de las bandas es baja debido a que el vector binario pBin-19 (3X35S) no es un plásmido multicopia, sin embargo, se alcanza a apreciar que con la primera se libera un fragmento de 1 Kb y otro de 2 Kb con la segunda. En ambos casos una banda adicional de que corresponde al vector binario pBin19 3X35S. De acuerdo con el esquema que se presenta en la figura 5A, tanto el promotor como el transportador se clonaron con la orientación correcta en el vector binario.

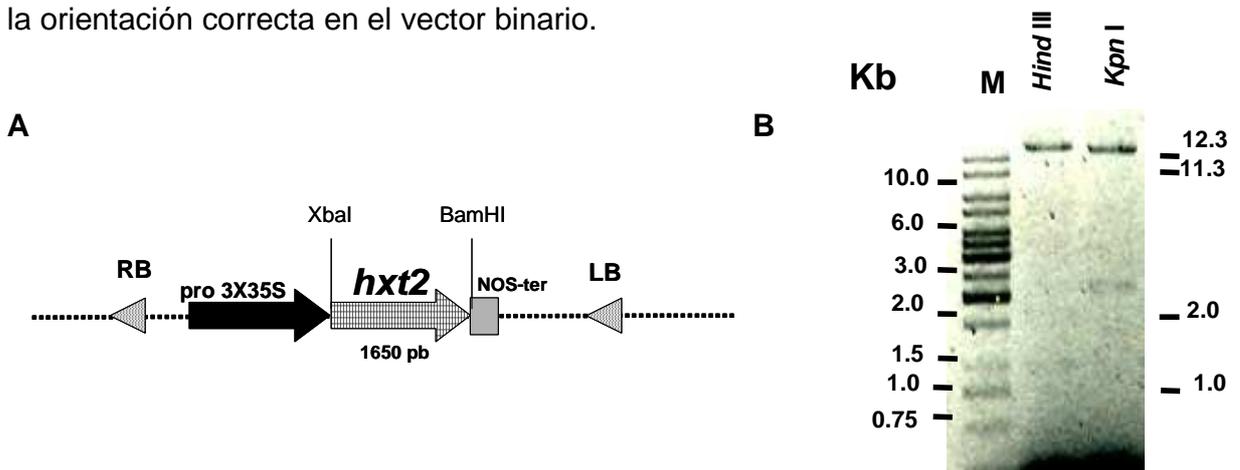


Figura 6. (A). Construcción usada para transformar plantas de *Arabidopsis* (B). Análisis de restricción en gel de agarosa de la construcción del transportador Hxt2 clonado en el vector binario pBIN19 3X35S que se usó para obtener las plantas transgénicas. M, marcadores de peso molecular.

Se colectaron por separado las semillas producidas por las plantas transformadas y aproximadamente 5 mil semillas se germinaron con Kanamicina. En este primer escrutinio se seleccionaron seis plantas resistentes. Esas plantas se cultivaron hasta que alcanzaron la madurez y sus semillas se colectaron por separado. El ciclo de selección se repitió 5 veces (T5) cuando todas las semillas fueron capaces de crecer en presencia de Kanamicina. Los experimentos que se reportan en este trabajo fueron realizados con ese material.

3.2 Análisis de las plantas transgénicas

3.2.1 Identificación del gen *hxt2* por PCR, Southern-blot y determinación de los niveles de transcrito por Northern-blot.

Usando DNA genómico purificado de hojas de las seis líneas transgénicas se amplificó por PCR la secuencia del transportador *hxt2* (ver materiales y métodos). La figura 7 muestra que en las seis líneas se amplificó una banda que corresponde al tamaño del gen del transportador (1.6 Kpb). La banda amplificada en las líneas L6 y L7 es de menor intensidad. Las causas de que la amplificación no resultara eficiente podrían ser que el DNA se haya degradado o que su pureza no fuera suficiente.

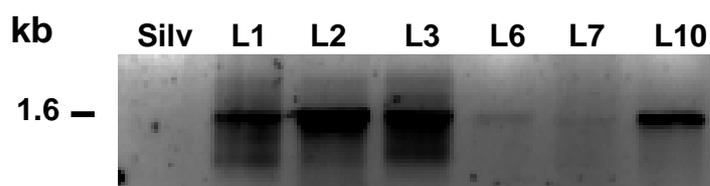


Figura 7. Análisis por PCR de plantas transgénicas de *A. thaliana*. Producto de la amplificación por PCR del transgen *hxt2* a partir de DNA genómico purificado de hojas de plantas de las seis líneas transgénicas. Como control negativo se usó DNA genómico purificado de plantas silvestres (Silv).

Con el fin de probar la independencia de las líneas transgénicas, el DNA genómico se digirió con *Eco* RI. Como se puede observar en la figura 8, no aparece señal con el DNA de las plantas silvestres y el patrón de hibridación es

diferente en cada una de las seis líneas, lo que indica que provienen de eventos de transformación independientes. El gen del transportador *hxt2* no tiene sitios que puedan ser cortados con esta enzima de restricción, por lo que es muy probable que en todos los casos se haya integrado sólo una copia del gen del transportador. En la L2 se observa tenuemente otra banda de aproximadamente 4.9 Kb. Es probable que se hayan incorporado dos copias en el genoma de esa línea.

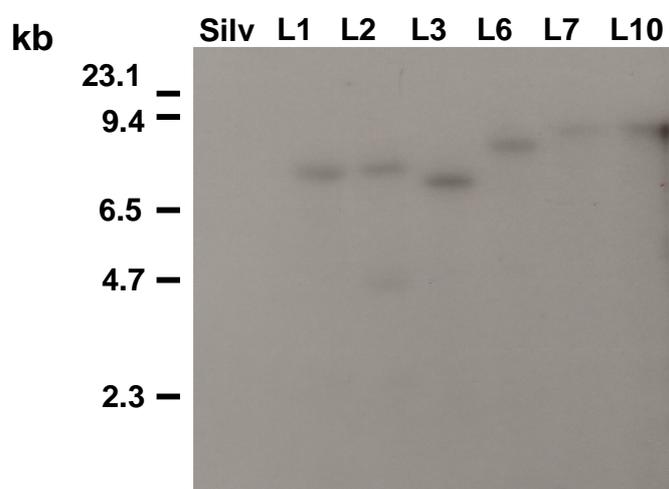


Figura 8. Análisis por Southern-blot de líneas transgénicas. El DNA genómico extraído de las plantas silvestres y de las líneas transgénicas fue digerido con la enzima *Eco* RI e hibridado con el gen del transportador *hxt2* marcado con [α - 32 P].

Para evaluar la expresión del gen del transportador *hxt2*, se purificó RNA total de las plantas transgénicas y silvestres. En la figura 9 se observa una banda de 1.6 Kb que sólo se observa en las muestras de las plantas transgénicas y que corresponde con el tamaño esperado del RNAm codificado por el gen del transportador *hxt2*. Así mismo, puede observarse que la expresión fue más alta en las plantas de la línea L2 y virtualmente ausente en la línea L10, por lo que a esta última no se le incluyó en los estudios posteriores.

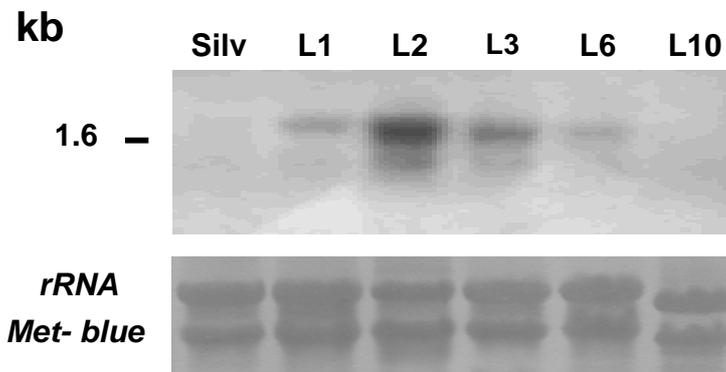


Figura 9. Análisis por Northern-blot de las líneas transgénicas. RNA total aislado de las líneas transgénicas y de las plantas silvestres se hibridó con el gen del transportador *hxt2* marcado con [α - 32 P].

3.2.2 Obtención de anticuerpos contra el transportador Hxt2 y determinación de los niveles de la proteína por Western-blot

Con el fin de evaluar la expresión de la proteína se seleccionó una región inmunogénica e hidrofílica de 50 aminoácidos para hacer anticuerpos específicos contra el transportador Hxt2 (ver materiales y métodos). Para tal efecto, la secuencia correspondiente se amplificó por PCR, se secuenció y se clonó en el vector de expresión pGEX que al ser digerida con *EcoR* I y *Bam* HI libera un fragmento de 150 pb (Figura 10A). Posteriormente, se estableció un cultivo que se indujo con IPTG durante tres horas (ver materiales y métodos). La proteína se expresa fusionada a glutatión S-transferasa (GST) y purificada se hidrolizó con trombina para eliminar la proteína de fusión. La banda correspondiente al fragmento del transportador se cortó de los geles de poliacrilamida (Figura 10B), se molió con PBS y se usó para inmunizar un conejo. Después de 4 inyecciones se obtuvo una muestra de sangre. El suero se usó para detectar al transportador Hxt2 en un extracto de levadura cultivada a 5 mM de glucosa, condición en la cual se induce la expresión de éste transportador (Douglas and Bisson, 1993). Se probaron diferentes diluciones y mientras que con el suero preinmune no se detectó reacción, el suero de los conejos inmunizados a una dilución de 1:1000 reconoció una banda de aproximadamente 50 kDa (Figura 10C), el cual es muy cercano al peso esperado del transportador (47 kDa). Esta banda desaparece

cuando se analizan extractos de levaduras cultivadas con 100 mM de glucosa (Figura 10D). Posteriormente se utilizaron extractos de proteínas de plantas silvestres y de la línea L2. Sin embargo, los anticuerpos reconocieron proteínas de pesos moleculares diferentes al esperado, muchas de las cuales también están presentes en las plantas silvestres (Figura 10E).

Como parte de los esfuerzos para evaluar la expresión de la proteína, se solicitó a la Dra. Laura Bisson de la Universidad de California una muestra de anticuerpos contra el transportador Hxt2 (Wendell and Bisson 1993). Los nuevos anticuerpos se probaron diluidos 1:500 en una preparación de proteínas microsomales obtenidas a partir de levaduras cultivadas con 5 mM de glucosa (ver materiales y métodos) detectaron varias bandas, una de un peso aproximado de 47 KDa (Figura 10F). Finalmente, los anticuerpos también se probaron en fracciones microsomales elaboradas a partir de extractos de las plantas silvestres y de las líneas transgénicas. En la figura 10G se observa que el anticuerpo reconoce varias bandas, algunas de las cuales tal vez son más intensas en los extractos de las plantas transgénicas aunque desafortunadamente también están presentes en los extractos de las plantas silvestres.

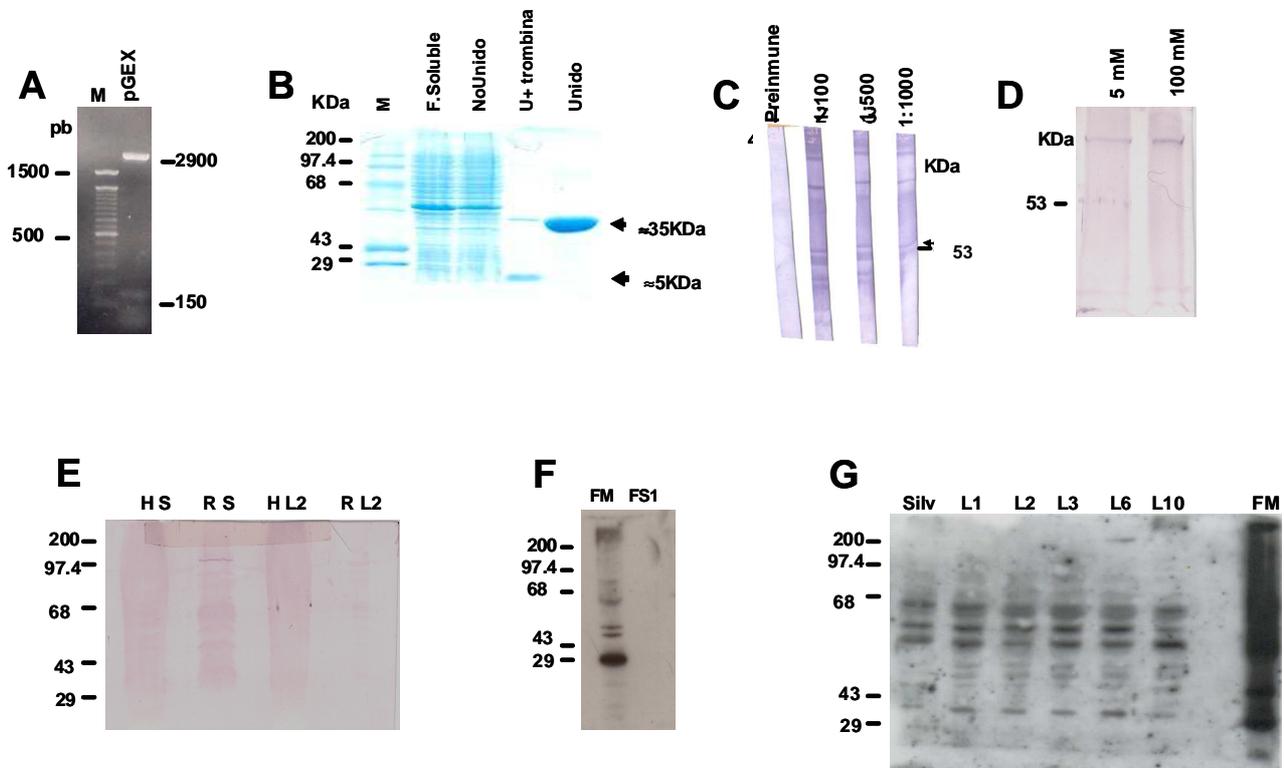


Figura 10. Obtención de anticuerpos policlonales contra el transportador Hxt2 y detección de la proteína por Western-blot. (A) Análisis de la restricción con *EcoRI* y *BamHI* de la construcción en el vector pGEX donde se aprecia la liberación de un fragmento de 150 pb. (B) Análisis en SDS-PAGE de la inducción de la proteína recombinante expresada en *E.coli*. (C) Establecimiento de la dilución óptima para identificar por Western-blot al transportador Hxt2 en extractos de levadura. (D) Detección por Western-blot del transportador Hxt2 en extractos de levadura cultivadas al 5mM y 100mM de glucosa. (E) Western-blot de extractos de hoja y raíz (H y R) de plantas silvestres (S) y de la L2. (F) Western-blot de extracto de levadura en la fracción microsomal (FM, fracción de proteínas sedimentadas después de una centrifugación a 85,000xg por 1h) y en la soluble (FS, proteínas que permanecen solubles después de la centrifugación a 85,000xg). (G) Western-blot de la fracción microsomal de extractos de las plantas silvestres y de las líneas transgénicas. Como control positivo se usó la fracción microsomal (FM) de levaduras cultivadas con 5 mM de glucosa.

3.2.3 Determinación de la incorporación de 3-O-metil [$U-^{14}C$] glucosa en plántulas transgénicas.

La incapacidad de los anticuerpos para detectar de manera confiable la expresión del transportador Hxt2 en los extractos de las plantas transgénicas puede tener varias explicaciones (Discusión), dentro de ellas que la proteína este presente pero no se detecta porque se produce en cantidades muy pequeñas o se

degrada durante el proceso de elaboración de los extractos. Para evaluar su función, plantas silvestres y de las líneas transgénicas L1, L2 y L6 (en las cuales de acuerdo con la figura 9 el gen *hxt2* se expresa en diferentes niveles) que durante 12 días se cultivaron en medio líquido Gamborg's B5 suplementado con sacarosa al 1%, se lavaron exhaustivamente y se incubaron en una solución de glucosa 25 mM y 3-O-metil [U-¹⁴C] glucosa (con actividad específica de 0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) durante 1h a 25°C (Ver materiales y métodos). Los resultados que se presentan en la figura 11, muestran que todas las líneas transgénicas acumularon una cantidad de radioactividad que es hasta 25 % superior a la que en las mismas condiciones incorporaron las plantas silvestres. De acuerdo a lo observado en el análisis de expresión (Figura 9), no hay una correlación evidente entre incorporación de marca y el nivel de expresión del RNA mensajero del transportador en las diferentes líneas transgénicas.

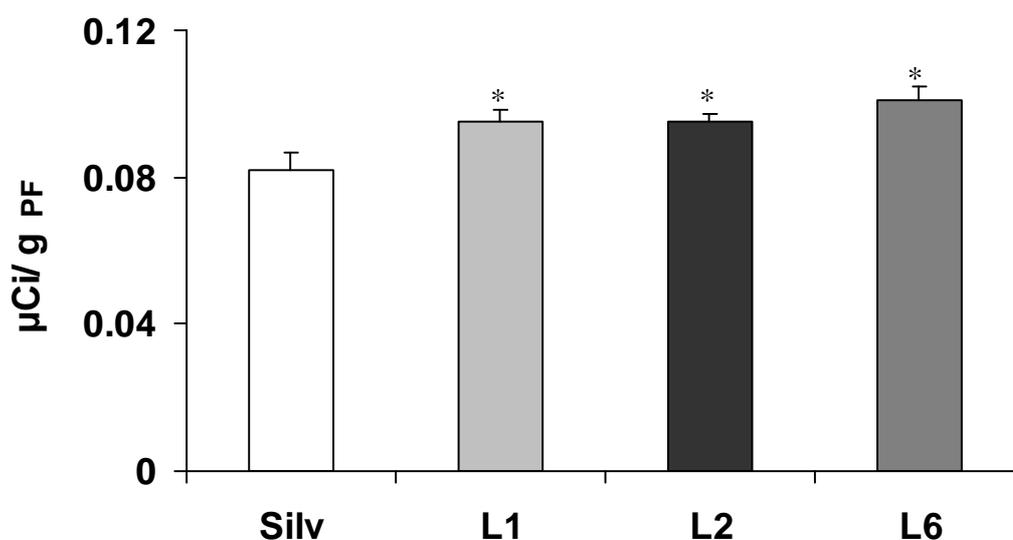


Figura 11. Incorporación de 3-O-metil [U-¹⁴C]-glucosa por plántulas cultivadas en medio líquido. Las barras representan el promedio \pm ES ($n=4$). * $p < 0.05$

3.2.4 Análisis fenotípico

3.2.4.1 Efecto en las plantúlas transgénicas a diferentes concentraciones de glucosa

Para la caracterización de los efectos que podría producir la expresión del transportador Hxt2, semillas de las plantas silvestres y de las líneas L1, L2 y L6 se cultivaron por 7 días en placas de medio Gamborg's B5 con diferentes concentraciones de glucosa (1, 3, 4 y 6%). Los resultados que se presentan en la figura 12 muestran que si se cultivan con 1% de glucosa no hay diferencias entre las plantas silvestres y las transgénicas. Sin embargo, a concentraciones superiores (3%, 4% y 6%), el crecimiento de la raíz primaria es mayor en las plantas transgénicas, las cuales también presentan más raíces laterales, cotiledones más grandes y de color verde más intenso posiblemente a la presencia de antocianinas. La figura 12A y 12B muestran el aspecto de las plantas cultivadas al 1, 3, 4% de glucosa y un acercamiento con 6%.

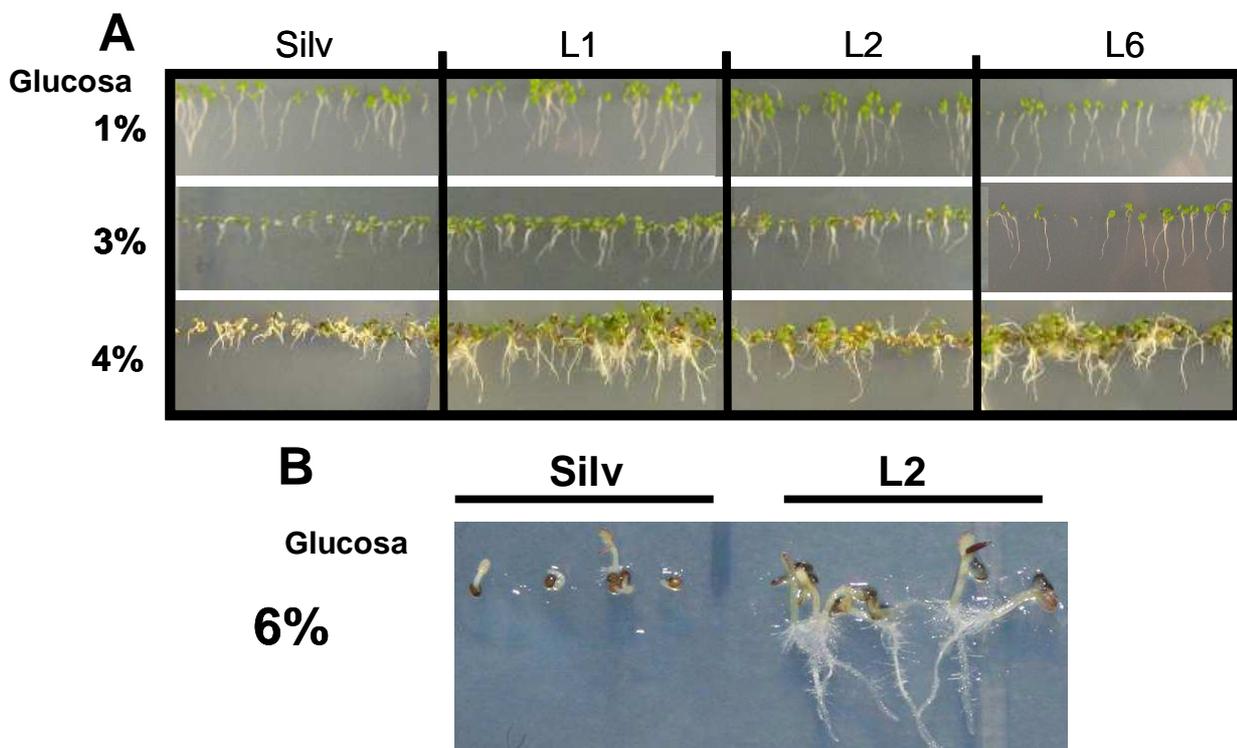


Figura 12. Imágenes de las plantas transgénicas y silvestres cultivadas por 7 días en placas verticales con medio Gamborg's B5 suplementado con 1, 3, 4 % (A) y 6% (B) de glucosa.

El resultado de la medición de la longitud primaria de las raíces se presenta en la figura 13. Como puede observarse, con 1% de glucosa no hay diferencias entre las plantas silvestres y transgénicas. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de glucosa en el medio de cultivo (3, 4 y 6%), la longitud de la raíz de las plantas silvestres resulta más afectada.

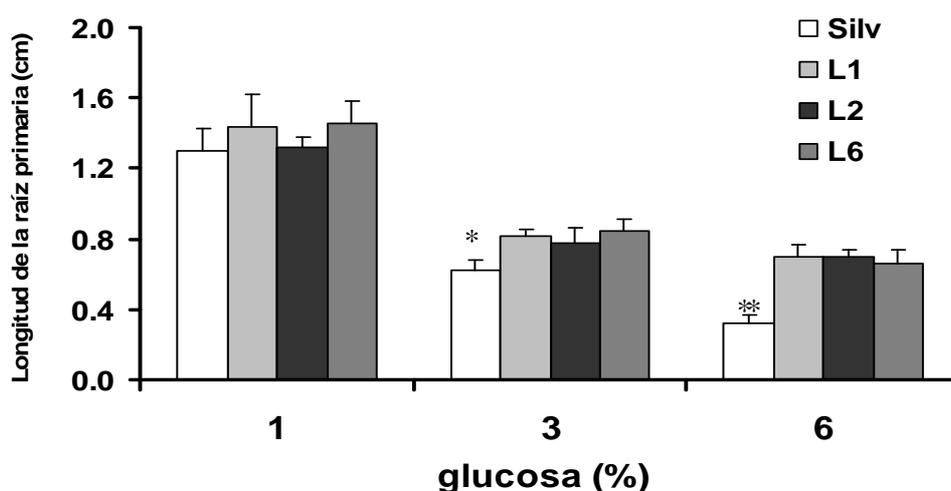


Figura 13. Efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre la longitud de la raíz primaria. Las plantas analizadas se cultivaron por 7 días en medio Gamborg's B5 suplementado con 1, 3 y 6% de glucosa. Estos resultados son el promedio \pm ES ($n = 15$). Las barras representan la media \pm ES ($n = 5$) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.2.4.2 Cinética de germinación a diferentes concentraciones de glucosa

Ante la posibilidad de que la expresión del transportador Hxt2 modificara la velocidad de germinación, 100 semillas de las plantas silvestres y de las líneas transgénicas L1, L2 y L6 se sembraron en cajas con medio Gamborg's B5 y glucosa a 1 y 3% (ver materiales y métodos) donde se analizó la cinética de germinación. El criterio de germinación se tomó en el momento en que protuyó la radícula.

Como puede apreciarse con 1% de glucosa, entre las 20 y 30 h la velocidad de germinación de las plantas transgénicas es ligeramente superior a la de las plantas silvestres (Figura 13A). La presencia de 3% de glucosa reduce la

velocidad de la germinación, pero la diferencia entre las plantas transgénicas y las silvestres se hace mas evidente entre las 20 y 40h (Figura 13B).

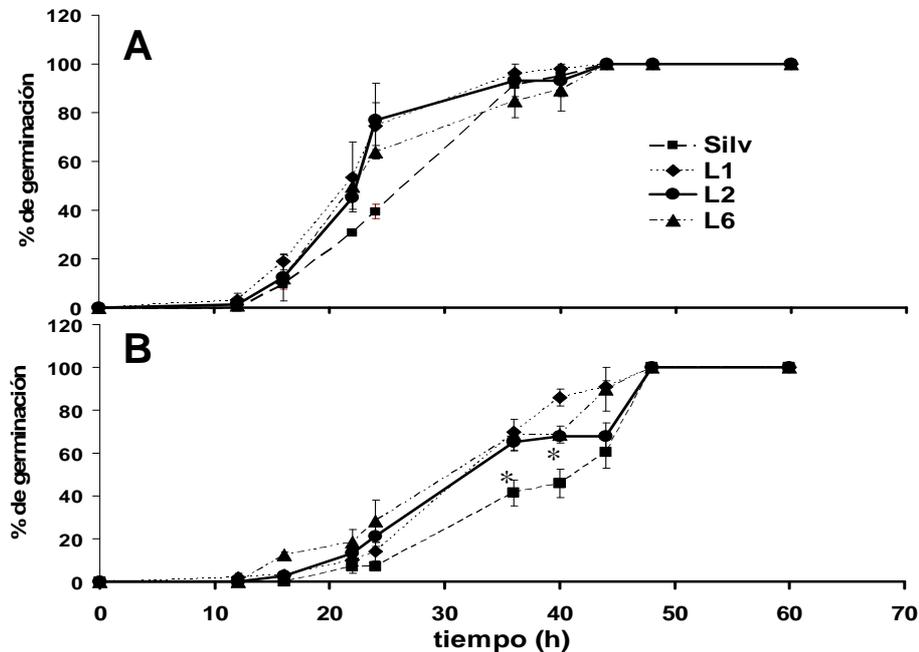


Figura 14. Cinética de germinación de semillas de plantas transgénicas y silvestres. A. 1% de glucosa, B. 3% de glucosa. Los resultados son el promedio de 100 semillas \pm ES (n= 3). * p < 0.05.

3.3 Efecto de la expresión del transportador Hxt2 en los niveles de azúcares y peso fresco.

Para evaluar los posibles efectos de la expresión del transportador Hxt2 sobre el metabolismo de azúcares, semillas de plantas silvestres y transgénicas se sembraron en placas elaboradas con medio Gamborg's B5 y sacarosa al 1%. Las placas se pusieron en posición vertical y 5 días después la mitad del material se cambió a medio suplementado con glucosa al 1% y la otra a un medio preparado con 3% de glucosa. Después de 5 días se determinó el peso fresco y los niveles de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), almidón y hexosas fosfato. Los resultados de este experimento se presentan en la figura 15. Como se puede observar, al 1% de glucosa, con excepción de las plantas de la línea L2 cuyo peso es mayor, el crecimiento de las plantas silvestres es igual al de las líneas transgénicas. Al 3% de glucosa el peso fresco de todas las líneas transgénicas fue claramente superior al de las plantas silvestres (Figura 15). Al 1% de glucosa

tampoco hubo diferencias importantes entre los niveles de glucosa (Figura 15), las cantidades de fructosa y sacarosa fueron ligeramente menores en las líneas transgénicas pero las diferencias con las plantas silvestres no fueron significativas (Figura 15), en almidón los cambios fueron mínimos y el nivel de las hexosas fosfato de la línea L2 fue superior al de las plantas silvestres y transgénicas (Figura 15). Cuando se cultivaron al 3% de glucosa los niveles internos de los azúcares analizados se incrementaron, sin embargo, la cantidad de glucosa y sacarosa en las líneas transgénicas L1 y L2 fue significativamente menor a las plantas silvestres (Figura 15). La cantidad de hexosas fosfato no mostró cambios importantes (Figura 15), y los niveles de almidón disminuyeron ligeramente en las plantas transgénicas con respecto a la silvestres (Figura 14).

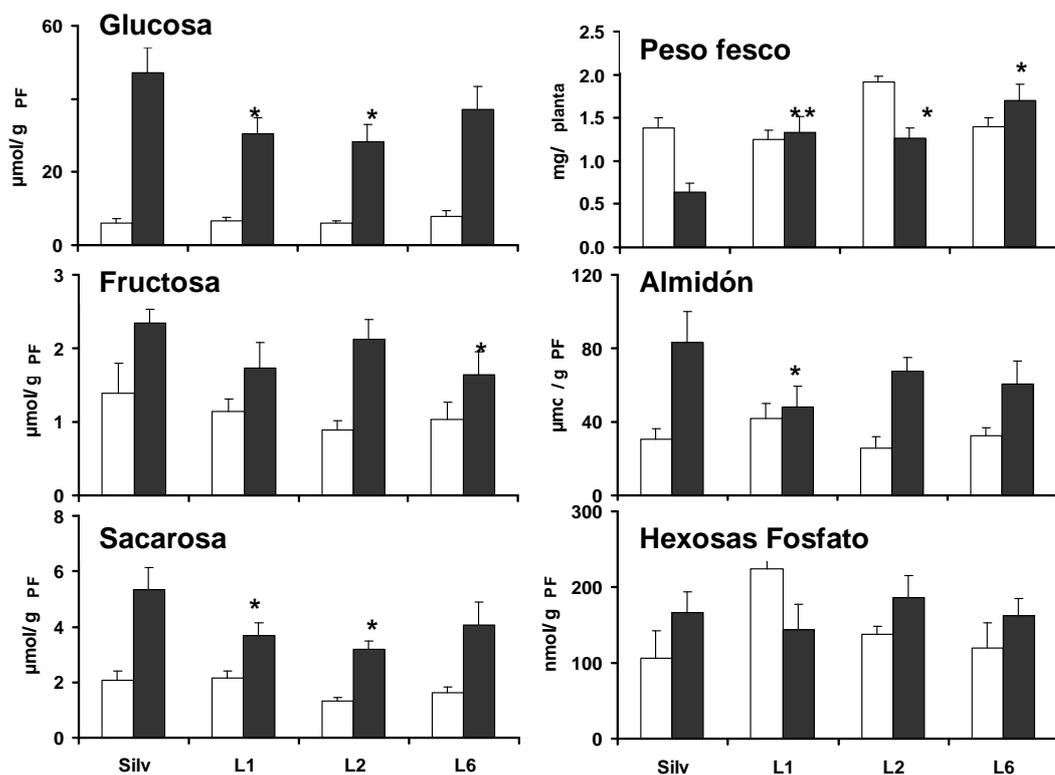


Figura 15. Determinación de los niveles de glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, hexosas fosfato y peso fresco en plantas cultivadas por 5 días en medios con 1 o 3% de glucosa. Las barras corresponden al promedio \pm DE ($n=4$). Las barras blancas representan el tratamiento al 1% de glucosa y las grises al 3% de glucosa. * y ** representan diferencias estadísticamente significativas en los valores de las plantas silvestres y los de las líneas transgénicas con $p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente.

Por lo anterior, se sugiere que los niveles de compuestos fosforilados y almidón en las plantas transgénicas sean menores a los de las silvestres cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo es 3%, donde en esas condiciones las plantas transgénicas son capaces de metabolizar más eficientemente la glucosa que introducen, lo cual se refleja en mayor crecimiento.

Con el fin de establecer los alcances de esta suposición, se determinó la actividad de glucocinasa y fructocinasa en plantas silvestres y en la línea transgénica L2. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 16. Como puede observarse, a 1% de glucosa la actividad de ambas enzimas es casi igual tanto en las plantas transgénicas como en las silvestres. La presencia de 3% de glucosa en el medio de cultivo en ambos casos estimuló las actividades de las dos enzimas. Sin embargo, mientras que los incrementos en las plantas silvestres fueron bajos, en las plantas transgénicas las actividades de fructocinasa y glucocinasa se incrementaron en 78 y 87%, respectivamente (Figura 16 A y B). Por otro lado, los cambios no fueron generalizados, pues la concentración de glucosa no modificó el perfil de proteínas totales (Figura 16C), así como tampoco alteró la cantidad de proteína detectada por el anticuerpo contra la subunidad grande de la Rubisco (Figura 16D).

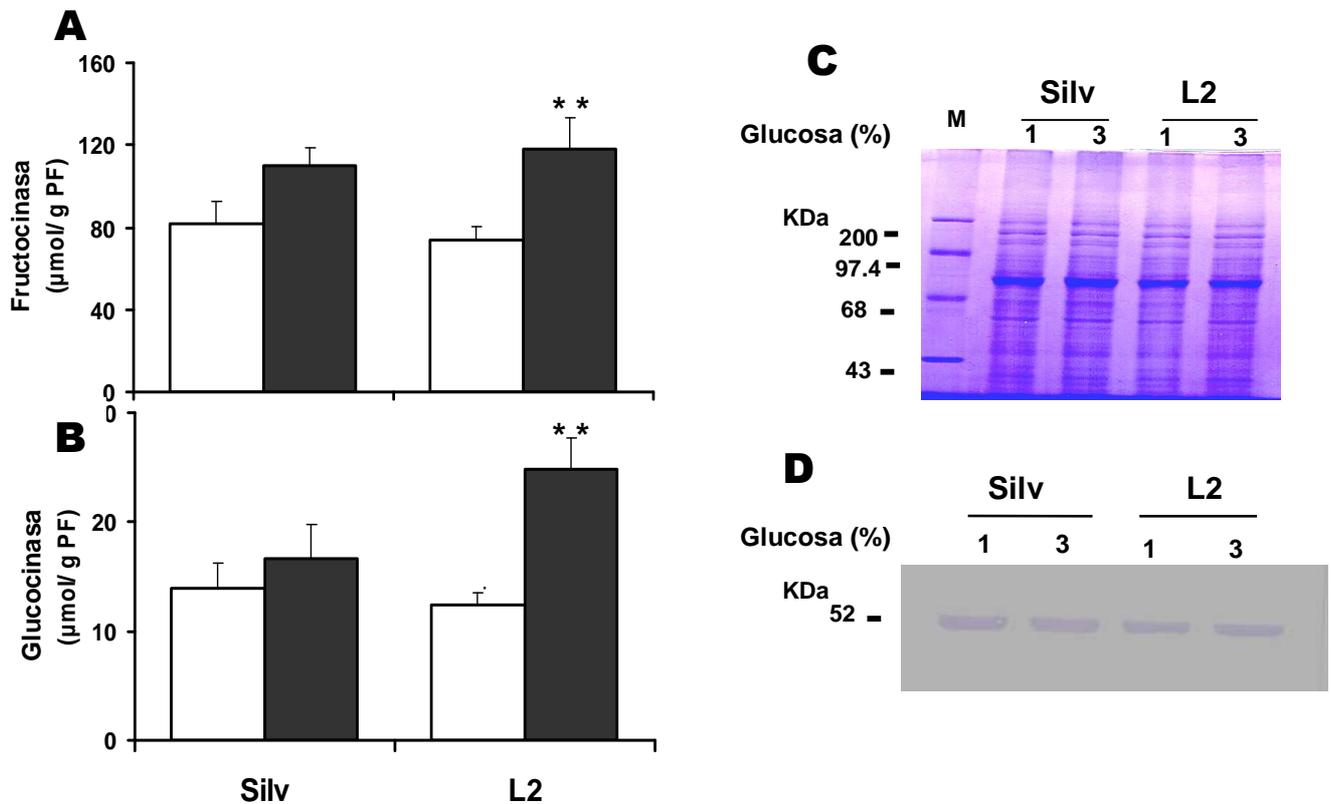


Figura 16. Determinación de la actividad de las enzimas glucocinasa (A) y fructocinasa (B). Las Plantas silvestres y de la línea L2 se cultivaron por 5 días en medio Gamborg's B5 con sacarosa al 1%, después se cambiaron a medios con 1 y 3% de glucosa y se analizaron 5 días después. Las barras blancas representan el tratamiento al 1% de glucosa y las grises al 3% de glucosa. * y ** representan diferencias significativas de la línea L2 comparado con silvestre. $p < 0.05$, 0.01 , respectivamente y corresponden al promedio \pm DE ($n = 4$). (C) SDS-PAGE de las proteínas presentes en extractos de plántulas silvestres y L2 cultivadas con 1 y 3% de glucosa. (D) Western-blot con anticuerpos contra la subunidad grande de la Rubisco.

3.4 Análisis de los cambios transcripcionales inducidos por la expresión del transportador Htx2

Para establecer las bases de los cambios inducidos por la expresión del transportador Hxt2 se realizó un análisis transcripcional. El RNA usado se extrajo de plantas silvestres y de la línea L2 cultivadas en medio líquido con 1% de glucosa durante 12 días y transferidas a medio con 3% de glucosa por 6h y 12h. Con ellos se prepararon las sondas para hibridar el chip 22K elaborado en la Universidad de Arizona. Una vez adquiridos los datos, el análisis estadístico se

realizó con los programas R (limma) y Excell usando un valor de significancia de $p < 0.01$ y \log_2 con un valor de cambio de > 1 . Sólo 163 genes de los 29,000 ordenados en el chip 22K mostraron cambios importantes en el nivel de expresión entre las plantas silvestres y las transgénicas (ver materiales y métodos). Esos genes se clasificaron en las siguientes categorías: metabolismo, membrana, transcripción, señalización, proteasas, relacionadas a RNA y otros con funciones desconocidas (Figura 17). Para corroborar la información obtenida del análisis del microarreglo, con RNA aislado de plantas silvestres y de las tres líneas transgénicas cultivadas de manera similar a las de las muestras usadas para hacer los microarreglos se evaluó por Northern-blot la expresión de los genes *STP1*, *Apl3* y *Hxk1*. Estos genes responden a la disponibilidad de glucosa y de acuerdo a lo reportado, a 3% de glucosa se reprime la expresión de *STP1* e induce las de *Apl3* y *HXk1* (Sherson et al. 2005). En la figura 18A se observa que la expresión de estos genes es idéntica en las plantas de la línea L2 y en las silvestres. La figura 18B muestra el promedio de la señal de la expresión de los genes *STP1*, *APL3* y *Hxk1* en los microarreglos. Como puede observarse, los resultados son similares en ambos casos. Esto también sugiere que la expresión del transportador *hxt2* no afecta las vías de señalización por azúcares que regulan la expresión de estos genes.

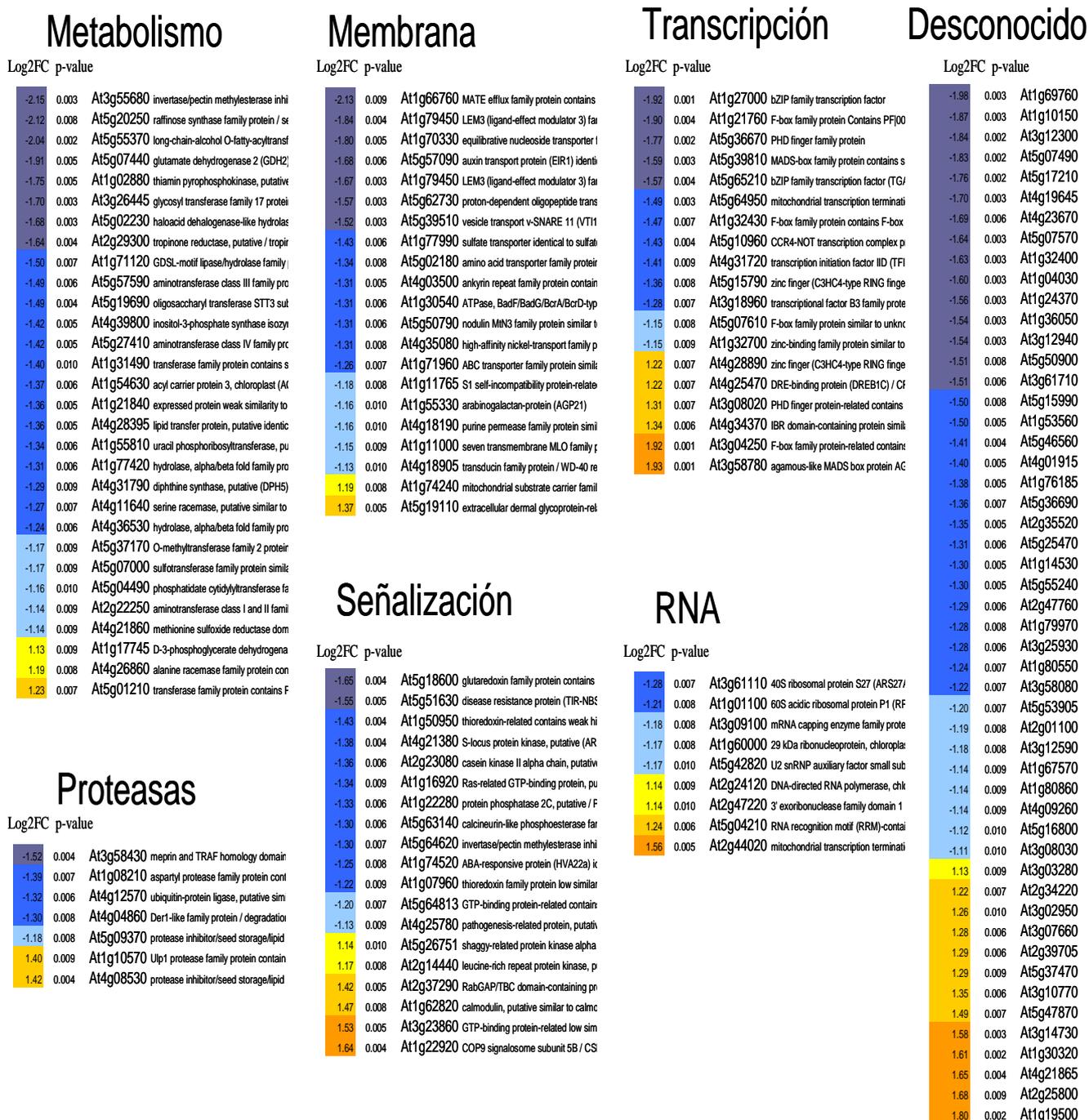


Figura 17. Análisis del efecto de la expresión del transportador *Hxt2* sobre la transcripción en plantas silvestres y transgénicas (L2). El RNA usado para este análisis proviene de plantas que fueron inducidas con 3% de glucosa por 6 y 12 h. Los colores significan el valor de cambio de mayor (azul) a menor (naranja).

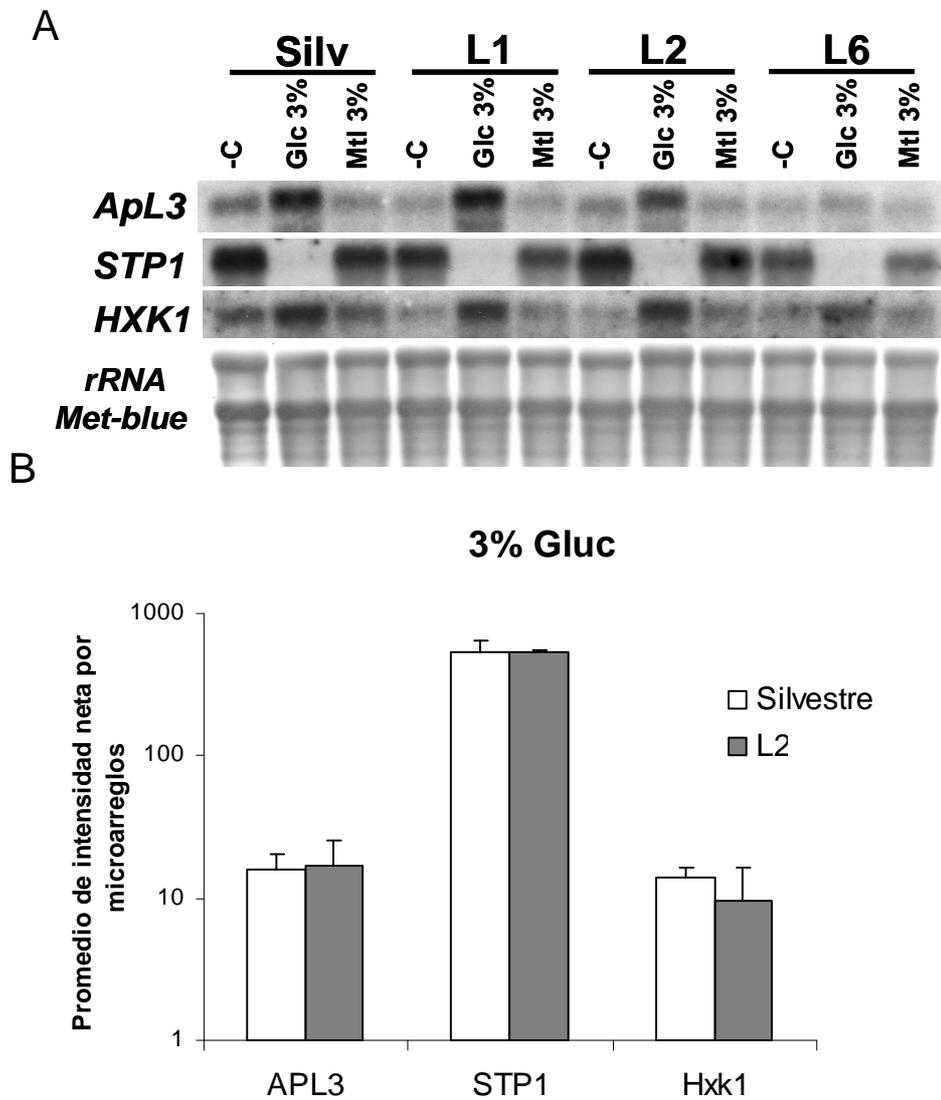


Figura 18. (A) Análisis por Northern-blot de los genes *ApL3*, *STP1* y *Hxk1* en plantas silvestres y transgénicas (L2). (C-) tiempo cero, (Glu 3%) glucosa 3%, (Mtl 3%) manitol 3%. La inducción fue por 6h. (B) Expresión promedio de los genes *Hxk1*, *ApL3* y *STP1* en los microarreglos que se realizaron de acuerdo a la figura 16.

3.5 Transformación de Jitomate

Para obtener las plantas transgénicas de jitomate se usó el promotor 2A11, el cual es fuerte, específico de fruto y activo en la parte final del desarrollo del fruto. De acuerdo con la secuencia que se encuentra en la base de datos del NCBI (ver materiales y métodos), se diseñaron oligos específicos y por PCR se amplificó un fragmento de 1394 pb. El producto de PCR se clonó en el vector pGMT-easy, se analizó con enzimas de restricción y al igual que con la secuencia del gen del transportador *hxt2*, la del promotor también se secuenció por completo. La construcción con la que se transformaron las plantas se llevó a cabo en el vector pBluescrip. Se hicieron análisis de restricción (Figura 18B) para verificar que el promotor y el gen del transportador se orientaron correctamente y posteriormente, se transfirió al vector binario pZY101.1. En la figura 18A se muestra como el gen *hxt2* quedó bajo el control del promotor 2A11, así como la secuencia de terminador del gen que codifica para la Nopalino sintetasa (NOS) (Ver materiales y métodos).

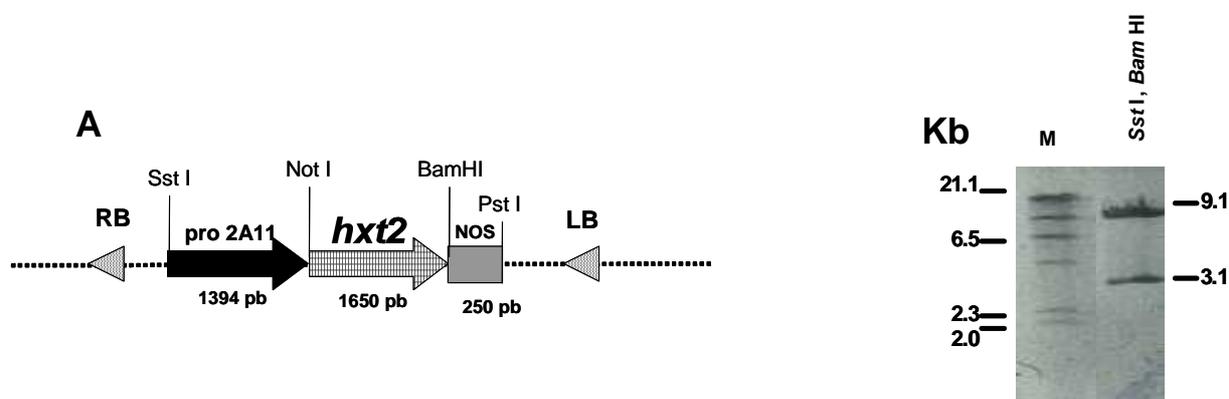


Figura 18. (A) Esquema de la construcción usada para la expresión del transportador *hxt2* en frutos de jitomate. (B) análisis de restricción de la misma. M, marcadores de peso molecular.

El vector binario también confiere resistencia al herbicida BASTA. En un experimento preliminar se probó el efecto de diferentes concentraciones (de 0.5 a 1.5 mg/l) del herbicida disuelto en medio MS sobre explantes de hoja de aproximadamente 0.5 a 0.8 cm². Se incubaron a 24°C con ciclos de 16 h luz y 8 h oscuridad por 3 semanas (Figura 19 A y B). Como puede observarse, los tejidos

silvestres no sobreviven a partir de 1mg/l de BASTA, por lo que para la selección de las plantas transgénicas se usó esta concentración (Figura 19C).

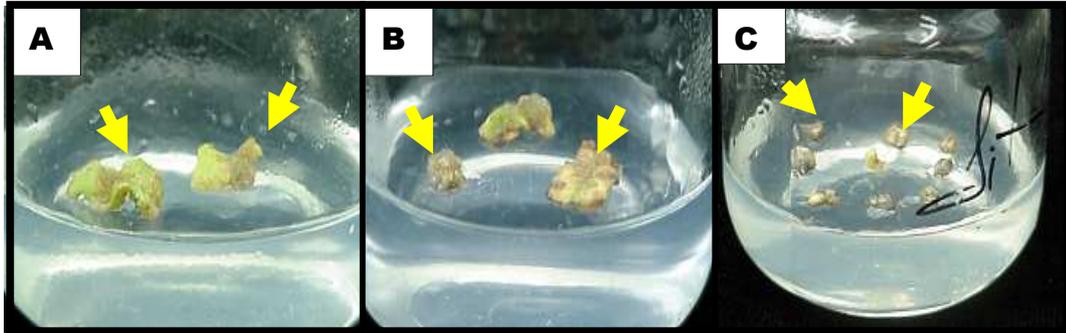


Figura 19. Determinación de la concentración óptima de BASTA para la selección de plantas transgénicas de jitomate. Explantes de hoja de jitomate colocados en medio MS con 0.5 mg/L (A), 1 mg/L (B) y 1.5 mg/L (C) de BASTA. Las flechas indican los efectos del herbicida sobre los explantes.

La transformación se realizó con alrededor de 400 explantes de cotiledones transformados con *A. tumefaciens* LBA4404 (ver Materiales y Métodos), se cultivaron en medio MS con Basta y después de tres semanas 20 los explantes mostraron crecimiento de callos y regeneraron brotes (Figura 20 A y B). A las cinco semanas, el crecimiento de los brotes fue claro en 10 explantes donde los callos con brotes se pasaron a un medio para inducción (Figura 20C). Cuatro semanas después, la parte aérea se desarrolló en el tallo y hojas (Figura 20D y E). La figura 20F muestra a los explantes que no fueron resistentes a BASTA presentando coloración café en todo el tejido.

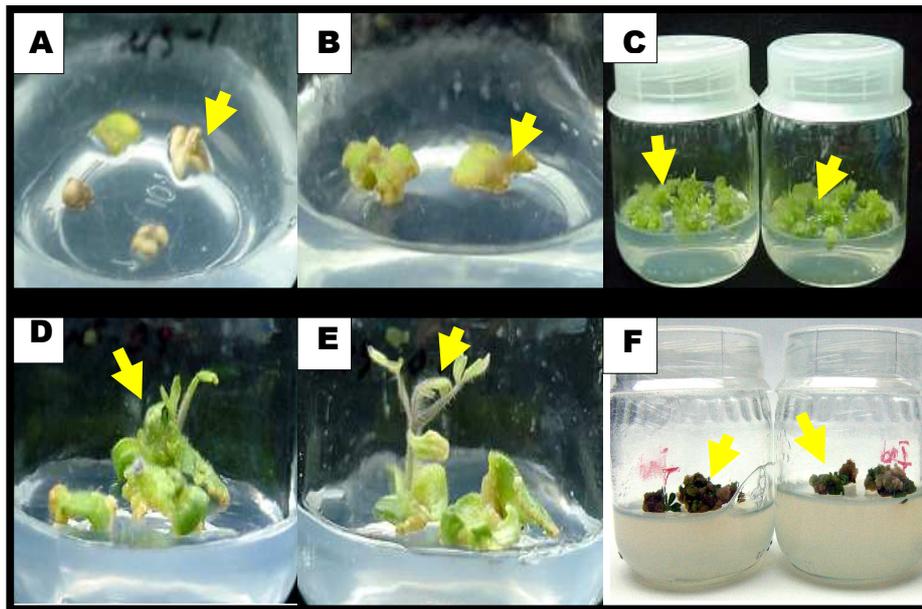


Figura 20. Imágenes que muestran la generación de la parte aérea a partir de callos de explantes de jitomate. Las imágenes A,B,C muestran el crecimiento de los callos en BASTA. Las imágenes D y E muestran la formación de hojas y tallos. La imagen F muestra algunos de los callos que no fueron resistentes a BASTA. Las flechas indican las zonas de contacto en el medio con BASTA.

Una vez que se formaron las plántulas se pasaron a medio de enraizamiento (ver materiales y métodos). Cinco semanas después se desarrolló la parte de la raíz (Figura 21) y posteriormente se transplantaron a suelo.

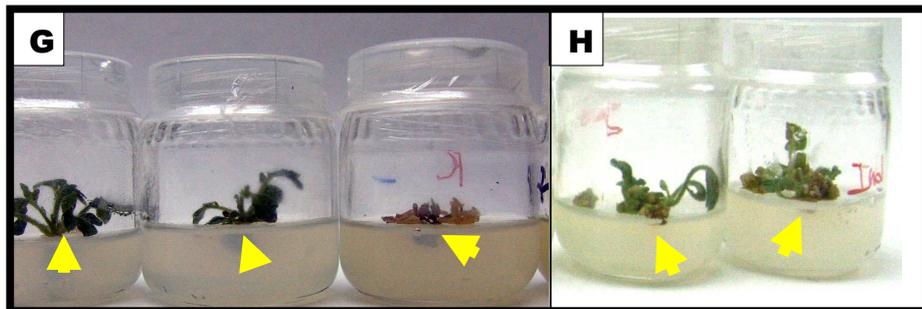


Figura 21. Plántulas con en medio de inducción de la raíz (G y H). Las flechas indican las zonas donde se desarrolló la raíz.



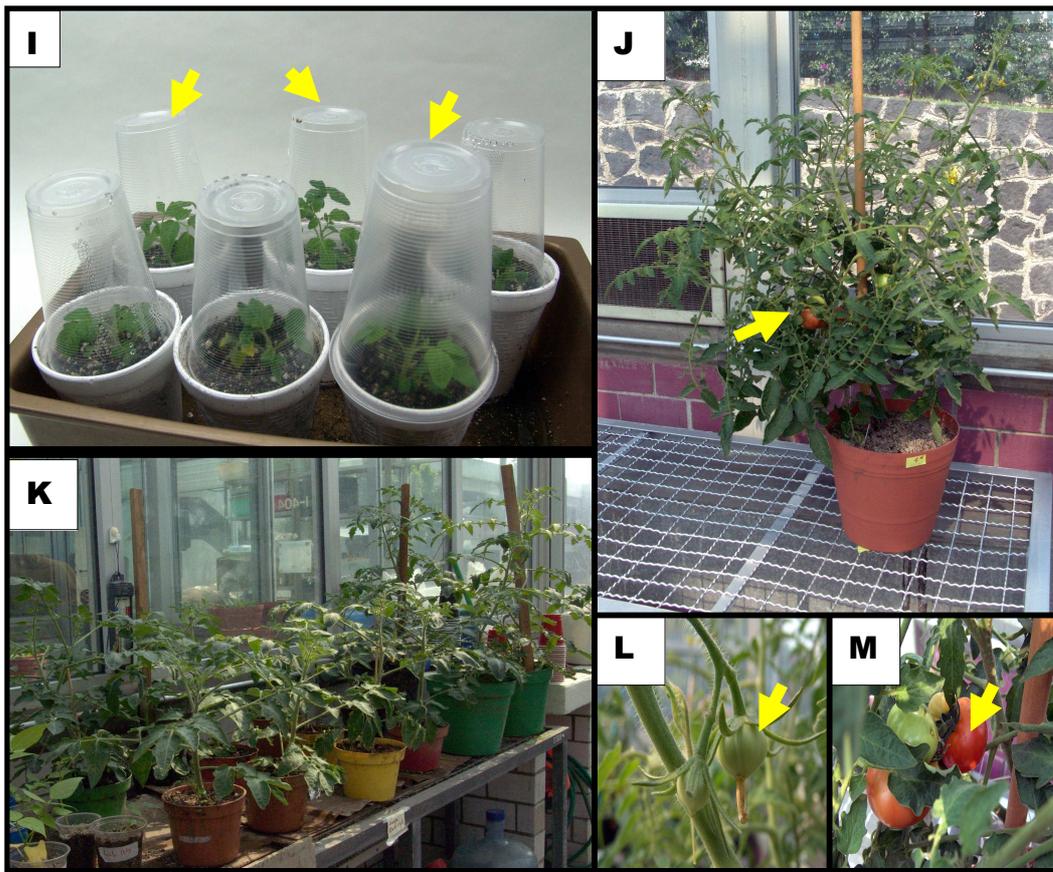


Figura 22. Transplante de las plantas transgénicas y cultivo en el invernadero. En la imagen I se muestra a las plantas transplantadas a suelo. Las imágenes J,K,L y M muestran a las plantas en el invernadero en la producción de frutos a diferentes etapas de crecimiento.

De un total de 10 plantas que se transplantaron a suelo (Figura 22I) sólo tres plantas sobrevivieron hasta la producción de frutos. A partir de esas plantas se obtuvieron semillas generación T1 que se sembraron y se cultivaron en el invernadero. En las Figuras 22 J-M se muestran diferentes etapas de crecimiento y producción de frutos, mismos que fueron colectados en la etapa madura para obtener semillas.

3.6 Identificación de las plantas transgénicas de jitomate por PCR

A partir de hojas de plantas que previamente habían sido seleccionadas por su capacidad para crecer en medio con BASTA, se aisló el DNA genómico (ver materiales y métodos) y usando oligonucleótidos específicos, por PCR se amplificó un fragmento de 150 pb (Figura 23). Las plántulas que resultaron

positivas al análisis por PCR se cultivaron hasta que produjeron frutos y las semillas colectadas (T2) se usaron para estudios posteriores.

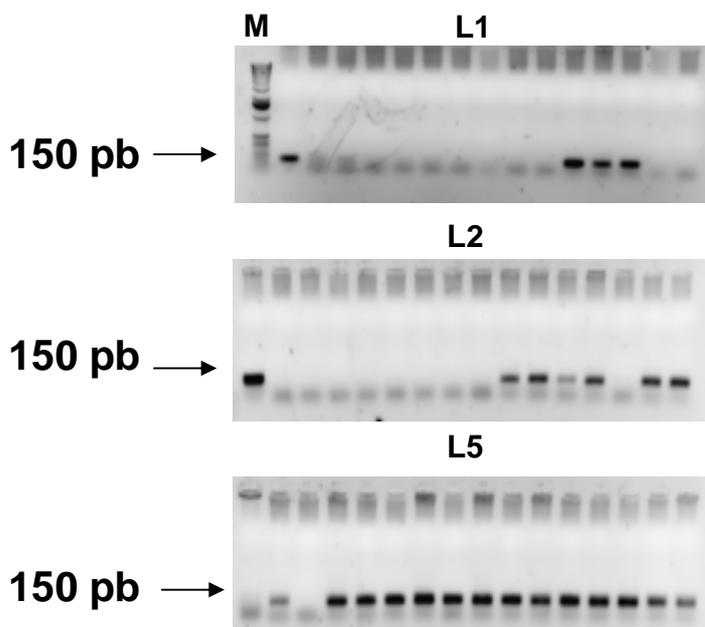


Figura 23. Análisis por PCR de plantas transgénicas de jitomate. Producto de la amplificación por PCR de un fragmento de 150pb del gen *hxt2* a partir de DNA genómico de plantas seleccionadas por su tolerancia a BASTA.

Con el fin de estudiar si la expresión del transportador afectaba el contenido de sólidos solubles de los frutos, se midieron los °Brix en frutos en las etapas amarillo, naranja y rojo maduro (ver materiales y métodos). En la etapa de frutos naranja se observó un incremento del 8% en la L1 y 23% en la L5 con respecto a la silvestre. En la etapa rojo maduro el incremento en los grados Brix en las líneas L1 y L5 sobre los frutos producidos por las plantas silvestres fue de 13%. La L2 no presentó cambios en ninguna de las etapas (Figura 24).

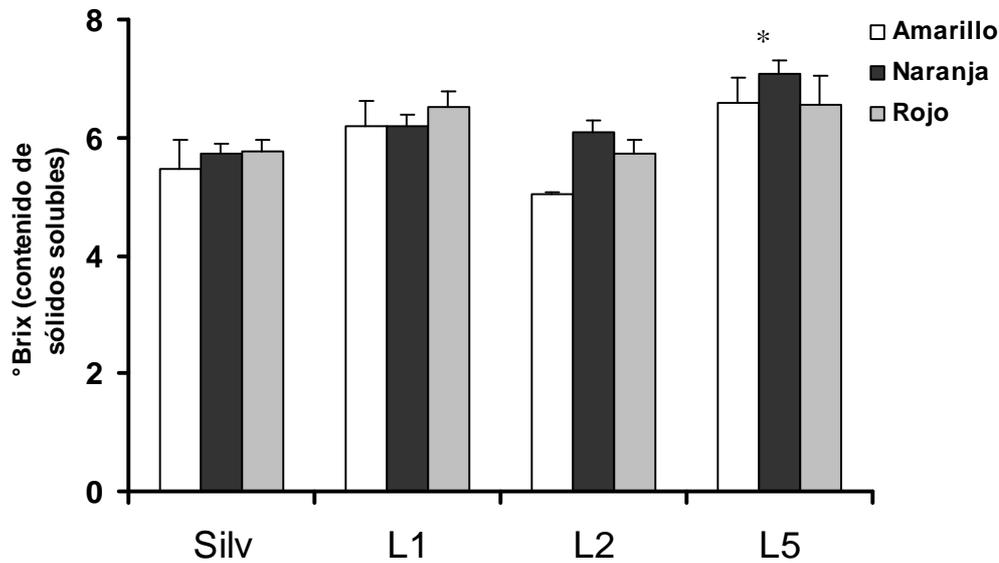


Figura 24. Cuantificación de °Brix en frutos. Frutos de etapa verde maduro se usaron para la medición de °Brix. Estos resultados son los \pm ES ($n=15$). * $p < 0.05$

3.7 Medición de la toma de glucosa en pericarpios de fruto de jitomate

Se realizó un experimento de toma de $[U^{14}\text{-C}]$ -glucosa en discos de pericarpios de frutos en la etapa naranja en donde de acuerdo con lo reportado ocurre la mayor acumulación de glucosa y fructosa (Hewitt, et al. 1988). En este experimento discos de pericarpio de 0.5 cm de diámetro se incubaron durante 1 hora con $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ glucosa (ver materiales y métodos). Los resultados se presentan en la figura 25 y como se puede observar, no hay un incremento significativo en la toma de $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ glucosa en los frutos de las plantas de jitomate transgénicas con respecto a las silvestres. Es posible que el transportador Hxt2 represente una pequeña fracción de los transportadores presentes en el tejido analizado y que para ver su contribución al flujo de azúcares se requieran tiempos mas largos. Por otro lado, los resultados obtenidos con las plantas de *Arabidopsis*, muestran que el transportador expresado se comporta como uno de baja afinidad por glucosa, es muy probable que en jitomate suceda algo similar, por lo que las concentraciones de hexosas en el apoplasto podrían ser insuficientes para que el transportador Hxt2 contribuyera eficientemente a su incorporación.

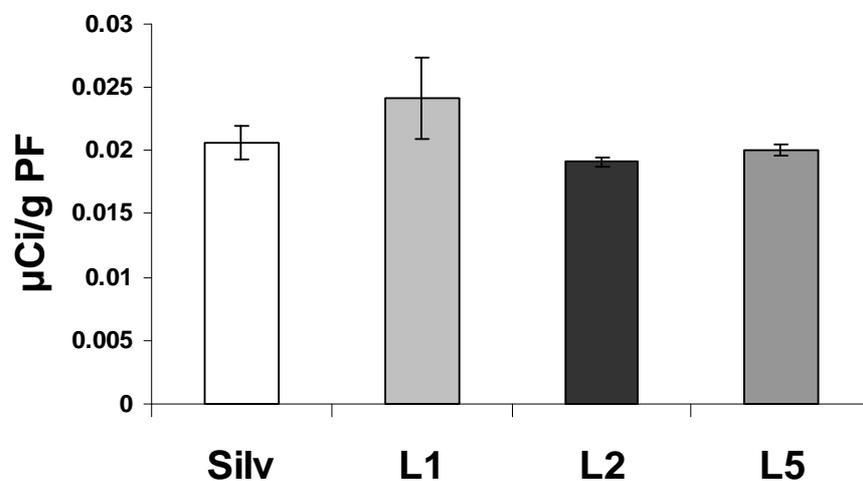


Figura 25. Incorporación de [U-¹⁴C] glucosa por discos de pericarpio de frutos de jitomate silvestre y transgénicas en la etapa naranja. Las barras representan el promedio \pm ES ($n=4$).

3.8 Análisis de los niveles de glucosa y fructosa en plantas de jitomate.

Las hexosas (glucosa y fructosa) y los ácidos orgánicos son los componentes más importantes de los sólidos solubles presentes en los frutos de jitomate. Con el fin de evaluar si la presencia del transportador Hxt2 produce algún efecto sobre los niveles de glucosa y fructosa en las plantas transgénicas, se midieron éstos en los estados de maduración amarillo, naranja y rojo. Los resultados se presentan en la figura 26 y como se puede apreciar, no hay cambios que pudieran atribuirse a la presencia del transportador.

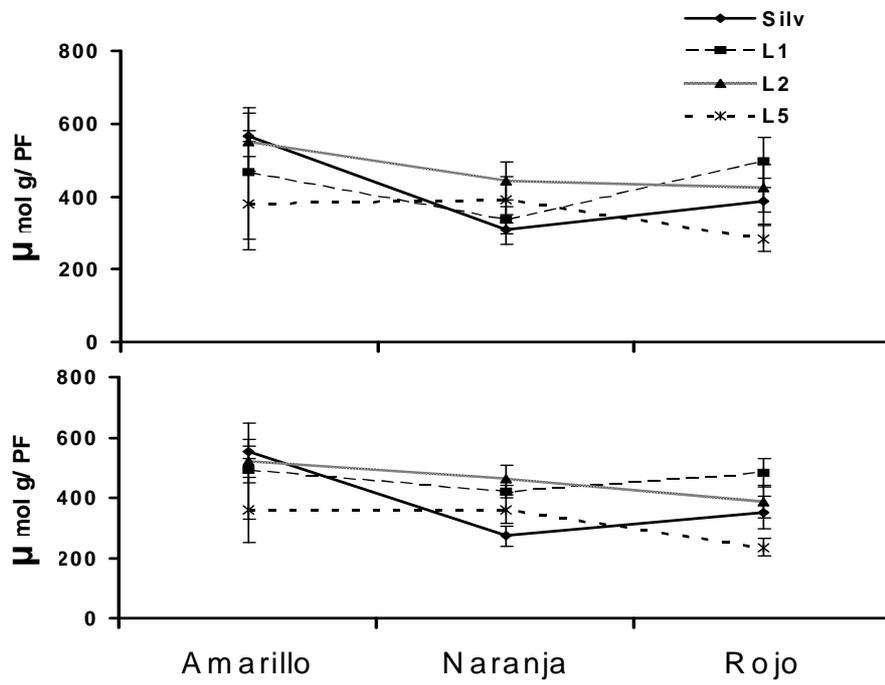


Figura 26. Determinación de los niveles de glucosa y fructosa en las etapas de amarillo, naranja y rojo maduro. Las barras representan el promedio \pm ES ($n=10$).

4. Discusión.

Los azúcares producidos por la fotosíntesis son utilizados para satisfacer las necesidades energéticas y proporcionar intermediarios tanto para la síntesis de nuevas estructuras como para la de compuestos de reserva (lípidos, almidón, sacarosa y fructanos). La distribución de fotosintatos está controlada, y gracias a ello, órganos con insuficiente o nula actividad fotosintética (raíces, flores, frutos y semillas) reciben los azúcares que les permiten crecer y llevar a cabo las funciones en las que están especializados. Diversos estudios han sugerido que los fotosintatos pueden ser requeridos simultáneamente en diferentes órganos de demanda, (Patrick, 1997) por lo que es probable que la cantidad disponible de ellos no sea suficiente para satisfacer plenamente todos los requerimientos. Por otro lado, tanto las necesidades fisiológicas de las plantas como la producción de fotosintatos cambian durante el desarrollo y el mecanismo que controla la relación fuente demanda debe ser capaz de percibir distintos estímulos (tanto internos como externos) generando señales de diferente intensidad y duración para que la distribución de los azúcares sea un elemento que contribuya eficientemente y en caso de ser necesario contribuya a la adaptación de las plantas al ambiente como temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes, ataque de plagas y enfermedades, etc.

En este contexto, la comunicación entre los tejidos que exportan fotosintatos (tejidos fuente) y aquellos cuyo crecimiento y desarrollo depende de los azúcares que reciben (órganos de demanda) se vuelve tan importante que, no es sorprendente que se hayan perfeccionado sistemas de transducción de señales capaces de percibir cambios en la disponibilidad de azúcares (concentración y tipo de azúcares) y que el funcionamiento de estos mecanismos esté relacionado con el de otros sistemas de transducción de señales responsables de la percepción de otros estímulos. Por ejemplo, la expresión de algunos genes relacionados con la fotosíntesis (*CAB* y *RBCS*) se inhibe a altas concentraciones de glucosa, pero esas mismas condiciones activan la expresión de genes relacionados con la síntesis de almidón como *AGPasa* y *Ap13* (Xiao et al., 2000).

La forma como los azúcares se liberan en los órganos de demanda y la actividad metabólica de los mismos, son elementos importantes para determinar la cantidad de azúcares disponibles y satisfacer las necesidades de los tejidos de demanda (Hebers and Sonnewald 1998). En algunos casos, la sacarosa que se transporta por el floema fluye libremente a los órganos de demanda por medio de plasmodesmos (vía simplástica) (Lucas, 1995), mientras que en otros, la sacarosa es descargada en el apoplasto (vía apoplástica), donde puede ser introducida hacia el citosol por transportadores específicos, o también puede ser hidrolizada por la invertasa que se encuentra asociada a la pared celular, cuyos productos (glucosa y fructosa) son introducidos a las células por medio de transportadores de hexosas (Patrick, 1997). Se ha visto que la expresión y regulación de los transportadores de azúcares de plantas es compleja debido a que diversos factores como: el tipo de tejido, las etapas de desarrollo y factores ambientales. Por ejemplo, en tabaco, papa y tomate, la luz promueve el aumento en la expresión del gen del transportador de sacarosa SUT1 y al propiciar cambios en el contenido de azúcares, también regula su actividad (Kühn et al, 1997). La expresión y la actividad del transportador de sacarosa BvSUT1 en hojas en desarrollo son reprimidas por sacarosa (Chiou y Bush, 1998; Vaughn et al., 2002; Ransom-Hodgkins et al., 2003); pero en células en suspensión de *Vitis vinifera* la expresión del transportador de hexosas VvHT1 es inducida por glucosa, sacarosa y palatinosa (Atanassova et al., 2003). Los transportadores de sacarosa LeSUT1 de jitomate y DcSUT1 de zanahoria son inhibidos por luz (Shakia and Sturm, 1998). En *A. thaliana* el control de la expresión de algunos genes de transportadores de hexosas son regulados por diversos factores, por ejemplo, la expresión del transportador AtSTP1 es reprimida por glucosa en plántulas y por luz en hojas de plantas maduras (Stadler et al., 2003; Gibson et al., 2005) mientras que la expresión de AtSTP4 es estimulada por la infección del patógeno *Pseudomonas syringae* (Truernit et al., 1996).

Con el fin de investigar si el incremento en el transporte de hexosas es un punto que limite la asimilación de fotosintatos en los órganos de demanda, se expresó el transportador de hexosas *hxt2* de *Saccharomyces cerevisiae* en dos

modelos: en *A. thaliana* bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S y en las plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) bajo el promotor 2A11, el cual es específico de frutos y es activo en la etapa de maduración. En esa etapa se lleva a cabo la acumulación de la mayor parte de los sólidos solubles (en las variedades comerciales mayoritariamente glucosa y fructosa) y dado que la actividad de invertasa asociada a la pared es muy elevada y probablemente suficiente para hidrolizar toda la sacarosa que se descarga, se crean las condiciones para que los frutos acumulen la glucosa y la fructosa en las células del fruto maduro (Vaan Haren et al., 1993). Por otro lado, la calidad de los frutos de jitomate está estrechamente relacionada con el contenido de sólidos solubles, por lo que se consideró que la expresión del transportador *hxt2* podría aumentar la capacidad de asimilación de hexosas y contribuir a mejorar la calidad de los frutos.

Por otro lado, se determinó que los modelos son complementarios y que su estudio puede proporcionar información valiosa acerca del papel del transporte de hexosas en plantas. En las plantas transgénicas de *Arabidopsis* la presencia del transgen se comprobó con la amplificación por PCR de un fragmento de DNA de 1.6 Kb (Figura 7). El tamaño corresponde con lo esperado. La amplificación en las líneas L6 y L7 fue menor a la de las líneas L1, L2 y L3. Es probable que el DNA genómico presentara degradación por lo que la amplificación no fue igual en todas las líneas y eso impidiera observar las bandas con la misma intensidad. Posteriormente, utilizando la sonda del gen *htx2*, se demostró por Southern-blot que las plantas transgénicas son líneas independientes (Figura 8), en la imagen se observa que todas las líneas poseen una copia del transgen, excepto la línea L2, donde se observan 2 copias. Es probable que ello contribuya a que en el análisis de los productos de la amplificación por PCR la banda correspondiente a la línea L2 sea la de mayor intensidad (Figura 7).

Utilizando la misma sonda del gen *htx2*, se detectó que en las plantas transgénicas se expresa un RNAm de 1.6 kb (correspondiente al esperado) y se observaron notables diferencias en los niveles del transcrito de las líneas. Las líneas L1, L2 y L6 tienen diferentes niveles de expresión (Figura 9) y por ello, se les eligió para una caracterización más detallada.

Se obtuvieron anticuerpos que reconocen una región de 50 residuos (ATSRVESGSQQTSTSIHSTPIVQKLETDESPIQTKSEYTNAELPA) del transportador Hxt2. En extractos de levadura se detectó una proteína de 53 KDa, tamaño muy cercano a los 47 kDa que se han reportado para el transportador Hxt2 (Wendell and Bisson 1993, 1994). Sin embargo, en los extractos de plantas no obtuvimos resultados consistentes. Usamos fracciones enriquecidas en membranas, pero los resultados no mejoraron. La secuencia de aminoácidos del transportador *hxt2* de levadura es muy diferente a la de los transportadores de hexosas hasta ahora identificados en *Arabidopsis* y la región que se usó para hacer los anticuerpos no tiene una homología importante con proteínas sintetizadas por las plantas de *Arabidopsis*. No obstante, los anticuerpos reconocieron bandas de pesos moleculares distintos al esperado (Figura 10). La incapacidad de los anticuerpos para detectar a la proteína Hxt2 en los extractos de plantas puede deberse a varias posibilidades: (1) que se produce en cantidades muy pequeñas, (2) que sea susceptible al ataque de proteasas, (3) que las condiciones usadas no hayan sido las más adecuadas para liberarla de la membrana plasmática o (4) que los anticuerpos no fueran funcionales. Sin embargo, las plantas transgénicas fueron capaces de incorporar hasta 25% más de 3-O-metil-glucosa marcada con ^{14}C que las plantas silvestres (Figura 11). Los transportadores de sacarosa SoSUT1 de *Spinacea oleracea* y StSUT1 de papa se expresaron en papa (Leggewie et al., 2003) y en cotiledones de chícharo (Rosche et al., 2002), respectivamente. En ambos casos la incorporación de sacarosa marcada con ^{14}C aumento en aproximadamente 50%. Los resultados en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* fueron menores, sin embargo, se consideró que el transportador Hxt2 que se expresa en las plantas transgénicas es funcional.

Posteriormente, las plantas se cultivaron en placas con diferentes concentraciones de glucosa. En medios con bajas concentraciones no se observaron diferencias que pudieran ser atribuidas a la presencia del transgén. Sin embargo, a concentraciones superiores (3, 4 y 6 %) las plantas transgénicas crecen mejor que las silvestres (Figuras 12 y 13). En levaduras, la afinidad del transportador Hxt2 está controlada por la concentración de glucosa en el medio

(Wendell and Bisson 1994; Reinfenberger et al., 1997). Siendo la interacción con la proteína Snf3 necesaria para que el transportador Hxt2 aumente su afinidad por glucosa (Liang and Gaber, 1996; Kruckeberg et al., 1990). Al no existir esta proteína (o alguna otra que pudiera sustituirla), la afinidad por glucosa disminuye considerablemente y se comporta como un transportador de baja afinidad por lo que los efectos de su presencia solo se hacen evidentes cuando la concentración de glucosa en el medio es suficientemente alta.

A pesar de que las plantas transgénicas tienen mayor capacidad para asimilar glucosa (Figura 11), cuando se les cultiva en medios con 3% de glucosa los niveles internos de glucosa, sacarosa, almidón e intermediarios fosforilados son menores que los de las silvestres (Figura 15). En esas mismas condiciones las actividades de la glucocinasa y de la fructocinasa son mayores en las plantas transgénicas en un 78 y 87 % respectivamente que las observadas en las plantas silvestres (Figura 16). Por alguna razón hasta ahora desconocida, la presencia del transportador Hxt2 contribuye a que las plantas transgénicas mantengan una actividad metabólica elevada en medios donde la concentración de glucosa (3%) limita el crecimiento de las plantas silvestres (Figura 12). Muchos de los efectos de las altas concentraciones de glucosa sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis* han sido documentados; se sabe que las plantas detienen su crecimiento (Arroyo et al., 2003) y que tanto la germinación como el desarrollo de las plántulas se inhiben con glucosa al 3%. Por otro lado, en *Arabidopsis* las altas concentraciones de glucosa estimulan la floración, la senescencia y la formación de raíces adventicias (Price et al., 2004; Pourtau 2006), mientras que en papa se incrementa el número de tubérculos y en tabaco se acelera la senescencia de las hojas (Gibson, 2005; Rolland et al., 2006).

Como parte de la caracterización de los efectos de la expresión del transportador Hxt2, se analizó la cinética de germinación en placas con medio B5 y glucosa al 1% y 3% (Figura 14). Con 1% de glucosa no se presentaron cambios que pudieran ser atribuidos a la presencia del transgén. Sin embargo, en las placas con 3% de glucosa, la velocidad de germinación de las plantas transgénicas fue mayor. La diferencia fue más clara entre las 20h y 40h (Figura

14B). Se ha establecido una conexión interesante entre el nivel de ácido abscísico (ABA) y la sensibilidad de la germinación a glucosa (Dekkers et al., 2008). Se sugiere que el arresto de la germinación se debe a que la glucosa de alguna manera inhibe la degradación de ABA. Por otro lado, algunas de las respuestas de las plantas a ABA se pueden revertir si en el medio están presentes glucosa o aminoácidos (Price et al., 2003; Garcíarubio et al. 1997; Dekkers et al., 2008). Dado que el 14% de genes regulados por ABA también son inducidos en respuesta a la incubación en medios con 3% de glucosa (Li et al., 2006; Price et al., 2003), las relaciones en las respuestas de las plantas a estos factores es hasta cierto lo esperado. Es posible que en las plantas transgénicas la velocidad de germinación sea mayor con respecto a la silvestre por algún cambio en la percepción de glucosa y por lo tanto una movilización de reservas más eficiente.

Las plantas poseen mecanismos complejos que les permiten detectar cambios tanto en la composición como en la concentración de los azúcares presentes (Jang and Sheen, 1997; Smeekens and Rook, 1997; Koch, 2004) y se ha propuesto que la percepción se lleva a cabo a diferentes niveles: (1) la concentración de azúcares en el apoplasto, (2) el flujo de carbohidratos entrando en la célula, (3) la concentración de azúcares en el citosol y (4) la velocidad con la que los azúcares son metabolizados (Lalonde et al., 1999). El papel de los azúcares como reguladores del crecimiento y desarrollo también está plenamente demostrado (Xiao, et al., 2000). Se ha establecido que en plantas existen por lo menos tres vías que permiten a los azúcares actuar como reguladores del crecimiento y del desarrollo. La primera que es dependiente de hexocinasa, aunque la actividad catalítica *per se* parece que no siempre es crucial para el funcionamiento de esta ruta. Dentro de los genes que se regulan por esta vía se encuentran *CAB1*, *PC*, *PLD* y *rbsc* (Xiao et al., 2000). La segunda vía es dependiente de la actividad catalítica de HXK. Esta vía puede depender de los niveles de un metabolito desconocido que podría generarse a partir del metabolismo de la glucosa. *PR1* y *PR5* (genes de respuesta a patógenos) son ejemplos de genes cuya expresión es regulada por este mecanismo. La tercera ruta es independiente de AtHXT1. Los componentes de este mecanismo de

transducción son desconocidos, aunque se ha establecido que el efecto de los azúcares sobre la expresión de *AGPasa*, *AS1*, *CHS* y *PAL1* es dependiente de este mecanismo (Xiao et al., 2000).

Para las levaduras es muy importante el monitoreo de la concentración externa de glucosa. Se ha establecido que las proteínas de membrana *SNF3* y *RGT2* participan en esa función. Estas proteínas tienen alta homología con otros transportadores, pero son inactivas (Özcan et al., 1998, 2002). Se ha propuesto que un dominio extracelular les permite formar un complejo con la glucosa y que mediante los cambios conformacionales esa información es transmitida al interior de las células. Los transportadores de monosacáridos *AtSUGTRPR* y *F23E12.140* (Lalonde et al., 1999) y el de sacarosa *SUT2* (Baker et al 2000), son proteínas que poseen un largo loop intracelular similar a *SNF3* y *RGT2* en levaduras, por lo que, se ha propuesto que un mecanismo idéntico también podría también funcionar en plantas para detectar la presencia de azúcares en el exterior de las células (Martin et al., 1997; Walsh et al. 1993).

Respecto al papel de la hexocinasa como sensor de los niveles de azúcares, se ha establecido que el efecto de la glucosa sobre la expresión de *CAB*, *ERA 1*, *PC,PLD*, *RCBCS* es dependiente de hexocinasa. El efecto de la glucosa sobre la expresión de *AGPasa*, *AS1*, *CHS*, *CIN1*, *PAL1*, *PAL3* es independiente de hexocinasa, mientras que la regulación de la expresión de *PR1* y *PR5* requiere de un intermediario de la glucólisis (Xiao et al., 2000). También se ha reportado que en plantas silvestres de *Arabidopsis* la expresión de *STP1* se reprime con 3% de glucosa en el medio de cultivo y que esa misma condición estimula la expresión de *Apl3* y *HXk1* (Sherson et al. 2000; Stadler et al. 2003; Ramon et al. 2007; Xiao et al. 200). Para investigar si la tolerancia de las plantas transgénicas a la concentración elevada de glucosa se debe a que la presencia del transportador *Hxt2* perturba el funcionamiento de los sistemas responsables de la percepción de glucosa, se analizó la expresión de *STP1*, *Apl3* y *HXk1* por Northern-blot. En la figura 18 se muestra que las líneas transgénicas y las plantas silvestres responden de manera similar. Estos resultados muestran que la expresión del transportador *Hxt2* no modificó las vías de señalización que

controlan la respuesta transcripcional de *STP1*, *Ap13* y *HXk1* a la concentración de glucosa. Sin embargo, el análisis de los cambios transcripcionales (microarreglos) observados a 6 y 12 h después de que plantas de la línea L2 y silvestres fueron transferidas de un medio con 1% de glucosa a otro con 3%, muestra que en las plantas transgénicas hubo 43 genes que aumentaron su expresión al mismo tiempo que otros 120 la disminuyeron significativamente (Figura 17). Los genes involucrados participan en diferentes procesos, los cuales se clasificaron en 7 categorías: metabolismo, transcripción, membrana, proteasas, señalización, relacionados con RNA y desconocidos.

El hecho de que los resultados de los microarreglos sean congruentes con los en los resultados obtenidos por los Northern-blot da validez a este análisis. Sin embargo, dentro de los genes cuyo expresión es afectada por la presencia del transportador Hxt2, no identificamos ninguno que tenga una conexión evidente con la tolerancia a glucosa que exhibieron las plantas transgénicas. Por otro lado, es probable que algunos de estos cambios también se deban a un cambio en la osmolaridad por las altas concentraciones de glucosa. Para explorar esa posibilidad, de las bases de datos de GeneOntology (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term-assoc.cgi?term=GO:0006970&sessionId=2025amigo1269809077>) y TAIR (<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=keyword&id=6618>) se obtuvieron los genes reportados por microarreglos en respuesta a estrés osmótico con manitol y se compararon con aquellos cuya expresión se modificó cuando las plantas transgénicas se pasaron de un medio de cultivo con 1% de glucosa a otro con 3%, de los 386 genes cuya expresión se modifica por estrés osmótico sólo el gen que codifica para una proteasa perteneciente a la familia Ulp1 (At1g10570) y que también se activa por estrés salino esta dentro del grupo de genes cuya expresión se modificó cuando plantas que expresan el transportador Hxt2 se pasaron a un medio con alta concentración de glucosa.

Con base en estos resultados se propone que la actividad de los transportadores de hexosas forma parte de los mecanismos que tienen las plantas de *Arabidopsis* para percibir y responder a los cambios en la concentración de glucosa. Los datos obtenidos en este trabajo muestran que en las plantas

transgénicas los mecanismos que controlan la respuesta transcripcional de *APL3*, *STP1* y *Hxk1* a concentraciones elevadas de glucosa se mantienen funcionales (Figura 18) y ponen de manifiesto que la participación de otros elementos regulatorios podría estar acoplada al funcionamiento de los transportadores ubicados en la membrana (Figura 27). Así, la presencia del transportador Hxt2 permite la entrada de glucosa, sin embargo, al tener una secuencia de aminoácidos muy diferente a las de los transportadores que se expresan en las células de *Arabidopsis* la entrada de glucosa escapa al control que se ejerce en ese punto. El hecho de que el transportador Hxt2 se comporte como uno de baja actividad explica porque los efectos solo se observaron con concentraciones elevadas de glucosa.

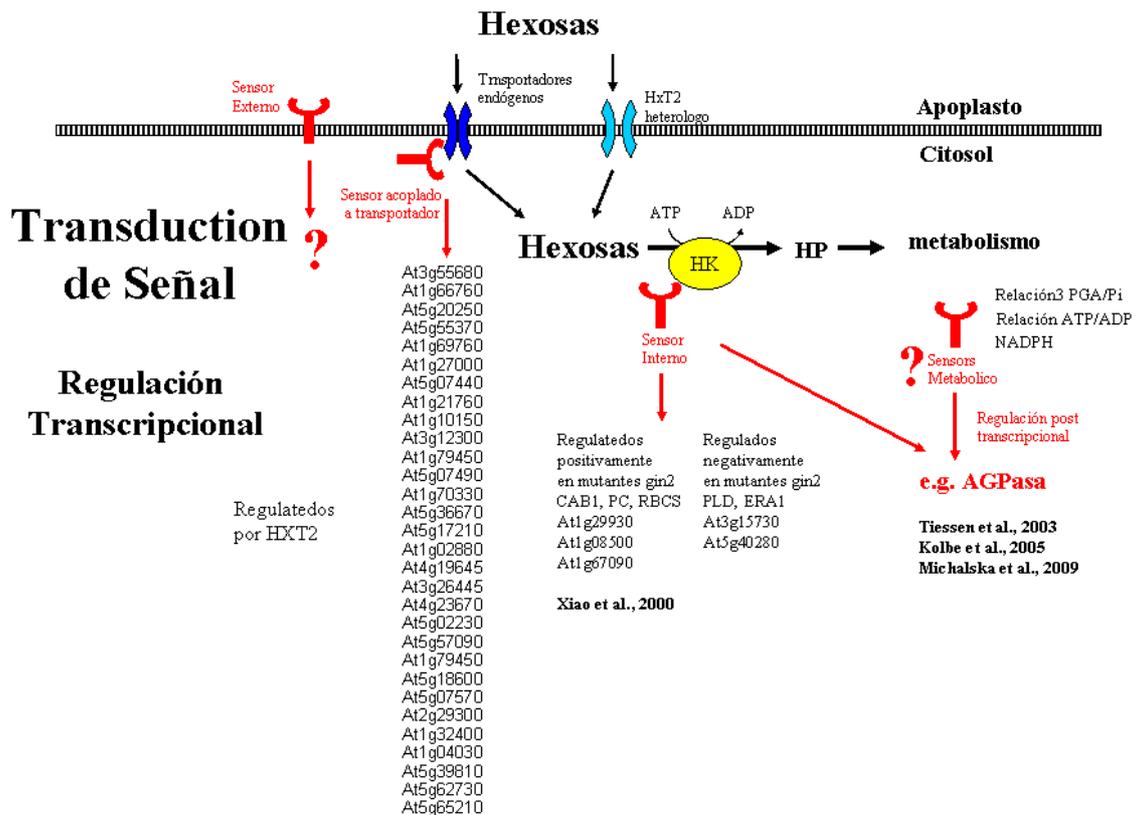


Figura 27. Modelo propuesto para explicar porqué las plantas transgénicas toleran altas concentraciones de glucosa. Se propone que la concentración de glucosa es evaluada a varios niveles. En primera instancia sensores ubicados en la membrana celular o sensores internos acoplados al funcionamiento de transportadores de azúcares serían responsables de evaluar la concentración de glucosa en el apoplasto y su ingreso a la célula, respectivamente. La expresión de algunos genes podría ser consecuencia de la percepción de glucosa a este nivel. De acuerdo con esta propuesta, la hexocinasa funciona como un sensor que percibe los niveles de glucosa en el citoplasma. Además del mecanismo del cual forma parte la hexocinasa, existe otro (independiente de hexocinasa) cuyo sensor no ha sido identificado, pero ambos mecanismos son capaces de regular la expresión de diversos genes. Este esquema también hace referencia a las señales que se producen como consecuencia de la metabolización de la glucosa. Finalmente, de acuerdo con esta propuesta, los efectos que se observan en las plantas que expresan el transportador hxt2, son el resultado de que el primer punto de control sea parcialmente ignorado.

La idea de que los frutos de jitomate pudieran asimilar mayor cantidad de azúcares durante el proceso de maduración partió de la suposición de que en esa etapa la actividad de los transportadores de hexosas es crítica, pues la sacarosa que recibe el fruto en el apoplasto es hidrolizada por la invertasa asociada a la pared celular, por lo que pensamos que podría crear un escenario adecuado para evaluar si la expresión del transportador incrementaba el contenido de sólidos solubles (CSS, fundamentalmente glucosa y fructosa) en los frutos maduros. A partir de la construcción en el vector binario pZY101.1 (Figura 18A) se transformaron bacterias de *Agrobacterium tumefaciens*. Posteriormente se obtuvo un cultivo donde se purificó DNA plasmídico y se verificó por análisis de restricción que el tamaño del cassette correspondiera al peso esperado (3.1 kb) del promotor 2A11, transportador *hxt2* y al terminador NOS (Figura 18B).

A partir de un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* se transformaron explantes de cotiledones en medios *in Vitro*, donde se seleccionaron callos con resistencia a BASTA (Figura 19 y 20). De los cuales se seleccionaron tres líneas que sobrevivieron a la etapa adulta y produjeron semilla (T1) (Figura 21 y 22). Las semillas se sembraron y hojas de las plántulas se usaron para extraer DNA y confirmar por PCR la presencia del gen del transportador *hxt2* (Figura 23). Sin embargo, el número de plantas donde amplificó por PCR el transgén varió entre las líneas. En la L1 el transgén se amplificó en sólo 3 plantas, 6 en la L2 y 13 en la L5.

La medición del contenido de sólidos solubles expresados como grados Brix en los frutos producidos por las plantas previamente identificadas como transgénicas mostró incrementos muy pequeños y poco consistentes. En el mejor de los casos en la etapa madura el incremento en el CSS fue de apenas 10% (Figura 24). Los resultados obtenidos con *Arabidopsis* muestran que el transportador se expresó como proteína funcional (Figura 11), creemos que algo similar pudo haber ocurrido en jitomate. La ausencia de las proteínas con las que normalmente interacciona en levadura (Liang and Gaber, 1996; Vagnoli et al., 1998; Walsh et al., 1993), hizo que en *Arabidopsis* se comportara como un transportador de baja afinidad y cuyos efectos sólo se hicieron evidentes cuando

las plantas se cultivaron en medios con altas concentraciones de glucosa (Figura 12A). 3% de glucosa equivale a 157 mM y aunque se ha reportado que la concentración de glucosa en el apoplasto puede estar en el rango de mM (Gear et al., 2000; Hackel et al., 2006) por lo que parece poco probable que sea lo suficientemente elevada, aunada a la posibilidad de que la cantidad de proteína expresada sea pequeña la contribución del transportador Hxt2 al balance de carbono en los frutos maduros se volvió muy reducida como puede observarse en la Figura 25 donde se muestra los resultados de los experimento de incorporación de [U-¹⁴C] glucosa por discos de pericarpio y de los niveles de glucosa y fructosa Figuras 26 a diferentes etapas de maduración no son deferentes a los niveles observados en las plantas control. Es probable que el uso de un transportador de alta afinidad cuyo funcionamiento no requiera de la interacción con otras proteínas permita obtener mejores resultados.

Finalmente, el uso del transportador Hxt2 ha permitido evaluar que algunos de los mecanismos de transducción de señales responsables de detener el crecimiento de las plantas cuando estas se cultivan con altas concentraciones de glucosa podrían estar asociados a la actividad de los transportadores. La expresión de transportadores de alta afinidad pudiera resultar útil para investigar si los transportadores también intervienen en las respuestas de las plantas cuando la concentración de glucosa es muy baja.

5. Conclusiones

- La tolerancia de las plantas transgénicas al 3% y 6% de glucosa en el estado de germinación y postgerminación sugiere que podría alterar alguna ruta de percepción de glucosa en las plantas de *Arabidopsis* como sucede en levaduras.
- En frutos de jitomate no se observaron cambios en las plantas transgénicas con respecto a las silvestres en los diferentes estudios (toma de [U-14C]-glucosa, Brix y niveles de glucosa y fructosa) en los tres estados de maduración, esto sugiere que el transportador Hxt2 al no estar en un sistema donde no se encuentran las proteínas que lo hacen funcionar como de alta afinidad, no pudo llevar a cabo un cambio en la asimilación de glucosa.

6. Perspectivas

Con el fin de establecer el efecto de la tolerancia a altas concentraciones de glucosa por sobreexpresión del transportador Hxt2 se requiere identificar la localización subcelular del transportador, esto con el objeto de analizar si el cambio en la percepción de glucosa es debido a la falta de interacción con otras proteínas endógenas que son necesarias para percibir la concentración de azúcares en el exterior (apoplasto). Por otro lado, se podría hacer cruces de las plantas transgénicas con algunas mutantes responsables de participar como sensores de azúcares esto permitiría ayudar a esclarecer si proteínas de membrana participan en un mecanismo de percepción de glucosa, como sucede en levaduras. Al mismo tiempo se podría identificar si el fenotipo (tolerancia a altas concentraciones de glucosa) es mimetizado por otros tipos de azúcares y entre ellos incluir controles osmóticos lo que podría ayudar a ver si es un efecto que ocurre sólo con glucosa.

En lo que se refiere al estudio en jitomate, a pesar de que no se observaron los cambios en la composición de glucosa y fructosa esperados, es importante determinar si los niveles de otros metabolitos fueron alterados como por ejemplo ácidos orgánicos y/o aminoácidos. Por otro lado, identificar el transgen, el número de copias en el genoma y los niveles de transcrito así como la cantidad de proteína desde el comienzo de la formación del fruto hasta la etapa de maduración son de gran importancia para estudiar más a detalle los efectos del transportador HXT2 en las plantas transgénicas de jitomate y correlacionar con los cambios en el número de frutos, aroma, textura, tamaño, forma, entre otros.

HXT2	Transportador de Hexosas 2
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina oxiidado
NADP	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
ATP	Adenosin trifosfato
BASTA	Ingrediente activo - glufosinato de amonio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CO ₂	Dióxido de Carbono
Pi	Fosfato inorgánico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
MS	Murashige y Skoog
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
IPTG	Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosido
PMSF	Fenilmetanesulfonilfluorido
Fru-2,6-P	Fructosa -2,6-bisfosfato
Triosa-P	Triosa fosfato
Fru-1,6-P	Fructosa -1,6-bisfosfato
FBPasa	Fructosa -1,6-bisfosfatasa
PFP	Fosfofructocinasa
PFK	Fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato
Pi	Fosfato inorgánico
Fruc-6p	Fructosa-6-fosfato
PGI citosolica	Fosfoglucoisomerasa
PGM citosólica	Fosfoglucomutasa
UGPasa	UDP-Glc pirofosforilasalase
SPS	Sacarosa fosfato sintasa

F2KP	Fructosa-2, Fructosa-2,6-bisfosfatasa, Fructosa-6-fosfato 2-cinasa
AGPasa	ADP-glucosa pirofosforilasa
NADP	Nicotin adenin difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín difosfato
Ppi	Pirofosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
2-PGA	2-fosfoglicerato
3-PGA	3-fosfoglicerato
Glu-1P	Glucosa 1-fosfato
Glu-6P	Glucosa 6-fosfato
Sac-6P	Sacarosa 6-fosfato

7. Bibliografía

1. Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., and Leon, P. (2000). Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development* **14**, 2085-2096.
2. Arroyo, A., Bossi, F., Finkelstein, R.R., León, P. (2003). Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis. *Plant Physiology* **133**(1):231-42.
3. Atanassova, R., Leterrier, M., Gaillard, C., Agasse, A., Sagot, E., Coutos-Thévenot P., Delrot, S. (2003). Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiology* **131**(1):326-34.
4. Balasubramanian, R., Karve, A., Kandasamy, M., Meagher, R.B., and Moore, B.D. (2007). A role for F-Actin in hexokinase-mediated glucose signaling(1 C W OA). *Plant Physiology* **145**, 1423-1434.
5. Balibrea, M.E., Martinez-Andujar, C., Cuartero, J., Bolarin, M.C., and Perez-Alfocea, F. (2006). The high fruit soluble sugar content in wild Lycopersicon species and their hybrids with cultivars depends on sucrose import during ripening rather than on sucrose metabolism. *Functional Plant Biology* **33**, 279-288.
6. Baluska, F., Cvrckova, F., Kendrick-Jones, J., and Volkmann, D. (2001). Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength?. *Plant Physiology* **126**, 39-46.
7. Barker, L., Kuhn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J.M., and Frommer, W.B. (2000). SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* **12**, 1153-1164.
8. Baxter, C.J., Carrari, F., Bauke, A., Overy, S., Hill, S.A., Quick, P.W., Fernie, A.R., and Sweetlove, L.J. (2005). Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids. *Plant and Cell Physiology* **46**, 425-437.
9. Behnke, H.D. (1989). Structure of the phloem. In *Transport of Photoassimilates*, J. ed. DABaker, ed (Harlow,UK:Longman), pp. 79-137.
10. Blackman, L.M., Boevink, P., Cruz, S.S., Palukaitis, P., and Oparka, K.J. (1998). The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana clevelandii*. *Plant Cell* **10**, 525-537.
11. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**. 248-254.
12. Bret-Harte, M.S., and Silk, W.K. (1994). Nonvascular, symplastic diffusion of sucrose cannot satisfy the carbon demands of growth in the primary root tip of *Zea mays*. *Plant Physiology* **105**, 19-33.
13. Burkle, L., Hibberd, J.M., Quick, W.P., Kuhn, C., Hirner, B., and Frommer, W.B. (1998). The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology* **118**, 59-68.

-
14. **Bush, D.R.** (1993). Proton-Coupled Sugar and Amino-Acid Transporters in Plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **44**, 513-542.
 15. **Buttner, M.** (2007). The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. Federation of European Biochemical Societies. Letters **581**, 2318-2324.
 16. **Buttner, M., and Sauer, N.** (2000). Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1465**, 263-274.
 17. **Buttner, M., Truernit, E., Baier, K., Scholz-Starke, J., Sontheim, M., Lauterbach, C., Huss, V.A.R., and Sauer, N.** (2000). AtSTP3, a green leaf-specific, low affinity monosaccharide-H⁺ symporter of Arabidopsis thaliana. Plant Cell and Environment **23**, 175-184.
 18. **Caspar, T., Huber, S.C., and Somerville, C.** (1985). Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of Arabidopsis-Thaliana (L) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity. Plant Physiology **79**, 11-17.
 19. **Chiou, T.J., Bush, D.R.** (1996). Molecular cloning, immunochemical localization to the vacuole, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet. Plant Physiology; **110**(2):511-20.
 20. **Cho, Y.H., Yoo, S.D., and Sheen, J.** (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. Cell **127**, 579-589.
 21. **Corruzzi, G.M, Zhou, L.** (2001) Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. Current Opinion of Plant Biology. **4**, 247-253.
 22. **Clough, S.J., and Bent, A.F.,** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant Journal **16**:735-43.
 23. **Damari-Weissler, H., Ginzburg, A., Gidoni, D., Mett, A., Krassovskaya, I., Weber, A.P.M., Belausov, E., and Granot, D.** (2007). Spinach SoHXK1 is a mitochondria-associated hexokinase. Planta **226**, 1053-1058.
 24. **D'Aoust, M.A., Yelle, S., and Nguyen-Quoc, B.** (1999). Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. Plant Cell **11**, 2407-2418.
 25. **Dawson, J.H., Musselman, L.J., and Wolswinkel, P.D.** (1994). Biology and control of Cuscuta. Revision of Weed Science **6**, 265-317.
 26. **Dekkers, B.J.W., Schuurmans, J., and Smeekens, S.C.M.** (2008). Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in Arabidopsis. Plant Molecular Biology **67**, 151-167.
 27. **Ding, B.** (1997). Cell-to-cell transport of macromolecules through plasmodesmata: A novel signalling pathway in plants. Trends in Cell Biology **7**, 5-9.
 28. **Eisenbarth, D.A., and Weig, A.R.** (2005). Sucrose Carrier RcSCR1 is Involved in Sucrose Retrieval, but not in Sucrose Unloading in Growing Hypocotyls of Ricinus communis L. Plant Biology **7**, 98-103.
 29. **Eschrich, W.** (1980). Free Space Invertase, Its Possible Role in Phloem Unloading. Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft **93**, 363-378.

-
30. **Ellul, P., Garcia-Sogo, B., Pineda, B., Ríos, G., Roig, L.A., Moreno, V.** (2003) The ploidy level of transgenic plants in Agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent. Theor Appl Genet **106** (2): 231-8.
 31. **Eshed, Y., and Zamir, D.** (1995). An Introgression Line Population of *Lycopersicon Pennellii* in the Cultivated Tomato Enables the Identification and Fine Mapping of Yield-Associated Qtl. Genetics **141**, 1147-1162.
 32. **Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., and Rock, C.D.** (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. Plant Cell **14**, S15-S45.
 33. **Fisher, D.B., and Oparka, K.J.** (1996). Post-phloem transport: Principles and problems. Journal of Experimental Botany **47**, 1141-1154.
 34. **Gamalei, Y.** (1989). Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. A taxonomic review. Trees **3**, 96-110.
 35. **Gan, S.S., and Amasino, R.M.** (1995). Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. Science **270**, 1986-1988.
 36. **Garcarrubio, A., Legaria, J.P., Covarrubias, A.A.** (1997). Abscisic acid inhibits germination of mature Arabidopsis seeds by limiting the availability of energy and nutrients. Planta **203**(2):182-7.
 37. **Gazzarrini, S., and McCourt, P.** (2001). Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology **4**, 387-391.
 38. **Gear, M.L., McPhillips, M.L., Patrick, J.W., and McCurdy, D.W.** (2000). Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization. Plant Molecular Biology **44**, 687-697.
 39. **Geigenberger, P., Kolbe, A., and Tiessen, A.** (2005). Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. Journal of Experimental Botany **56**, 1469-1479.
 40. **Gerhardt, R., and Held, H.W.** (1984). Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. Plant Physiology **75**, 542-547.
 41. **Giaquinta, R.T.** (1979). Phloem Loading of Sucrose - Involvement of Membrane Atpase and Proton Transport. Plant Physiology **63**, 744-748.
 42. **Gibson, S.I.** (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. Current Opinion in Plant Biology **8**, 93-102.
 43. **Goetz, M., Godt, D.E., Guivarc'h, A., Kahmann, U., Chriqui, D., and Roitsch, T.** (2001). Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**, 6522-6527.
 44. **Gottwald, J.R., Krysan, P.J., Young, J.C., Evert, R.F., and Sussman, M.R.** (2000). Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**, 13979-13984.
 45. **Guan, H.P., and Keeling, P.H.** (1998). Starch Biosynthesis Understanding the Functions and Interactions of Multiple Isozymes of Starch Synthase and Branching Enzyme. Trends in Glycosci and Glycotechnol **10**, 307-319.

-
46. **Graham, J.W.A., Williams, T.C.R., Morgan, M., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G., and Sweetlove, L.J.** (2007). Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. Plant Cell **19**, 3723-3738.
 47. **Granot, D.** (2007). Role of tomato hexose kinases. Functional Plant Biology **34**, 564-570.
 48. **Hackel, A., Schauer, N., Carrari, F., Fernie, AR., Grimm, B., Kühn, C.** (2006) Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. Plant Journal. **45**(2):180-92.
 49. **Halford, N.G, Hey, S.J.** (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. Biochemical Journal. **419**, 247-259.
 50. **Halford, N.G, Paul, M.J.** (2003). Carbon metabolite sensing and signalling. Plant Biotechnology Journal. **1**, 381-398.
 51. **Herbers, K., Sonnewald, U.** (1998) Molecular determinants of sink strength. Current Opinion of Plant Biology. **1**(3):207-16.
 52. **Hewitt, J.D., and Stevens, M.A.** (1981). Growth Analysis of 2 Tomato Genotypes Differing in Total Fruit Solids Content. Journal of the American Society for Horticultural Science **106**, 723-727.
 53. **Hewitt, J.D., Dinar, M., and Stevens, M.A.** (1982). Sink Strength of Fruits of 2 Tomato Genotypes Differing in Total Fruit Solids Content. Journal of the American Society for Horticultural Science **107**, 896-900.
 54. **Ho, L.C.** (1996). The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. Journal of Experimental Botany **47**, 1239-1243.
 55. **Holdaway-Clarke, T.L., Walker, N.A., Hepler, P.K., and Overall, R.L.** (2000). Physiological elevations in cytoplasmic free calcium by cold or ion injection result in transient closure of higher plant plasmodesmata. Planta **210**, 329-335.
 56. **Huber, S.C.** (1989). Biochemical-Mechanism for Regulation of Sucrose Accumulation in Leaves During Photosynthesis. Plant Physiology **91**, 656-662.
 57. **Husain, S.** (2001). Invertase protein, but not activity, is present throughout development of *Lycopersicon esculentum* and *L. pimpinellifolium*. New Phytologist **150**, 71-83.
 58. **Imlau, A., Truernit, E., and 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**, 309-322.
 59. **Itaya, A., Liang, G.Q., Woo, Y.M., Nelson, R.S., and Ding, B.** (2000). Nonspecific intercellular protein trafficking probed by green-fluorescent protein in plants. Protoplasma **213**, 165-175.
 60. **Jang, J.C., and Sheen, J.** (1997). Sugar sensing in higher plants. Trends in Plant Science **2**, 208-214.
 61. **Kanayama, Y., Granot, D., Dai, N., Petreikov, M., Schaffer, A., Powell, A., and Bennett, A.B.** (1998). Tomato fructokinases exhibit differential expression and substrate regulation. Plant Physiology **117**, 85-90.
 62. **Knight, J.S., and Gray, J.C.** (1994). Expression of Genes Encoding the Tobacco Chloroplast Phosphate Translocator Is Not Light-Regulated and Is Repressed by Sucrose. Molecular & General Genetics **242**, 586-594.

-
63. **Knoblauch, M., and van Bel, A.J.E.** (1998). Sieve tubes in action. Plant Cell **10**, 35-45.
64. **Koch, K.** (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Current Opinion in Plant Biology **7**, 235-246.
65. **Kortstee, A.J., Appeldoorn, N.J.G., Oortwijn, M.E.P., and Visser, R.G.F.** (2007). Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. Planta **226**, 929-939.
66. **Kruckeberg AL, Bisson LF.** (1990). The HXT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. Mol Cell Biol. **10**(11):5903-13.
67. **Kühn, C., Franceschi, V.R., Schulz, A., Lemoine, R., and Frommer, W.B.** (1997). Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. Science **275**, 1298-1300.
68. **Kühn, C., Quick, W.P., Schulz, A., Riesmeier, J.W., Sonnewald, U., and Frommer, W.B.** (1996). Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. Plant Cell and Environment **19**, 1115-1123.
69. **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**(259): 680-5.
70. **Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D.G., and Gibson, S.I.** (2000). The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. Plant Journal **23**, 587-596.
71. **Lalonde, S., Wipf, D., and Frommer, W.B.** (2004). Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. Annual Review of Plant Biology **55**, 341-372.
72. **Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, 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.
73. **Lara, M.E.B., Garcia, M.C.G., Fatima, T., Ehness, R., Lee, T.K., Proels, R., Tanner, W., and Roitsch, T.** (2004). Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. Plant Cell **16**, 1276-1287.
74. **Leggewie, G., Kolbe, A., Lemoine, R., Roessner, U., Lytovchenko, A., Zuther, E., Kehr, J., Frommer, W.B., Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., and Fernie, A.R.** (2003). Overexpression of the sucrose transporter *SoSUT1* in potato results in alterations in leaf carbon partitioning and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology. Planta **217**, 158-167.
75. **Lemoine, R., Kuhn, C., Thiele, N., Delrot, S., and Frommer, W.B.** (1996). Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: Effects on amount and activity. Plant Cell and Environment **19**, 1124-1131.
76. **Leon, P., and Sheen, J.** (2003). Sugar and hormone connections. Trends in Plant Science **8**, 110-116.
77. **Leterrier, M., Atanassova, R., Laquitaine, L., Gaillard, C., Coutos-Thevenot, P., and Delrot, S.** (2003). Expression of a putative grapevine hexose transporter in tobacco alters morphogenesis and assimilate partitioning. Journal of Experimental Botany **54**, 1193-1204.

-
78. **Li, Y., Lee, K.K., Walsh, S., Smith, C., Hadingham, S., Sorefan, K., Cawley, G., and Bevan, M.W.** (2006). Establishing glucose and ABA regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance vector Machine. Genome Research **16**, 414-427.
79. **Long, J.C., Zhao, W., Rashotte, A.M., Muday, J.K., and Huber, S.C.** (2002). Gravity-stimulated changes in auxin and invertase gene expression in maize pulvinal cells. Plant Physiology **128**, 591-602.
80. **Lu, Y.Q., and Rausher, M.D.** (2003). Evolutionary rate variation in anthocyanin pathway genes. Molecular Biology Evolution. **20**, 1844-1853.
81. **Lucas, W.J.** (1995). Plasmodesmata - Intercellular Channels for Macromolecular Transport in Plants. Current Opinion in Cell Biology **7**, 673-680.
82. **Liang, H., Gaber, R.F.** (1996). A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. Molecular Biology of the Cell. **7**(12):1953-66.
83. **Martin, T., Hellmann, H., Schmidt, R., Willmitzer, L., Frommer, W.B.** (1997) Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. Plant Journal. **11**(1):53-62.
84. **Menu, T., Saglio, P., Granot, D., Dai, N., Raymond, P., and Ricard, B.** (2004). High hexokinase activity in tomato fruit perturbs carbon and energy metabolism and reduces fruit and seed size. Plant Cell and Environment **27**, 89-98.
85. **Meyer, S., Lauterbach, C., Niedermeier, M., Barth, I., Sjolund, R.D., and Sauer, N.** (2004). Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. Plant Physiology **134**, 684-693.
86. **Michalska, J., Zauber, H., Buchanan, B.B., Cejudo, F.J., and Geigenberger, P.** (2009). NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. Proceedings of the National Academy of Sciences, **-106**, 9908-9913.
87. **Mishra, S.,B, Singh, M., Aggrawal, P., Laxmi, A.** (2009). Glucose and Auxin Signaling Interaction in Controlling Arabidopsis thaliana Seedlings Root Growth and Development. Plos One.**4**: 1-13.
88. **Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T., and Sheen, J.** (2003). Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. Science **300**, 332-336.
89. **Münch, E.** (1930). Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Gustav Fischer, Jena, Germany.
90. **Murashige, T.; Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia. Plantarum. **15**: 473-497.
91. **Nelson, R.S.** (1998). The mystery of virus trafficking into, through and out of the vascular tissue. Prog. Bot. **59**, 476-533.
92. **Nemeth, K., Salchert, K., Putnoky, P., Bhalerao, R., Koncz-Kalman, Z., Stankovic-Stangeland, B., Bako, L., Mathur, J., Okresz, L., Stabel, S., Geigenberger, P., Stitt, M., Redei, G.P., Schell, J., and Koncz, C.** (1998). Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in Arabidopsis. Genes & Development **12**, 3059-3073.

-
93. **Neuhaus, H.E., Kruckeberg, A.L., Feil, R., and Stitt, M.** (1989). Reduced-Activity Mutants of Phosphoglucose Isomerase in the Cytosol and Chloroplast of *Clarkia-Xantiana* .2. Study of the Mechanisms Which Regulate Photosynthate Partitioning. Planta **178**, 110-122.
 94. **Nguyen-Quoc, B., and Foyer, C.H.** (2001). A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. Journal of Experimental Botany **52**, 881-889.
 95. **Nielsen, T.H., Henrik, R.J., and Villadsen, D.** (2004). Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. Trends in Plant Science **9**, 556-563.
 96. **Obiadalla-Ali, H., Fernie, A.R., Lytovchenko, A., Kossmann, J., and Lloyd, J.R.** (2004). Inhibition of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphatase in tomato fruits leads to decreased fruit size, but only small changes in carbohydrate metabolism. Planta **219**, 533-540.
 97. **Oparka, K.J., and Cruz, S.S.** (2000). The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **51**, 323-347.
 98. **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 Journal **6**, 759-766.
 99. **Orlich, G., Hofbruck, M., and Schulz, A.** (1998). A symplastic flow of sucrose contributes to phloem loading in *Ricinus* cotyledons. Planta **206**, 108-116.
 100. **Özcan, S., Dover, J., Johnston, M.** (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. **17**(9):2566-73.
 101. **Özcan S.** (2002) Two different signals regulate repression and induction of gene expression by glucose. J Biol Chem.**277**(49):46993-7.
 102. **Paterson, A.H., Damon, S., Hewitt, J.D., Zamir, D., Rabinowitch, H.D., Lincoln, S.E., Lander, E.S., and Tanksley, S.D.** (1991). Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits in Tomato - Comparison across Species, Generations, and Environments. Genetics **127**, 181-197.
 103. **Patrick, J.W.** (1997). Phloem unloading: sieve element unloading and post-phloem transport. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**, 191-222.
 104. **Paterson, A. H., S. Damon, et al.** (1991). Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits in Tomato - Comparison across Species, Generations, and Environments. Genetics **127**(1): 181-197.
 105. **Patrick, J.W., and Offler, C.E.** (1996). Post-sieve element transport of photoassimilates in sink regions. Journal of Experimental Botany **47**, 1165-1177.
 106. **Pego, J.V., Kortstee, A.J., Huijser, G., and Smeekens, S.G.M.** (2000). Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. Journal of Experimental Botany **51**, 407-416.
 107. **Petreikov, M., Shen, S., Yeselson, Y., Levin, I., Bar, M., and Schaffer, A.A.** (2006). Temporally extended gene expression of the ADP-Glc pyrophosphorylase large subunit (AgpL1) leads to increased enzyme activity in developing tomato fruit. Planta **224**, 1465-1479.

-
108. **Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A.**(2006). Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. Planta. **224**(3):556-68.
 109. **Preiss, J.** (1988). Biosynthesis of starch and its regulation. In The Biochemistry of Plants. (San Diego, CA: Academic Press).
 110. **Price, J., Laxmi, A., St Martin, S.K., and Jang, J.C.** (2004). Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. Plant Cell **16**, 2128-2150.
 111. **Price, J., Li, T.C., Kang, S.G., Na, J.K., Jang, J.C.** (2003) Mechanisms of glucose signaling during germination of Arabidopsis. Plant Physiology. **132**(3):1424-38.
 112. **Proels, R.K., and Roitsch, T.** (2009). Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. Journal of Experimental Botany **60**, 1555-1567.
 113. **Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J.M., van Dijck, P., Leyman, B.** (2007). ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on Arabidopsis growth and starch breakdown. Plant Molecular Biology **63**.195-206.
 114. **Ransom-Hodgkins, W.D., Vaughn, M.W., Bush, D.R.** (2003) Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton-sucrose symporter. Planta; **217**(3):483-9.
 115. **Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M.**(1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. European Journal of Biochemistry. **245** (2):324-33.
 116. **Riesmeier, J.W., Hirner, B., and Frommer, W.B.** (1993). Potato Sucrose Transporter Expression in Minor Veins Indicates a Role in Phloem Loading. Plant Cell **5**, 1591-1598.
 117. **Riesmeier, J.W., Leggewie, G., Hirner, B., Willmitzer, L., and Frommer, W.B.** (1994). Role and Function of Sucrose Transporters from Higher-Plants. Journal of Cellular Biochemistry, 120-120.
 118. **Robinson, N.L., Hewitt, J.D., and Bennett, A.B.** (1988). Sink Metabolism in Tomato Fruit .1. Developmental-Changes in Carbohydrate Metabolizing Enzymes. Plant Physiology **87**, 727-730.
 119. **Rochat, C., Wuilleme, S., Boutin, J.P., and Hedley, C.L.** (1995). A Mutation at the Rb Gene, Lowering Adpgppase Activity, Affects Storage Product Metabolism of Pea Seed Coats. Journal of Experimental Botany **46**, 415-421.
 120. **Roitsch, T.** (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. Current Opinion in Plant Biology **2**, 198-206.
 121. **Roitsch, T., and Tanner, W.** (1994). Expression of a Sugar-Transporter Gene Family in a Photoautotrophic Suspension-Culture of *Chenopodium-Rubrum* L. Planta **193**, 365-371.
 122. **Roitsch, T., and Gonzalez, M.C.** (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. Trends in Plant Science **9**, 606-613.
 123. **Roitsch, T., Ehness, R., Goetz, M., Hause, B., Hofmann, M., and Sinha, A.K.** (2000). Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signalling. Australian Journal of Plant Physiology **27**, 815-825.

-
124. **Rolland, F., Moore, B., and Sheen, J.** (2002). Sugar sensing and signaling in plants. Plant Cell **14**, S185-S205.
 125. **Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. Annual Review of Plant Biology **57**, 675-709.
 126. **Rook, F., and Bevan, M.W.** (2003). Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. Journal of Experimental Botany **54**, 495-501.
 127. **Rook, F., Hadingham, S.A., Li, Y., and Bevan, M.W.** (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. Plant Cell and Environment **29**, 426-434.
 128. **Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C., and Bevan, M.W.** (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. Plant Journal **26**, 421-433.
 129. **Rosche, E., Blackmore, D., Tegeder, M., Richardson, T., Schroeder, H., Higgins, T.J.V., Frommer, W.B., Offler, C.E., and Patrick, J.W.** (2002). Seed-specific overexpression of a potato sucrose transporter increases sucrose uptake and growth rates of developing pea cotyledons. Plant Journal **30**, 165-175.
 130. **Ruan, Y.L., and Patrick, J.W.** (1995). The Cellular Pathway of Postphloem Sugar-Transport in Developing Tomato Fruit. Planta **196**, 434-444.
 131. **Rung, J.H., Draborg, H.H., Jorgensen, K., and Nielsen, T.H.** (2004). Carbon partitioning in leaves and tubers of transgenic potato plants with reduced activity of fructose-2,6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Physiologia Plantarum **121**, 204-214.
 132. **Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.
 133. **Sauer, N.** (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. Federation of European Biochemical Societies. Letters **581**, 2309-2317.
 134. **Sauer, N., Baier, K., Gahrtz, M., Stadler, R., Stolz, J., and Truernit, E.** (1994). Sugar-Transport across the Plasma-Membranes of Higher-Plants. Plant Molecular Biology **26**, 1671-1679.
 135. **Sauer, N., Ludwig, A., Knoblauch, A., Rothe, P., Gahrtz, M., and Klebl, F.** (2004). AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different Arabidopsis ecotypes. Plant Journal **40**, 120-130.
 136. **Scott, P. and N. J. Kruger** (1995). Influence of elevated fructose-2,6-bisphosphate levels on starch mobilization in transgenic tobacco leaves in the dark. Plant Physiology **108**: 1569-1577.
 137. **Schneider, A., Hausler, R.E., Kolukisaoglu, U., Kunze, R., van der Graaff, E., Schwacke, R., Catoni, E., Desimone, M., and Flugge, U.I.** (2002). An Arabidopsis thaliana knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished. Plant Journal **32**, 685-699.

-
138. **Schneiderei, A., Scholz-Starke, J., Sauer, N., and Buttner, M.** (2005). AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in Arabidopsis. Planta **221**, 48-55.
 139. **Scholz-Starke, J., Buttner, M., and Sauer, N.** (2003). AtSTP6, a new pollen-specific H⁺-monosaccharide symporter from Arabidopsis. Plant Physiology **131**, 70-77.
 140. **Schulz, A.** (1994). Phloem Transport and Differential Unloading in Pea-Seedlings after Source and Sink Manipulations. Planta **192**, 239-248.
 141. **Schulz, A.** (1995). Plasmodesmatal widening accompanies the short-term increase in symplastic phloem unloading in pea root tips under osmotic stress. Protoplasma **188**, 22-37.
 142. **Shakia, R., Sturm, A.** (1998). Characterization of Source- and Sink-Specific sucrose/H⁺ Symporters from Carrot. Plant Physiology **118** (1): 1473-1480.
 143. **Scott, P., and Kruger, N.J.** (1995). Influence of elevated fructose-2,6-bisphosphate levels on starch mobilization in transgenic tobacco leaves in the dark. Plant Physiology **108**, 1569-1577.
 144. **Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J.C.** (1999). Sugars as signaling molecules. Current Opinion in Plant Biology **2**, 410-418.
 145. **Sherson, S.M., Hemmann, G., Wallace, G., Forbes, S., Germain, V., Stadler, R., Bechtold, N., Sauer, N., and Smith, S.M.** (2000). Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of Arabidopsis seeds and seedlings to sugars. Plant Journal **24**, 849-857.
 146. **Smeekeens, S.** (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **51**, 49-81.
 147. **Smeekeens, S., Rook, F.** (1997). Sugar Sensing and Sugar-Mediated Signal Transduction in Plants. Plant Physiology. **115**(1):7-13.
 148. **Sonnewald, U., Lerchl, J., Zrenner, R., and Frommer, W.** (1994). Manipulation of Sink-Source Relations in Transgenic Plants. Plant Cell and Environment **17**, 649-658.
 149. **Stadler, R., Truernit, E., Gahrtz, M., and Sauer, N.** (1999). The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in Arabidopsis. Plant Journal **19**, 269-278.
 150. **Stadler, R., Brandner, J., Schulz, A., Gahrtz, M., and Sauer, N.** (1995). Phloem Loading by the Pmsuc2 Sucrose Carrier from Plantago-Major Occurs into Companion Cells. Plant Cell **7**, 1545-1554.
 151. **Stadler, R., Buttner, M., Ache, P., Hedrich, R., Ivashikina, N., Melzer, M., Shearson, S.M., Smith, S.M., and Sauer, N.** (2003). Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of Arabidopsis. Plant Physiology **133**, 528-537.
 152. **Sterrett, S.B., Hohlt, H.E., and Savage, C.P.** (2005). Alternative management strategies for tomato affect cultural and economic sustainability. Hortscience **40**, 602-606.
 153. **Stitt, M., and Quick, P.** (1989). Photosynthetic Carbon Partitioning - Its Regulation and Possibilities for Manipulation. Physiologia Plantarum **77**, 633-641.

-
154. **Stitt, M., Grosse, H., and Woo, K.C.** (1988). Interactions between Sucrose Synthesis and Co₂ Fixation .2. Alterations of Fructose 2,6-Bisphosphate During Photosynthetic Oscillations. Journal of Plant Physiology **133**, 138-143.
155. **Tang, G.Q., Luscher, M., and 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.
156. **Thompson, G.A., and Schulz, A.** (1999). Macro-molecular trafficking in the phloem. Trends in Plant Science **4**, 354-361.
157. **Tiessen, A., Hendriks, J.H.M., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farre, E.M., and Geigenberger, P.** (2002). Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. Plant Cell **14**, 2191-2213.
158. **To, J.P.C., Reiter, W.D., and Gibson, S.I.** (2002). Mobilization of seed storage lipid by arabidopsis seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. BMC Plant Biology **2**, 4.
159. **To, J.P.C., Reiter, W.D., and Gibson, S.I.** (2003). Chloroplast biogenesis by Arabidopsis seedlings is impaired in the presence of exogenous glucose. Physiologia Plantarum **118**, 456-463.
160. **Towle, H.C.** (2005). Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. Trends Endocrinol. Metab. **16**, 489-494.
161. **Truernit, E., and Sauer, N.** (1995). The Promoter of the Arabidopsis-Thaliana Suc2 Sucrose-H⁺ Symporter Gene Directs Expression of Beta-Glucuronidase to the Phloem - Evidence for Phloem Loading and Unloading by Suc2. Planta **196**, 564-570.
162. **Truernit, E., Schmid, J., Eppele, 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, elicitors, and pathogen challenge. Plant Cell **8**, 2169-2182.
163. **Turgeon, R.** (1989). The Sink-Source Transition in Leaves. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **40**, 119-138.
164. **Tymowska-Lalanne, Z., and Kreis, M.** (1998). Expression of the Arabidopsis thaliana invertase gene family. Planta **207**, 259-265.
165. **Ullah, H., J. G. Chen, et al.** (2002). Role of a heterotrimeric G protein in regulation of Arabidopsis seed germination. Plant Physiology **129**(2): 897-907.
166. **van Bel, A.J.E.** (1996). The pore/plasmodesm unit: key elements in the interplay between sieve element and companion cell. Prog. Bot. **58**, 278-291.
167. **van Bel, A.J.E., Ehlers, K., and Knoblauch, M.** (2002). Sieve elements caught in the act. Trends in Plant Science **7**, 126-132.
168. **van Bel, A.J.E., Gaupels, F., Will, T., and Kogel, K.H.** (2004). Phloem-mediated remote control by long-distance signals. Progress in Botany, Vol 65 **65**, 372-393.
169. **Van Haaren, M.J., Houck, C.M.** (1993). A functional map of the fruit-specific promoter of the tomato 2A11 gene. Plant Molecular Biology. 21(4):625-40.

-
170. **Vaughn, M.W., Harrington, G.N., and Bush, D.R.** (2002). Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**, 10876-10880.
 171. **Viola, R., Roberts, A.G., Haupt, S., Gazzani, S., Hancock, R.D., Marmioli, N., Machray, G.C., and Oparka, K.J.** (2001). Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. Plant Cell **13**, 385-398.
 172. **Walsh, M.C., Scholte, M., Valkier, J., Smits, H.P., van Dam, K.** (1996). Glucose sensing and signalling properties in *Saccharomyces cerevisiae* require the presence of at least two members of the glucose transporter family. Journal Bacteriology. **178**(9):2593-7.
 173. **Wang, N., and Fisher, D.B.** (1995). Sucrose Release into the Endosperm Cavity of Wheat Grains Apparently Occurs by Facilitated Diffusion across the Nucellar Cell-Membranes. Plant Physiology **109**, 579-585.
 174. **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. Journal of Plant Physiology **143**, 178-183.
 175. **Weise, A., Barker, L., Kuhn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, W.B., and Ward, J.M.** (2000). A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. Plant Cell **12**, 1345-1355.
 176. **Wendell, D.L., Bisson, L.F.** (1993). Physiological characterization of putative high-affinity glucose transport protein Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae* by use of anti-synthetic peptide antibodies. Journal of Bacteriology. **175** (23):7689-96.
 177. **Wendell, D.L., Bisson, L.F.**(1994). Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. Journal of Bacteriology.; **176**(12):3730-7.
 178. **Williams, J.H.H., Minchin, P.E.H., and Farrar, J.F.** (1991). Carbon partitioning in split root systems of barley: the effect of osmotica. Journal Experimental Botany **42**, 453-461.
 179. **Williams, L.E., and Amanda, G.** (2004). Changes in the expression pattern of the plasma membrane H⁺-ATPase in developing *Ricinus communis* cotyledons undergoing the sink /source transition. Planta **218**, 562-568.
 180. **Williams, L.E., Lemoine, R., and Sauer, N.** (2000). Sugar transporters in higher plants - A diversity of roles and complex regulation. Trends in Plant Science **5**, 283-290.
 181. **Wolswinkel, P., and Ammerlaan, A.** (1983). Phloem unloading in developing seeds of *Vicia faba* L. Planta **158**, 208-215.
 182. **Worrell, A.C., Bruneau, J.M., Summerfelt, K., Boersig, M., and Voelker, T.A.** (1991). Expression of a Maize Sucrose Phosphate Synthase in Tomato Alters Leaf Carbohydrate Partitioning. Plant Cell **3**, 1121-1130.
 183. **Wu, G.L., Zhang, X.Y., Zhang, L.Y., Pan, Q.H., Shen, Y.Y., and Zhang, D.P.** (2004). Phloem unloading in developing walnut fruit is symplasmic in the seed pericarp, and apoplasmic in the fleshy pericarp. Plant and Cell Physiology **45**, 1461-1470.

-
184. **Xiao, W.Y., Sheen, J., and Jang, J.C.** (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. Plant Molecular Biology **44**, 451-461.
 185. **Yelle, S., Hewitt, J.D., Robinson, N.L., Damon, S., and Bennett, A.B.** (1988). Sink Metabolism in Tomato Fruit .3. Analysis of Carbohydrate Assimilation in a Wild-Species. Plant Physiology **87**, 737-740.
 186. **Yelle, S., Chetelat, R.T., Dorais, M., Deverna, J.W., and Bennett, A.B.** (1991). Sink Metabolism in Tomato Fruit .4. Genetic and Biochemical-Analysis of Sucrose Accumulation. Plant Physiology **95**, 1026-1035.
 187. **Zhang, X.Y., Wang, X.L., Wang, X.F., Xia, G.H., Pan, Q.H., Fan, R.C., Wu, F.Q., Yu, X.C., and Zhang, D.P.** (2006). A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. Plant Physiology **142**, 220-232.
 188. **Zhang, L.Y., Peng, Y.B., Pelleschi-Travier, S., Fan, Y., Lu, Y.F., Lu, Y.M., Gao, X.P., Shen, Y.Y., Delrot, S., Zhang, D.P.** (2004). Evidence for Apoplasmic Phloem Unloading in Developing Apple Fruit. Plant Physiology **135**, 574-586.
 189. **Zhou, L., Jang, J.C., Jones, T.L., and Sheen, J.** (1998). Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**, 10294-10299.
 190. **Zhou, Y., Chan, K., Wang, T.L., Hedley, C.L., Offler, C.E., and Patrick, J.W.** (2009). Intracellular sucrose communicates metabolic demand to sucrose transporters in developing pea cotyledons. Journal Experimental Botany **60**, 71-85.
 191. **Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L., and Sonnewald, U.** (1995). Evidence of the Crucial Role of Sucrose Synthase for Sink Strength Using Transgenic Potato Plants (*Solanum-Tuberosum* L). Plant Journal **7**, 97-107.

Heterologous expression of yeast *Hxt2* in *Arabidopsis thaliana* alters sugar uptake, carbon metabolism and gene expression leading to glucose tolerance of germinating seedlings

Daniel Padilla-Chacón · Elizabeth Cordoba ·
Teresa Olivera · Sobeida Sánchez · Patricia Coello ·
Patricia León · Axel Tiessen · Eleazar Martínez-Barajas

Received: 17 August 2009 / Accepted: 13 January 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract The hexose transporter 2 gene (*Hxt2*) from *Saccharomyces cerevisiae* was expressed in *Arabidopsis thaliana* under control of the 35S promoter. Several independent transgenic lines were selected after confirming single gene insertion by southern blot analysis in the T4 generation. Northern blots revealed the presence of heterologous transcript. Radiolabeling experiments revealed an increased rate of incorporation of the non-metabolizable analog 3-O-methyl-[U-14C]-glucose. This confirmed that the yeast *Hxt2* transporter was functional in *Arabidopsis*. No phenotypic changes at the vegetative and reproductive stages could be detected in the transgenic lines when compared to wild type plants. Shortly after germination some differences in development and glucose signaling were observed. Transgenic seedlings cultivated in liquid medium or on solid agar plates were able to grow with 3% glucose (producing bigger plants and longer roots), while development of wild type plants was delayed under those conditions. Metabolite analysis revealed that the *Hxt2* transgenic lines had higher

rates of sugar utilization. Transcriptional profiling showed that particular genes were significantly up- or down-regulated. Some transcription factors like At1g27000 were repressed, while others, such as At3g58780, were induced. The mRNA from classical sugar signaling genes such as *STP1*, *Hxk1*, and *ApL3* behaved similarly in transgenic lines and wild type lines. Results suggest that the *Hxt2* transgene altered some developmental processes related to the perception of high carbon availability after the germination stage. We conclude that the developmental arrest of wild type plants at 3% glucose not only depends on *Hxk1* as the only sugar sensor but might also be influenced by the route of hexose transport across the plasma membrane.

Keywords *Hxt2* · Sugar uptake · Glucose tolerance

Abbreviation

Hxt2 Hexose transporter 2

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11103-010-9602-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Padilla-Chacón · T. Olivera · S. Sánchez · P. Coello ·
E. Martínez-Barajas (✉)
Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad
Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México
e-mail: emtz@servidor.unam.mx

E. Cordoba · P. León
Departamento de Biología Molecular de Plantas, Universidad
Nacional Autónoma de México Av, Universidad 2001, Col.
Chamilpa, 62250 Cuernavaca, Morelos, México

A. Tiessen
Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV, Irapuato,
México

Introduction

Plants need to respond to environmental conditions, particularly those related to the availability of mineral and organic nutrients. Some environmental inputs such as light, temperature and carbon dioxide can be sensed directly in green tissues. The integrated sum of environmental conditions influencing the rate of photosynthesis in source organs can also be sensed indirectly in sink organs through the amount—and type—of sugars arriving via the phloem. Biosynthetic metabolism in source tissues is linked to heterotrophic metabolism in sink tissues through the export–import and hydrolysis of sucrose. The passage of sugars involves both transport across membranes (active

and passive), as well as symplastic transport via mass flow. The route of transport—the type and localization of membrane transport steps—is of particular importance for cellular differentiation and plant development (Lalonde et al. 2004; Rolland et al. 2006). Phloem unloading may occur through plasmodesmatal connections between the phloem and sink cells, as in potato tubers, or via efflux into the apoplast, as in maize seeds. Sucrose can be incorporated by transporters localized in the plasmalemma (Patrick and Offler 1996) or hydrolyzed apoplastically to glucose and fructose by cell wall invertases (Roitsch 1999). Fourteen monosaccharide transporters have been identified in the *Arabidopsis* genome (Buttner and Sauer 2000; Sherson et al. 2003). Most of these are highly expressed in sink organs (Williams et al. 2000; Buttner 2007). Because coordinated expression of cell wall invertase and hexose transporters has been observed (Ehness et al. 1997; Fotopoulos et al. 2003), a major role of hexose transporters in facilitating the acquisition of sugars unloaded into the apoplast has been suggested (Schneidereit et al. 2005).

In addition to their major role in metabolism, sugars can also act as signaling molecules modulating transcriptional and post-transcriptional responses to source-sink interactions (Tiessen et al. 2002, 2003; Leon and Sheen 2003; Price et al. 2004; Baena-Gonzalez et al. 2007). The effects of sugar on gene expression and enzyme activities have profound effects on plant metabolism and development (Price et al. 2004; Rolland et al. 2006). It has been suggested that regulation mediated by sugars can occur through distinct signaling pathways in several plant species. Some responses are specific for the type of sugar and are seen at both the transcriptional level (Loreti et al. 2000; Price et al. 2004) and the posttranscriptional level (Tiessen et al. 2002; Geigenberger et al. 2005). Some pathways involve SNF1 related kinases (SnRK1) (Baena-Gonzalez et al. 2007; Halford and Hey 2009), while others require hexokinase-1 (Hxk1) (Jang et al. 1997; Xiao et al. 2000) or both kinases (Tiessen et al. 2003). Some disaccharide-specific responses have been linked to Trehalose-6P metabolism (Kolbe et al. 2005; Lunn et al. 2006) and to the redox status of thioredoxins and other enzymes inside the plastid (Tiessen et al. 2002; Geigenberger et al. 2005; Kolbe et al. 2006; Michalska et al. 2009). These transduction mechanisms are interlinked with other developmental processes (Rolland et al. 2006; Smith and Stitt 2007). Several mutations leading to sugar insensitivity affect genes involved in hormone biosynthesis or signaling, particularly involving abscisic acid (Finkelstein and Gibson 2002; Leon and Sheen 2003).

In *Arabidopsis*, at least three different sensing pathways for glucose have been proposed: one where apoplastic hexoses might trigger effects and where membrane transport might be involved (Lalonde et al. 1999, 2004; Rolland et al. 2001), another where glucose phosphorylation inside the

cytosol is required and Hxk1 acts as a sensor (Jang et al. 1997; Xiao et al. 2000; Baud and Graham 2006) and another in which hexose-phosphates must be further metabolized to produce compounds such as 3PGA, ATP or NADPH, which regulate several enzymes allosterically (Preiss 1984; Geigenberger et al. 2005; Michalska et al. 2009).

In multicellular organisms like plants, it is difficult to establish whether extracellular or intracellular sugars are responsible for any given response. In bacteria and in yeast, the role of membrane proteins in sugar signaling has been clearly established (Rolland et al. 2006). In *Saccharomyces cerevisiae* the glucose transporters RGT2 and SNF3 act as low- and high-affinity glucose sensors, respectively (Ozcan et al. 1996; Ozcan and Johnston 1999). Both have a large cytosolic C-terminal domain that is implicated in signal transduction. The *Arabidopsis* monosaccharide transporters *AtSUGTRPR* (=TMT1 = *At1g20840*) and *F23E12.140* (=TMT2 = *At4g35300*) (Lalonde et al. 1999) and the sucrose transporter SUT2 from tomato plants and *Arabidopsis* (*At2g02860*) (Barker et al. 2000) encode proteins with large cytosolic loops. It is not yet known if these play a role similar to that of the membrane sensor proteins in yeast.

Most of the responses to glucose in plants are associated with the perception of internal sugar levels through the involvement of kinases (e.g., Hxk1 or SnRK1). A role of membrane proteins for sugar signaling has been suggested (Lalonde et al. 1999, 2004) but convincing experimental evidence is still lacking.

To investigate the role of hexose transport in regulating responses to high glucose concentrations, we expressed a well characterized transporter (*Hxt2*) from *Saccharomyces cerevisiae* (Reifenberger et al. 1997) in *Arabidopsis thaliana* under the control of the constitutive 35S promoter. We show that the transgenic lines respond differently in growth mediums supplemented with high glucose. Analysis of metabolite levels and key enzymatic activities show that transgenic lines do more readily utilize hexose for growth. Transcriptional profiling revealed that particular genes are significantly up- or down-regulated and that the group of genes that are differentially expressed in *Hxt2* transgenic lines does not overlap with the classical set of sugar signaling genes that have been reported to be linked to Hxk1 as a sensor. We conclude that *Hxt2* transgenic plants provide a valuable tool for the study of sugar signaling effects dependent upon membrane proteins.

Materials and methods

Construction of transgenic plants

Standard procedures were used for nucleic acid work (Sambrook et al. 1989) and the generation of transgenic

plants (Clough and Bent 1998). A full length clone of *Hxt2* (Genebank accession P23585) was amplified from yeast genomic DNA by PCR using *Hxt2*-forward (5'-TTGCG GCCGCATGTCTGAATTCGCTACTAGCCGCG-3') and *Hxt2*-reverse (5'-CGCGGATCCTTATTCTCGGAAACT CTTTTTCTT-3') primers. The expected 1.6 kbp PCR product was cloned in pGEMT-easy (Invitrogen). The insert was subcloned into the binary vector pBin-19 3X35S (Bevan 1984). Error free cloning was confirmed by two strand sequencing. *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia was transformed with *Agrobacterium* (strain LBA 4404) using the floral dip method (Clough and Bent 1998). Seeds from transformed plants were selected on plates containing Gamborg B5 medium (Gamborg et al. 1968) supplemented with 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin. Plants were transplanted into soil, self-pollinated and harvested individually up to generation T4. Selection on kanamycin plates was repeated up to generation T5, where all seedlings were resistant and homozygous.

Plant material and growth conditions

Seeds were always first surface sterilized and then grown in Gamborg B5 agar medium supplemented with different concentrations of glucose as the main carbon source. *Arabidopsis* plants were grown under controlled conditions (25°C, 16-h light/8-h dark photoperiod, $\sim 300 \mu\text{E}$). For gene expression experiments, seedlings were cultivated in flasks with liquid media (1% sucrose) for 12 days on a rotary shaker (125 rpm) and then transferred to a media without sugars for 48 h in the dark (carbon starvation) before being induced with 3% glucose for 6 h.

DNA-gel and RNA-gel blot analysis

Genomic DNA was extracted from vegetative tissue using standard protocols (Dellaporta et al. 1983; Sambrook et al. 1989). A 15 μg aliquot of DNA was digested with EcoRI and blots were probed with ^{32}P -radiolabeled *Hxt2*. High-stringency hybridization (250 mM Na_2HPO_4 , 2.5 mM EDTA, 3.5% SDS) was carried out at 62°C overnight, and washing was conducted with $0.2\times$ SSC/0.2% SDS. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) following manufacturer's instructions. RNA samples (20 μg) were separated by formaldehyde-agarose gel electrophoresis and hybridized under stringent conditions, as described above.

In vitro sugar uptake

Sugar uptake by seedlings was measured according to (Damon et al. 1988). Seedlings were washed twice with buffer containing 5 mM Mes (pH 6.5), 5 mM KCl, 0.5 mM NaCl, 0.1 mM MgCl_2 , and 0.1 mM CaCl_2 .

Excess buffer was removed and the plant material was placed in sealed vials containing 1.5 ml of the same buffer with 25 mM glucose and 3-O-methyl-[U- ^{14}C] glucose (0.1 $\mu\text{Ci } \mu\text{mol}^{-1}$, Amersham) and incubated for 1 h at 25°C and 125 rpm. After that, the material was rinsed three times with 10 ml buffer, dried with absorbent paper and weighed. The tissue was extracted twice with ethanol, and the incorporated radioactivity was measured by liquid scintillation counting (Beckman-Coulter model LS 6500).

Analysis of metabolites and enzymes

Plant material was frozen in liquid nitrogen and extracted once with 80% (v/v) ethanol and twice with 50% (v/v) ethanol. The supernatants were mixed and used for determination of soluble sugars, while starch was measured in the pellet after digestion with α -amylase and amyloglucosidase. Metabolites were determined spectrophotometrically at 340 nm following standard enzymatic procedures linked to NADPH and G6PDH (Bernal et al. 2005). Fructose and glucose phosphorylating activities were determined according to (Martinez-Barajas and Randall 1996; Martinez-Barajas et al. 1997).

Microarray experiments

Plants were cultivated in 1% sucrose for 12 days in flask on a rotary shaker (125 rpm) and then transferred to media without sugars for 48 h in darkness before being induced with 3% glucose for 6 and 12 h. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) following manufacturer's indications. Two different timepoints (6 and 12 h) were used as sample replicates in order to detect significantly regulated genes. Ten microgram of total RNA was used for cDNA synthesis incorporating dUTP-Cy3 or dUTP-Cy5 using the CyScribe First-Strand cDNA labeling kit (Amersham). Incorporation of fluorophore was analyzed by using absorbance at 555 nm for Cy3 and at 655 for Cy5. A 22K (ATv3.4.2.Z) *Arabidopsis* microarray (Arizona University) was hybridized with equal quantities of labeled cDNA using hybridization solution HybIT2 (TeleChem International INC). The arrays were incubated for 14 h at 42°C and then washed three times with $1\times$ SSC, 0.05% SDS at room temperature. Acquisition and quantification of array images was performed in ScanArray 4000 with its accompanying software from Packard BioChips. All images were captured using 65% PMT gain, 70–75% laser power and 10 μm resolution at a 50% scan rate. For each spot the Cy3 and Cy5 density mean values and the Cy3 and Cy5 background mean values were calculated with ArrayPro Analyzer software from Media Cybernetics. Microarray data analysis was performed with the free software genArise, developed in the Computing Unit of the

Cellular Physiology Institute of UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>).

Statistical analysis

Statistical significance was determined by one way analysis of variance (ANOVA) using MS Excel and R (cran.R-project.org). Mean values were compared using Tukey's multiple comparison test with $P < 0.05$. Data presented are mean values \pm standard error. The manova and limma packages of R were used for microarray data analysis. Normalization within and between arrays was done with the quantile method and modeling was done with lmFit first and then with the eBayes fit. A provisory list of significantly up- or down-regulated genes was built by using a threshold of $P < 0.01$ and a log₂ fold change of >1 . In order to be more stringent in gene selection, the microarray data was subjected to a second round of *T* tests with Excel, using the net intensity values. In addition, genes with low expression values were filtered out (<30 net intensity under all conditions). Genes that met all previous selection criteria were finally marked as significantly up- or down-regulated.

Results

Generation of transgenic plants expressing Hxt2

The route of glucose uptake across the membrane can modulate some aspects of plant development. To test the implications of this hypothesis, the *Hxt2* hexose transporter from *S. cerevisiae* was cloned by PCR and used to construct *Arabidopsis* plants that express it under the control of the 35S promoter (Fig. 1a). Because the coding sequence of the recombinant gene was identical to that of the yeast *Hxt2* protein, it is also expected to display similar sub-

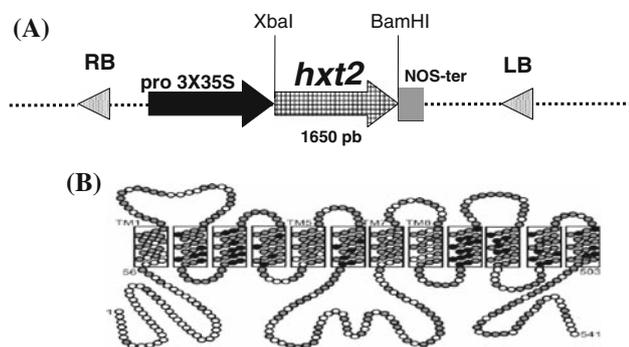


Fig. 1 **a** Construction used for heterologous expression of yeast *Hxt2* in *Arabidopsis thaliana* plants. **b** Predicted protein structure of Hxt2 transporter (541aa) showing 12 membrane spanning domains and 3 cytosolic regions (Kasahara et al. 2006)

cellular targeting and membrane topology (Fig. 1b). The successful generation of at least 6 independent transgenic lines was confirmed by southern blot (Fig. 2a). Inserts of different sizes correspond to transgenic insertions in different parts of the genome. Northern blot analysis revealed that transgenic lines had a wide range of steady state mRNA levels (Fig. 2b). Lines with the highest *Hxt2* expression were selected for further characterization.

To assess if the mRNA was transcribed to a functional heterologous protein, seedlings were pre-cultivated in liquid medium for 5 days, incubated with 3-O-methyl-[U-¹⁴C] glucose for 1 h, washed thoroughly and measured for radioactivity in the ethanol-soluble fraction. Compared to wild type plants, a non-significant increase of the non-metabolizable sugar analog import was observed at 5 mM (data not shown) but at 25 mM L2 plants accumulated 25% more label than wild-type plants (Fig. 3). These experiments confirmed that the yeast *Hxt2* was functional in the transgenic plants and that in *Arabidopsis* *Hxt2* was acting as a low affinity hexose transporter. This result was expected because other yeast proteins that bind to the *Hxt2* cytosolic loop an increase its affinity (Walsh et al. 1994) are not present in *Arabidopsis*.

Phenotypic characterization

Transgenic plants grown on soil behaved similarly to wild type controls. Plants were of equivalent sizes and shapes.

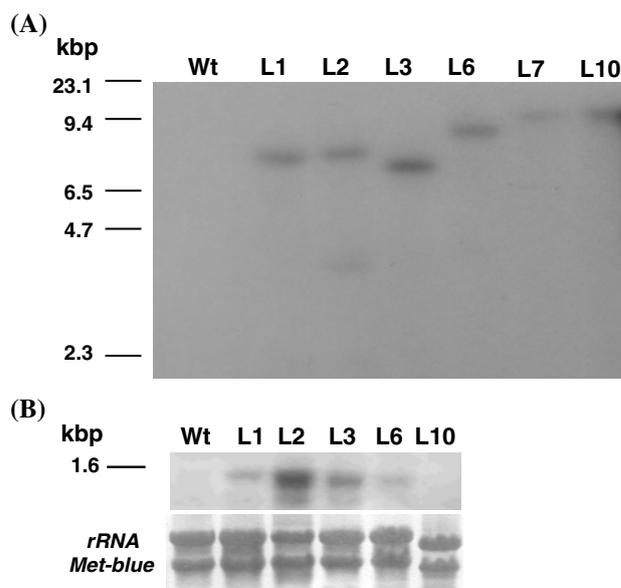


Fig. 2 Confirmation of single gene insertions and proof of heterologous expression. **a** Southern-blot analysis. Genomic DNA from T4 generation plants was digested with Eco R1 and the blot was probed at high stringency with ³²P radiolabeled *Hxt2*. **b** Northern-blot analysis of *Hxt2* expression. Total RNA was extracted from wild type and transgenic seedlings cultivated in liquid medium supplemented with 1% (w/v) sucrose. Blot was probed with ³²P radiolabeled *Hxt2*

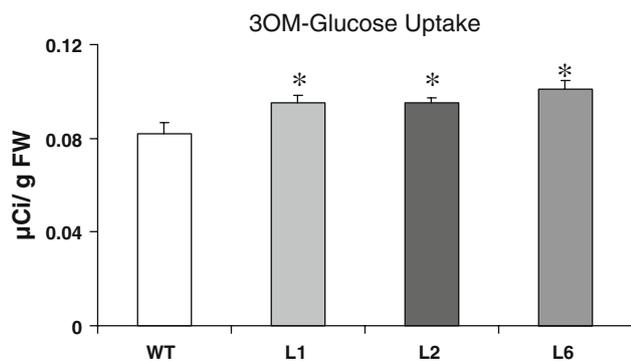


Fig. 3 Incorporation of 3-O-methyl-[U- 14 C] glucose by wild type and transgenic seedlings cultivated in liquid medium supplemented with 25 mM glucose. Bars represent the mean of incorporation after 30 min \pm SE ($n = 4$). * represent significant differences of transgenic lines compared to wild type at $P \leq 0.05$

There were no observable morphological alterations, nor were there any changes in adult plant development or flowering time (data not shown). This indicated that the overexpression of Hxt2 did not cause any drastic alteration of source-sink relations in adult plants. However, the different accumulated levels of 3-O-methyl-glucose observed at 25 mM, suggested that at high glucose concentration transgenic lines have different rates of sugar utilization compared to wild type seedlings. We therefore analyzed the phenotype of seedlings incubated with different concentrations of glucose in more detail.

The growth of wild type seedlings was reduced by increasing glucose concentration up to 4% (Fig. 4a and b). At 6% glucose, the growth of wild type seedlings is severely reduced, while transgenic plants showed a primary root with covered with abundant secondary roots (Fig. 4c). In several experimental setups it was observed that the transgenic plants had an increased ability to grow at 3–6% glucose, a phenotypic effect known as glucose insensitivity (Moore et al. 2003). We also measured some key metabolites under similar experimental conditions (Fig. 5). In comparison to plants cultivated at 1%, plants growing at 3% glucose had lower fresh weight, had higher levels of glucose, fructose, sucrose and accumulated more starch. Compared to wild type seedlings, transgenic lines responded differently to the increased glucose levels. The lines were not inhibited in their growth (Fig. 4a), whereas the increase of starch was reduced in all lines and almost abolished in line L1 (Fig. 5). Transgenic lines growing at 3% glucose could grow bigger than wild type lines, indicating that they could maintain a more rapid rate of cell division and elongation.

The lower levels of glucose and sucrose in comparison to wild type plants and the similar levels of hexoses phosphate (Fig. 5) are indicative of a more active rate of carbon utilization in the transgenic lines. To test this hypothesis we measured the activity of the key enzymes to the entry of carbon into glycolysis: fructokinase and hexokinase. In wild type plants, both activities presented only a small increase when comparing growth conditions

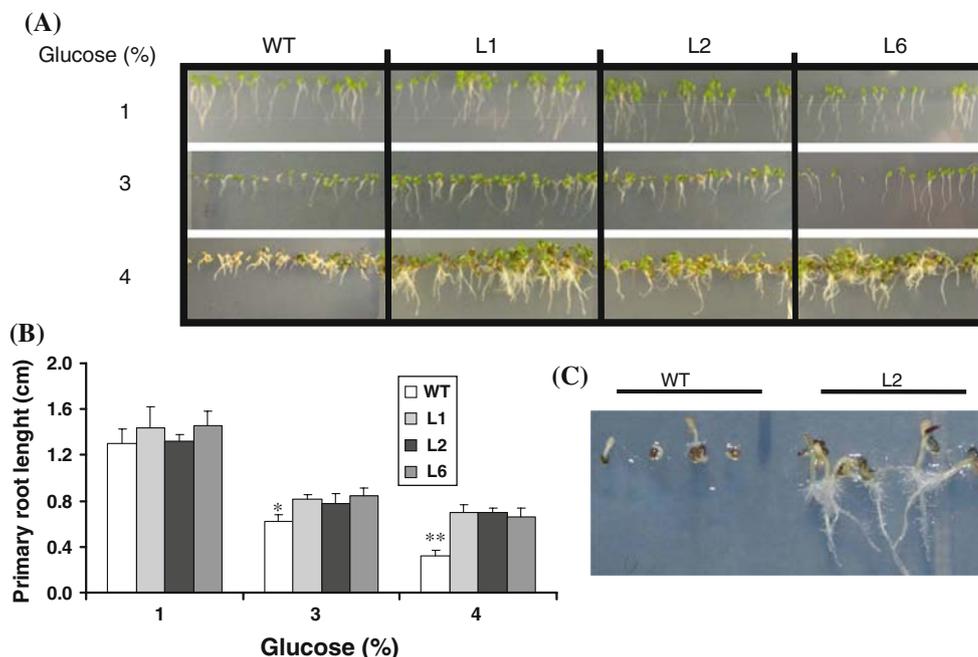


Fig. 4 Effect of glucose in seedlings growth. **a** Seedlings cultivated for 10 days in solid medium supplemented with different glucose concentrations. **b** Root growth. **c** Closeup of wild type and L2

germinated at 6% glucose. * and ** represent significant differences of transgenic lines compared to wild type at $P \leq 0.05$ and 0.01, respectively

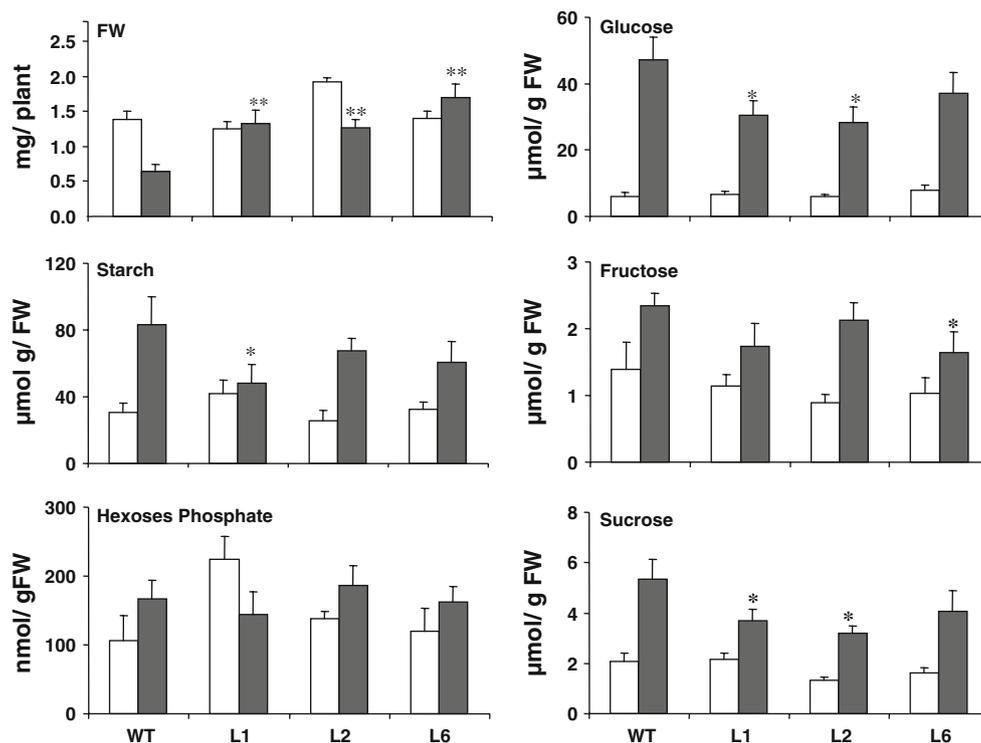


Fig. 5 Metabolites levels in seedlings. Plants were cultivated in solid medium with 1% glucose for 5 days and then transferred to a fresh medium with 1 (white bars) or 3% glucose (black bars) and analyzed

5 days later. Bars are the mean \pm SE ($n = 8$). * and ** represent significant differences of transgenic lines L1, L2 and L6 compared to wild type (WT) at $P \leq 0.05$ and 0.01 , respectively

of 1 or 3% glucose. However, in the L2 transgenic line, fructose and glucose phosphorylating activities increased by 78 and 87%, respectively (Fig. 6). Taken together, the above results indicate that transgenic lines show a phenotype of glucose tolerance—relative insensitivity—manifested as improved seedling development under conditions of high carbon availability, possibly due to an activation of key metabolic enzymes.

A similar glucose insensitive phenotype has been reported in *Arabidopsis* seedlings defective in the hexokinase-1 (*Hxk1*) gene (Xiao et al. 2000). Knockout of *Hxk1* by mutagenesis or antisense mutation leads to an altered response by germinating seedlings to high glucose (Moore et al. 2003). Data on the *glucose insensitive mutant 2* (*gin2*) and other results led some groups to conclude that *Hxk1* enzyme is the main glucose sensor in *Arabidopsis* (Xiao et al. 2000; Moore et al. 2003; Lin et al. 2007). Such reports have shown that the expression of a select group of sugar responsive genes is altered during carbon starvation and glucose re-addition.

Expression profiling

In order to determine which set of genes were unaffected or altered in the Hxt2 transgenic lines, we performed transcriptional profiling. The most representative line, L2, was

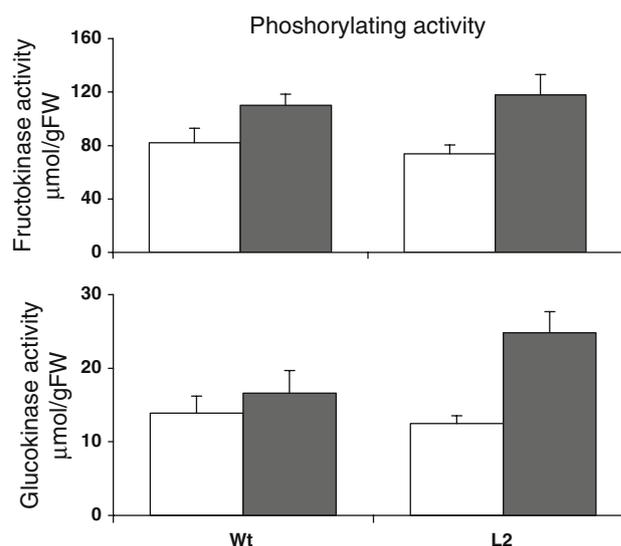


Fig. 6 Fructose dependent (a) and glucose dependent (b) phosphorylating activities in wild type and L2 seedlings. Plants were cultivated in liquid medium with 1% sucrose for 7 days and then transferred to a fresh medium with 1 (white bars) and 3% glucose (black bars) and analyzed 5 days later. Bars are the mean \pm SE ($n = 4$). ** significant differences at $P \leq 0.01$

used for this purpose. We isolated mRNA from wild type and L2 transgenic seedlings pregrown at 1% glucose and then transferred to 3% glucose for 6 or 12 h. The two

different time points (6 and 12 h) were used as sample replicates in order to detect significantly regulated genes. The labeled cDNA was hybridized to a 22K gene chip from Arizona University. A summary of the significantly differently expressed genes (wild type versus L2) is shown in Fig. 8, with genes grouped by functional categories.

Compared to other microarray experiments, only a small fraction of genes were significantly altered in the *Hxt2* transgenics. In total, we identified 43 genes as significantly up-regulated and 120 genes as significantly down-regulated (see Fig. 8 and supplemental materials).

The transgenic line L2 had the same pattern of expression for many—but not all—of the previously reported sugar signaling genes. Some of the genes that have been typically used as classical markers for sugar responses in *Arabidopsis* were not altered in the transgenic lines, as compared to wild type controls. In order to confirm the microarray results, we decided to run additional gene expression experiments. We grew plants, isolated RNA and performed standard northern blot analysis using probes for some of the most typical genes, such as *STP1*, which is repressed by high glucose, or *ApL3* and *Hxk1*, which are induced by high levels of sugar. In accordance with previous reports, we observed that the expression of *STP1* was repressed, while *ApL3* and *Hxk1* were induced by 3% glucose in wild type plants and the same expression and

response pattern was observed in the *Hxt2* transgenics (Fig. 7a). The expression of *ApL3*, *Hxk1*, and *STP1* is altered in *gin2* mutants defective in the Hxk1 sensor domain (Moore et al. 2003) but not in our *Hxt2* transgenics. This indicated that heterologous *Hxt2* overexpression did alter a different set of sugar responsive genes, despite transgenic lines having a phenotype of glucose tolerance similar to that of the Hxk1 mutant *gin2*.

Discussion

Sugar signaling in plants

The ability to sense the presence of different sugars and its concentrations is important not only in the context of resource allocation but also to regulate different processes in plants (Koch 1996; Rolland et al. 2006). For example, a high sucrose/hexose ratio promotes starch storage and accumulation, while cell division and respiration is stimulated when the ratio is low (Cheng et al. 1996; Geiger et al. 1998; Weber et al. 1998). High glucose concentration also causes developmental arrest in *Arabidopsis* seedlings (Sheen et al. 1999; Arenas-Huertero et al. 2000; Arroyo et al. 2003). The mechanisms underlying developmental regulation by sugars are not yet well understood in plants. Sugar sensing has been better characterized in microorganisms. In yeast external glucose is sensed by SNF3 and RGT2 (Ozcan et al. 1996; Ozcan and Johnston 1999). These transmembrane proteins do not mediate significant glucose transport (Ozcan et al. 1996). By analogy with yeast, it has been suggested that in plants, sugar transporters might also be involved in sensing sugars (Roitsch 1999; Williams et al. 2000). In fact, several monosaccharide transporters from *Arabidopsis* and sucrose transporter SUT2 (Barker et al. 2000), encode proteins with large intracellular loops that may play a role similar to that of the RGT2 and SNF3 sensor proteins in yeast. We therefore decided to clone a hexose transporter from yeast in order to over-express it in *Arabidopsis*. We chose *Hxt2* because it is not a sensor, but rather a high capacity transporter that would be able to bypass the endogenous hexose transporters from *Arabidopsis*. Successful construction of transgenic plants expressing *Hxt2* was confirmed by southern blot, northern blot and ^{14}C transport studies (see Figs. 2, 3). Careful characterization of the *Hxt2* plants gave us hints of the importance of sugar transporter proteins for development.

Hexose transporters in plants

One of the known effects of glucose is the repression of glucose transporters (Price et al. 2004), which not only reduces glucose uptake, but also the signals that the

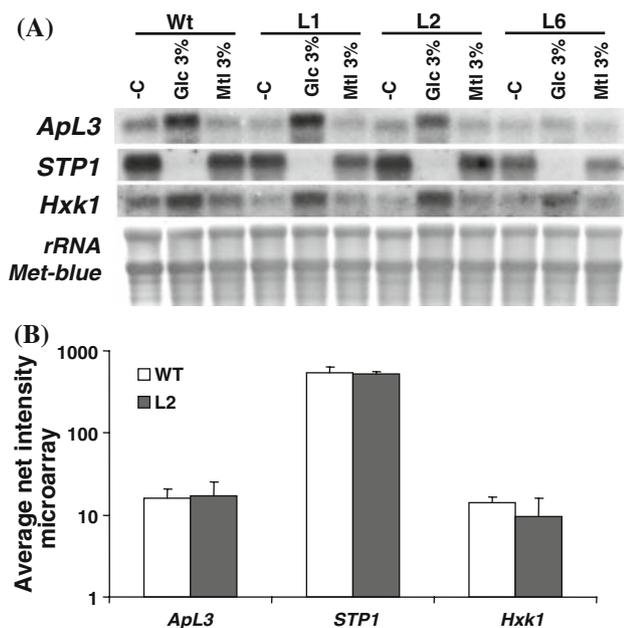


Fig. 7 Expression pattern of some sugar regulated genes: *ApL3*, *STP1*, and *Hxk1*. **a** Seedlings were cultivated in sucrose 1% ($t = 0$), starved in dark for 48 h and then incubated with 3% glucose or 3% mannitol. Glucose induces the expression of *ApL3* and *Hxk1* and strongly represses *STP1* in both, wild type and transgenic lines. **b** Intensity values of *ApL3*, *STP1*, and *Hxk1* expression from WT versus L2 from microarray experiment (Fig. 8)

transporters produce. For example, the expression of the *V. vinifera* hexose transporter (VvHT1) in tobacco repressed the expression of the endogenous tobacco hexose transporters, reduced hexose uptake and severely affected growth (Letierrier et al. 2003). In *Arabidopsis*, 14 sugar transporters have been putatively identified (Rolland et al. 2006), of which 13 monosaccharide transporters and one sucrose transporter are regulated by glucose under the same conditions (Price et al. 2004). Hxt2 has low homology with *Arabidopsis* hexose transporters. The microarray data we obtained from the *Hxt2* transgenic line indicated that there were no major expression changes of endogenous hexose transporters. In fact, metabolic analysis indicated that glycolytic flux in *Hxt2* transgenic was not repressed, but was instead activated (see Figs. 5, 6).

In yeast, interaction with other proteins makes Hxt2 work as a high affinity transporter (Walsh et al. 1994). In *Arabidopsis*, however, regulatory proteins are not present. This might explain its heterologous function as a low affinity transporter because no response was detected at 1% glucose, but developmental differences between wild type controls and *Hxt2* transgenics were only noticed at 3% glucose, and more markedly at 4 and 6% glucose.

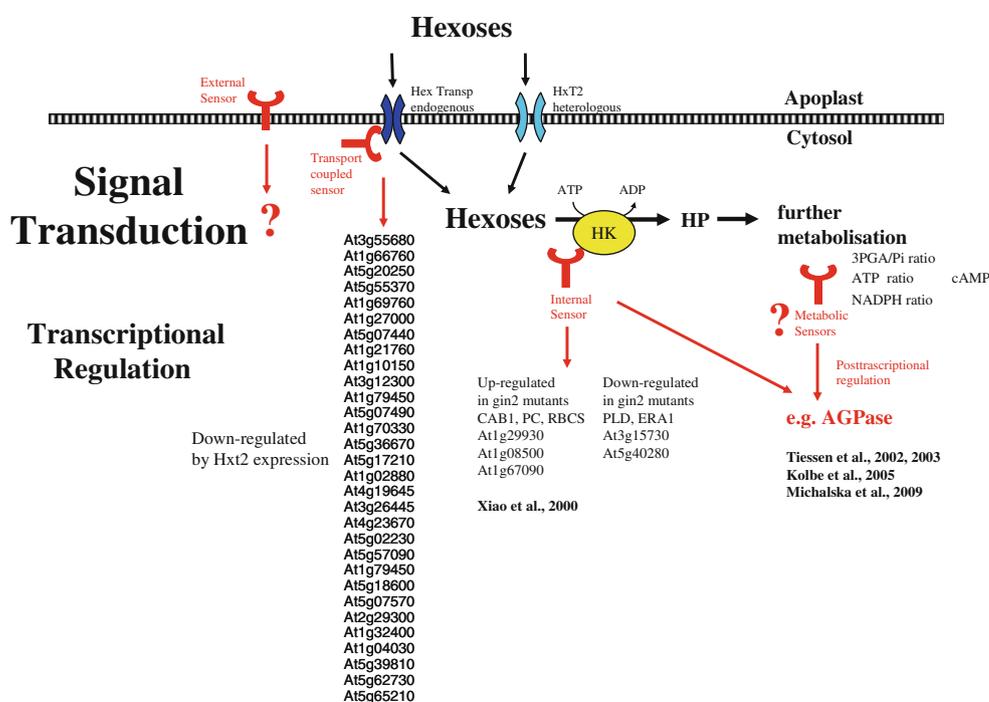
Developmental arrest of seedlings by glucose

It has been reported that high glucose concentration produces developmental arrest in *Arabidopsis* plants (Arroyo et al. 2003). This has been usually associated with hexokinase1 (Hxk1) as the main and only glucose sensor (Xiao

et al. 2000; Moore et al. 2003). Some genes related to abscisic acid synthesis and signaling have also been associated with glucose tolerance (Arenas-Huertero et al. 2000). Our results show that the glucose tolerance phenotype can also be mimicked by heterologous expression of Hxt2 (see Fig. 4c). The expression of *Hxt2* reduced sensitivity to glucose, evidenced by more rapid growth and root elongation rates (see Fig. 4). The expression of *Hxk1* was not altered in the transgenic lines, nor were other genes that had been previously associated with Hxk1 dependent regulation (see Fig. 8). Only a particular and novel set of genes was perturbed (see Fig. 8 and supplemental materials). We interpret this as showing that *Hxk1* dependent glucose signaling was not affected by the ectopic expression of Hxt2, but that this expression possibly did affect other routes of sugar sensing. These results are in accordance with the hypothesis that seedling development and metabolism can be modulated by the route of glucose transport across the membrane. We suggest that heterologous expression of *Hxt2* altered the regulation of some genes and enzymes (see Fig. 8), ultimately leading to the observed phenotype: more rapid growth and glucose utilization under conditions of high carbon availability.

In the *Hxt2* transgenic lines, glucose perception was altered by a pathway different from the one of *ApL3*, *STP1*, and *Hxk1* (see Fig. 7). More work is needed in order to confirm the direct and indirect effects caused by glucose and to identify cis-regulatory elements and trans-acting factors involved in the transcriptional activation or repression mechanisms. A greater number of genes were

Fig. 8 Sugar signaling model showing different routes for glucose sensing. Previous reports have postulated some genes that are dependent on Hxk1 as the glucose sensor (Xiao et al. 2000). The expression of Hxt2 did not alter significantly those genes. The figure shows some of the most repressed genes in the *Hxt2* transgenic plants. This could represent a subset of genes that are normally activated by a membrane protein that has been perturbed by the overexpression of Hxt2 (heterologous route for glucose transport). The figure also shows examples of multiple signaling pathways that act at the transcriptional or post-transcriptional level on parallel



down-regulated than up-regulated in the *Hxt2* transgenic line compared to wild type controls (see Fig. 8 and supplemental materials). We speculate that these down-regulated genes correspond to those genes which are activated in wild type plants by a sensor protein that is dependent on the flux of an endogenous glucose transporter. With clues such as those provided by microarray analysis, more detailed experiments may eventually determine how membrane proteins regulate developmental processes in plants, dependent on carbon availability.

Metabolic phenotype

The measured metabolite levels of glucose, sucrose and hexose-P, together with the significant increase in fructose and glucose phosphorylating activities (see Fig. 6) suggest that the transgenic lines are not stuck in glycolytic flux. This conclusion is also supported by microarray data because the mRNA levels of most enzymes of glycolysis and respiration were either not inhibited but rather up-regulated (see supplemental materials). The slight decrease of starch (see Fig. 5) indicates that storage metabolism is not activated in transgenic lines by the high external glucose, but that in comparison to wild type, carbon is instead used for respiration, growth, cell division and cell elongation. This explains why the transgenic seedlings can develop much larger roots when germinated at 6% glucose (see Fig. 4c).

Conclusion

Overall, the above results show that the developmental arrest of wild type plants at 3–6% glucose not only depends on Hxk1 as the sugar sensor (Moore et al. 2003) but might also be influenced by the route of hexose transport across the plasma membrane. It also shows that some subsets of genes that are altered under conditions of high glucose depend on the expression of other genes (e.g., *Hxk1* or *Hxt2* in our case). This is in agreement with the view that some effects of sugar are not caused by carbon usage or metabolism *per se*. It is also in accordance with previous reports on the existence of several glucose perception pathways in *Arabidopsis*, both dependent and independent of Hxk1 activity (Rolland et al. 2006). It is also evident that some sugar responses are specific to developmental stage, as a strong phenotype was observed shortly after the germination stage of the *Hxt2* transgenics (see Fig. 4a–c), but no major alterations were found in adult plants.

The fact that we detected a set of genes that are modified by the heterologous expression of *Hxt2* indicates that membrane proteins are important for developmental regulation (see supplemental figures). Additional experiments

are needed in order to establish the possible effect of *Hxt2* overexpression on the activity of membrane bound proteins in transgenic lines. Further research is required to provide a more direct indication that cytosolic glucose levels are indeed sensed by Hxk1 by a particular set of genes, while apoplastic glucose levels—or the import of glucose across the membrane—can also be sensed by the action of transporter proteins, by another set of genes.

Acknowledgments The authors thank to Laurel Fabila for her skillful technical assistance. We also thank to Lorena Chávez González, Simón Guzmán León, José Luis Santillán Torres and Jorge Ramírez (IFC-UNAM) and Frédérique Hilliou (INRA-Sophia France) for the very valuable advice on microarray data analysis, and to Gerardo Coello, Gustavo Corral and Ana Patricia Gómez for genArise software assistance. The research was supported by CONACYT (grant 46827-Q) and Facultad de Química, UNAM (PAIP 6290-14). D. Padilla-Chacón was supported by a fellowship from CONACYT. A. Tiessen also acknowledges project funding by CONACYT.

References

- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, Leon P (2000) Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Gene Dev* 14:2085–2096
- Arroyo A, Bossi F, Finkelstein RR, Leon P (2003) Three genes that affect sugar sensing (Abscisic Acid Insensitive 4, Abscisic Acid Insensitive 5, and Constitutive Triple Response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133:231–242
- Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448:938–942
- Barker L, Kuhn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12:1153–1164
- Baud S, Graham IA (2006) A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of *Arabidopsis* using in situ histochemistry. *Plant J* 46:155–169
- Bernal L, Coello P, Martinez-Barajas E (2005) Possible role played by R1 protein in starch accumulation in bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings under phosphate deficiency. *J Plant Physiol* 162:970–976
- Bevan M (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12:8711–8721
- Buttner M (2007) The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 581:2318–2324
- Buttner M, Sauer N (2000) Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Bba-Biomembranes* 1465:263–274
- Cheng W, Taliercio E, Chourey P (1996) The miniature 1 seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell* 8:971–983
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735–743

- Damon S, Hewitt J, Nieder M, Bennett AB (1988) Sink metabolism in Tomato Fruit.2. Phloem unloading and sugar uptake. *Plant Physiol* 87:731–736
- Dellaporta S, Wood J, Hicks J (1983) A plant DNA miniprep preparation version II. *PMB Report* 4:19–21
- Ehness R, Ecker M, Godt DE, Roitsch T (1997) Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 9:1825–1841
- Finkelstein RR, Gibson SI (2002) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr Opin Plant Biol* 5:26–32
- Fotopoulos V, Gilbert MJ, Pittman JK, Marvier AC, Buchanan AJ, Sauer N, Hall JL, Williams LE (2003) The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, At beta fruct1, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol* 132: 821–829
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151–158
- Geigenberger P, Kolbe A, Tiessen A (2005) Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *J Exp Bot* 56:1469–1479
- Geiger M, Stitt M, Geigenberger P (1998) Metabolism in slices from growing potato tubers responds differently to addition of sucrose and glucose. *Planta* 206:234–244
- Halford NG, Hey SJ (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J* 419:247–259
- Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9:5–19
- Kasahara T, Ishiguro M, Kasahara M (2006) Eight amino acid residues in transmembrane segments of yeast glucose transporter Hxt2 are required for high affinity transport. *J Biol Chem* 281:18532–18538
- Koch KE (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:509–540
- Kolbe A, Tiessen A, Schlupepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11118–11123
- Kolbe A, Oliver SN, Fernie AR, Stitt M, van Dongen JT, Geigenberger P (2006) Combined transcript and metabolite profiling of *Arabidopsis* leaves reveals fundamental effects of the thiol-disulfide status on plant metabolism. *Plant Physiol* 141:412–422
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999) The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11:707–726
- Lalonde S, Wipf D, Frommer WB (2004) Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* 55:341–372
- Leon P, Sheen J (2003) Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci* 8:110–116
- Leterrier M, Atanassova R, Laquitaine L, Gaillard C, Coutos-Thevenot P, Delrot S (2003) Expression of a putative grapevine hexose transporter in tobacco alters morphogenesis and assimilate partitioning. *J Exp Bot* 54:1193–1204
- Lin PC, Hwang SG, Endo A, Okamoto M, Koshiba T, Cheng WH (2007) Ectopic expression of ABSCISIC ACID 2/GLUCOSE INSENSITIVE 1 in *Arabidopsis* promotes seed dormancy and stress tolerance. *Plant Physiol* 143:745–758
- Loreti E, Alpi A, Perata P (2000) Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. *Plant Physiol* 123:939–948
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible WR, Carillo P, Hajirezaei MR, Stitt M (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADP glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 397:139–148
- Martinez-Barajas E, Randall DD (1996) Purification and characterization of fructokinase from developing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruits. *Planta* 199:451–458
- Martinez-Barajas E, Krohn BM, Stark DM, Randall DD (1997) Purification and characterization of recombinant tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fructokinase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 11:41–46
- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci* 106:9908–9913
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300:332–336
- Ozcan S, Johnston M (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters [Review]. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:554–569
- Ozcan S, Dover J, Rosenwald AG, Wolf S, Johnston M (1996) Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12428–12432
- Patrick JW, Offler CE (1996) Post-sieve element transport of photoassimilates in sink regions. *J Exp Bot* 47:1165–1177
- Preiss J (1984) Starch, sucrose biosynthesis and partition of carbon in plants are regulated by ortho-phosphate and triose-phosphates. *Trends Biochem Sci* 9:24–27
- Price J, Laxmi A, St Martin SK, Jang JC (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2128–2150
- Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem* 245:324–333
- Roitsch T (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr Opin Plant Biol* 2:198–206
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2001) Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 26: 310–317
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:675–709
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Schneiderei A, Scholz-Starke J, Sauer N, Buttner M (2005) AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Planta* 221:48–55
- Sheen J, Zhou L, Jang JC (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2:410–418
- Sherson SM, Alford HL, Forbes SM, Wallace G, Smith SM (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 54: 525–531
- Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* 30:1126–1149
- Tiessen A, Hendriks JHM, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farre EM, Geigenberger P (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism

- linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* 14:2191–2213
- Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geigenberger P (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J* 35:490–500
- Walsh MC, Smits HP, Scholte M, Vandam K (1994) Affinity of glucose-transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *J Bacteriol* 176:953–958
- Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Manteuffel R, Wobus U (1998) Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. *Plant J* 16:163–172
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N (2000) Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci* 5:283–290
- Xiao WY, Sheen J, Jang JC (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biol* 44:451–461

REB

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Revista de Educación Bioquímica
Universidad Nacional Autónoma de México
reb@bq.unam.mx
ISSN (Versión impresa): 1665-1995
ISSN (Versión en línea): 187-3690
MÉXICO

2007

Daniel Padilla Chacón / Eleazar Martínez Barajas

FACTORES INVOLUCRADOS EN LA DISTRIBUCIÓN DE AZÚCARES EN LAS PLANTAS
VASCULARES: COMUNICACIÓN ENTRE LOS TEJIDOS FUENTE Y TEJIDOS DEMANDA

Revista de Educación Bioquímica, septiembre, año/vol. 26, número 003

Universidad Nacional Autónoma de México

Distrito Federal, México

pp. 99-105

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Universidad Autónoma del Estado de México

<http://redalyc.uaemex.mx>



FACTORES INVOLUCRADOS EN LA DISTRIBUCIÓN DE AZÚCARES EN LAS PLANTAS VASCULARES: COMUNICACIÓN ENTRE LOS TEJIDOS FUENTE Y TEJIDOS DEMANDA*

Daniel Padilla Chacón y Eleazar Martínez Barajas

RESUMEN

El estudio de las características que diferencian a los órganos fuente o fotosintéticos (hojas maduras) de los tejidos demanda (semillas, flores, raíces, hojas jóvenes, tubérculos, etc.) y de las relaciones que se establecen entre ellos, ha abierto la posibilidad de modificar la distribución de fotosintatos en cultivos de interés comercial. La forma en que son cargados y descargados del floema (vías simplástica y apoplástica) es uno de los factores que definen la cantidad de azúcares que son exportados desde los órganos fuente hacia los tejidos de demanda. Sin embargo, la magnitud de los flujos de carbono está sujeta a una regulación muy compleja, en la que participan elementos internos y factores ambientales que en su conjunto permiten que la distribución pueda ajustarse para satisfacer las necesidades fisiológicas de cada órgano en respuesta al desarrollo y cambios en el ambiente.

PALABRAS CLAVE: Vía simplástica, vía apoplástica, floema, transportadores de sacarosa y hexosas.

ABSTRACT

The study of the characteristics that differentiate to the source tissues (mature leaves) from the sink tissues (seeds, flowers, roots, young leaves, tubers, etc) and of the relations among them, it has opened the possibility to modify the distribution of photosynthates in cultivars of commercial interest. The pathway in which they are loaded and unloaded from the phloem (routes symplastic and apoplastic) is one of the factors that defines the amount of sugars that are exported from the source tissues towards sink tissues. However, the magnitude of the flows of carbon is subject to a very complex regulation in which internal elements and environmental factors participate as a whole, allowing that the distribution of the photosynthates can adjust to satisfy the physiological necessities of each organ in response to its development and to changes in the environment.

KEY WORDS: Symplastic route, apoplastic route, phloem, transporters of sucrose and hexoses.

INTRODUCCIÓN

Las plantas vasculares tienen un mecanismo complejo que regula la cantidad de nutrimentos que se exportan desde las hojas (tejidos fuente) hacia tejidos de poca o nula actividad fotosintética como raíces, flores, semillas, hojas jóvenes, meristemas, etc. (tejidos demanda) (1). Se llama carga del floema al proceso por el cual los fotosintatos sintetizados en las hojas son concentrados en el floema. Por su parte, su liberación controlada en los

tejidos demanda se conoce como descarga del floema (Fig. 1). Ambos procesos son afectados por factores ambientales, bioquímicos, fisiológicos y de desarrollo que en conjunto determinan la cantidad de fotosintatos que pueden ser descargados en los tejidos demanda (2).

Un aspecto de gran importancia en la distribución de los nutrimentos es la forma en que las células del mesófilo de las hojas y las del tejido demanda están comunicadas con el

floema. En algunos casos la carga del floema se lleva a cabo por movimiento transmembranal (carga apoplástica) o por plasmodesmata (carga simplástica). Debido a la gran variedad de especies que se han estudiado, la carga del floema se ha clasificado en 2 tipos: los del Tipo 1 se caracterizan porque se realiza por cargadores simplasto (Fig. 1b y d) y los del Tipo 2 se presentan cuando las células del complejo elementos cribosos/células acompañantes (EC/CAs) se encuen-

*Recibido: 12 de marzo de 2007 Aceptado: 11 de septiembre de 2007

Departamento de Bioquímica. Conjunto E. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Institutos s/n. Ciudad Universitaria. México D.F. C.P. 04510. Teléfono 5622-5276. Correo E: danielpadilla30@yahoo.com.mx

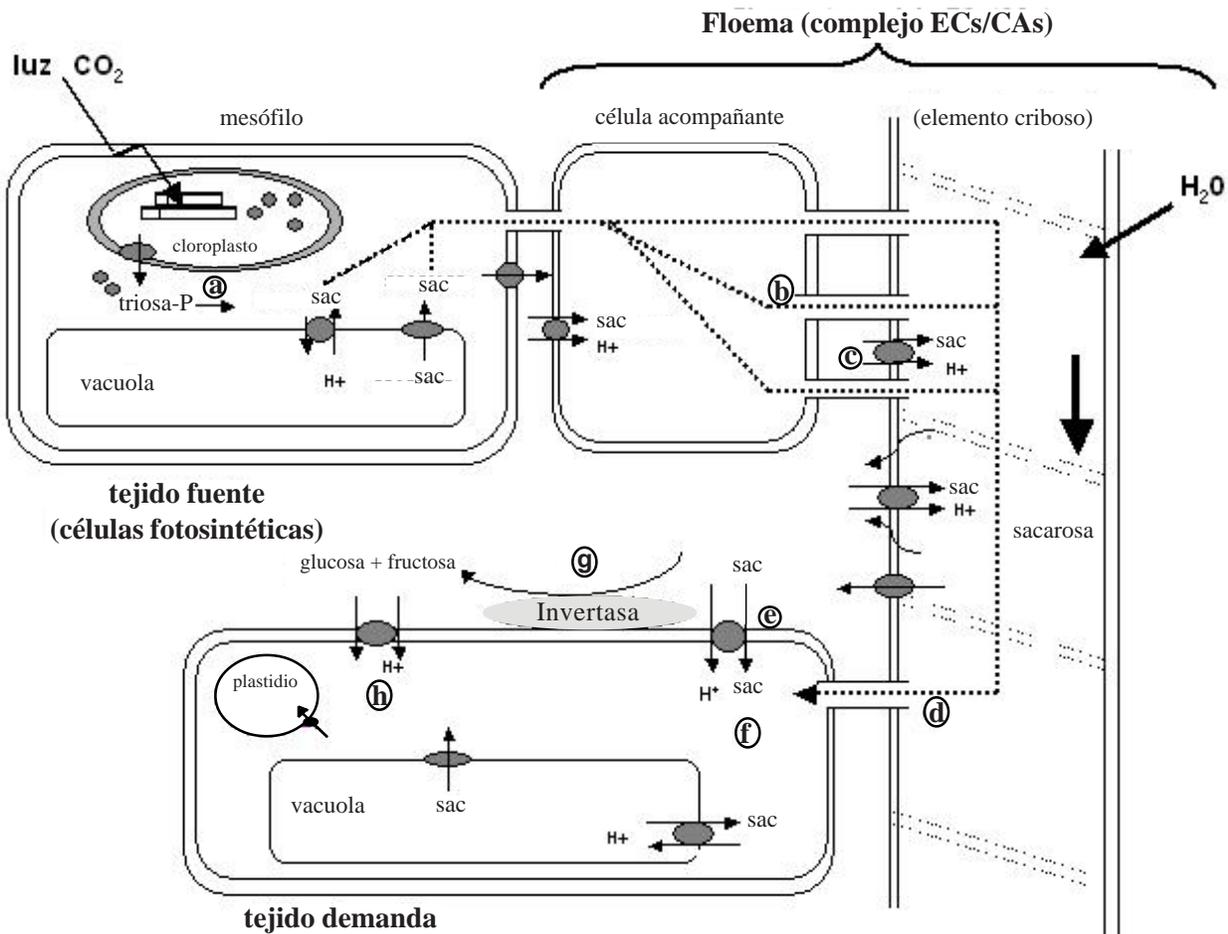


Figura 1. Ruta de fotosintatos desde el tejido fuente hacia el tejido demanda. En las hojas se realiza la fotosíntesis y síntesis de sacarosa (a). Mecanismos de carga y descarga del floema vía simplasto, la sacarosa (sac) viaja a través de conductos llamados plasmodesmos (b, d). Mecanismos de carga y descarga vía apoplasto, la sacarosa es liberada al apoplasto y transportadores (H^+ /sacarosa) cargan y descargan la sacarosa del floema (c, e). La sacarosa puede ser incorporada por un transportador (H^+ /sacarosa) (f) o puede ser hidrolizada por una invertasa de pared (g). Los productos glucosa y fructosa son incorporados por transportadores (H^+ /hexosa) (h). Modificado de la referencia 3.

tran simplásticamente aislados y la carga del floema la realizan en el apoplasto por transportadores de azúcares (Fig. 1c y e). Dentro de este grupo existen otros dos subtipos 2a y 2b y las diferencias están dadas por la morfología de las células (3).

De igual manera, en la descarga del floema están presentes las dos vías antes mencionadas (simplástica y apoplástica). En la ruta simplástica, los plasmodesmos y el gradiente de concentración determinan la magnitud y la dirección del flujo de fotosintatos. La ruta apoplástica se caracteriza porque los azúcares que viajan por el floema se liberan al espacio intercelular de las células que forman los órganos de

demanda. En este caso, la cantidad de azúcares que dichas células asimilen dependerá de la actividad de los transportadores ubicados en la membrana plasmática (4).

La sacarosa que se descarga en el apoplasto puede ser incorporada por las células del tejido de demanda mediante un transportador específico (Fig. 1f) y/o puede ser hidrolizada por la invertasa de pared celular (Fig. 1g). En las células de los órganos de demanda también se expresan genes que codifican a transportadores de hexosas ubicados en la membrana plasmática, que permiten la entrada de la glucosa y fructosa producidas por la invertasa de pared celular (Fig. 1h).

Algunos de los transportadores de azúcares en plantas superiores han sido caracterizados en sistemas heterólogos. Se ha determinado que funcionan como "simporter" (H^+ /sacarosa o H^+ /hexosas) y su actividad permite el movimiento de azúcares en contra del gradiente de concentración. Se ha sugerido que la predominancia de las rutas de descarga de fotosintatos simplástica y apoplástica está relacionada con la forma en que se usan los fotosintatos. En tejidos que acumulan almidón la descarga es por vía simplástica, pues el almidón además de ser osmóticamente menos activo que la sacarosa, se compartamentaliza en los amiloplastos, lo cual ayuda a

que se mantenga el gradiente de concentración, que favorece la asimilación de fotosintatos desde el floema (5). Por otro lado, en tejidos con descarga apoplástica los azúcares libres generalmente se acumulan en la vacuola, si bien esto favorece la formación de un gradiente de concentración que facilita la asimilación de azúcares, la participación de los transportadores ubicados en la membrana celular es fundamental para transportar los azúcares (6).

ESTRUCTURA DEL FLOEMA

El floema es un tejido especializado en transportar nutrimentos a larga distancia. Está formado por dos tipos celulares relacionados ontogenéticamente: elementos cribosos (ECs) y células acompañantes (CAs) (Fig. 2). Los ECs son células altamente modificadas que durante la maduración pierden el núcleo y las mitocondrias. Poseen abundantes perforaciones en las paredes celulares de la zona donde se unen a otros ECs para formar conductos co-

nocidos como tubos cribosos por donde viajan los nutrimentos. Las CAs se caracterizan por tener un protoplasma denso, núcleo y numerosas mitocondrias, se encuentran conectadas a los ECs por un conjunto de plasmodesmos, de tal forma que la funcionalidad metabólica de los ECs depende de los procesos que ocurren en las CAs (Fig. 2).

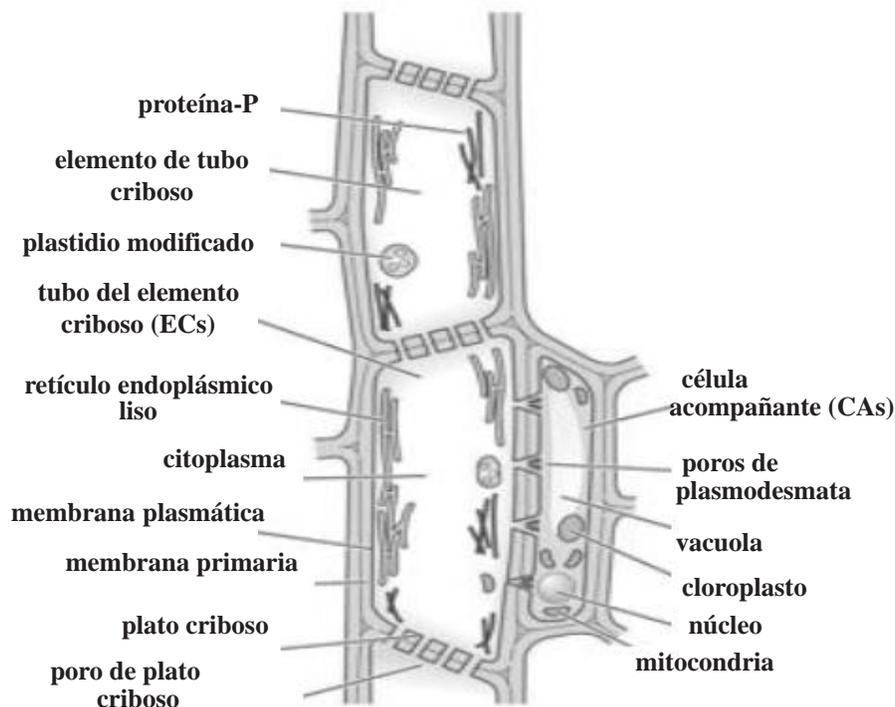
Los ECs de la mayoría de las plantas contienen proteínas específicas conocidas como proteínas-P, las cuales pueden formar filamentos, túbulos y agregados cristalinos. Las proteínas-P de la familia *Cucurbitaceae* son las que mejor se han caracterizado, pues se les puede purificar fácilmente a partir del exudado del floema. En *Cucurbita maxima* se han encontrado a dos polipéptidos: PP1 de 96 KDa que forma filamentos y la PP2 de 48 KDa que funciona como una lectina. La transcripción y traducción de la PP1 y PP2 ocurre en la CAs y son responsables de formar un sello cuando los ECs sufren heridas (7).

CARGA DEL FLOEMA

La sacarosa es el compuesto preferido por las plantas para proveer de azúcares a los órganos demanda. Durante el día se sintetiza en el citoplasma a partir de triosas fosfato provenientes del cloroplasto, por la noche se elabora como producto derivado de la degradación de almidón. La vía que sigue la sacarosa para llegar al floema puede ser vía simplástica (Fig. 3a) o vía apoplástica (Fig. 3b). Y por lo tanto, se puede clasificar en dos tipos dependiendo de la influencia sobre la carga o ausencia a nivel del floema debido al número de las venas menores que comunican entre sí a las células. Las especies de Tipo 1, presentan una configuración "abierta" con numerosas interconexiones entre las células acompañantes y las células de la vaina, las especies que tienen este tipo son la calabaza (*Cucurbita pepo*) y uva (*Vitis vinifera*). En especies donde la carga del floema es vía apoplástica se le ha clasificado como de Tipo 2 y se caracteriza por tener una configuración "cerrada" en que las venas menores no tiene una relación directa y el complejo EC/CAs aparece simplásticamente aislado. Este tipo se clasifica en dos subgrupos: Tipo 2a y Tipo 2b. Ambos tipos se diferencian por la morfología que presentan las células, en las de Tipo 2a, las células acompañantes pierden las invaginaciones en la pared celular y en las de Tipo 2b la morfología de las células acompañantes conserva las invaginaciones. Entre las especies que se caracterizan por ser de Tipo 2a se encuentra la papa (*Solanum tuberosum*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y entre las de Tipo 2b, el chícharo (*Pisum sativum*) y la lechuga (*Lactuca sativa*) (3).

En estos casos es importante la participación de diferentes transportadores de sacarosa que pertenecen a la familia SUTs (sucrose transporters), miembros de la familia catión glicósido-

Figura 2. Esquema del complejo formado por las células acompañantes (CAs) y elementos cribosos (ECs). En la imagen se muestran las diferentes estructuras entre los tipos celulares que forman el floema. Modificado de la referencia 31.



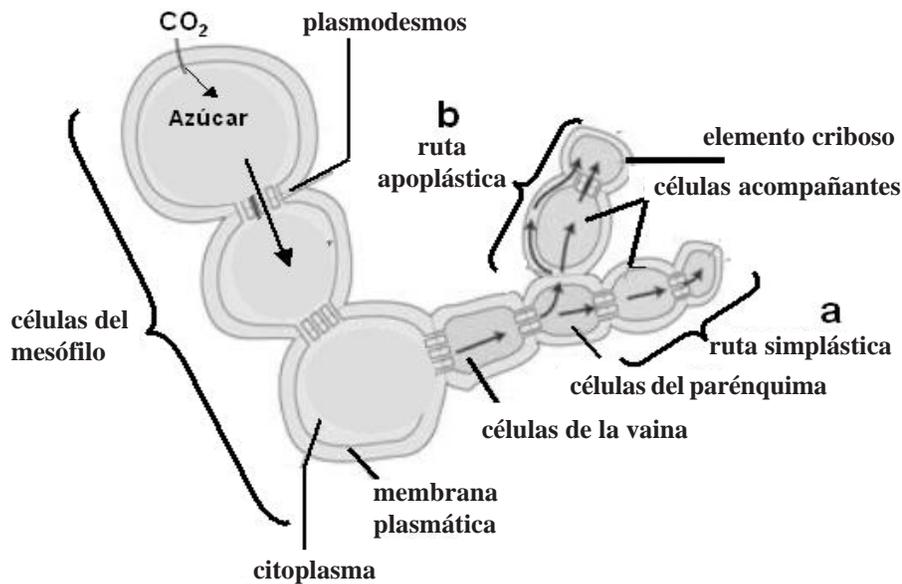


Figura 3. Esquema de la ruta de los azúcares en la carga del floema. La carga del floema vía simplástica (a). La Carga del floema vía apoplástica (b). Modificado de la referencia 31.

pentósido-hexurónico (GPH), la cual a su vez forma parte de la superfamilia (MSF) (8,9). En algunos casos las dos vías de carga pueden coexistir, generalmente esto está altamente relacionado con el estado fisiológico de la hoja. En cotiledones de Ricino (*Ricinus communis*) se ha demostrado que la carga del floema puede cambiar de simplástica a apoplástica en respuesta al ajuste osmótico en las células, aunque aparentemente la vía simplástica es la más importante (10).

DESCARGA DEL FLOEMA

El flujo de la sacarosa hacia el tejido que lo demanda se explica por la hipótesis de Münch que se resume en las siguientes ecuaciones:

$$R_f = J_v AC \quad (1)$$

$$R_f = L_p (P_{EC \text{ fuente}} - P_{EC \text{ demanda}}) AC \quad (2)$$

De acuerdo con este planteamiento, el flujo de los solutos a través de los ECs (J_v) en un área (A) y la concentración (C) de fotosintatos asimilados determina la velocidad del flujo (R_f) (ecuación 1). J_v es dirigido por el gradiente de presiones hidrostáticas

(L_p) que existe entre los elementos cribosos (EC) de los tejido fuente y demanda, modulado por la conductividad hidráulica (L_p) de la interconexión axial (ecuación 2) (11).

La eficiencia de descarga en los órganos demanda está determinada por su capacidad para remover los azúcares liberados. En ese sentido, la velocidad de hidrólisis de la sacarosa o de la síntesis de oligosacáridos de la serie de la rafinosa, así como de compuestos de alto peso molecular (almidón o triacilglicérols) ayudan a generar el gradiente de concentración que favorece la descarga de azúcares y la compartimentalización de los fotosintatos incorporados (12).

Si bien el gradiente de concentración existente entre el floema y el tejido demanda es fundamental para que la descarga de fotosintatos ocurra, la ruta de descarga es un factor que puede facilitar el proceso. Al igual que en la carga del floema, la descarga del floema también puede darse por vía simplástica y apoplástica. La descarga vía simplasto que se caracteriza por la facilidad con la que se movilizan grandes cantidades de sacarosa, es común en ápices de raíz, hojas en ex-

pansión y tubérculos de papa en desarrollo. En las membranas celulares de los tejidos demanda donde opera la vía apoplástica, se expresan genes que transcriben a transportadores que permiten importar tanto sacarosa como las hexosas resultantes de la actividad de la invertasa de pared celular (13).

REGULACIÓN EN LA DESCARGA VÍA DEL SIMPLASTO

Si bien la presencia de una red de plasmodesmos que comunican al floema con los tejidos demanda permite la liberación de grandes cantidades de sacarosa, la descarga vía del simplasto es afectada por la actividad metabólica de los tejidos (5). La velocidad con que la sacarosa se metaboliza y la compartimentalización de los productos sintetizados también influyen sobre la velocidad de descarga, por lo cual, enzimas que participan en el metabolismo de la sacarosa han resultado ser piezas clave para la asimilación de fotosintatos. Por ejemplo, reducir la actividad de la sacarosa sintasa (SuSy) disminuye en un 50% el peso seco del tubérculo de papa (14). En cuanto al tomate, al disminuir la actividad de SuSy, la importación de sacarosa por frutos de siete días después de la antesis se redujo en un 90% (15). No se conocen a profundidad los factores que determinan la formación de plasmodesmos, sin embargo, observaciones en ápices de la raíz y hojas jóvenes de tabaco sugieren que la sacarosa por sí misma podría controlar la cantidad de plasmodesmos lo que a su vez definiría su velocidad de descarga (16). Tampoco se conocen los factores que regulan su actividad, pero se ha observado que el aumento en la osmolaridad de las células que forman las fibras de algodón bloquea de manera reversible el plasmodesmata, sugiriendo que la turgencia celular es otro elemento que puede influir en el proceso de descarga del floema (17).

Por otro lado, en experimentos con estambres de *Stecreaea* se redujo la capacidad de conducir solutos en el plasmodesmata incrementando la concentración de Ca^{+2} en el citosol, sugiriendo que dentro del mecanismo podría funcionar como un segundo mensajero que permite el paso por estos conductos (3).

REGULACIÓN EN LA DESCARGA VÍA DEL APOPLASTO

Cuando los fotosintatos son descargados por vía apoplástica, su asimilación depende de la actividad de transportadores de sacarosa y monosacáridos ubicados en la membrana plasmática.

Los transportadores de sacarosa tienen doce regiones transmembranales. En el genoma de *Arabidopsis*, se han identificado muchas secuencias que potencialmente codifican para transportadores de sacarosa. Todos ellos comparten alto grado de homología, que ha permitido clasificarlos dentro de la familia GPH, que como se mencionó anteriormente forman parte de la mayor superfamilia de facilitadores de azúcares (MSF) (18). En estudios basados en análisis de filogenética y de comparación de secuencias de péptidos recientemente se logró clasificar a los SUTs de dicotiledóneas en tres grupos: SUT1, SUT2 y SUT4. Sin embargo, no está totalmente comprendido si cada tipo de SUT tiene un papel fisiológico diferente dentro de las especies de dicotiledóneas (19).

Por otro lado, es probable que algunos transportadores de sacarosa como SUT2 que se expresa preferencialmente en las CAs de *Arabidopsis* (20) participan en la carga del floema. Otros como AtSUC3 que se expresan en tejidos demanda (21) probablemente permitan la entrada de sacarosa a los tejidos que la metabolizan. La afinidad de los transportadores por la sacarosa es variable, por ejemplo los

transportadores SUT1 y SUT2 presentan una alta afinidad (K_M entre 0.5-2 mM). Por otro lado, el transportador de sacarosa SUT4 posee una K_M 11.6 mM que es diez veces mayor al de SUT2 (22).

Una parte de las moléculas de sacarosa que se liberan al apoplasto es hidrolizada por la invertasa asociada a la pared celular, la cual juega un papel muy importante, ya que puede controlar la composición de azúcares solubles que pueden ser asimilados (23).

La actividad de la invertasa de pared se incrementa en tejidos donde la expansión celular es alta, su actividad ayuda a mantener grandes diferencias entre las concentraciones de sacarosa del floema y la de células de los tejidos demanda. Al mismo tiempo impide que los transportadores de sacarosa (SUTs) localizados en la membrana del complejo ECs/CAs recarguen al floema (18). Estudios con plantas transgénicas han permitido establecer la importancia de la actividad la invertasa de pared en la fisiología de las plantas (24). En plantas de zana-horia su represión por RNAm antisentido produjo una marcada disminución en el crecimiento de la raíz y un aumento en el número de hojas (25).

Muchos de los transportadores de monosacáridos estudiados se expresan preferencialmente en las membranas plasmáticas de las células de los tejidos demanda y se ha propuesto que son los responsables de incorporar glucosa y fructosa resultantes de la hidrólisis de sacarosa por invertasas (26).

Los transportadores de hexosas pertenecen a familias génicas de muchos miembros, por ejemplo, en *Arabidopsis* se han identificado 26 secuencias, algunos de los cuales son llamados transportadores de azúcares (AtSTPs) (3). De igual forma, sus secuencias de aminoácidos han permi-

tido clasificarlos como miembros MFS. Igual que los transportadores de sacarosa (SUTs) los miembros de esta familia se caracterizan por tener una estructura con doce regiones transmembranales (19). Algunos de ellos han sido clonados y expresados en sistemas heterólogos como levadura u oocitos de *Xenopus*, donde se ha caracterizado su funcionalidad. Todos los que se han estudiado tienen un mecanismo que es dependiente de energía (H^+ /simporter) (26).

El análisis de estos transportadores ha puesto de manifiesto la importancia del transporte de sacarosa y hexosas en la fisiología de las plantas. La sobreexpresión del transportador de sacarosa de papa StSUT1 bajo el control de promotor de vicilina en el parénquima de cotiledones de chícharo duplicó el transporte de sacarosa e incrementó la cantidad de fotosintatos almacenados en las semillas (27). En tabaco se sobreexpresó el transportador de hexosas *VvHTI* proveniente de uva, lo cual produjo un aumento significativo en la relación parte aérea/raíz (28).

CAMBIOS DE LAS RUTAS DE DESCARGA DE FOTOSINTATOS

Durante el desarrollo de las plantas la ruta de descarga puede sufrir cambios y adecuarse a las necesidades de los tejido demanda.

En *A. thaliana* el colorante 5(6)-carboxifluoresceína (CD) que es incapaz de cruzar membranas, difunde libremente en el ápice de la raíz, sugiriendo que allí la descarga es fundamentalmente vía simplasto mientras que en otras regiones la descarga del floema es fundamentalmente vía apoplástica (29). En tubérculo de papa y en frutos de jitomate la vía de descarga del floema presenta cambios ligados al desarrollo. En etapas iniciales del desarrollo del tubérculo de papa la descarga del floema es predominante vía apoplasto. A medida que

el tubérculo se expande, comienzan a aparecer plasmodesmos, de tal forma que durante el periodo de máxima acumulación de almidón la descarga del floema es fundamentalmente por la vía simplasto (13). En el fruto del jitomate sucede lo contrario, durante las primeras etapas del desarrollo la descarga del floema hacia las células del parénquima del fruto es por vía simplasto, cuando alcanza la etapa verde maduro, el plasmodesmata comienza a desaparecer y la descarga vía apoplasto se vuelve predominante (30).

Se ha sugerido que la vía de descarga predominante y los cambios que ésta pudiera sufrir, están relacionados con el tipo de metabolitos que se acumulan. Así por ejemplo, en el fruto de jitomate el cambio de la vía simplástica a apoplástica coincide con

la acumulación de grandes cantidades de glucosa, fructosa, sacarosa y agua, lo cual puede hacer que las diferencias en presiones hidrostáticas entre el floema y las células demanda disminuyan o se inviertan, reduciendo la capacidad de asimilación de las células del fruto. La separación anatómica o la eliminación de los plasmodesmos que comunican los tejidos vasculares y de demanda representan una solución que garantiza que la asimilación de azúcares continúe (30). En tubérculo de papa se ha observado el efecto contrario, la vía apoplástica cambia a vía simplástica para satisfacer la gran demanda de carbono que se requiere para la síntesis de almidón el cual a pesar de que se acumulan grandes cantidades modifica poco el potencial osmótico y favorece la descarga vía simplasto (13).

PERSPECTIVAS

El uso de herramientas bioquímicas y moleculares ha permitido ubicar una serie de factores clave en la regulación de las relaciones entre los tejidos fuente y demanda. Sin embargo, hay experimentos que demuestran la importancia de diversas hormonas (citocininas, ABA, giberelinas, auxinas y brasinoesteroides) sobre la actividad de ciertas enzimas clave del metabolismo de los azúcares, por lo que es necesario realizar estudios que permitan establecer su papel en la distribución de fotosintatos. Además, la forma en que los tejidos demanda asimilan fotosintatos sufre transiciones durante el desarrollo, por lo que será necesario estudiar las diferentes etapas de crecimiento para entender cómo se ajusta el metabolismo a dichos cambios.

REFERENCIAS

1. Eschrich W (1980) Free space invertase, its possible role in phloem unloading. *Berichte der Deut. Botan. Gesell.* 93: 363-378.
2. Rolland F, Moore B, Sheen J (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, S185-S205, supplement 2002.
3. Buchanan B, Gruisen W, Jones R (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Amer. Soc. Plant Physiol. Rockville, USA, p 730-784.
4. Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Baker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999) The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell*. 11: 707-726.
5. Patrick JW (1997) Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 28: 165-190.
6. Sonnewald U, Hebers K (1998) Molecular determinants of sink strength. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 207-216.
7. Oparka KJ, Santa Cruz S (2000) The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 323-347.
8. Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holtst M, Frommer WB, Patrick JW (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell and Environment*. 26: 37-56.
9. Chang AB, Lin R, Studley WK, Trand and Milton. CV (2004) Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Mol. Mem. Biol.* 21: 171-181.
10. Orlich G, Hofbrück M and Schulz A (1998) A symplastic flow of sucrose contributes to phloem loading in *Ricinus cotyledons*. *Planta*. 206: 108-116.
11. Münch E (1930) *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Fisher, Jena, Germany.
12. Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Macharay GC, Oparka KJ (2001) Tuberisation in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell*. 13: 385-398.
13. Koch K (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 235-246.
14. Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 7: 97-107.

15. D' aoust MA, Yelle S, Nguyen-Quoc B (1999) Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell*. 11: 2407-2418.
16. 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: 309-322.
17. Ruan YL, Patrick JW, Furbank RT (2001) The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. *Plant Cell*. 13: 47-60.
18. Lalonde S, Wipf D, Frommer WB (2004) Transport mechanism for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55: 341-372.
19. Aoki N, Hirose T, Scofield EN, Whitfield PR, Furbank RT (2003) The sucrose transporter gene family in rice. *Plant Cell Physiol.* 44: 223-234.
20. Truernit E, Sauer N (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC 2- sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading by SUC2. *Planta*. 196: 564-570.
21. Meyer S, Melzar M, Truernit EH, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N (2000) AtSUC3, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cell adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant Journal*. 24: 869-882.
22. Wiese A, Baker L, Kühn C, Lalonde S, Bushmann H, Frommer WB, Ward JM (2000) A New subfamily sucrose transporter, SUC4, with low affinity /high capacity localized in enucleated sieve elements of plant. *Plant Cell*. 12:1345-1355.
23. Roitsch T, Ehness R, Goetz M, Hause B, Hofmann M, Sinha AK (2000) Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signalling. *Aus. J. Plant Physiol.* 27: 815-825.
24. Roitsch T, Gonzales MC (2004) Function and regulation of plant invertases: sweets sensations. *Trends in Plant Science*. 9: 606-613.
25. Tang GQ, Lüscher M, Sturm A (1999) Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrots alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell*. 11: 177-189.
26. Tanner E, Caspari T (1996) Membrane transport carriers. *Ann Rev. Plant Mol. Biol.* 47: 595-626.
27. Rosche E, Blackmore D, Tegeder M, Richardson T, Schroeder H, Higgins TJ, Frommer WB, Offler CE, Patrick JW (2002) Seed-specific overexpression of a potato sucrose transporter increases sucrose uptake and growth rates of developing pea cotyledons. *Plant J.* 30: 165-175.
28. Letterier M, Atanassova R, Laquitaine L, Gaillard C, Coutus-Thévenot P, Delrot S (2003) Expression of a putative grapevine hexose transporter in tobacco alters morphogenesis and assimilate partitioning. *J. Exp. Bot.* 54: 1193-1204.
29. Oparka KJ, Duckett CM, Prior DAM, Fisher DB (1994) Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *Plant J.* 6: 759-766.
30. Ruan YL, Patrick JW (1995) The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta*. 196:434-444.
31. Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Massachusetts, USA, p 287-293.