



Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la regulación de genes implicados en el metabolismo carbonado en plantas de tomate (*Solanum esculentum*)



Sonia García Rodríguez
Tesis Doctoral
Granada, 2006



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sonia García Rodríguez
D.L.: Gr. 2495 - 2006
ISBN: 84-338-4185-8

UNIVERSIDAD DE GRANADA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la
regulación de genes implicados en el metabolismo
carbonado en plantas de tomate
(*Solanum esculentum*)**

SONIA GARCÍA RODRÍGUEZ

TESIS DOCTORAL
Granada, 2006

**Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la regulación
de genes implicados en el metabolismo carbonado en
plantas de tomate (*Solanum esculentum*)**

Memoria que presenta la Licenciada en
Bioquímica Sonia García Rodríguez
para aspirar al Título de Doctor

Fdo. Sonia García Rodríguez

VºBº
Las Directoras

Fdo. D^a. Concepción Azcón González de Aguilar
Doctora en Biología
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Fdo. D^a. Nuria Ferrol González
Doctora en Química
Científico Titular del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2006

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada, y financiada mediante una beca predoctoral I3P del C.S.I.C para "Desarrollo de Tesis Doctoral en líneas de investigación con interés para el sector industrial" (conv. B.O.E. 24/10/01).

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	IX
INTERÉS DEL TRABAJO, OBJETIVOS Y APOORTE CIENTÍFICO	1
INTRODUCCIÓN	7
1. MICORRIZAS	9
1.1. Tipos de asociaciones micorrícicas	9
2. LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES	11
2.1. Generalidades de los hongos que forman micorrizas arbusculares	11
2.2. Taxonomía de las micorrizas arbusculares	13
2.3. Ciclo de vida de los hongos formadores de micorrizas arbusculares	16
2.4. Fisiología de la simbiosis	23
2.4.1. Intercambio de nutrientes en micorrizas arbusculares	24
2.4.1.1. <i>Absorción de nutrientes minerales del suelo</i>	25
2.4.1.1.A Nutrición fosforada	25
2.4.1.1.B Nutrición nitrogenada	27
2.4.1.1.C Micronutrientes	29
2.4.1.2. <i>Metabolismo del carbono en los hongos micorrícicos</i>	30
2.4.1.3. <i>Metabolismo del carbono en las plantas micorrizadas</i>	31
3. REGULACIÓN DEL METABOLISMO CARBONADO EN PLANTAS SUPERIORES	33
3.1. Sistemas de transporte de azúcares en plantas superiores	33
3.2. Estudio de la regulación del metabolismo de carbono de las plantas mediante las interacciones planta-microorganismo	35
3.3. Localización y regulación de la actividad de las enzimas clave en el metabolismo de la sacarosa	38
3.3.1. Enzimas implicadas en la síntesis de sacarosa	41
3.3.1.1. <i>Sacarosa-fosfato sintasa</i>	41
3.3.2. Enzimas implicadas en la degradación y utilización de sacarosa	43
3.3.2.1. <i>Invertasas</i>	44
3.3.2.2. <i>Sacarosa sintasa</i>	48
3.3.2.3. <i>Enzimas que degradan sacarosa y micorrizas</i>	52
3.4. Fructanos	52

3.4.1. Relación de las FEHs y las fructosiltransferasas con las invertasas	56
3.4.2. FEHs en plantas que no sintetizan fructanos	57
3.4.3. Fructosiltransferasas	58
3.4.3.1. <i>En plantas</i>	58
3.4.3.2. <i>En hongos</i>	59
3.4.3. Fructanos en micorrizas arbusculares	59
3.5. Transportadores de azúcares	60
3.5.1. Transportadores de sacarosa	61
3.5.2. Transportadores de monosacáridos	62
3.6. Metabolismo de los carbohidratos en ectomicorrizas	63
3.7. Metabolismo de los carbohidratos en tomate	65
MATERIALES Y MÉTODOS	69
1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	71
1.1. Material vegetal	71
1.1.1. Planta utilizada	71
1.1.2. Cultivo de plantas	71
1.1.2.1. <i>Substrato: composición y esterilización</i>	71
1.1.2.2. <i>Esterilización, germinación y siembra de las semillas</i>	71
1.1.2.3. <i>Solución nutritiva para las plantas</i>	71
1.1.2.4. <i>Condiciones de crecimiento en invernadero</i>	72
1.1.2.5. <i>Cosecha de distintos órganos</i>	73
1.1.2.6. <i>Aplicación de fitohormonas y azúcares</i>	73
1.1.3. Determinaciones fisiológicas	73
1.1.3.1. <i>Producción de biomasa</i>	73
1.2. Material fúngico	73
1.2.1. Hongos micorrícicos utilizados	73
1.2.2. Determinación de la micorrización	73
1.2.3. Estimación de la colonización micorrícica	73
1.2.4. Hongos patógenos utilizados, aplicación y determinación de la infección	74
1.3. Experimentos	75
1.3.1. Experimento 1	75
1.3.2. Experimento 2	75
1.4. Material bacteriano	75

1.4.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	75
1.4.2. Medios de cultivo	76
1.4.2.1. Medio LB (<i>Luria-Bertani</i>)	76
1.4.2.2. Medio SOC	76
1.4.3. Marcadores de selección	77
1.4.4. Preparación de células quimiocompetentes	77
1.4.5. Preparación de células electrocompetentes	78
1.5. Cepas de levadura	78
1.5.1. Cepas de levadura utilizadas	78
1.5.2. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	79
1.5.2.1 Medio YPD (<i>Yeast extract-Peptone-Dextrose</i>)	79
1.5.2.2. Medio SD (<i>Synthetic-Dextrose</i>)	79
1.6. Mantenimiento de las cepas	80
2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	80
2.1. Plásmidos	80
2.2. Aislamiento de ADN	81
2.2.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	81
2.2.2. Extracción de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	81
2.2.3. Extracción de ADN genómico de <i>tomate</i>	82
2.2.3.1. Tratamiento con RNasa del ADN genómico de <i>tomate</i>	83
2.2.4. Extracción de ADN genómico <i>Gomus mosseae</i>	83
2.3. Cuantificación de ADN	83
2.4. Visualización del ADN mediante electroforesis en geles de azarosa	84
2.5. Southern blot	84
2.5.1. Digestión del ADN genómico	84
2.5.2. Electroforesis en gel de agarosa y transferencia a membrana	85
2.5.3. Síntesis de la sonda marcada radiactivamente mediante PCR	86
2.5.4. Purificación de las sondas marcadas radioactivamente	87
2.5.5. Pre-hibridación e hibridación	87
2.5.6. Detección y revelado	87
2.6. Reacción en cadena de la polimerasa	87
2.7. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	90
2.8. Desfosforilación de vectores de clonación	90
2.9. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	90

2.10. Ligación en vectores de clonación	91
2.10.1. Productos de PCR	91
2.10.1.1. Ligación en <i>pGEM-T Easy</i>	91
2.10.1.2. Ligación en <i>pYES 2.1 TOPO TA</i>	91
2.10.2. Ligación de fragmentos de restricción	91
2.11. Transformación	92
2.11.1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	92
2.11.1.1. Transformación de células quimiocompetentes	92
2.11.1.2. Transformación de células electrocompetentes	92
2.11.2. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	93
2.12. Purificación de ADN plasmídico	93
2.13. Paseo cromosómico	94
2.14. Extracción de ARN	94
2.14.1. Extracción de ARN de tomate	94
2.14.2. Extracción de ARN de <i>Sacharomices cerevisiae</i>	96
2.14.3. Cuantificación del ARN	96
2.14.4. Visualización del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa	96
2.14.5. Tratamiento del ARN con DNasa	97
2.15. Técnicas de RACE	98
2.16. Análisis de PCR cuantitativa a tiempo real	98
2.16.1. Retrotranscripción <i>in vitro</i> : síntesis de ADNc	98
2.16.2. PCR cuantitativa a tiempo real	99
2.17. Secuenciación	100
3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS	100
3.1. Técnicas bioquímicas	100
3.1.1. Extracción de proteínas totales de levadura	100
3.1.2. Cuantificación de proteínas	101
3.2. Determinaciones enzimáticas	101
3.2.1. Determinación de la actividad invertasa en extractos proteicos de levadura	101
3.2.2. Determinación de la actividad fructoexohidrolasa en extractos proteicos de levadura	102
4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	103
4.1. Determinación de azúcares solubles	103
4.2. Determinación de sacarosa, glucosa y fructosa	103
5. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS	104

5.1. Identificación de secuencias de interés en bases de datos	104
5.2. Diseño de cebadores	104
5.3. Comparación de secuencias	104
5.4. Análisis de promotores	104
5.5. Obtención de la secuencia aminoacídica	105
5.6. Predicción de la topología de proteínas transmembrana	105
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	105
RESULTADOS	107
1. DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA SIMBIOSIS EN LA CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE LA PLANTA HOSPEDADORA	109
1.1. Efecto de la colonización micorrícica sobre el contenido de azúcares solubles totales	109
1.2. Efecto de la colonización micorrícica sobre el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa	110
1.3. Efecto de la colonización micorrícica sobre las enzimas implicadas en la fijación de carbono	112
2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS IMPLICADAS EN LA HIDRÓLISIS DE SACAROSA (invertasa y sacarosa sintasa)	114
2.1. Clonación de genes que codifican invertasas en raíces micorrizadas	
2.1.1. Clon genómico de Lin10	121
2.2. Análisis funcional de los genes clonados Lin9 y Lin10	123
2.2.1. Expresión heteróloga de Lin9 y Lin10 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	123
2.2.2. Determinación de la actividad invertasa en extractos proteicos de levadura	125
2.2.3. Determinación de la actividad fructo-exohidrolasa en extractos proteicos de levadura transformada con pLin10	126
2.3. Regulación por el desarrollo de la simbiosis de la expresión de los genes aislados y de otras isoformas presentes en la base de datos	127
2.3.1. Regulación de la expresión génica en raíces	129
2.3.2. Regulación de la expresión génica por el fósforo suministrado	132
2.3.3. Regulación de la expresión génica en raíces por el patógeno de raíz <i>Phytophthora parasitica</i> (Phy)	134

2.4. Búsqueda y análisis de los promotores de los genes que se regulan por la simbiosis	136
2.4.1. Regulación de los genes de invertasas y fructo-exohidrolasa de tomate por azúcares y hormonas	138
2.5. Análisis de la regulación de la expresión de genes que codifican la sacarosa sintasa de tomate durante la simbiosis micorrícica	140
2.5.1. Regulación de la expresión génica en raíces	140
2.5.2. Regulación de la expresión génica de TOMSSF por el fósforo suministrado	140
2.5.3. Regulación de la expresión génica en raíces por el patógeno de raíz <i>Phytophthora parasitica</i> (Phy)	141
2.5.4. Búsqueda y análisis del promotor de TOMSSF	142
2.6. Análisis de la expresión de los genes Lin9 y Lin10 en los distintos órganos de la planta de tomate	145
2.7. Análisis de la expresión de los genes analizados en hojas	147
3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN TRANSPORTADORES DE AZÚCARES EN PLANTAS MICORRIZADAS	148
3.1. Clonación de genes que codifican transportadores de hexosas en raíces micorrizadas	149
3.2. Expresión heteróloga de <i>LeST3</i> en levadura	154
3.3. Análisis de la regulación por la simbiosis del gen identificado	154
3.3.1. Regulación de la expresión génica en raíces	154
3.3.2. Regulación de la expresión génica en raíces por el fósforo suministrado	155
3.3.3. Regulación de la expresión génica en hojas	156
3.3.4. Regulación de la expresión génica por el patógeno de raíz <i>Phytophthora parasitica</i> (Phy)	156
DISCUSIÓN	159
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFÍA	179

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AS	Ácido salicílico
BAS	Estructura Ramificada de Absorción
DEPC	Dietyl-pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Etilen-diamino-tetraacético
FEH	Fructano exohidrolasas
FFT	Fructosiltransferasa
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
MOPS	Ácido 4-Morfolinopropanosulfónico
MA	Micorrizas arbusculares
PEG	Polietilenglicol
RuBisCo	Ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SPS	Sacarosa-6fosfato-sintasa
SS, SuS	Sacarosa sintasa
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

**INTERÉS DEL TRABAJO, OBJETIVOS
Y APORTE CIENTÍFICO**

En términos de Agricultura Sostenible, se recomienda un uso mínimo de productos en cuya composición o preparación intervengan materias o procesos producidos con un gasto de energías no renovables o bien que resulten contaminantes de los agrosistemas. Por ello, se preconiza la utilización y optimización de los recursos naturales, entre los cuales los microorganismos del suelo son protagonistas destacados (Barea, 1991). La mayoría de las plantas terrestres viven asociadas, formando simbiosis mutualísticas, con ciertos hongos del suelo, dando lugar a las llamadas "micorrizas" (hongo-raíz). Existen distintos tipos de micorrizas, de las cuales son las micorrizas arbusculares (MA) las más extendidas en la naturaleza. La importancia ecológica y económica de las MA está avalada por su presencia en más del 80% de las especies vegetales. Entre ellas se encuentran leguminosas herbáceas y leñosas, cereales, árboles frutales y otras de interés en hortofruticultura, industria o en revegetación de suelos degradados (Azcón-Aguilar & Barea, 1997). En las MA el hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, sobre la que desarrolla un micelio extenso altamente efectivo que ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales, especialmente fosfato, y agua del suelo. A su vez, la planta hospedadora proporciona nutrientes orgánicos al hongo simbiote (Azcón-Aguilar & Bago, 1994). Este intercambio bidireccional de nutrientes entre ambos simbioses ocurre a nivel de los arbusculos, estructuras típicas de colonización que el hongo desarrolla en las células corticales. Las micorrizas juegan un papel clave en la supervivencia de las plantas y en el reciclaje de nutrientes en el ecosistema (Requena et al., 2001). La optimización de las actividades de los hongos MA y la manipulación racional de la simbiosis es crucial para mantener niveles de productividad sostenidos mediante prácticas respetuosas con el medio ambiente. La aproximación finalista para desarrollar una biotecnología que permita aplicar dichos hongos en cultivos de interés necesita de una investigación básica apropiada, ya que se ignoran los mecanismos moleculares implicados en la transferencia de nutrientes entre ambos organismos y de aquellos que controlan la eficiencia simbiótica de una determinada asociación.

En consecuencia, se propuso como **objetivo general** de esta Tesis Doctoral el profundizar en el estudio de los cambios inducidos por el desarrollo de la simbiosis en el metabolismo carbonado de las raíces hospedadoras, con el fin de obtener evidencias sobre los mecanismos que controlan la transferencia de nutrientes de la planta al hongo. Para ello se ha seguido una aproximación molecular y se ha investigado la regulación por parte de las micorrizas arbusculares de genes implicados en el metabolismo carbonado de la planta. Los resultados obtenidos se integraran en el modelo general de funcionamiento de la simbiosis y

se discutirán en el contexto de su relevancia en la integración funcional de ambos simbioses.

Para abordar ese objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1.-Determinar los cambios inducidos por el desarrollo de la simbiosis en la concentración de carbohidratos de la planta hospedadora.

2.- Aislar y caracterizar genes que codifican enzimas implicadas en la hidrólisis de sacarosa (invertasa y sacarosa sintasa).

2.1. Clonación de genes que codifican invertasas en raíces micorrizadas.

2.2. Análisis funcional de los genes clonados.

2.3. Regulación por el desarrollo de la simbiosis de la expresión de los genes aislados y de otras isoformas presentes en las bases de datos.

2.4. Búsqueda y análisis de los promotores de los genes de invertasa que se regulan por el desarrollo de la simbiosis.

2.5. Análisis de la regulación de la expresión de genes que codifican la sacarosa sintasa de tomate durante la simbiosis micorrízica.

3.- Aislar y caracterizar genes que codifican transportadores de azúcares en plantas micorrizadas.

3.1. Clonación de genes que codifican transportadores de hexosas en raíces micorrizadas.

3.2. Análisis de la regulación por la simbiosis de los genes identificados.

APORTE CIENTÍFICO

Los resultados de la investigación supondrán un avance en los conocimientos de cómo se regula el metabolismo carbonado de la planta como consecuencia del establecimiento de la simbiosis y de cómo se produce el intercambio de compuestos carbonados por parte de la planta al hongo en la simbiosis MA. Estos conocimientos permitirán desde el mayor entendimiento a nivel molecular mejorar el rendimiento de la simbiosis, lo que se traducirá en una mejora del estado nutricional de la planta. Esta mejora permitirá obtener plantas más saludables, lo que significa tener plantas más resistentes a los distintos estreses medioambientales, lo que a su vez hará a estas plantas mejores candidatas para su utilización en la recuperación de ambientes degradados. Además la identificación de genes implicados en el metabolismo carbonado de la planta que se regulan como consecuencia del establecimiento de la simbiosis, permitirá desarrollar marcadores moleculares que

puedan utilizarse como indicadores de eficiencia simbiótica de una determinada asociación micorrícica.

INTRODUCCIÓN

1. MICORRIZAS

El término "micorrizas" hace referencia a las asociaciones simbióticas mutualistas que se establecen entre las plantas y ciertos hongos del suelo, siendo este tipo de simbiosis la más extendida en cuanto a hábitats (Barea & Azcón-Aguilar 1983) y a al número de plantas superiores capaces de formar dicha asociación, ya que entorno al 90% de las plantas terrestres son capaces de establecer algún tipo de micorrizas (Smith & Read 1997). Este término (procedente del griego "mikos", hongo, y "rriza", raíz) fue utilizado por primera vez por Frank (1885) pero no es hasta mediados del siglo XX cuando se empieza a poner de manifiesto el significado y la importancia de estas asociaciones, así como su presencia en la casi totalidad de los sistemas suelo-planta (Barea & Jeffries 1995). La razón principal por la que esta asociación simbiótica se mantiene en el tiempo, se debe a la mejora de la nutrición mineral que el hongo le proporciona a la planta hospedadora, de forma, que la colonización de la superficie terrestre por parte de las plantas, fue mediada posiblemente por el establecimiento de esta simbiosis (Simon *et al.* 1993; Redecker *et al.* 2000). Pero no es esta la única ventaja que las micorrizas proporcionan a las plantas, sino que contribuyen también a su protección frente a estreses bióticos (patógenos del suelo) y abióticos (salinidad, sequía, presencia de metales pesados) (Van Tichelen *et al.* 2001, Azcón-Aguilar *et al.* 2002; Ruiz-Lozano 2003). Por su parte, la planta hospedadora proporciona al hongo los compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis necesarios para su desarrollo.

1.1 Tipos de asociaciones micorrícicas

Atendiendo a la estructura y al tipo de plantas y hongos implicados, se pueden distinguir tres grandes grupos de Micorrizas (Fig. 1):

- a) Endomicorrizas: son las más extendidas en la naturaleza y tienen como característica principal, que sus hifas penetran en el interior de las células del córtex y/o epidermis de la raíz. Otra característica es que no forman manto. Dentro de este grupo se distinguen varios subgrupos:
 - a.1) Ericoides. En este caso, las plantas participantes en la asociación simbiótica son de la familia de las Ericáceas y los hongos pueden ser ascomicetos o basidiomicetos. La característica a destacar de los hongos que forman esta simbiosis, es su gran versatilidad en cuanto al uso de fuentes de C, N y P, ya sean de origen orgánico o no. Esta característica fúngica, confiere parte de la capacidad a las plantas que forman este tipo de Micorrizas, para crecer en suelos con un

elevado contenido en materia orgánica (Pearson & Read 1975; St-John *et al.* 1985).

a.2) Orquidoides. Formadas entre plantas de la familia Orquidaceae y hongos basidiomicetos. En la fase heterótrofa del ciclo de vida de esta familia de plantas, ésta, recibe compuestos carbonados a partir del hongo (Smith 1966). Como características morfológicas del hongo, cabe destacar que tras penetrar en las células de la raíz forma ovillos dentro de la célula hospedadora previa invaginación de la membrana plasmática, así como agregados poco organizados de hifas (pelotones) que liberan los nutrientes cuando degeneran.

a.3) Arbusculares. Los hongos implicados en la formación de micorrizas arbusculares, pertenecen al phylum Glomeromycota (Shüßler *et al.* 2001), y dicha asociación la realizan con la mayoría de las plantas terrestres (entre el 80 y el 85%) (Smith & Read 1997). La principal característica morfológica de estos hongos es su ramificación dicotómica repetida una vez que han penetrado en las células del córtex de la raíz, para la formación de los arbuscúlos, estructuras típicas de la colonización de dichos hongos. Algunas especies de estos hongos forman otras estructuras en el interior de la raíz llamadas vesículas, que contienen sustancias de reserva y por las que también se ha conocido a estos hongos con el nombre de vesículo-arbusculares.

- b) Ectomicorrizas: se ponen de manifiesto principalmente en especies de plantas con interés forestal como Fagáceas, Betuláceas, Pináceas, etc..., suponiendo tan solo el 3% del total de las asociaciones micorrícicas. Se caracterizan principalmente porque las hifas del hongo limitan su desarrollo a los espacios intercelulares del córtex, no llegando a penetrar nunca en las células vegetales de la raíz. Este modo de desarrollo en el interior de la raíz, da lugar una estructura característica denominada red de Hartig. Y en el exterior, un entramado de hifas rodea la raíz dando lugar al llamado "manto" (Smith & Read 1997). Los hongos que forman este tipo de Micorrizas son fundamentalmente basidiomicetos, aunque también algunos ascomicetos.
- c) Ectendomicorrizas: presentan características comunes con los dos tipo de micorrizas expuestos anteriormente y son las menos extendidas. Con las ectomicorrizas tienen en común que pueden formar un "manto" más o menos desarrollado y red de Hartig, y con las endomicorrizas, que existe una ligera penetración de las hifas en las células de la corteza formando

enrollamientos u ovillos (Yu *et al.* 2001). Los hongos que forman estas micorrizas, son basidiomicetos, y las plantas tipo de estas asociaciones son fundamentalmente arbutoides o monotropales, pudiendo no obstante también formar ectendomicorrizas con árboles de la misma zona.

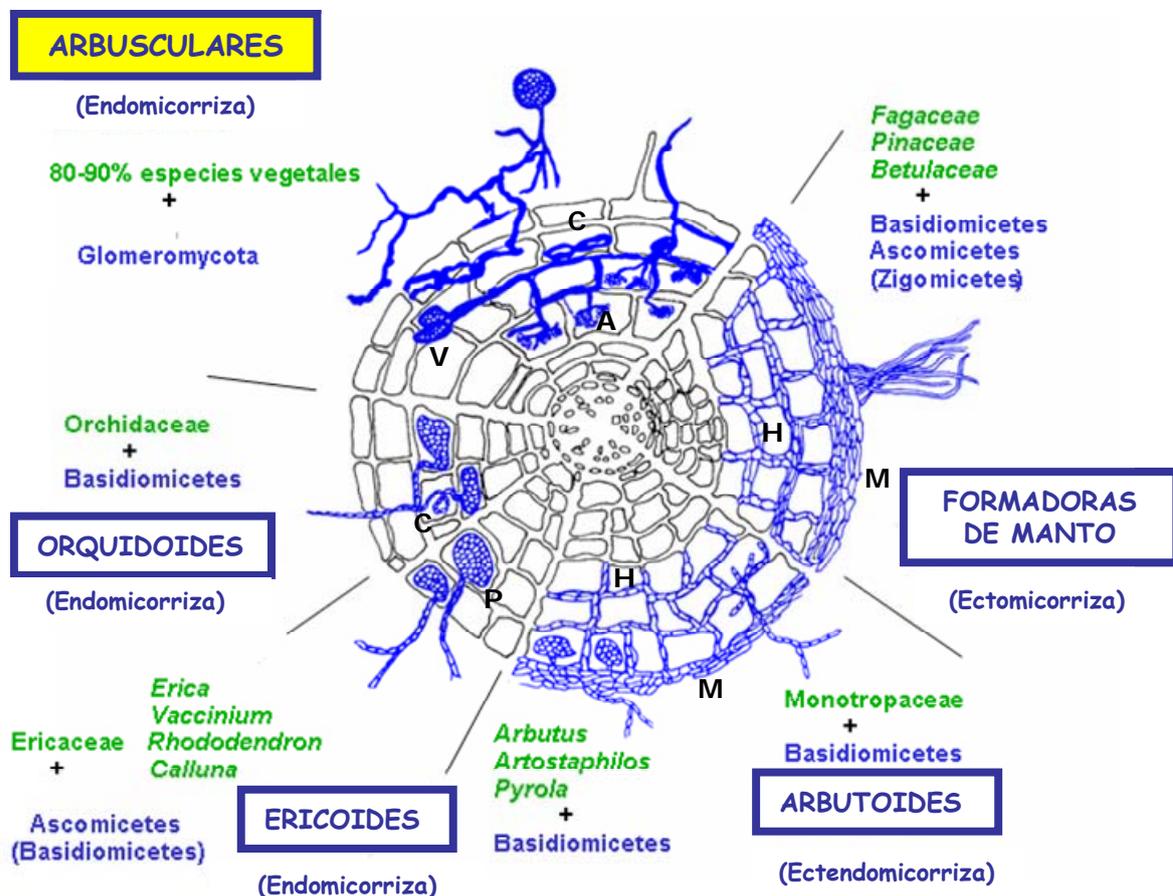


Figura 1. Tipos de micorrizas y simbiontes implicados en su formación. Se representa en azul el desarrollo del micelio en cada tipo de micorriza. Leyenda: M= manto, H = red de Hartig, P= agregados de hifas o "pelotones", C=ovillos o "coils", A=arbuscúlos, V=vesículas. Modificación de esquema cedido por el Dr. Barea.

2. LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES

2.1 Generalidades de los hongos que forman micorrizas arbusculares

La simbiosis micorrícico arbuscular, formada entre hongos del suelo y las plantas vasculares tiene una larga historia, con registros fósiles que ponen de manifiesto la existencia de hongos micorrícico arbusculares en las raíces de las primeras plantas terrestres de más de 400 millones de años (Remy *et al.* 1994). Sin embargo, estudios de secuencias y de fósiles de esporas, datan la existencia de las micorrizas arbusculares incluso anterior, hace más de 460 millones de años, lo que sugiere un papel importante de estos hongos en la transición de la vida

acuática a la terrestre de las plantas (Simon et al. 1993; Redecker *et al.* 2000). Hoy en día, la capacidad de formar este tipo de asociaciones esta ampliamente distribuida por todo el reino vegetal incluyendo angiospermas (al menos el 80% son capaces de formar simbiosis micorrízico arbuscular), gimnospermas, pteridofitos, y algunos briofitos (Newman & Reddell 1987; Smith & Read 1997). Solo algunas familias, entre ellas las Cruciferae, Fumariaceae, Chenopodiaceae, Urticaceae y Polygonaceae, poseen especies que normalmente no forman este tipo de simbiosis (Trappe 1986). Como microorganismos biotrofos obligados que son, los hongos micorrízicos necesitan de una planta susceptible de ser colonizada para establecer la simbiosis, y así, poder completar su ciclo de vida. Esta característica de simbiosis obligados, da idea de la relación tan estrecha de dichos hongos con las plantas terrestres con las que forman la simbiosis.

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares no tienen fase de reproducción sexual, o al menos no se conoce aún, pero si son capaces de formar esporas de resistencia sobre hifas vegetativas. Dichas esporas son multinucleadas, y el número de núcleos es muy variable dependiendo del hongo en cuestión, encontrando esporas con 72 núcleos en el caso de *Scutellospora castanea* (Hosny *et al.* 1998), y otras con hasta 2600 en el caso de especies del género *Gigaspora* (Cooke et al. 1987; Bécard & Pfeffer 1993). El tamaño del ADN contenido en las esporas también es muy variable, dependiendo de la especie del hongo micorrízico, pudiendo ir desde las 16.54 Mb de *Glomus intraradices* (Hijri & Sanders 2004), hasta las 1058 Mb descritas por Hosny y colaboradores en 1998 para *Scutellospora gregaria*. Estos datos, indican que los hongos micorrízico arbusculares tienen un genoma más largo que otros hongos. El genoma haploide (Hijri & Sanders 2004 y 2005) de los hongos micorrízicos, esta formado tanto por secuencias de copia única, como por secuencias repetidas (aproximadamente el 1.6% en *Glomus intraradices*) (Hijri & Sanders 2004). Un número creciente de secuencias génicas obtenidas de esporas individuales de *G. caledonium*, *G. geosporum* y *G. mosseae* (Skuklenbrock & Rosendahl 2005), indican que el grado de duplicación génica en los hongos micorrízicos, debe estar más limitado, involucrando solo a regiones específicas del genoma. También, se han encontrado en genoma de estos hongos, secuencias con homología a Long Terminal-Repeats (LTRs). Otra característica de dicho genoma fúngico, es el bajo contenido de GC que forman parte del mismo, sólo el 30-35%, y casi el 25% de la cisteína esta metilada (Hosny *et al.* 1997), siendo este porcentaje demasiado alto para tratarse de hongos.

El estudio a nivel genético de estos hongos, se complica aún más si tenemos en cuenta indicios de que dentro de una misma espora, no todos sus núcleos son iguales, manifestándose polimorfismo a nivel del ADN ribosómico (Clapp *et al.*

2001). Sin embargo, debido a la estructura multinucleada de las esporas de los hongos micorrízico arbusculares, la fuente de ese polimorfismo intraesporal del ADN_r, no está todavía claro. La variación intrasporal de ARN_r podría estar contenida en su totalidad en un mismo núcleo individual (modelo homocariótico), o distribuida entre los diferentes núcleos (modelo heterocariótico) (Pawlowska & Taylor 2002; revisión Pawlowska 2005). Del mismo modo resulta polémico el tipo de multiplicación nuclear, con evidencias tanto a favor del modelo clonal, como a favor de la recombinación entre núcleos (Rosendahl & Taylor 1997; Vandenkoornhuyse *et al.* 2001).

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la fusión de hifas entre las hifas del micelio de un mismo individuo, ó entre micelio de individuos del mismo aislado (Giovannetti *et al.* 1999, 2001; de la Previdencia *et al.* 2005), evitando así dicha fusión entre individuos genéticamente diferentes. Por ejemplo, hifas de *Glomus mosseae* de aislados de distintas áreas geográficas, se acercan las unas a las otras, indicando la capacidad de reconocerse entre individuos de la misma especie. Sin embargo, la retracción del citoplasma desde los extremos de las hifas interrelacionadas y la formación de tabiques antes o durante el contacto entre las hifas, excluye la formación de un micelio heterocariótico (Giovannetti *et al.* 2003).

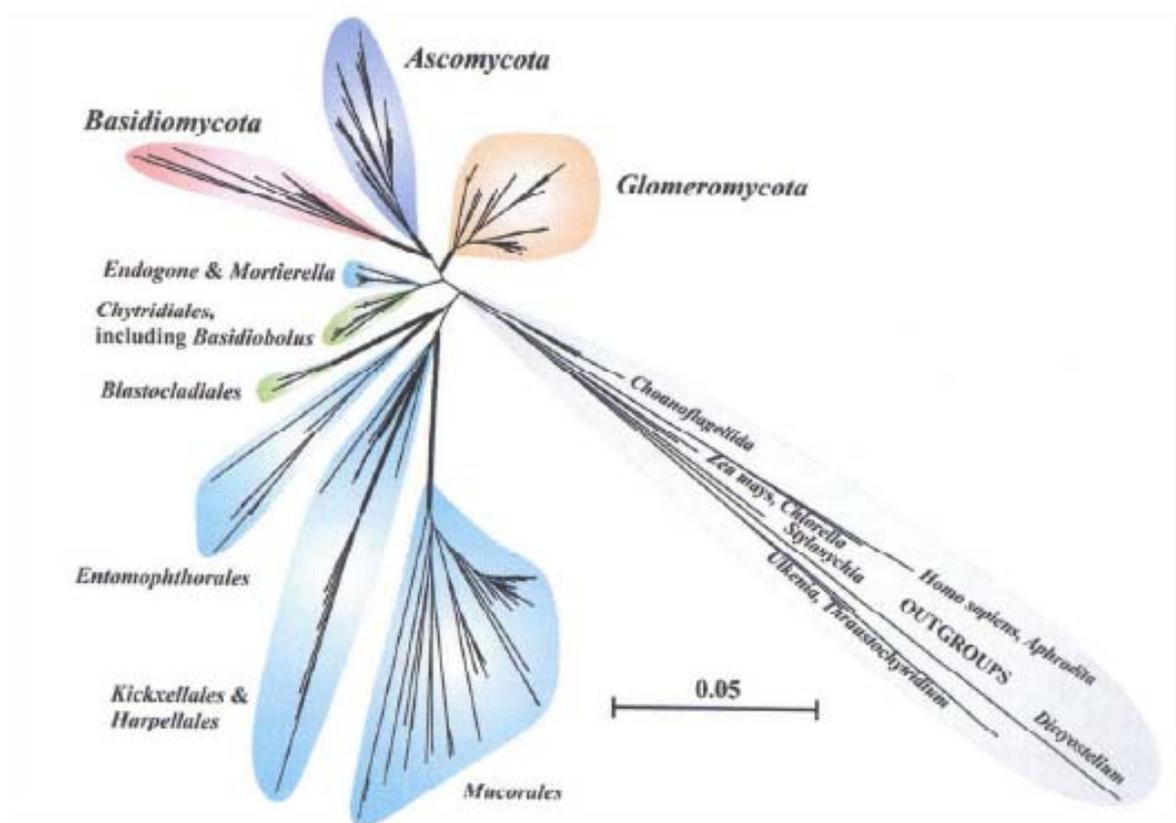
A pesar de todos estos datos, muchos aspectos de biología básica de los hongos micorrízico arbusculares, incluyendo estructura del genoma, variación genética dentro de un mismo individuo, y modo de reproducción, son muy poco conocidos. Estas lagunas en el conocimiento de dicho aspectos, entorpecen la investigación sobre los mecanismos de las interacciones de los hongos micorrízicos con las plantas tanto de forma individual como dentro de las comunidades, y su aplicación en la agricultura. Por lo tanto, queda una larga tarea de investigación hasta conocer los procesos genéticos que se dan en estos hongos (revisado por Pawlowska 2005).

2.2 Taxonomía de las micorrizas arbusculares

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares se consideraban hasta hace muy pocos años incluidos en la familia Endogonaceae, dentro del phylum Zygomycota, clasificación que estaba basada fundamentalmente en el análisis de las características morfológicas, estructurales y ontogénicas de las esporas que desarrollan (Gerdemann & Trappe 1974; Morton & Benny 1990; Redecker *et al.* 2000). De acuerdo con este criterio, las más de 150 especies descritas hasta la fecha, se incluyeron en el orden Glomales. Hasta entonces no se había puesto de manifiesto el posible origen monofilético de estos hongos compartiendo un ancestro común. Origen monofilético, que hoy en día se ha podido determinar en base al

análisis de la subunidad pequeña del ARNr 18S, agrupándose así en el nuevo phylum Glomeromycota. Dicho phylum, se encontraría más próximo de los ascomicetos y basidiomicetos, con los que compartiría un ancestro común, que con los zigomicetos (Schußler *et al.* 2001). Nuevo phylum, que está compuesto por una sola clase, los Glomeromycetes, que a su vez incluye cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaesporales (Figura 2B).

A



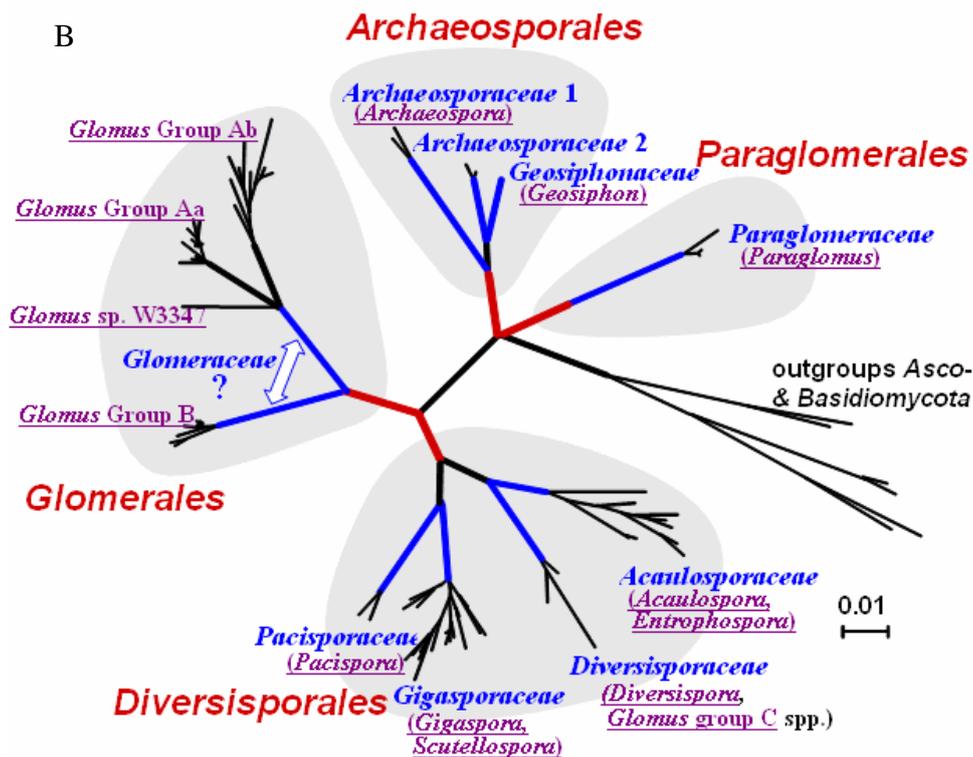


Figura 2. (A) Filogenia propuesta para los hongos formadores de micorrizas arbusculares basadas en las secuencias de la subunidad pequeña (SSU) del ARNr. Tomado de Schüßler *et al.* (2001). (B) Estructura taxonómica propuesta del phylum Glomeromycota en base a las secuencias de la SSU del ARNr.

Cada vez hay más evidencias de que la identificación basada en criterios morfológicos tiene un uso limitado, ya que la baja diversidad morfológica de las esporas de los hongos micorrícicos, no refleja la gran plasticidad fisiológica, diversidad genética, y posiblemente funcional de sus poblaciones aún por describir. Un ejemplo, es la escisión del género *Glomus*, en al menos tres grupos distintos en la nueva clasificación: *Glomus A*, *B* y *C*. Los grupos *A* y *B*, pertenecen al orden Glomerales, mientras que el grupo *C* pertenece a los Diversisporales.

Debido a la limitación de material fúngico disponible para ser analizado como consecuencia del carácter de simbioses obligados de estos hongos, la aplicación de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, PCR) ha supuesto un avance muy importante en la caracterización genética de estos microorganismos (Sanders *et al.* 1996; Clapp *et al.* 2002). Del mismo modo, técnicas como el análisis de los genes ribosómicos o metodologías como PCR-SSCP (Polimerase Chain Reaction-Single Strand Conformational Polimorfism) o PCR-TGGE (Polimerase Chain Reaction-Temperature Gradient Gel Electrophoresis), están ayudando a estudiar la diversidad de las poblaciones de los hongos micorrícicos (Chelius & Troplett 1999; Daniell *et al.* 2001; Fitter 2001; Clapp *et al.* 2001;

Prosser 2002). Todos estos avances en el análisis de la diversidad genética de los hongos formadores de micorrizas arbusculares, llevan a hacer muy difícil, una definición de especie, e incluso de individuo en estos hongos (Clapp *et al.* 2002).

2.3 Ciclo de vida de los hongos formadores de micorrizas arbusculares

Como se ha mencionado anteriormente, los hongos formadores de micorrizas arbusculares son simbioses estrictas, por lo que necesitan la raíz de una planta susceptible de ser colonizada para completar su ciclo de vida.

Se acepta que existen en el suelo tres formas de propágulos que se diferencian en su capacidad de supervivencia y potencial infectivo. Las tres formas son, las esporas, que son las formas de resistencia de estos hongos, los fragmentos de raíces micorrizadas de plantas preexistentes y por último, las redes de hifas que sobreviven en el suelo. Estos propágulos, pueden mantener su capacidad infectiva incluso tras permanecer en el suelo seco durante varios meses (Tommerup & Abbot 1981).

El ciclo de vida se inicia con la germinación de las esporas que los hongos micorrizicos producen de forma asexual, y que poseen un gran número de núcleos y de glóbulos lipídicos (Bécard & Pfeffer 1993). Esta primera fase, es un proceso independiente de la presencia o no de la planta hospedadora, requiriendo tan solo unas condiciones adecuadas de humedad y temperatura. No obstante, sí es cierto que determinados factores químicos, como elevadas concentraciones de CO₂, y biológicos, como la presencia de exudados radiculares (Bécard & Piché 1989), así como factores físicos, como exponer a las esporas durante unos días a temperaturas de 4°C (Hepper 1981), y los derivados de una amplia variedad de hongos y bacterias del suelo (Azcón-Aguilar *et al.* 1986; Azcón 1987; Hildebrandt *et al.* 2002) aceleran el ritmo de germinación de dichas esporas. El primer proceso que se da cuando germinan las esporas en condiciones favorables, es la formación de uno o varios tubos de germinación que pueden proliferar y formar un micelio que se extiende de forma radial y errática a través del suelo en busca de una planta hospedadora susceptible de ser colonizada (Giovannetti 2000; Giovannetti *et al.* 2002). La formación de los tubos de germinación va acompañada de una activación del metabolismo de la espora, provocando cambios en la estructura nuclear y la replicación del ADN (Sward 1981; Bonfante-Falsolo 1984). Como consecuencia de dicha replicación, durante la germinación el número de núcleos aumenta desde los 800-2000 que hay en una espora en reposo, hasta casi 30000. En cuanto a aspectos metabólicos, en los primeros días de su desarrollo, el tubo de germinación consume trehalosa (Bécard *et al.* 1991), pasando posteriormente a consumir triglicéridos (Beilby 1980). También incrementa la actividad mitocondrial

(Tamasloukht *et al.* 2003) y la de sistemas enzimáticos como la H⁺ATPasa que es la principal responsable del transporte iónico, y cuya actividad esta localizada fundamentalmente en el ápice del tubo de germinación (Beilby & Kidby 1982). Durante la germinación se inducen otros genes, como por ejemplo, genes involucrados en el metabolismo carbonado (fosfoglicerato kinasa) (Harrier *et al.* 1998), o genes implicados en el ciclo celular, como homólogos de TOR2 (Requena *et al.* 2000) y GmGIN (Requena *et al.* 2002), genes todos ellos que podrían estar implicados en los procesos de señalización previos al establecimiento de la simbiosis.

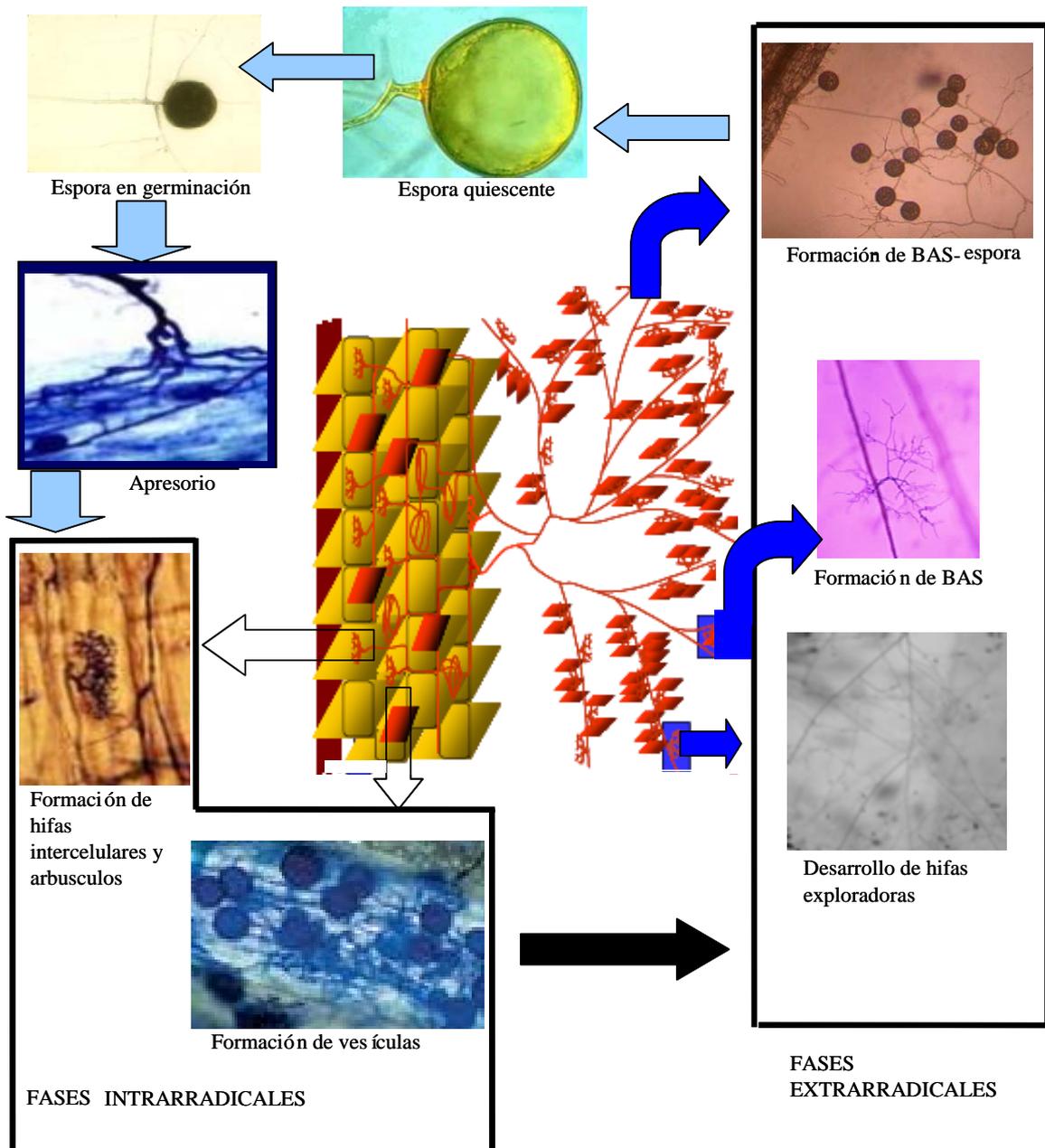


Figura 3. Ciclo de vida de *Glomus intraradices*.

Si las hifas del hongo tras la germinación no encuentran raíces de una planta susceptible de ser colonizada, se produce un micelio muy reducido, manteniendo el crecimiento tan sólo unos cuantos días tras la producción del tubo de germinación y, transcurrido este tiempo, el citoplasma de las nacientes hifas, se retrae hacia la espора entrando ésta de nuevo en reposo (Azcón-Aguilar *et al.* 1998; Bago *et al.* 1999). La espора tiene capacidad para iniciar el proceso de germinación repetidas veces antes de degenerar definitivamente, por lo que iniciará nuevamente el proceso cuando las condiciones vuelvan a ser favorables (Bago *et al.* 1998; Azcón-Aguilar *et al.* 1998).

La presencia de raíces de especies micotróficas, o de los exudados radicales que éstas producen, promueve un mayor desarrollo del micelio, aumentando especialmente su grado de ramificación (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1989; Becard *et al.* 2004). La estimulación antes mencionada, no se produce cuando en las inmediaciones del naciente micelio se encuentran raíces de plantas no hospedadoras, o cuando los exudados proceden de plantas no micotróficas en cuyo caso, algunas veces se han mostrado efectos inhibitorios (Giovanetti *et al.* 1994; Vierheilig *et al.* 1996). Recientemente, se ha aislado un compuesto de exudados radicales de *Lotus japonicum* que actúa como factor de ramificación de las hifas de *Gigaspora margarita*, provocando una extensiva ramificación de las mismas (Akiyama *et al.* 2005). Dicho compuesto es un sesquiterpeno, concretamente la estrigalactona 5-deoxi-estrigol. Hay bastantes evidencias que ponen de manifiesto que los hongos micorrícicos reciben señales de las plantas hospedadoras antes del establecimiento de la simbiosis (revisado Harrison 2005).

Del mismo modo que el hongo reacciona ante la presencia de una planta hospedadora, dicha planta también percibe señales del hongo micorrícico arbuscular (revisado Harrison 2005). Recientemente por ejemplo, experimentos con *Medicago truncatula* han mostrado la inducción del gen *MtENOD11* en la simbiosis (Chabaud *et al.* 2002; Journet *et al.* 2001), inducción que podría ser desencadenada en la raíz antes de tener ésta un contacto directo con el hongo (Kosuta *et al.* 2003), ya que se ha detectado expresión de este gen incluso cuando el hongo está separado de la raíz de la planta por una membrana artificial. Estos datos, junto con los que muestran la estimulación de la ramificación del hongo por los exudados de las plantas, proporcionan evidencias directas de la existencia de mecanismos de señalización antes de existir un contacto físico entre los simbiosis.

Una vez que el hongo encuentra una raíz susceptible de ser colonizada, éste experimenta una notable estimulación que se manifiesta en una abundante proliferación del micelio, y sobre todo en un aumento de la ramificación,

umentando así sus posibilidades de contacto con la raíz (Giovannetti *et al.* 1993). Cuando ese contacto se produce, el hongo se adhiere a la raíz y forma un apresorio sobre la epidermis de la misma, formándose así la estructura de precolonización a partir de la cual, dos o tres días después, se iniciará la penetración del hongo en la raíz de la planta (Giovannetti *et al.* 1993; Jolicoeur *et al.* 1998). Se acepta, que los sitios más habituales de penetración coinciden con los lugares más activos de la raíz, posiblemente porque la exudación radical es más abundante en estas zonas. El hongo micorrízico no penetra por heridas ni coloniza raíces muertas.

En contraste con los elaborados y melanizados apresorios formados por hongos patógenos sobre las hojas de la planta, los apresorios que forman los hongos micorrízicos arbusculares son simples, estructuras no melanizadas. Se ha sugerido, que la producción localizada de enzimas pectinolíticas y celulolíticas del hongo que degradan la pared celular de la planta lo justo para desorganizarla y no destruirla, junto al desarrollo de una presión física, podrían ser los mecanismos responsables de la entrada de las hifas en la raíz (García-Romera *et al.* 1990; García-Romera *et al.* 1991; Bonfante-Fasolo *et al.* 1992; García-Garrido *et al.* 2000).

Las señales que dirigen la formación de apresorios en la simbiosis micorrízica arbuscular son aún desconocidas. Dichas señales deben estar basadas en una activación del programa genético, tanto de la planta como del hongo, existiendo un intercambio de señales entre ambos simbiosis. Como ejemplos de dicho intercambio está, el aumento de la expresión de unas de las isoformas de la H⁺ATPasa de *G. mosseae* (Requena *et al.* 2003), el de un ortólogo de la proteína 14-3-3 implicada en rutas de señalización como respuesta a estreses bióticos y abióticos en otros organismos, así como de un número de genes implicados en el uso del calcio como segundo mensajero (Ca²⁺-ATPasa, Ca- calmodulina y homólogos a Ras activados por Ca) (Breuninger & Requena 2004). Estos datos sugieren que el Ca²⁺ podría actuar como segundo mensajero en la transmisión de la señal de la planta que da lugar a la formación del apresorio. Y a nivel de la planta, se ha observado la inducción de la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo primario, transducción de señales, síntesis proteica, y de otros genes aún con función desconocida (Brechenmacher *et al.* 2004; Weidmann *et al.* 2004).

Una vez que la hifa colonizadora ha superado las primeras capas de células de la raíz, el hongo micorrízico coloniza el córtex de la misma constituyendo un micelio intrarradical que se ramifica intercelularmente, sin invadir endospermos ni meristemas. La colonización del córtex, puede desarrollarse siguiendo dos patrones distintos: tipo *Arum* o *Paris*, dependiendo de la estructura de la raíz. Las micorrizas de tipo *Arum* que son las más descritas en la bibliografía, se caracterizan porque las

hifas del hongo se extienden por los espacios intercelulares del córtex, formando a intervalos regulares, pequeñas ramificaciones laterales que penetran las paredes celulares y se ramifican dicotómicamente de forma repetida en hifas con un diámetro cada vez menor, para dar lugar a las estructuras más características de la simbiosis, los arbuscúlos. Las micorrizas tipo *Paris*, están presentes en especies vegetales como *Ginkgo* (Bonfante-Falsolo & Fontana 1985), *Taxus* (Strullu 1978) y otras especies con una característica en común, que apenas si tienen espacios intercelulares, con lo que la formación de hifas entre las células está muy limitada, por lo que la colonización se extiende de célula a célula formando bucles, en los que se producen pequeñas ramificaciones a modo de arbuscúlos. Salvo que se indique lo contrario, nos referiremos siempre a las micorrizas tipo *Arum*.

En cada célula sólo puede formarse un arbuscúlo, que recibe este nombre porque su estructura recuerda a la de un pequeño árbol con tronco y ramificaciones. La formación de los arbuscúlos lleva consigo una alteración de la célula vegetal manifestada principalmente por la deformación y proliferación del plasmalema para acomodar al arbuscúlo (Alexander *et al.* 1988). Las hifas del hongo no penetran en el plasmalema de la célula hospedadora, sino que se produce una invaginación de éste que rodea las ramas del arbuscúlo. Así, la interfase entre los dos simbiosis queda en esencia constituida por el plasmalema de la célula hospedadora o membrana periarbuscular, una matriz interfacial, la pared celular del hongo que es muy precaria a nivel de las hifas más finas del arbuscúlo, y su membrana plasmática (Bonfante-Falsolo *et al.* 1986; Balestrini *et al.* 1996; Gianinazzi-Pearson *et al.* 1996; Bonfante 2001). La barrera que suponen las paredes entre ambos simbiosis, queda por lo tanto reducida al mínimo (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1991). Otras alteraciones que se producen en la célula vegetal es por ejemplo, una reordenación del citoesqueleto (Genre & Bonfante 1998; Matsubara *et al.* 1999), lo que conlleva que el núcleo cambie de posición migrando al centro de la célula, y que la vacuola se fragmente (Bonfante & Perotto 1995). Asimismo, se observa una disminución en la heterocromaticidad del núcleo de la célula, lo que es indicativo de una mayor actividad transcripcional y un aumento del metabolismo (Smith & Gianinazzi-Pearson 1988; Balestrini *et al.* 1994).

El propio hongo, también experimenta cambios en su estructura cuando se produce la colonización intraradical, siendo el más señalado, la progresiva reducción antes mencionada, del grosor de la pared celular a medida que se producen las ramificaciones dicotómicas más finas, pasando de unos 500nm de grosor en las hifas intercelulares, a los 50nm descritos en los ápices de los arbuscúlos (Bonfante-Falsolo *et al.* 1992). La observación de que en la membrana

periarbuscular se localizan transportadores de fosfato específicos de la simbiosis (Rausch *et al.* 2001), y una H⁺-ATPasa (Gianinazzi-Pearson *et al.* 2000), hace pensar que es a nivel de los arbusculos donde se produce el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo.

Los arbusculos tienen una vida media muy breve, aproximadamente 7 días (Alexander *et al.* 1988), transcurridos los mismos, los arbusculos degeneran y la célula cortical recupera su morfología previa a la colonización, e incluso puede ser colonizada de nuevo. El colapso arbuscular podría estar inducido por el reconocimiento por parte de la planta del arbusculo como una estructura extraña (García-Garrido & Ocampo 2002). De hecho, distintos estudios han puesto de manifiesto la expresión de genes implicados en respuestas de defensa en células colonizadas por arbusculos (Blee & Anderson 1996), las cuales podrían desempeñar un papel clave en la regulación del desarrollo del hongo. Estas respuestas de defensa durante los primeros estadios del desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular, se ha descrito que declinan o se van reprimiendo durante el desarrollo de la simbiosis (Harrison & Dixon 1993; Lambais & Medhy 1993; Volpin *et al.* 1995; Gianinazzi-Pearson *et al.* 1996; Kapulnik *et al.* 1996; David *et al.* 1998). Sin embargo, no hay que descartar, que el colapso arbuscular sea parte del programa intrínseco de desarrollo de los hongos micorrízicos, ocurriendo la degeneración en este caso por autólisis (Peterson & Bonfante 1994). Esta última explicación, podría explicar la acumulación de Ca o de especies reactivas de oxígeno en el arbusculo senescente (Ryan *et al.* 2003; Lanfranco *et al.* 2005), ya que estos iones podrían servir como detonantes de eventos apoptóticos en el arbusculo.

Estudios realizados en plantas leguminosas afectadas en la nodulación, han revelado que parte de la ruta de transducción de señales que permite dicho proceso en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, regula también la colonización por hongos micorrízicos (para una revisión detallada ver Parniske 2004 y Harrison 2005). La regulación genética depende del estadio de desarrollo de la simbiosis, activándose los genes implicados en respuestas de defensa frente a patógenos y diferentes tipos de estrés como hemos mencionado anteriormente, en los primeros estadios del desarrollo, mientras que en estadios más tardíos se detecta la activación de genes implicados en rutas de transducción de señales, procesos de transporte, y otros de función desconocida.

Algunas especies de hongos pueden formar también otro tipo de estructuras durante su colonización intraradical, son las llamadas vesículas, estructuras globosas con un alto contenido en lípidos y que parecen constituir un órgano de reserva de nutrientes (Barea *et al.* 1991). Estas vesículas no son efímeras como los arbusculos, sino que desde que aparecen van madurando pudiendo en algunas

ocasiones, llegar a convertirse en esporas del hongo. Esta transformación de vesículas en esporas, podría estar ligada a situaciones de estrés para la micorriza, o a la muerte inminente de la planta.

Simultáneamente al desarrollo del hongo en el interior de la raíz, se desarrolla en el suelo una red de micelio formando lo que se denomina micelio externo o extrarradical, principal responsable de la absorción de nutrientes minerales del suelo, que posteriormente cederá a la planta. Por lo tanto, éste micelio, funciona como un sistema radical complementario, con una función fundamental en la adquisición de nutrientes y agua para la planta (Barea 2000). Se estima que por cada cm de raíz micorrizada, se puede producir hasta 1 m de hifas. Este micelio externo, aporta una ventaja muy importante a las plantas, y es la de explorar microhábitats del suelo inaccesibles para las raíces. Sobre las hifas extrarradicales, se pueden formar esporas de resistencia, con lo que se cierra de este modo el ciclo del hongo. Las hifas fúngicas que forman este micelio externo, pueden además formar nuevos puntos de entrada sobre la superficie de la raíz y contribuir así a la generalización de la colonización micorrícica. Pero sin duda, el estudio y observación directa del micelio externo del hongo ha sido extremadamente difícil (dado el carácter de simbiote estricto de los hongos micorrícicos) hasta el desarrollo de las técnicas de cultivo monoxénico, que permiten el establecimiento de la simbiosis entre raíces micotróficas y hongos micorrícicos, en una placa de Petri con un medio sintético (Bécard & Fortín 1988). Con esta técnica, se ha observado que el hongo desarrolla inicialmente unas hifas relativamente gruesas denominadas hifas exploradoras, que crecen con una marcada apicalidad, y que sufren periódicas ramificaciones (hifas secundarias), que a su vez vuelven a ramificarse varias veces (hifas terciarias, cuaternarias, ...). Las hifas exploradoras son las responsables del avance del micelio para la extensión de la colonia fúngica. A intervalos regulares, se forman estructuras muy ramificadas, parecidas en cierta medida a los arbuscúlos de la colonización intrarradical, y que hoy en día se conocen como BAS (del inglés *Branched Absorbing Structures*, Estructuras ramificadas de absorción), cuya hipotética función sería la absorción de nutrientes del suelo (Bago *et al.* 1998a; Bago 2000). Esta hipótesis, está respaldada por las modificaciones estructurales que ocurren a nivel del BAS: disminución progresiva del grosor de la pared hacia el ápice de las hifas, lo que facilitaría la absorción de nutrientes, y un aumento en el número de hifas, lo que facilitaría la absorción de nutrientes. También hay un aumento en el número de mitocondrias en la base del BAS, lo que aumenta la disponibilidad de energía para el transporte (Bago *et al.* 1998b). Los BAS son estructuras transitorias, por lo que al cabo de pocos días pierden su contenido citoplasmático a menos que desarrollen

esporas. Dichas esporas pueden desarrollarse de dos maneras diferentes en función de la especie de hongo micorrícico que las produzca, libres como en *G. intraradices*, o agrupadas en cuerpos fructíferos conocidos como esporocarpos como en el caso de *G. mosseae*. (Figura 3).

Dado que el micelio extrarradical se desarrolla directamente en el suelo, se encuentra más expuesto a las condiciones ambientales, y a la acción de otros microorganismos que el micelio intrarradical, ya que este último se encuentra protegido por los tejidos de la raíz. Es con los microorganismos del suelo, con los que el micelio externo va a desarrollar interacciones de gran importancia para el desarrollo de las plantas, el equilibrio de las poblaciones microbianas y para la formación de agregados estables en el suelo y el mantenimiento de su estructura (Jeffries & Barea 2001).

2.4 Fisiología de la simbiosis

Debido a las inherentes propiedades de los componentes simbióticos, todas las interacciones mutualísticas planta-microorganismo, muestran esencialmente el mismo patrón de intercambio y similares características estructurales. Aunque la transferencia de nutrientes no es el único beneficio para los componentes de la simbiosis, sí que es cierto que representa un importante factor de las interacciones micorrícicas. La planta aporta carbohidratos a cambio de nutrientes minerales aportados por el microsimbionte. Los nutrientes tienen que ser transportados a través de la membrana plasmática de la planta y del hongo. Estos procesos en combinación con las proteínas identificadas de formar parte en la simbiosis micorrícico arbuscular, han sido resumidos por Hause & Fester (2005) (Figura 4).

La principal contribución de las micorrizas arbusculares a la nutrición de la planta se basa en una mejora de la absorción de fósforo, aunque también mejoran la absorción de otros nutrientes de baja movilidad en el suelo, como amonio y zinc. Es obvio que la formación y actividad de las MA conlleva un drenaje de carbono para satisfacer las necesidades del hongo. Normalmente, este hecho no tiene una repercusión negativa en el desarrollo de la planta, lo que se debe a que las micorrizas arbusculares ejercen la llamada compensación fotosintética. Esta compensación consiste, por un lado, en un incremento de la actividad fotosintética de la planta debido al efecto sumidero que ejerce el hongo y, de otro, por la mejora en la nutrición fosforada de la planta. El papel regulador que ejerce el fósforo sobre la actividad fotosintética *in vivo* es bien conocido y justifica la inversión de la planta en la simbiosis micorrícica. La relación entre el peso de parte aérea y raíz suele ser mayor en plantas micorrizadas que en sus correspondientes controles no micorrizados. Este efecto se ejerce disminuyendo el envío de nutrientes a la raíz

derivado del incremento en el aporte de nutrientes a tallos y hojas; por tanto, la cantidad de carbono retenido en la parte aérea es relativamente mayor en las plantas micorrizadas. Este hecho es importante desde un punto de vista bioenergético, ya que favorece al sistema autótrofo (productor) de la planta en relación al heterótrofo (raíz, consumidora de carbono).

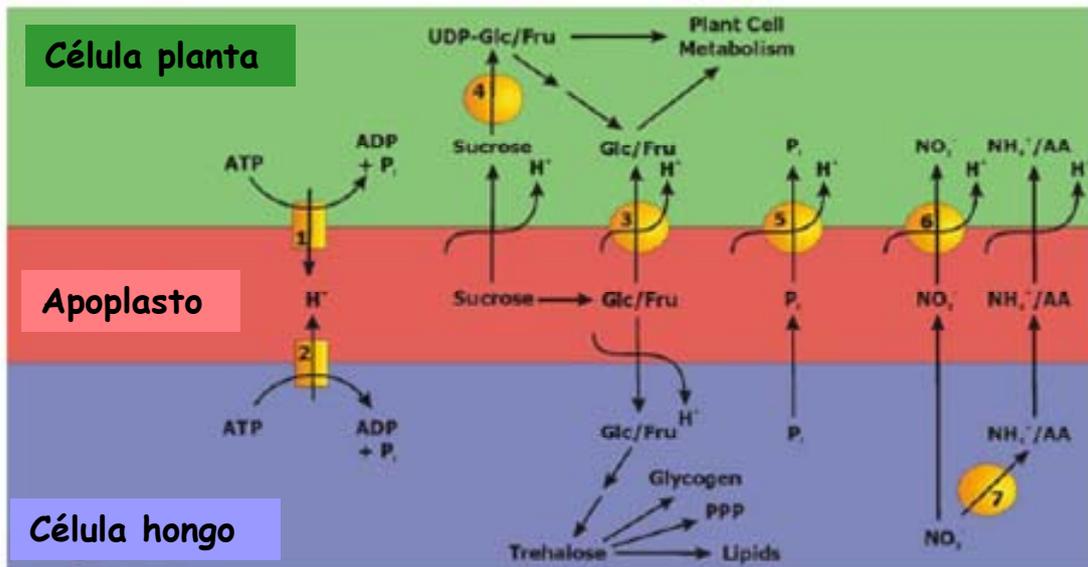


Figura 4. Transferencia de nutrientes en las raíces micorrízicas arbusculares. Se indican las enzimas y los transportadores que se ha descrito que se inducen específicamente con la simbiosis. El transportador de membrana de muchos metabolitos, es esperable que sea dependiente del pH, y que sea activado por la actividad de las H⁺-ATPasas de la planta (1) y del hongo (2). Las H⁺-ATPasas fúngicas no están restringidas a los arbusculos, lo que sugiere un transporte activo también en las hifas intercelulares. La sacarosa que llega del floema puede ser hidrolizada por invertasas apoplásticas y absorbida por la planta (3) ó por los transportadores de hexosas fúngicos, o bien, importada al interior de las células corticales de la raíz e hidrolizada allí por una sacarosa sintasa citoplasmática (4). El hongo transforma rápidamente las hexosas en trehalosa que es utilizada en la ruta de las pentosas fosfato, ó se utiliza para la biosíntesis de glucógeno y lípidos. Las células de la planta toman fósforo del espacio periarbuscular usando transportadores específicos protón-dependientes (5). También se han encontrado transportadores de nitrato inducidos por la simbiosis (6), que sugiere un mecanismo de transporte similar al del fósforo. Por otro lado, el aumento de los niveles de transcripción de una nitrato reductasa de origen fúngico (7), sugiere la transferencia del nitrógeno en forma reducida. AA= aminoácidos. Esquema tomado de Hause & Fester (2005).

2.4.1 Intercambio de nutrientes en micorrizas arbusculares

La aplicación de técnicas de biología molecular al estudio de la simbiosis permite dilucidar los mecanismos implicados en la absorción de nutrientes de la solución edáfica por las hifas del hongo y de aquéllos que controlan el intercambio bidireccional de nutrientes entre la planta y el hongo. A continuación, se resumen los aspectos fundamentales del funcionamiento de la simbiosis, refiriéndonos principalmente en su papel en la absorción e inmovilización de nutrientes, así como al intercambio de esos nutrientes entre ambos simbiosis.

2.4.1.1 Absorción de nutrientes minerales del suelo

Aunque como ya se ha mencionado anteriormente, las micorrizas existen desde hace más de 400 millones de años, no es hasta mediados del siglo pasado cuando empieza a cobrar interés su estudio como causa del mejor crecimiento que aportan a las plantas. El primer trabajo, mostraba como el manzano micorrizado presentaba un mayor contenido en Fe y Cu que el no micorrizado cuando ambos crecían en suelos deficientes en esos micronutrientes (Mosse 1957). Posteriormente, también se puso de manifiesto como los hongos formadores de micorrizas arbusculares mejoraban la absorción de fosfato por parte de la planta (Gerdemann 1964; Daft & Nicolson 1966; Baylis 1967), que eran capaces de transferir N a la planta mediante la absorción de NH_4^+ (Johansen *et al.* 1992; Frey & Schüepp 1993), o de la de NO_3^- (George *et al.* 1992; Tobar *et al.* 1994; Bago *et al.* 1996) del suelo circundante, y su posterior transferencia. Las causas de esta mejora de la nutrición mineral pueden ser múltiples:

a)- Las hifas del hongo son capaces de competir más eficientemente que las raíces con otros microorganismos del suelo por los nutrientes (Liderman 1992).

b)- Dichas hifas, pueden absorber fuentes de nutrientes no disponibles para la planta (Swaminathan 1979).

c)- Como consecuencia de su tamaño y distribución, el micelio extrarradical es capaz de explorar un mayor volumen de suelo que las propias raíces, por lo que aumenta la capacidad de absorción de nutrientes, especialmente de aquellos que difunden con dificultad en la solución del suelo, y que por tanto, dan lugar a la formación de zonas de deficiencia alrededor de la raíz (Sanders & Tinker 1973).

d)- Se ha postulado con la idea de que los transportadores de los hongos micorrícicos presenten una mayor afinidad por el sustrato mineral que los de la planta (Cress *et al.* 1979).

2.4.1.1.A *Nutrición fosforada*

El fosfato es un nutriente mineral limitante para el crecimiento de las plantas debido a su baja solubilidad en muchos de sus estados naturales. Los hongos micorrícicos arbusculares transportan fosfato desde reservorios a distancia hasta la planta, lo que se ha podido mostrar usando compartimentos en el suelo con ^{33}P solo accesibles a las hifas del hongo y no a las raíces de la planta. En este sistema e incluso bajo condiciones no limitantes de aporte de fosfato, las raíces colonizadas reducen la actividad de su propio sistema de absorción de fosfato y dependen principalmente del simbionte fúngico para su abastecimiento de fosfato (Smith *et al.* 2003). Otros muchos estudios han puesto de manifiesto que la mayoría de las plantas aumentan la absorción de fósforo al establecer asociaciones micorrícicas (Raghothama 1999; Rausch & Bucher 2002; Jia *et al.* 2004), pudiendo llegar a ser

responsables del 100% de la incorporación de fosfato en algunas especies vegetales (Smith *et al.* 2004). La información bibliográfica al respecto es muy numerosa (Sanders & Tinker 1973; Dunne & Fitter 1989; Merryweather & Fitter 1995; Jacobsen 1996; Bi *et al.* 2003).

La absorción de fosfato es un mecanismo altamente eficiente, lo que se pone de manifiesto por la rápida incorporación de fósforo por las hifas del micelio extrarradical, requiriéndose tan sólo tres horas para alcanzar los niveles máximos de incorporación de polifosfato (Ezawa *et al.* 2004), velocidad comparable a la de los organismos hiperacumuladores de fosfato. Se han clonado los transportadores de fosfato involucrados en ésta absorción de fosfato desde el medio externo hasta las hifas fúngicas, de hongos como *Glomus versiforme* (Harrison & van Buuren 1995), *G. intraradices* (Malodonado-Mendoza *et al.* 2001) y *Gigaspora margarita* (L. Lanfranco, comunicación personal). Este transporte está asociado a un simporte de protones, que es creado con distintas H⁺-ATPasas (Ferrol *et al.* 2002; Requena *et al.* 2003). Para evitar la acumulación de iones fosfato, que dificultarían el funcionamiento normal del hongo mediante un aumento de la presión osmótica, dichos iones se polimerizan formando cadenas de polifosfato (entorno a 17 unidades), que se acumulan fundamentalmente en las vacuolas (Rasmussen *et al.* 2000). Son concretamente unas vacuolas tubulares que se encuentran asociadas a los microtúbulos del citoesqueleto, quienes contienen esas cadenas de polifosfato (Olsson *et al.* 2002; Uetake *et al.* 2002). El fosfato así acumulado en el interior de las vacuolas, es transportado al micelio intrarradical.

Una vez que está en el micelio intrarradical, el polifosfato es hidrolizado, liberándose el fosfato, mediante la actividad de ciertas fosfatasas alcalinas presentes en la vacuola (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi 1978). Como avance en este estudio, recientemente se han clonado, un gen de *G. intraradices* y otro de *G. margarita*, que codifican fosfatasas alcalinas (Aono *et al.* 2004), aunque no se ha puesto de manifiesto su capacidad para hidrolizar polifosfatos y, aparentemente, no están regulados por fósforo.

De todos los procesos en relación a la transferencia de fosfato, la liberación de fósforo por el hongo es el menos conocido y más inusual en biología, ya que el fósforo es un nutriente escaso y los organismos generalmente no lo liberan al medio externo. Actualmente se piensa que ésta liberación puede estar inducida por la planta hospedadora mediante mecanismos desconocidos y que ocurren a través de algún canal iónico no identificado. Sin embargo, sí da un poco de luz a este proceso, el hecho de que se hayan descrito transportadores de fosfato que se expresan específicamente en raíces micorrizadas de plantas como *Solanum tuberosum* (Rausch *et al.* 2001), *Medicago truncatula* (Harrison *et al.* 2002), y

Oryza sativa (Paszkowski *et al.* 2002). La inmunolocalización del transportador de *M. truncatula* (MtPT4), sugiere que se localiza específicamente en la membrana periarbuscular, y que usa el gradiente de pH establecido a través de ésta membrana, para tomar el fosfato previamente liberado desde los arbuscúlos fúngicos hasta el espacio periarbuscular, siendo por lo tanto la transferencia de fosfato un proceso activo que ocurre preferencialmente a nivel de las células colonizadas por arbuscúlos. En la figura 5 se esquematiza el transporte de fosfato en plantas micorrizadas.

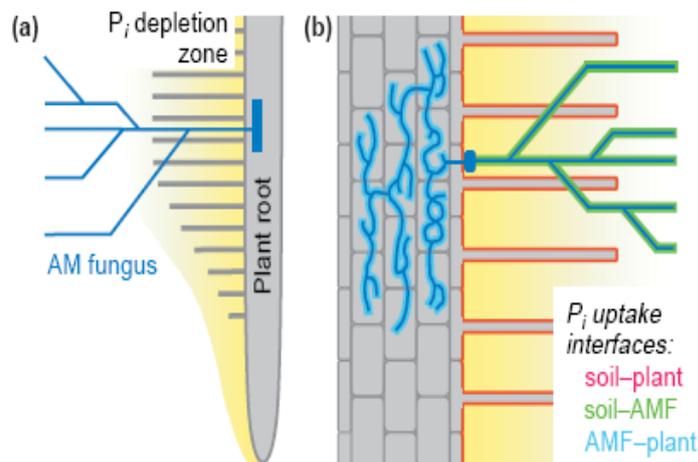


Figura 5. Transporte del P en plantas micorrizadas. (a) La raíz de la planta crea una zona de agotamiento de P causada por la captación de P y la baja tasa de difusión de P en el suelo. El micelio extrarradical del hongo MA crece hacia la zona de agotamiento, alcanzando un nuevo pool de P soluble. (b) La interfase implica la captación de P en la simbiosis MA. Las interfases suelo-planta, suelo-hongoMA y hongo MA-planta se puestran en rojo, verde y azul respectivamente. La translocación transmembrana del P está mediada por transportadores de P que residen en la membrana de las células de la correspondiente interfase. (Adaptado de Karandashov y Bucher, 2005).

2.4.1.1.B Nutrición nitrogenada

Los hongos micorrícicos son también capaces de transferir nitrógeno del suelo circundante a la planta, bien mediante la absorción de NH_4^+ (Johansen *et al.* 1992; Frey & Schüepp 1993; Johansen *et al.* 1993), o de NO_3^- (George *et al.* 1992; Tobar *et al.* 1994; Bago *et al.* 1996). Asimismo hay indicios de cierta capacidad de transporte de N orgánico (Hodge *et al.* 2001), especialmente aminoácidos (Hawkins *et al.* 2000). En apoyo a ésta última forma del transporte de N, de ha aislado un gen que codifica una permeasa de aminoácidos de *G. mosseae* (L. Lanfranco, comunicación personal).

Sin embargo, los hongos micorrícicos prefieren como fuente de N al amonio frente al nitrato (Johansen *et al.* 1992). La incorporación del amonio se lleva a cabo mediante transportadores específicos, de los que actualmente tan solo se ha aislado uno en *G. intraradices* (López-Pedrosa *et al.* 2006). El amonio así absorbido, se incorporaría rápidamente el glutamato, para dar glutamina, lo que podría ocurrir por distintos mecanismos, aunque el más probable parece ser el ciclo de la Glutamina sintasa/Glutamato sintasa, ya que estas actividades ha sido detectadas en hongos micorrícicos (Johansen *et al.* 1996; Breuninger *et al.* 2004).

En la asimilación de nitrato, parece estar implicada la enzima nitrato reductasa, cuya actividad se ha detectado tanto en esporas (Ho & Trappe 1975), como en extractos de raíces micorrizadas (Subramanian & Charest 1998). Molecularmente, se ha aislado el gen codificante para una nitrato reductasa de *G. intraradices*, que se expresa fundamentalmente en el arbusculo (Kaldorf *et al.* 1998). Ésa actividad permitiría la reducción del nitrato para su posterior incorporación a la glutamina en forma de amonio.

La transferencia de N hasta su absorción por la planta, ocurre por un proceso asociado al ciclo de la urea y al transporte de polifosfato, propuesto ya por Bago *et al.* (2001) y recientemente confirmado por Govindarajulu *et al.* (2005). El proceso comienza con la entrada del amonio o nitrato a las hifas extrarradicales, donde el nitrato será transformado en amonio por la nitrato reductasa, y dicho amonio mediante la acción de la glutamina sintetasa se transforma en glutamina, que mediante el ciclo de la urea se convierte en arginina. Y así ya como arginina es translocado al micelio intrarradical asociándose a la transferencia de polifosfato. Ya una vez en la fase intrarradical del hongo, la arginina entraría a formar parte de nuevo del ciclo de la urea, liberándose ornitina y urea, que por acción de la ureasa y la ornitina aminotransferasa liberaran el amonio que será así transferido a la planta. La posibilidad de una transferencia directa de arginina desde el hongo a la planta, ha sido descartada debido a que no se detectan carbonos marcados en la parte aérea de la planta cuando se añade ^{13}C -acetato en el medio donde crece el hongo (Fitter *et al.* 1998). Proceso resumido en la figura 6.

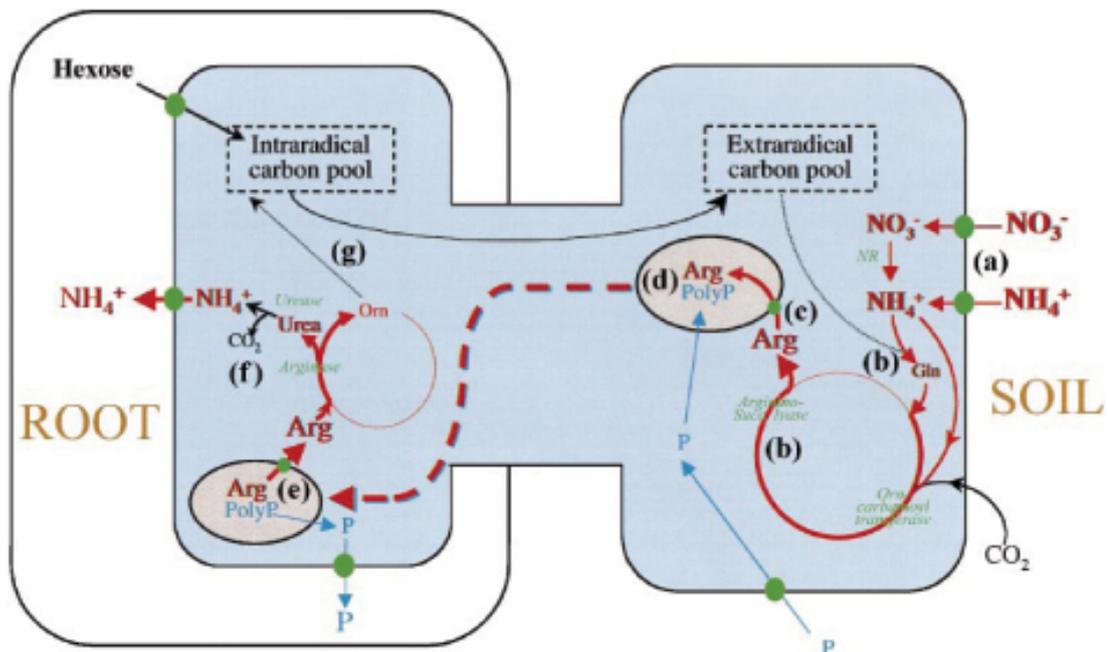


Figura 6. Mecanismo propuesto para el transporte de nitrógeno a la planta en micorrizas arbusculares. El nitrógeno adquirido se transforma en amonio o se adquiere como tal. Mediante el ciclo de la urea pasa a formar parte de la arginina. La transferencia al micelio intrarradical se lleva a cabo en forma de arginina, asociada a los polifosfatos. Una vez en el micelio intrarradical, se libera el amonio de nuevo mediante el ciclo de la urea. Tomado de Bago *et al* (2001).

2.4.1.1.C Micronutrientes

El hongo micorrícico también es capaz de absorber y transferir a la planta micronutrientes tales como el Zn y el Cu, confiriendo así una mayor eficiencia en la absorción de estos micronutrientes a las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas. La absorción de estos elementos por las hifas, es independiente de la nutrición fosforada (Weissenhorn *et al.* 1995; Chen *et al.* 2001). En repetidas ocasiones se ha puesto de manifiesto una capacidad tamponadora de los hongos micorrícicos sobre el nivel de metales pesados en la planta hospedadora, efecto amortiguador que se traduce en un aumento en el suministro de micronutrientes a la planta cuando ésta crece en suelos deficientes en esos micronutrientes. En la situación contraria, donde las plantas crecen en suelos con niveles elevados de micronutrientes, los hongos micorrícicos reducen la incorporación de metales a los tejidos vegetales (Diaz *et al.* 1996; Chen *et al.* 2004).

El efecto protector de las micorrizas sobre los tejidos de la parte aérea de la planta se ha observado para Al (Cumming & Ning 2003), U (Rufiyikiri *et al.* 2002), Cs (Berreck & Hanselwandter 2001), As (Knudson *et al.* 2003), Sr (Entry *et al.* 1999), Cd (Rivera-Becerril *et al.* 2002), Mn (Malcová *et al.* 2003) y Cu (Griffioen *et al.* 1994). Este efecto protector, es debido a la inmovilización del metal,

fundamentalmente en el micelio externo (Joner *et al.* 2000), aunque también en estructuras intrarradicales como vesículas, o intracelularmente, en los gránulos de polifosfato (Rauser & Ackerley 1987; Turnau *et al.* 1993; Weiersbye 1999).

2.4.1.2 Metabolismo del carbono en los hongos micorrizicos

En lo referente al transporte de nutrientes, se piensa que la transferencia de carbohidratos es el principal beneficio que obtiene el simbionte fúngico en la asociación micorrizica arbuscular. Debido al carácter de biotrófos obligados de los hongos micorrizicos arbusculares, sus hifas extrarradicales son incapaces de absorber carbohidratos del medio. Ése mismo carácter de simbiontes obligados, junto con la dificultad de aislar las estructuras intrarradicales de estos hongos, dificulta el estudio de los procesos por los cuales se produce la transferencia de carbono en la simbiosis, y de las bases de la biotrofia obligada que presentan.

La primera evidencia experimental sobre la transferencia de compuestos carbonados de la planta al hongo fue proporcionada por Ho y Trappe (1973), quienes usando $^{14}\text{CO}_2$ demostraron que, tras unas semanas, se detectaba C marcado en el micelio del hongo. Más tarde, Pfeffer *et al.* (1999) demostraron la incapacidad de las hifas extrarradicales para tomar carbohidratos, mediante la aplicación de varios compuestos marcados con ^{13}C en placas de petri compartimentadas donde en uno de los compartimentos había raíces de zanahoria (*Daucus carota*) transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* y colonizadas por *G. intraradices*, y en el otro compartimento sólo micelio extrarradical del hongo. Este estudio, también documentó la absorción de glucosa y fructosa por las estructuras intrarradicales del hongo. Otro estudio que apoya esta incapacidad del micelio extrarradical para absorber hexosas del medio, es el realizado por Bago *et al.* (2000). Por analogía con lo que ocurre en otras asociaciones simbióticas, se admite que la célula hospedadora libera sacarosa a la matriz interfacial mediante transporte pasivo, se hidroliza en glucosa y fructosa mediante la acción de una invertasa apoplástica y, finalmente, la glucosa se absorbe por el hongo mediante un proceso de transporte activo (Blee & Anderson 2002; Hohnjec *et al.* 2003). Sin embargo, aún es materia de debate, las estructuras fúngicas exactas responsables de esta absorción (Douds *et al.* 2000).

Las H^+ -ATPasas fúngicas, implicadas posiblemente en ése transporte activo de carbohidratos desde el apoplasto, están localizadas fundamentalmente en el tronco de los arbusculos y en las hifas intercelulares, apoyando la absorción de carbohidratos por estas estructuras (Gianinnazi-Pearson *et al.* 1991). Sin embargo, en plantas mutantes de guisante donde los hongos micorrizicos son incapaces de formar arbusculos, el micelio extrarradical tiene muy disminuido su crecimiento,

argumentando así a favor de un papel arbuscular en la absorción de carbohidratos (Kling *et al.* 1996).

El destino metabólico de las hexosas tomadas por las estructuras fúngicas intrarradicales, fue determinado mediante experimentos de marcaje radiactivo usando cultivo de raíces de *D. carota* en placas de petri compartimentadas. En experimentos a corto plazo, la glucosa es transformada principalmente a trehalosa o glucógeno (Douds *et al.* 2000), con el fin de disminuir la osmolaridad. Después de periodos de incubación más largos, la glucosa es usada en ambas formas, directamente para la biosíntesis de lípidos, o para entrar en la ruta de las pentosas fosfato, suministrando así los equivalentes de reducción necesarios para la biosíntesis de lípidos (Peffeffer *et al.* 1999). Los lípidos y el glucógeno, se transfieren al micelio extrarradical (Bago *et al.* 2003), donde se puede observar *in vivo* el movimiento bidireccional de los cuerpos lipídicos (Bago *et al.* 2002). Una vez en el micelio extrarradical, los compuestos lipídicos se transformarán en carbohidratos mediante gluconeogénesis. El micelio extrarradical depende para su desarrollo de este aporte de productos carbonados. En los hongos micorrizicos existe una compartimentación del metabolismo, de forma que las capacidades de síntesis lipídica sólo residen en el micelio intrarradical, mientras que las capacidades gluconeogénicas se localizan únicamente en el micelio extrarradical. En esta marcada compartimentación del metabolismo del hongo, asociada a la diferenciación que experimenta el micelio al establecer la simbiosis, podría residir la base de la incapacidad del hongo para crecer independientemente de la planta.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la espora es capaz de un desarrollo limitado en ausencia de la raíz hospedadora, estando éste sustentado por las reservas lipídicas de la espora, dado que el micelio producido es incapaz de sintetizar ácidos grasos (Bago *et al.* 1999). No obstante, en este micelio sí se han detectado otras rutas metabólicas como son: gluconeogénesis, glucólisis, ciclo de la urea, ruta de las pentosas fosfato, ciclo del glioxilato y vía de los ácidos tricarbónicos (Macdonald & Lewis 1978; Saito 1995; Harrier *et al.* 1998; Bago *et al.* 1999).

2.4.1.3 Metabolismo del carbono en las plantas micorrizadas

Referente a la planta, hay suficientes evidencias de que como consecuencia del establecimiento de la simbiosis, se dirige hacia la raíz una proporción más elevada de fotoasimilados, y aumenta la proporción neta de la fotosíntesis de la planta huésped (Douds *et al.* 1988; Graham 2000; Tinker *et al.* 1994), debido a que ésta asociación simbiótica representa una demanda adicional de carbono para los tejidos fotosintéticos, lo que se añade a la demanda sumidero de la raíz. Medidas del flujo de carbono indican que las plantas micorrizadas dirigen de un 4 a

un 20% más de fotoasimilados al sistema radical que las plantas no micorrizadas (Jackobsen & Rosendahl 1990; Pearson & Jacobsen 1993; Graham 2000). La sacarosa, que es la forma de transporte de los carbohidratos dentro de las plantas superiores, debe jugar un papel importante en la transferencia de carbono en la simbiosis micorrízico arbuscular. Por lo tanto, tienen que existir mecanismos que aseguren que las raíces micorrizadas reciben un adecuado suministro de azúcares para la correcta formación, mantenimiento y función de las estructuras micorrízicas.

En las plantas, los transportadores de mono- y disacáridos tienen un papel relevante en la distribución los fotoasimilados desde los tejidos fuente a los sumidero (para una revisión ver Büttner & Sauer 2000; Lemoine 2000; Williams *et al.* 2000). Por lo tanto, es probable que estos transportadores de carbohidratos estén regulados por el desarrollo de la simbiosis. De hecho, un gen codificaste para un transportador de hexosas de *Medicago*, que probablemente está involucrado en la absorción de azúcares, se ha visto que aumenta su expresión en raíces colonizadas por *Glomus versiforme*, y más específicamente en las regiones de la raíz con una elevada colonización fúngica (Harrison 1996).

La utilización de la sacarosa transportada a las raíces como fuente de carbono y energía, tanto por parte del hongo como de la planta, depende de su hidrólisis en hexosas mediante la acción de una sacarosa sintasa ó invertasa. Ambas enzimas desempeñan un papel clave en los procesos que controlan la distribución y metabolismo de carbohidratos en plantas superiores. Estudios de hibridación *in situ* han mostrado una acumulación de transcritos de los genes que codifican la invertasa vacuolar y la sacarosa sintasa citoplasmática de *P. vulgaris* en células corticales colonizadas por arbusculos, mientras que dichos transcritos no se detectaron en las células corticales de las raíces no micorrizadas (Blee & Anderson, 2002). Sin embargo, no se encontraron diferencias en las actividades soluble y asociadas a pared entre raíces micorrizadas y no micorrizadas de soja, pero si un incremento significativo en la actividad de la invertasa soluble alcalina (Schubert *et al.*, 2003). Ravnskov y colaboradores (2003) también encontraron un aumento de la expresión de dos genes que codifican la sacarosa sintasa de raíces de maíz tras la inoculación con hongos micorrízico arbusculares. Recientemente, Hohnjec *et al.* (2003) informaron que el gen de la sacarosa sintasa *MtSucS1* de *Medicago truncatula* está fuertemente inducido durante interacciones endosimbióticas con *Rhizobium* y el hongo micorrízico arbuscular *G. mosseae*. Además, estos autores observaron que dicho gen se expresaba en células colonizadas por arbusculos así como en las células corticales adyacentes. Estos resultados han llevado a proponer que esta enzima puede estar implicada en la generación de la fuerza sumidero de las raíces micorrizadas. La correspondiente inducción de hidrólisis de sacarosa tanto

apoplástica como simplástica, refleja probablemente el aumento de las necesidades de carbohidratos en las células corticales de la raíz simbiótica. Como se mencionó anteriormente, se asume que en la simbiosis micorrízico arbuscular, la sacarosa es liberada en el apoplasto a la interfase planta-hongo, e hidrolizada por una invertasa asociada a la pared celular de la planta. Sin embargo, los conocimientos actuales sobre el papel de la invertasa asociada a pared son muy limitados. Blee y Anderson (2002) encontraron un gen de una invertasa asociada a pared de zanahoria, que no se expresaba en células corticales que contenía arbuscúlos; pero eso no puede excluir que otras isoformas de invertasas asociadas a la pared celular estén inducidas por la simbiosis.

Dado que el efecto de las micorrizas arbusculares sobre la regulación de genes implicados en el metabolismo del carbono en la planta, es la base del estudio de la presente tesis doctoral, este tema será abordado de forma más profunda más adelante.

3. REGULACIÓN DEL METABOLISMO CARBONADO EN PLANTAS SUPERIORES

3.1. Sistemas de transporte de azúcares en plantas superiores

Las células heterótrofas de raíces, estructuras reproductoras, de reserva y órganos en desarrollo, dependen del abastecimiento de azúcares para su nutrición; por lo que son conocidas como "sumidero de carbono". En las plantas superiores, la fijación del carbono se da principalmente en las células del mesófilo de las hojas maduras y los azúcares allí sintetizados, son el principal producto fotosintético exportado a las partes sumidero de la planta. Deben existir mecanismos que aseguren que esos tejidos sumidero reciban un adecuado suministro de azúcares para su desarrollo y crecimiento, y los transportadores de azúcares tienen un papel principal en el transporte de membrana de azúcares y su distribución a través de la planta.

El transporte a larga distancia de los carbohidratos entre las partes fuente y las sumidero, ocurre en células específicas del sistema vascular, los elementos de los tubos cribosos del floema (Lalonde *et al.* 1999) (Figura 7). Durante su desarrollo, los elementos de los tubos cribosos se extienden longitudinalmente, y pierden la mayoría de sus orgánulos. Y paralelamente, se produce un gran incremento en la densidad de orgánulos de las células acompañantes del floema. Ambos, elementos de los tubos cribosos y células acompañantes están conectados íntimamente por plasmodesmos formando un complejo celular. Las células acompañantes tienen una importante función, el abastecimiento de energía y proteínas a los elementos de los tubos cribosos. La sacarosa representa la principal forma de transporte del

carbono reducido en los elementos de los tubos cribosos, aunque algunas plantas pueden también transportar otros compuestos como rafinosa, polioles etc...

Después de su síntesis, la sacarosa puede realizar la ruta completa desde las células del mesófilo hasta las células acompañantes de los tubos cribosos en el simplasto transfiriéndose de célula a célula por medio de los plasmodesmos (carga simplástica) (Figura 7). Sin embargo, a menudo, la sacarosa va desde las células del mesófilo hasta el complejo células acompañantes-tubos cribosos, por vía apoplástica (carga apoplástica), la cual necesita de simporte se membrana plasmática sacarosa- H^+ . La ruta elegida depende de la especie (ambas rutas deben darse en el mismo organismo), del órgano ó tejido, y del estado de desarrollo. Las células sumidero pueden bien importar sacarosa desde el apoplasto directamente por medio de transportadores de sacarosa, o, alternativamente, la sacarosa puede ser hidrolizada a glucosa y fructosa por invertasas asociadas a la pared celular y estas hexosas son absorbidas por medio de transportadores de monosacáridos.

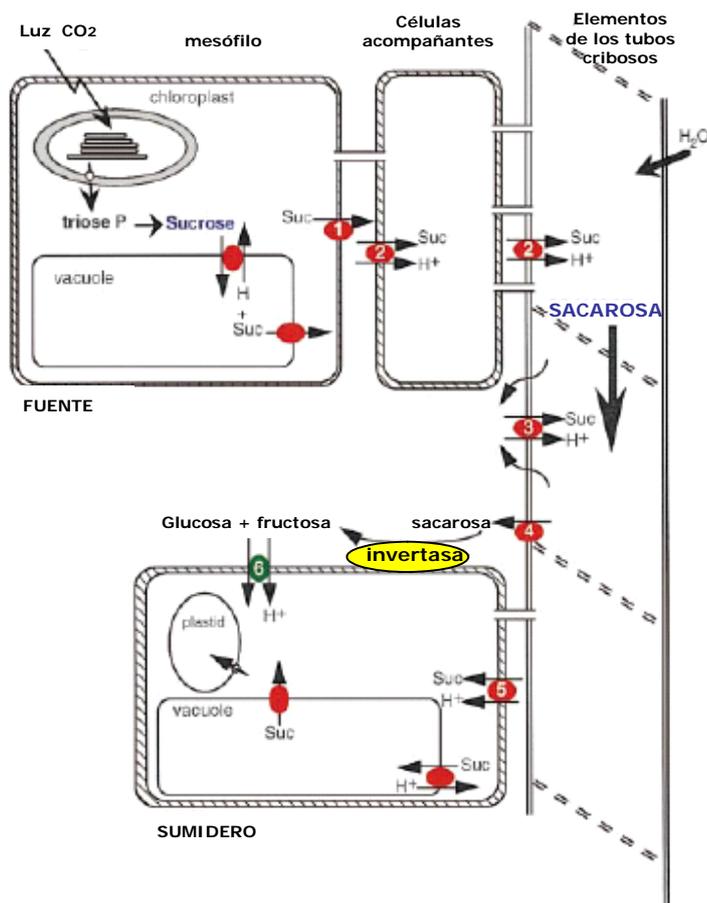


Figura 7. Transporte del carbono fijado a través del floema. Desde su punto de síntesis en el mesófilo, la sacarosa puede transferirse al complejo células acompañantes/elementos cribosos, bien a través de plasmodesmos, ó por vía apoplástica. El mecanismo apoplástico de carga del floema, requiere de la exportación de sacarosa (1)

desde el mesófilo ó desde parénquima vascular y su reabsorción (2) al complejo células acompañantes/elementos cribosos. La reabsorción (3) ocurre también a lo largo de la trayectoria del floema. La descarga apoplásmica del floema o post-floema, necesita de un exportador de sacarosa a los tejidos sumidero (4). La absorción de sacarosa y otros solutos en el interior de los tejidos sumidero, puede ocurrir a través de plasmodesmos o de transportadores de sacarosa (5). Pero las células en los tejidos sumidero pueden también tomar la sacarosa después de su hidrólisis por una invertasa apoplástica, y convertida así en hexosas (6). Tomado de Lalonde *et al.* (1999).

Las plantas disponen de varios transportadores de monosacáridos y disacáridos para coordinar el movimiento de azúcares en los distintos tejidos a diferentes estados de desarrollo y bajo distintas condiciones medioambientales (para una revisión ver Büttner & Sauer 2000; Lemoine 2000; Williams *et al.* 2000). Éstos transportadores son miembros de la superfamilia de los facilitadores mayores, la cual se caracteriza por un motivo estructural común de 12 dominios transmembrana, y la presencia de otros motivos aminoacídicos conservados (Saier *et al.* 1999). Mientras que los transportadores de disacáridos parecen ser específicos de plantas, si se han encontrado en bacterias, hongos y mamíferos numerosos genes homólogos a transportadores de monosacáridos. Así, se han clonado transportadores de monosacáridos de diferentes hongos tales como levaduras (Heiland *et al.* 2000), *Aspergillus* (Yu *et al.* 2000), *Neurospora* (Madi *et al.* 1997), el hongo ectomicorrízico *Amanita muscaria* (Nehls *et al.* 1998), y el patógeno *Uromyces fabae* (Voegelé *et al.* 2001).

3.2. Estudio de la regulación del metabolismo de carbono de las plantas mediante las interacciones planta-microorganismo

Las plantas superiores están compuestas de diferentes tipos de células y tejidos que llevan a cabo funciones especializadas y permiten el crecimiento coordinado, el desarrollo y la reproducción del organismo en su conjunto. Con respecto al metabolismo, los órganos de las plantas pueden ser divididos en tejidos fuente ó sumidero. Los tejidos fuente como las hojas maduras producen un exceso de asimilados los cuales se transportan vía floema a los distintos tejidos sumidero que no son capaces de producir por sí mismos suficiente cantidad de asimilados.

En una planta, hay distintos órganos sumidero como meristemos, hojas en desarrollo, frutos, semillas ó tubérculos, que tienen funciones específicas y compiten por los asimilados que se producen en las hojas fuente ó maduras. La distribución de carbohidratos entre los distintos órganos sumidero, se determina por la fuerza sumidero relativa de los tejidos individuales. Por otro lado, la distribución del carbono está influenciada por factores bióticos y abióticos. Una compleja red de regulación permite integrar cambios medioambientales, metabólicos y fisiológicos, y ajustar la producción de carbono a las respectivas

demandas. Por esto, la sutil coordinación de la distribución de carbono entre los tejidos productores y los consumidores, es la responsable del crecimiento y desarrollo normal de la planta y afecta en gran medida al rendimiento de las cosechas. Como se expone en Biemelt & Sonnewald (2006), las interacciones fuente-sumidero deben estar reguladas a tres niveles diferentes: (i) producción de asimilados, (ii) localización y (iii) utilización (Figura 8).

Durante las últimas décadas, gracias a los estudios bioquímicos y moleculares, ha mejorado notablemente nuestro conocimiento sobre esos tres procesos. En particular, las plantas transgénicas que tienen alterada la actividad de una sola enzima, contribuyen a un mejor entendimiento del flujo de carbono, revelando también la enorme flexibilidad del metabolismo de las plantas (revisado en Frommer & Sonnewald 1995; Paul & Foyer 2001; Fernie *et al.* 2002). Varias aproximaciones para mejorar el rendimiento de las cosechas mediante la manipulación de un solo paso, no mejoraron sustancialmente el rendimiento. Sin embargo, hay algunos ejemplos de mejora de las cosechas interfiriendo sólo una enzima metabólica. Por ejemplo, Regierer *et al.* (2002) pudieron incrementar el rendimiento de la patata y su contenido en almidón en un 85% y un 60% respectivamente, mediante la represión antisentido de una adenilato Kinasa plastidial. Sin embargo, hay aún bastantes cuestiones importantes sin resolver, siendo las más importantes: a) ¿Cómo se adaptan las hojas fuente a las necesidades de los órganos sumidero locales y los distantes?, b) ¿Cómo se regula el transporte de asimilados a larga distancia y célula a célula?, c) ¿Qué determina la fuerza sumidero?.

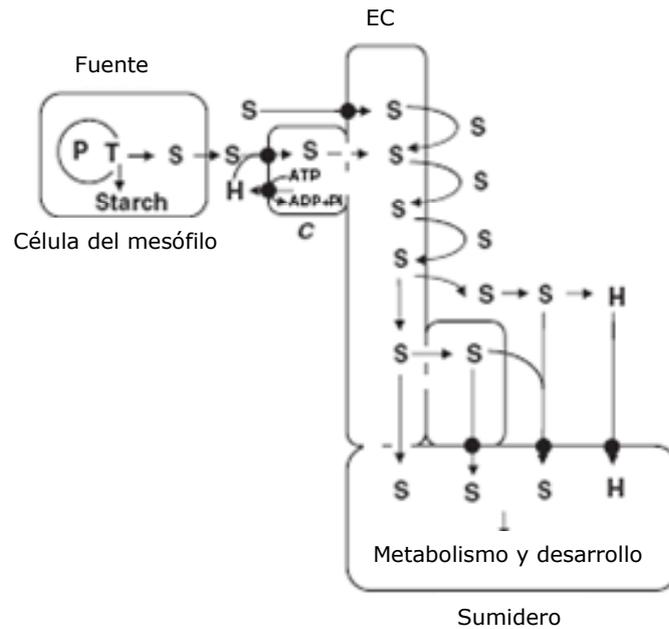


Figura 8. Esquema de las relaciones fuente-sumidero.
Tomado de Biemelt & Sonnewald (2006).

De esta manera, elucidando las sofisticadas redes que unen las diferentes rutas y la regulación de las interacciones fuente-sumidero, se colocarán los cimientos para una manipulación con éxito de las rutas bioquímicas y para llevar a cabo la mejora de las cosechas.

El estudio de la interacción planta-microbio, proporciona una nueva y sencilla aproximación para elucidar los mecanismos reguladores de la interacción sumidero-fuente en plantas (para una revisión ver Biemelt & Sonnewald 2006). Los virus de plantas, han desarrollado estrategias sofisticadas para reconducir las rutas de transporte de macromoléculas intra- e intercelulares de las plantas. Así, estudiando cuales son las dianas de las proteínas de transporte viral dentro del huésped, se podrían identificar los componentes de la maquinaria de transporte tanto de célula a célula como del transporte a larga distancia. Mientras que los virus modulan el transporte intracelular de macromoléculas, las bacterias fitopatógenas inyectan proteínas efectoras en el interior de las células del huésped, modificando así procesos metabólicos centrales. Se han descrito un número de posibles y ya probadas proteínas efectoras, algunas de las cuales se ha propuesto que tengan función en la regulación del metabolismo de carbohidratos. Los hongos parecen modular los procesos metabólicos de forma similar a las bacterias; sin embargo, no se ha demostrado el hecho de que inyecten efectores intracelulares en las células vegetales. Por lo tanto, se puede concluir, que los hongos aumentan el control metabólico mediante la modificación de proteínas receptoras extracelulares.

3.3. Localización y regulación de la actividad de las enzimas clave en el metabolismo de la sacarosa

Desde el descubrimiento de la biosíntesis de la sacarosa, se han hecho avances considerables para entender su regulación y el papel crucial que desempeña en la biología funcional de las plantas. Sin embargo, aspectos importantes de este metabolismo son aún un enigma. Estudios en cianobacterias y la publicación de la secuenciación de varios genomas completos, han significado un avance en el conocimiento de la estructura de las proteínas implicadas en el metabolismo de la sacarosa, y han dado una nueva percepción de sus orígenes y su evolución futura (Salerno & Curatti 2003).

La sacarosa tiene un papel central en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Su síntesis está restringida al citosol debido a la estricta compartimentación de las enzimas implicadas en su biosíntesis. Es sintetizada en las hojas como uno de los productos primarios finales de la fotosíntesis y funciona como transporte primario de azúcares, y en algunos casos, como regulador directo ó indirecto de la expresión génica. La principal ruta de biosíntesis de sacarosa implica la acción secuencial de sacarosa-fosfato-sintasa (SPS; UDP-glucosa:D-fructosa-6-fosfato 2- α -D-glucosiltransferasa, EC 2.4.1.14), y sacarosa-fosfato-fosfatasa (SPP; sacarosa-6^F-fosfato-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.24), liberando sacarosa libre y fosfato inorgánico (Huber & Huber 1996) (Figura 9). Otra enzima, la sacarosa sintasa (SuS ó SS; UDP-glucosa:D-fructosa 2- α -D-glucosiltransferasa, EC 2.4.1.13), cataliza una reacción reversible pudiendo estar implicada tanto en la síntesis como en la degradación de sacarosa. Sin embargo, a la SuS generalmente se la asigna un papel en la degradación de la sacarosa en la mayoría de las condiciones fisiológicas en los tejidos que usan sacarosa, liberando nucleótidos de azúcares, que son precursores en la formación de polisacáridos estructurales y de reserva (Winter & Huber 2000). Como contraste, la hidrólisis irreversible de la sacarosa en hexosas, es catalizada por invertasas (EC 3.2.1.26), de las cuales existen varias isoformas, y tienen un papel importante cuando hay una demanda de carbono y energía.

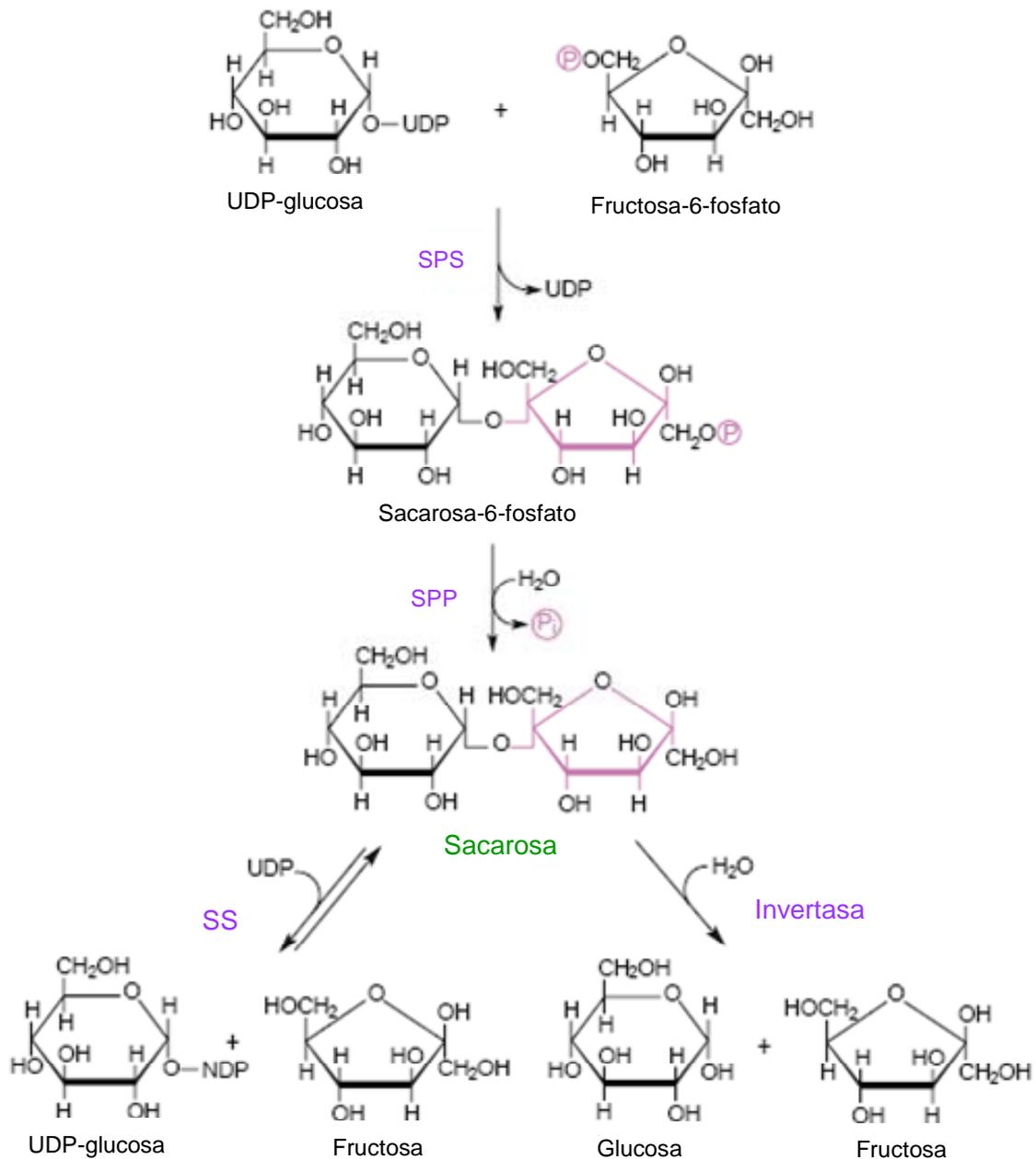


Figura 9. Metabolismo de la sacarosa en plantas superiores.

Durante el día, el sustrato para la biosíntesis de sacarosa son las triosas fosfato, procedentes del cloroplasto por un transportador de triosas fosfato y en antiporte con fosfato inorgánico. Por la noche, la movilización del almidón proporciona los sustratos para la biosíntesis de sacarosa probablemente en forma de glucosa, derivada de la rotura aminolítica del almidón (Schleucher *et al.* 1998). Así, la biosíntesis de sacarosa durante periodos de activa fotosíntesis, implica la fructosa-1,6-bifosfatasa citosólica y un control asociado por el sistema fructosa-2,6-bifosfatasa, mientras que este punto de control es eludido en la oscuridad. Las

características básicas de la regulación de la ruta de biosíntesis de sacarosa, su coordinación con la tasa de asimilación de CO₂ y la producción de almidón se han revisado en varios trabajos (Stitt *et al.* 1987; Huber *et al.* 1993; Quick 1996).

A pesar de todo el azúcar transportado, se acepta que la síntesis neta de sacarosa puede darse en algunos tejidos sumidero en desarrollo (por ejemplo, varios frutos, incluyendo el tomate y las cucurbitáceas, y las raíces del azúcar de remolacha; ver Huber *et al.* 1993; Quick 1996), y tejidos fuente no fotosintéticos (por ejemplo semillas en germinación). Parece ser que la sacarosa-fosfato sintasa (SPS), es la enzima responsable de la síntesis de sacarosa en los tejidos no verdes, aunque la procedencia del sustrato y las rutas implicadas, variarán dependiendo si los azúcares están siendo consumidos (como en el desarrollo del fruto), o utilizados como reserva (como en la germinación de semillas). En la mayoría de los tejidos sumidero, lo que ocurre por supuesto, es la degradación neta de la sacarosa.

La hidrólisis de la sacarosa es vital en plantas multicelulares, no sólo por la distribución de los recursos de carbono, sino también por la existencia de señales de azúcares basadas en hexosas en las estructuras que importan el carbono. La regulación de las reacciones de hidrólisis de sacarosa y sus consecuencias, se ha convertido por lo tanto, en una cuestión central en el metabolismo carbonado de las plantas. Los mecanismos primarios de esta regulación implican la capacidad de las invertasas para alterar las señales de azúcares ya que produce glucosa en lugar de UDP-glucosa, y por lo tanto, produce dos veces más hexosas que la sacarosa sintasa (Fig. 10). Además, los sitios de hidrólisis de sacarosa vacuolares por invertasas podrían permitir un control temporal via la compartimentación. Los miembros de las familias génicas que codifican para invertasas ó sacarosas sintasas, responden a nivel transcripcional y postranscripcional a las distintas señales medioambientales, incluyendo cambios endógenos que reflejan su propia acción (por ejemplo, hexosas y sistemas hormonales que responden a hexosas tales como la señalización por ácido abscísico (ABA)). A nivel enzimático, la sacarosa sintasa puede ser regulada por cambios rápidos en la localización subcelular, por fosforilación, y sensiblemente modulada por la renovación de proteínas. Además del control transcripcional, la acción de las invertasas puede estar regulada también a nivel enzimático por proteínas inhibitoras y por un sistema que tiene el potencial de iniciar y terminar actividad invertasa en vacuolas.

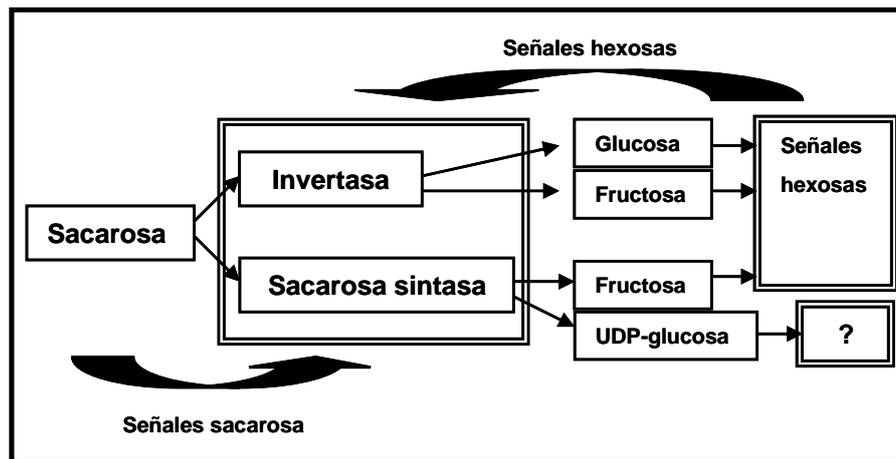


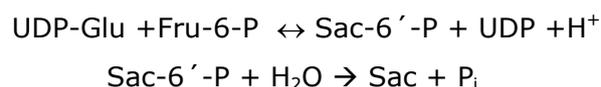
Figura 10. Respuesta de los genes que codifican para enzimas que degradan sacarosa a sus propios productos enzimáticos. Tomado de Koch 2004.

3.3.1. Enzimas implicadas en la síntesis de sacarosa

Como ya se ha mencionado, la síntesis de sacarosa está restringida al citosol debido a la compartimentación de las enzimas implicadas en el proceso. Durante el periodo de luz, el almidón y la sacarosa son sintetizados como productos de la asimilación fotosintética del carbono en las hojas fuente. La sacarosa se exporta a las partes no fotosintéticas de las plantas para su crecimiento y desarrollo, mientras que el almidón es retenido en las hojas. Por la noche, el almidón es degradado para suministrar sustratos para continuar la síntesis y la exportación de sacarosa (Geiger & Servaites 1994). Más allá de su papel en el metabolismo energético, la sacarosa se acumula a menudo como respuesta a estreses medioambientales tales como frío, salinidad y sequía (Yang *et al.* 2001; Strand *et al.* 2003).

3.3.1.1 Sacarosa-fosfato-sintasa

Como se mencionó anteriormente, la biosíntesis de sacarosa está catalizada por la acción secuencial de la sacarosa-fosfato-sintasa (SPS) y sacarosa-6'-fosfato-fosfatasa (SPP):



La rápida retirada de Sac-6'-P por una fosfatasa específica y con alta actividad, desplaza la reacción reversible de la SPS *in vivo* (Stitt *et al.* 1987), por lo que se piensa que la actividad de la SPS contribuye al control del flujo de carbono en forma de sacarosa (Huber & Huber 1996). Mientras que la actividad de la SPP es abundante en las hojas fuente, y no ejerce un control significativo sobre la síntesis

de sacarosa en condiciones normales de crecimiento (Chen et al. 2005a), la SPS si tiene una contribución importante sobre el control del flujo de carbono en forma de sacarosa. Ésta enzima, está regulada por una jerarquía de mecanismos que implican modificación postranscripcional via fosforilación, control directo por medio de efectores metabólicos, tales como glucosa-6-fosfato y fosfato inorgánico (Huber & Huber 1996; Winter & Huber 2000), y regulación transcripcional durante la transición sumidero-fuente (Harn *et al.* 1993; Klein *et al.* 1993; Chávez-Bárceñas *et al.* 2000).

La regulación de la actividad de la SPS en hojas de espinacas (*Spinacia oleracea*), está bien caracterizada. La enzima tiene tres sitios de fosforilación, Ser-158, Ser-229, y Ser-424, los cuales están implicados en la regulación por luz/oscuridad (Huber & Huber 1996; Toroser *et al.* 1999), unión a proteínas 14-3-3 (Toroser *et al.* 1999), y activación por estrés osmótico (Toroser & Huber 1997) respectivamente. En oscuridad, la fosforilación de la Ser-158 inactiva a la SPS. Éste efecto es revertido en presencia de luz por una fosfatasa tipo 2A, habiendo una activación de la SPS como consecuencia de un incremento en la afinidad hacia sus sustratos, al regulador alostérico positivo Glc-6-P, y a un descenso en la sensibilidad a P_i (Huber & Huber 1996).

Hay bastantes evidencias de que las plantas superiores contienen más de un gen codificante para SPS. Los análisis filogenéticos presentados por Langenkamper *et al.* (2002), demuestran que hay tres familias de genes de SPS en plantas superiores. Ésas tres familias han sido llamadas A, B y C, y tanto en *Arabidopsis*, como en *Citrus unshiu* (Komatsu *et al.* 1996; Komatsu *et al.* 1999) y en arroz (Yu *et al.* 2001) se ha visto que hay representantes de las tres familias. Por esto, se supone que todas las plantas superiores tienen en su genoma al menos un representante de cada familia, y que se expresa un miembro de cada una, aunque debe predominar una isoforma (Lunn & McRae 2003). Recientemente se ha mostrado que las especies monocotiledóneas tienen una familia D adicional que probablemente apareció después de la divergencia de mono- y dicotiledóneas (Castlenden *et al.* 2004). Estudios comparativos de la expresión, revelan una expresión espacial y temporal distinta aunque coincidente de cada una de las familias génicas (Komatsu *et al.* 1996; Castlenden *et al.* 2004). Chen *et al.* (2005b) proporcionaron evidencias de que las familias génicas A, B y C de dicotiledóneas son funcionalmente distintas, en tabaco al menos, se expresa un representante de cada familia y los tres genes tienen distintos patrones de expresión. Estudios de expresión también muestran que los genes de la familia A están expresados de manera más abundante que los de otras familias.

La importancia de esta enzima en la biosíntesis de sacarosa se ha confirmado gracias a los esfuerzos para usar genética molecular en la modificación de dicha enzima. La sobreexpresión de la SPS de maíz en tomate, provoca un aumento en la síntesis de sacarosa, incrementando la relación sacarosa/almidón en hojas y la capacidad fotosintética, indicando que la SPS es un punto principal de control de la fotosíntesis bajo condiciones de elevado CO₂ y saturación de luz (Galtier *et al.* 1993; Galtier *et al.* 1995; Micallef *et al.* 1995). Sin embargo, en algunos casos, la sobreexpresión de SPS no tiene como resultado un incremento de la actividad SPS debido a la regulación postranscripcional del enzima.

3.3.2. Enzimas implicadas en la degradación y utilización de la sacarosa

Las únicas rutas que se conocen para la hidrólisis de sacarosa en plantas, están catalizadas por invertasas (sacarosa + H₂O → glucosa + fructosa) ó sacarosa sintasa (sacarosa + UDP ↔ fructosa + UDP-glucosa). En el citosol se dan ambas rutas (Ferne *et al.* 2002).

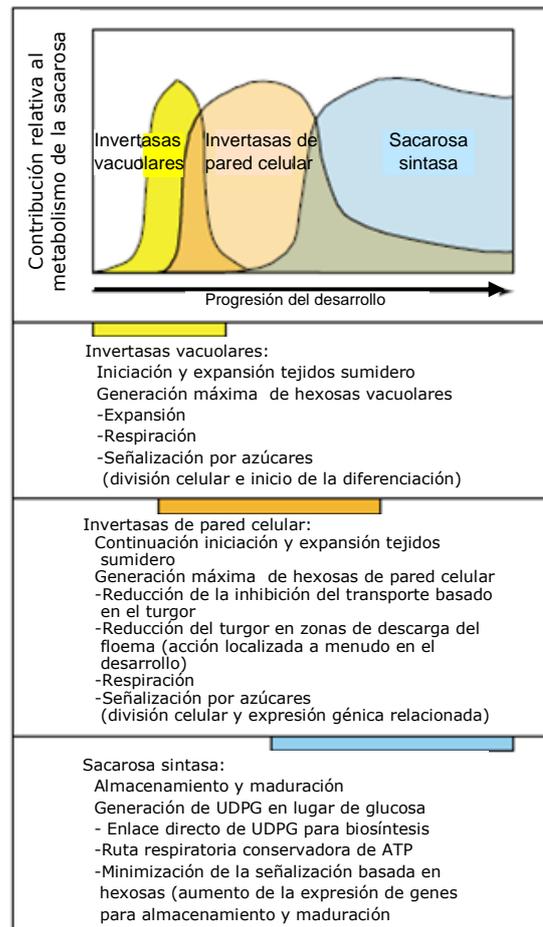


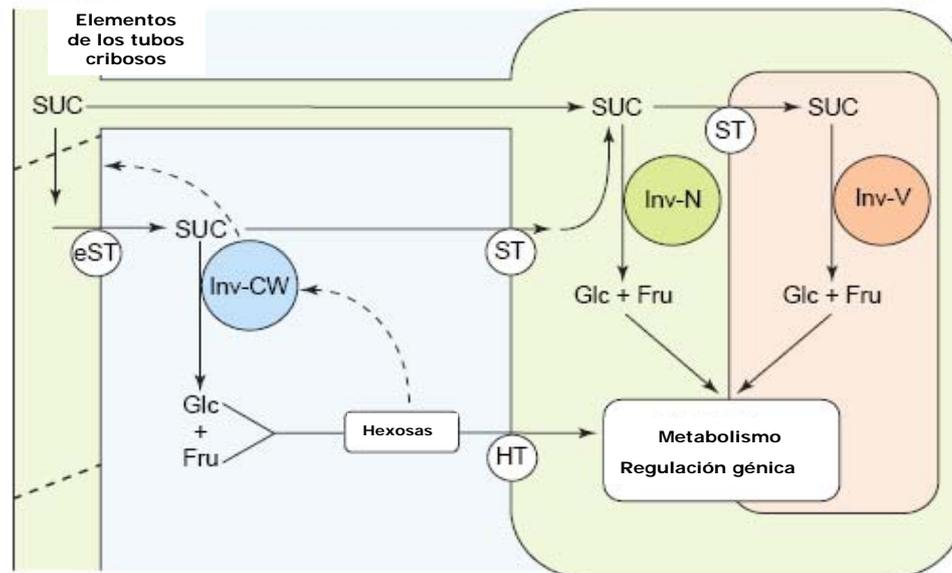
Figura 11. Contribución de las distintas enzimas del catabolismo de la sacarosa, según el estadio de desarrollo de la planta. Tomado de Koch (2004).

Estas enzimas contribuyen de forma distinta en el metabolismo de la sacarosa según el estadio de desarrollo en el que se encuentre la planta (revisado en Koch 2004) (Figura 11). Las invertasas participan en la iniciación y expansión de las estructuras sumidero (Sonnewald *et al.* 1997; Sturm & Tang 1999; Koch & Zeng 2002), y a menudo, la actividad de las invertasas vacuolares precede a las de las invertasas asociadas a pared celular (Andersen *et al.* 2002; Wachter *et al.* 2003). La acción de la invertasa de pared celular coincide en algunos sistemas con una expresión elevada de los transportadores de hexosas (Sherson *et al.* 2003). Más tarde, la transición a las fases de maduración y almacenamiento, se facilita gracias a cambios en la relación hexosa/sacarosa (Wobus & Weber 1999; Borisjuk *et al.* 2002; Borisjuk *et al.* 2003; Weschke *et al.* 2003), y por cambios en las rutas de la hidrólisis de sacarosa desde las que utilizan invertasas a las que están catalizadas por sacarosa sintasa. Aunque, en algunas regiones muy localizadas, durante la maduración, persisten elevados niveles de invertasas de pared celular. Del mismo modo, la sacarosa sintasa puede estar activa en determinados emplazamientos durante las fases iniciales del desarrollo (por ejemplo en el floema). Sin embargo, diversas evidencias apoyan la idea de que el balance entre actividad invertasa y sacarosa sintasa puede alterar el desarrollo de la planta a través de diferentes efectos sobre los sistemas de señalización por azúcares.

3.3.2.1. *Invertasas*

La importancia de las invertasas solamente fue reconocida cuando se iniciaron los estudios moleculares en los años 90 (Sturm & Chrispeels 1990; von Schaewen *et al.* 1990; Miller & Chourey 1992); después de eso, las invertasas atrajeron mucho la atención y los datos muestran que hay más de 300 secuencias de invertasas en la base de datos, que representan a más de 200 isoenzimas diferentes de aproximadamente 50 especies de plantas.

Basándose en su solubilidad, localización subcelular, pH óptimo y punto isoeléctrico, se pueden distinguir tres tipos diferentes de isoenzimas de invertasas: invertasas vacuolares (Inv-V), asociadas a pared celular (Inv-CW) y neutrales (Inv-N) (revisión Roitsch & González 2004).



	pH-óptimo	pI	Localización	Funciones
Invertasa vacuolar	Ácido	Neutro	Vacuola	Control de la composición de azúcares en frutos y órganos de reserva Osmoregulación y crecimiento celular Respuesta a sequía, hipoxia y gravitropismo Respuesta a heridas
Invertasa extracelular	Ácido	Básico (neutro)	Apoplasto	Regulación de la distribución de sacarosa Respuesta a heridas e infección por patógenos Regulación del desarrollo de semillas y polen
Invertasa neutra	Neuto ó básico	Neutro	Citoplasma	Desconocida

Figura 12. Localización subcelular, propiedades y funciones de las distintas isoformas de invertasas. Tomado de Roitsch & González 2004.

Las invertasa vacuolares y las asociadas a pared celular, tienen propiedades enzimáticas y bioquímicas similares, y muestran un elevado grado de homología en sus secuencias así como dos motivos aminoacídicos muy conservados. Ambos tipos de invertasas son β -fructofuranosidasas, por lo que tienen un pH óptimo ácido y son capaces de aceptar como sustrato otros fructofuranosidos aunque con una eficiencia de hidrólisis bastante reducida. Ambas son glicoproteínas, se ha demostrado que la inhibición de la glicosilación tiene como consecuencia una rápida degradación de una Inv-CW (Pagny *et al.* 2003). La actividad invertasa se inhibe por agentes bloqueantes de grupos sulfidrilo y la función principal de los residuos conservados de cisteína se ha demostrado por análisis mutacionales (Goetz & Roitsch 2000). Las isoenzimas de las invertasas son codificadas por una familia de genes pequeña que comprende más de dos miembros de invertasas vacuolares y más de seis de las asociadas a pared celular. El ADNc clonado de invertasas ácidas de plantas revela que cada isoforma es codificada por un gen diferente (Sturm 1996; Tymowska-Lalanne & Kreis 1998). Los polipéptidos que codifican para estos genes, se pueden dividir en dos clases principales con diferentes propiedades. Una de las clases incluye a polipéptidos de invertasas de pared celular con un pI básico, y la otra comprende polipéptidos de invertasa vacuolar con un pI ácido.

La estructura genómica y la organización intrón-exón parece estar conservada entre los genes de invertasas de mono- y dicotiledóneas. Una característica especial es la presencia de un mini exón de tan solo nueve nucleótidos que se encontró en todas y cada uno de los genes de invertasas (Lorenz *et al.* 1995; Simpson *et al.* 2000). Este mini exón codifica tres aminoácidos de la secuencia conservada N-DPN-G/A que abarca tres exones y que se encuentra en invertasas de plantas, bacterias y levaduras. Las secuencias genómicas en tandem de las Inv-CWs de patata y tomate parecen conservarse en otras especies (Fridman & Zamir 2003; Proles *et al.* 2003), y la inserción de un transposón se ha identificado en el primer intrón largo de una Inv-V de zanahoria (Yau & Simon 2003) y de una Inv-CW (Lin5) de tomate (Proels & Roitsch 2006).

Las invertasas vacuolares son invertasas ácidas solubles caracterizadas por un pH óptimo ácido (pH 5.0-5.5) y están localizadas en la vacuola (Husain *et al.* 2001). Las Inv-Vs tienen extensiones N-terminales que no tienen las secuencias de las Inv-CWs (Sturm & Tang 1999). Estas invertasas determinan el nivel de sacarosa almacenado en la vacuola y la movilización de la sacarosa para los procesos metabólicos.

Las invertasas asociadas a pared celular, también llamadas extracelulares, opoplásticas, periplásmicas ó invertasas del espacio libre, se caracterizan por un pH óptimo bajo (pH 3.5-5.0), un alto punto isoeléctrico y por estar iónicamente unidas a la pared celular. Como originalmente sugirió Eschrich (1980), las Inv-CWs hidrolizan sacarosa que difunde ó que es transportada por un transportador de sacarosa desde los elementos cribosos del floema hasta el apoplasto. Los productos de la hidrólisis se transportan al interior de las células sumidero a través de transportadores de hexosas. La unión funcional de los transportadores de hexosas y las Inv-CWs (Roitsch & Tanner 1996) se verifica por una co-expresión específica de tejido (Weber *et al.* 1997; Weschke *et al.* 2003) y por una regulación coordinada (Ehneß & Roitsch 1997a; Fotopoulos *et al.* 2003). Mientras que se requiere una ruta apoplástica para células que están aisladas simplásticamente como polen y células guarda, cada vez parece estar más claro que las Inv-CWs también son importantes en tejidos sumidero con conexiones simplásticas.

El otro motivo aminoacídico conservado es WECP/V, en el que todas las invertasas vacuolares poseen un residuo de valina (V), mientras que todas las invertasas extracelulares se caracterizan por un residuo de prolina (P). Ese único aminoácido diferencial determina el pH óptimo más ácido de las Inv-CWs y su especificidad de sustrato (Goetz & Roitsch 1999). Sin embargo, se han clonado algunas Inv-CWs que se caracterizan por un punto isoeléctrico ácido, apoyando la idea de un segundo tipo de invertasas de pared celular que no están iónicamente

unidas a la pared celular (Ehneß & Roitsch 1997b; Kim *et al.* 2000; Hirose *et al.* 2002).

El tercer tipo de invertasas, las neutras, conocidas también como citoplasmáticas ó alcalinas por su pH óptimo de 6.8-8.0 y su localización subcelular (el citosol). La información disponible sobre su función fisiológica es muy limitada, porque tiene baja actividad enzimática que se pierde rápidamente, y solo se han clonado y caracterizado muy pocas invertasas de este tipo como la del hipocotilo de soja (Chen *et al.* 1992), la de los cotiledones de *Vicia faba* (Ross *et al.* 1996), en las raíces de *Cichorium* (Van den Ende *et al.* 1996), la de zanahoria (Lee & Sturm 1996), y más recientemente hay datos de este tipo de invertasas en azúcar de caña (Bosch *et al.* 2004). Su función específica es no se conoce actualmente (Sturm 1999; Roitsch & González 2004), se consideran enzimas de "mantenimiento" implicadas en la degradación de sacarosa cuando las actividades de la invertasa ácida y la sacarosa sintasa son bajas. A diferencia de las invertasas ácidas, no están glicosiladas, y preferencialmente ó solamente hidrolizan sacarosa por lo que no son fructofuranosidasas. Su actividad, se inhibe fuertemente por los productos resultantes de la hidrólisis pero no se afecta por metales pesados, lo que sugiere un sitio catalítico distinto. Las pocas secuencias disponibles de invertasas neutras son altamente homólogas, con un elevado grado de conservación en la parte C-terminal, pero muestran poco homología con las invertasas vacuolares y las de pared celular. Las invertasas neutras sólo se han encontrado en cianobacterias y plantas, lo que sugiere que las Inv-Ns de las plantas modernas deben de haberse originado a partir de un gen ortólogo procariota después de la endosimbiosis (Vargas *et al.* 2003).

Las invertasas de plantas, están bajo el control de una variedad de mecanismos reguladores. El principal mecanismo que determina los niveles de invertasas es un mecanismo de regulación transcripcional muy sensible. Esto se aplica tanto para la expresión específica según el estadio de desarrollo y el tejido, como para la regulación por diversos estímulos internos y externos. Los estímulos internos incluyen los azúcares que se generan directa ó indirectamente como consecuencia de su propia expresión. Distintas Inv-CWs se inducen metabólicamente por glucosa, lo que se proporciona por un mecanismo de retroalimentación positiva que es relevante incluso para la regulación por otros estímulos: la inducción de una Inv-Cw por alguna clase de estímulos puede ser mantenida o amplificada debido a la señal que proporciona los azúcares generados por la elevada actividad invertasa, para más tarde aumentar el flujo de asimilados (Figura 12) (ver detalles en Roitsch *et al.* 2003). Diferentes miembros de la familia muestran respuestas contrarias a estímulos particulares y la expresión del mismo

gen puede variar mucho en los distintos tejidos. Se han identificado muchos mecanismos diferentes en la regulación de la expresión y de la actividad de las invertasas, incluyendo una formación transcripcional diferencial (Cheng *et al.* 1999), reorganización de exones (Bournay *et al.* 1996), inhibición por inhibidores de proteínas de plantas (Rausch & Greiner 2004), y un mecanismo nuevo que controla la compartimentación y la degradación (Rojo *et al.* 2003). El amplio rango de mecanismos reguladores confirma la idea de que las invertasas tienen un papel principal en el metabolismo de las plantas.

El transporte a larga distancia de asimilados fotosintéticos desde las hojas fuente hasta los órganos sumidero, se da gracias a las diferencias en los potenciales osmóticos. Por lo tanto, la hidrólisis de sacarosa por la invertasa de pared celular localizada en la descarga del floema y la metabolización de los productos de la hidrólisis, controlan la fuerza sumidero para atraer la sacarosa (Eschrich 1980). Se demuestra así, una función de las invertasas en la distribución de carbohidratos en la planta. El papel esencial de las Inv-CWs en la regulación de la descarga del floema y en la fuerza sumidero que ha sido analizada en plantas transgénicas de zanahoria, demostrando la importante función de éstas invertasa en la distribución de la sacarosa (Tang *et al.* 1999). Juegan también un papel muy importante en el suministro de carbohidratos en el polen (Goetz *et al.* 2001).

Varios estudios recientes indican que las invertasas deben estar implicadas en una gran variedad de procesos que incluyen la formación de metabolitos secundarios (Baumert *et al.* 2001; Arnold & Schultz 2002), interacciones planta-herbívoros (Rehill & Schultz 2003), respuesta a estrés salino (Fukushida *et al.* 2001; Balibrea *et al.* 2003), función en las hojas fuente (Kingston-Smith *et al.* 1999), en las interacciones planta-patógeno (Roitsch *et al.* 2003), y en interacciones simbióticas tales como micorrizas (Blee & Anderson 2002) e interacciones planta-rhizobium (Chopra *et al.* 2003). Estos descubrimientos apoyan la sugerencia de que las invertasas tienen un papel en aspectos adicionales del metabolismo y desarrollo de las plantas, aunque son necesarios más estudios para elucidar el significado fisiológico en estos sistemas.

3.3.2.2. *Sacarosa sintasa*

La sacarosa sintasa cataliza la otra posible ruta de hidrólisis de sacarosa del citosol, convirtiendo la sacarosa en UDP-glucosa y fructosa. La UDP-glucosa formada se convierte en glucosa-1-fosfato por la UDP-glucosa pirofosforilasa, que son las hexosas-fosfato que toman preferencialmente los amiloplastos de los tejidos no verdes para ser utilizadas en reacciones posteriores relacionadas con la síntesis de almidón. En especies monocotiledóneas, la sacarosa sintasa está codificada por dos loci no alélicos que se expresan diferencialmente (*sus1* y *sus2*).

En arroz se ha identificado un tercer gen *sus3* (Huang et al. 1996). La mayoría de las especies dicotiledóneas también tienen dos genes no alélicos de sacarosa sintasa, que son funcionalmente análogos a las dos clases de genes de las monocotiledóneas (Fu *et al.* 1995). Sin embargo, en legumbres sólo se ha identificado un solo gen *sus*.

Las distintas isoenzimas exhiben diferente expresión espacial y temporal en la planta (Chen & Chourey 1989), y se regulan de forma diferente tanto a nivel de la transcripción como a nivel de la traducción. A nivel transcripcional, los genes de la sacarosa sintasa que se inducen por la escasez de carbohidratos, suelen ser los que se inducen más intensamente por la falta de oxígeno, confiriendo por su patrón de expresión prioridad para el importe de sacarosa y la supervivencia a los tejidos clave (Koch 1996; Zeng *et al.* 1998; Koch *et al.* 2000). Las proteínas de la sacarosa sintasa están expuestas a una fosforilación reversible de la proteína pasando de ser una proteína asociada a membrana a ser una proteína soluble que puede interactuar con el citoesqueleto cuando se fosforila. La sacarosa sintasa también se regula por su localización subcelular como se resume en la figura 13, y también se regula a nivel de la degradación de la proteína (Koch 2004). Tal esfuerzo en la regulación de la expresión génica y en la localización de un enzima sugiere un papel principal en el metabolismo de la planta. De hecho, la actividad de la sacarosa sintasa se ha relacionado con la síntesis de almidón (Déjardin *et al.* 1997), la síntesis de la pared celular (Chourey *et al.* 1998; Nakai *et al.* 1999), y la fuerza sumidero (Sun *et al.* 1992; Zrenner *et al.* 1995).

Recientes avances indican que el papel de la sacarosa sintasa en el importe de la sacarosa debe implicar una doble capacidad para dirigir el carbono tanto hacia la biosíntesis de polisacáridos como hacia una ruta de respiración (Koch 2004) (Figura 13). La función de la sacarosa sintasa en los procesos de biosíntesis, está respaldada por pruebas que demuestran su contribución en la formación de la pared celular en mutantes de maíz (Winter & Huber 2000; Cheng *et al.* 1996), en plantas de zanahoria (Sturm & Tang 1999), y en semillas de algodón (Ruan *et al.* 2003). Análisis adicionales de plantas mutantes y anti-sentido que tenían reducida su expresión de sacarosa sintasa (ver revisión en Koch & Zeng 2002), mostraban que éstas plantas tenían de forma notable menos almidón en sus órganos de reserva (por ejemplo raíces de zanahoria y tubérculos de patata). El producto UDP-glucosa de la sacarosa sintasa se ha implicado en la formación del almidón (Asano *et al.* 2002), en la síntesis de callos (Subbaiah & Sachs 2001; Salnikov *et al.* 2003), y de diversos polisacáridos de pared celular (Doblin *et al.* 2002; Albrecht & Mustroph 2003). La actividad génica de esta enzima se ha relacionado con la fuerza sumidero ejercida en frutos de tomate (Wang *et al.* 1993), y la distribución de los

ARNs mensajeros muestran por hibridación *in situ* que está estrechamente relacionada con la distribución del almidón en frutos jóvenes (Wang *et al.* 1994). Además, es el más activo de los genes implicados en el metabolismo carbonado en tubérculos de patata inmaduros (Li 2001).

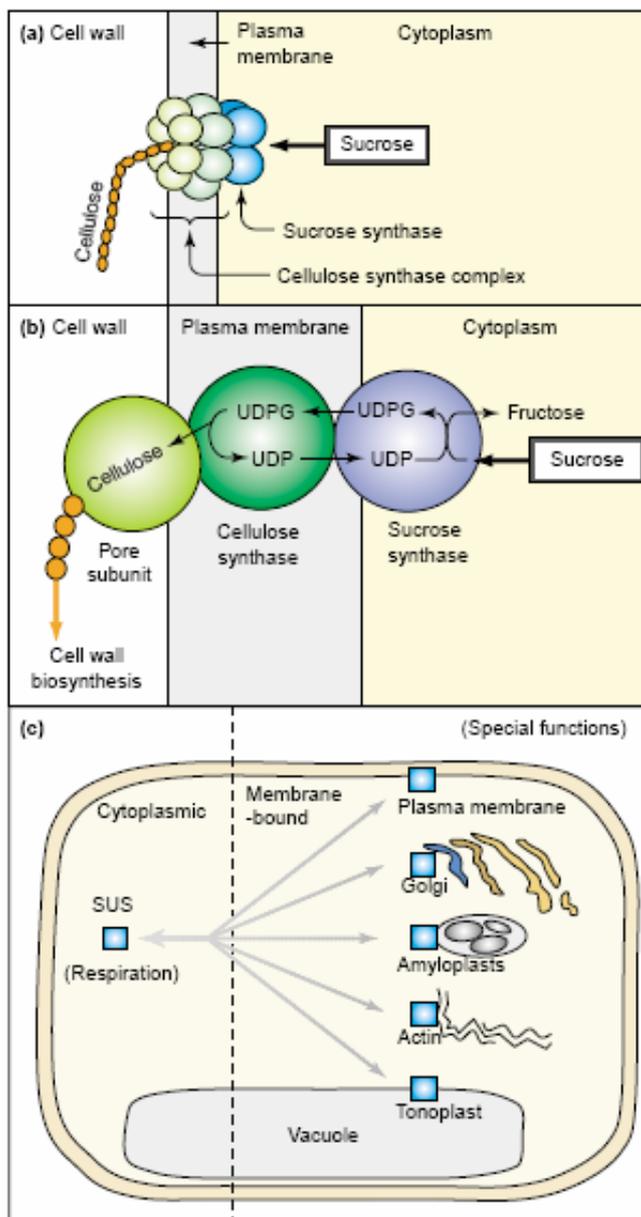


Figura 13. Regulación de la sacarosa sintasa por su localización subcelular. (a) Asociación entre sacarosa sintasa y el complejo celulosa sintasa de membrana plasmática. (b) Características bioquímicas del complejo. (c) Asociaciones de la sacarosa sintasa con membranas y/o la actina como: biosíntesis de pared celular (en la membrana plasmática y Golgi), biosíntesis de almidón (en los plastidios), canales metabólicos (un proceso relacionado con la actina), y posiblemente compartimentación y/o movilización (implicando el tonoplasto o la membrana plasmática de los tubos cribosos). El estatus celular de azúcar, el estado de desarrollo, y la fosforilación, parecen influir en el paso de la sacarosa sintasa desde la forma citoplasmática a la forma unida a la membrana. Tomado de Koch 2004.

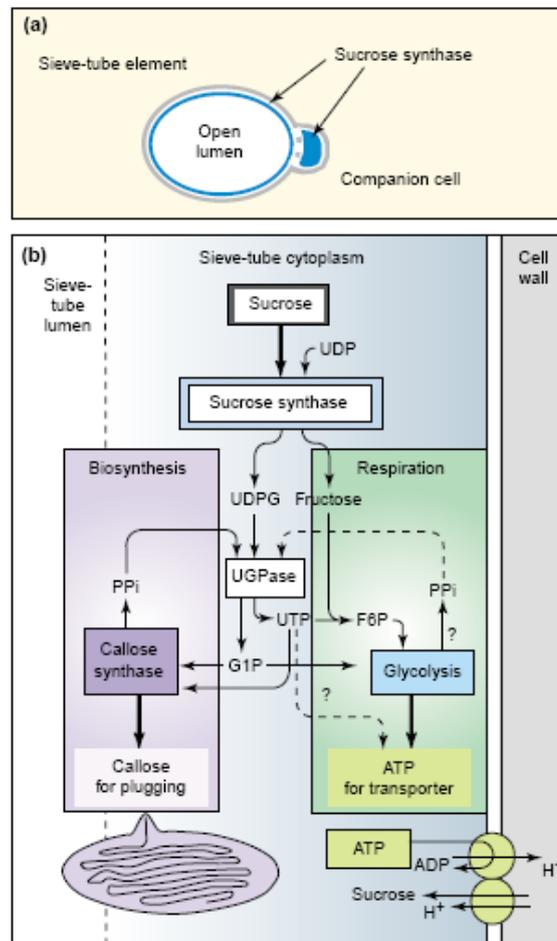


Figura 14. Metabolismo de la sacarosa en los elementos de los tubos cribosos del floema. (a) Localización de la sacarosa sintasa en los elementos de los tubos cribosos. (b) Modelo de regulación del uso de la sacarosa en el interior de los tubos cribosos, integrando información reciente sobre la localización celular y subcelular de éste azúcar gracias a los resultados de los análisis de los cambios metabólicos en el flujo del floema (Lerchl *et al.* 1995; Fernie *et al.* 2002) y en el medio ambiente interno (van Dongen *et al.* 2003). Tomado de Koch 2004.

Las sacarosas sintasas pueden ser centrales en la eficacia de algunas simbiosis como por ejemplo en los nódulos fijadores de nitrógeno (Gordon *et al.* 1999; Xie *et al.* 2003), y se han implicado en el mantenimiento de otras como por ejemplo las micorrizas. Una mutación que reduce los niveles de sacarosa sintasa en semillas de guisante, inhibe la fijación de nitrógeno en los nódulos (Gordon *et al.* 1999); inversamente, en nódulos de soja incapaces de fijar nitrógeno no hay inducción de sacarosa sintasa (Xie *et al.* 2003). La sacarosa sintasa y la invertasa vacuolar se inducen específicamente en células de raíces que contienen arbuscúlos

(Blee & Anderson 2002), y algunas veces incluso en células adyacentes (Hohnjec *et al.* 2003), y ésta inducción ocurre en los estadíos iniciales del desarrollo de la simbiosis (Ravnskov *et al.* 2003).

La sacarosa sintasa ha sido implicada en el desarrollo de la planta, así como en el importe de sacarosa por diversos tejidos sumidero, e incluso ha sido inmunolocalizada en los elementos de los tubos cribosos y en las células acompañantes, dándole a la hidrólisis de sacarosa una función más directa en los tubos cribosos que la que se le había dado previamente (ver revisión Koch 2004).

3.3.2.3. *Enzimas que degradan sacarosa y micorrizas*

El efecto del desarrollo de la simbiosis micorrícico arbuscular sobre la actividad y la expresión de las enzimas que degradan sacarosa no está demasiado claro: no se han observado cambios en la actividad de la invertasa soluble ácida en maíz, alubias rojas y habas, ni de la sacarosa sintasa en alubias rojas (Schellenbaum *et al.* 1998; Blee & Anderson 2002), mientras que los transcritos de invertasa ácida soluble y sacarosa sintasa se concentran en células de alubia roja colonizadas por arbuscúlos (Blee & Anderson 2002). Por el contrario, se observó un incremento en las actividades de invertasas y sacarosa sintasa en las raíces de trébol inoculado con una mezcla de hongos micorrícico arbusculares, aunque estas raíces también tenían nódulos y la contribución de cada simbiote a la alteración de las actividades de hidrólisis de la sacarosa no estaba bien definida (Wright *et al.* 1998). La expresión de genes que codifican para sacarosas sintasas se puede también ver afectada de forma diferente por la inoculación, como en el caso del maíz (Ravnskov *et al.* 2003). Eliminando el efecto de la nodulación sobre la hidrólisis de sacarosa en las raíces de leguminosas, Schubert *et al.* (2003), mostraron que en soja (*Glicine max*), la colonización fúngica de las raíces incrementa la actividad invertasa alcalina, mientras que no había diferencias en las actividades de las invertasas solubles y las ácidas asociadas a pared celular entre plantas micorrizadas y no micorrizadas. Y la actividad de la sacarosa sintasa comenzó a ser significativamente mayor en plantas micorrizadas sólo 40 días después de la germinación.

3.4. Fructanos

Los fructanos son oligómeros o polímeros de fructosa que los sintetizan un pequeño número de plantas y bacterias. La mayoría de las plantas almacenan almidón (almacenado de forma insoluble en el amiloplasto o temporalmente en el cloroplasto) ó sacarosa (disuelta en grandes cantidades en la vacuola) como carbohidratos de reserva, pero existen también los fructanos aunque son menos conocidos. Son polisacáridos no estructurales solubles en agua. Están presentes en

el 15% de las especies de plantas con flores las cuales pertenecen principalmente a las Asteráceas, Campunaláceas y Boragináceas (dicotiledóneas), y a las Poáceas y Liliáceas (monocotiledóneas) (Hendry 1993). Los fructanos son polímeros de fructosa lineares y ramificados, que se sintetizan añadiendo mediante enlaces $\beta(2,1)$ - ó $\beta(2,6)$ - unidades de fructosa a tres trisacáridos básicos (1-kestosa, 6-kestosa y neokestosa); éstos trisacáridos básicos se producen por la unión de una fructosa a uno de los tres grupos hidroxilo primarios de la sacarosa vacuolar (Figura 15). Las siguientes elongaciones ocurren por fructosil-transferasas específicas. Los fructanos lineares tipo $\beta(2,1)$ (inulinas, en especies dicotiledóneas) y tipo $\beta(2,6)$ (levanos, en monocotiledóneas y bacterias), son los fructanos más simples y los más estudiados (Edelman & Jefford 1968; Van Laere & Van den Ende 2002; Ritsema & Smeekens 2003). Ya que los fructanos tienen como sustrato para su síntesis la sacarosa que se almacena en la vacuola, también ellos se almacenan en éste orgánulo celular. Pero a diferencia de la sacarosa que se sintetiza en el citoplasma, los fructanos se sintetizan en la vacuola por la acción de enzimas específicas (fructosiltransferasas) que transfieren fructosa desde la sacarosa para la elongación de la cadena de fructano.

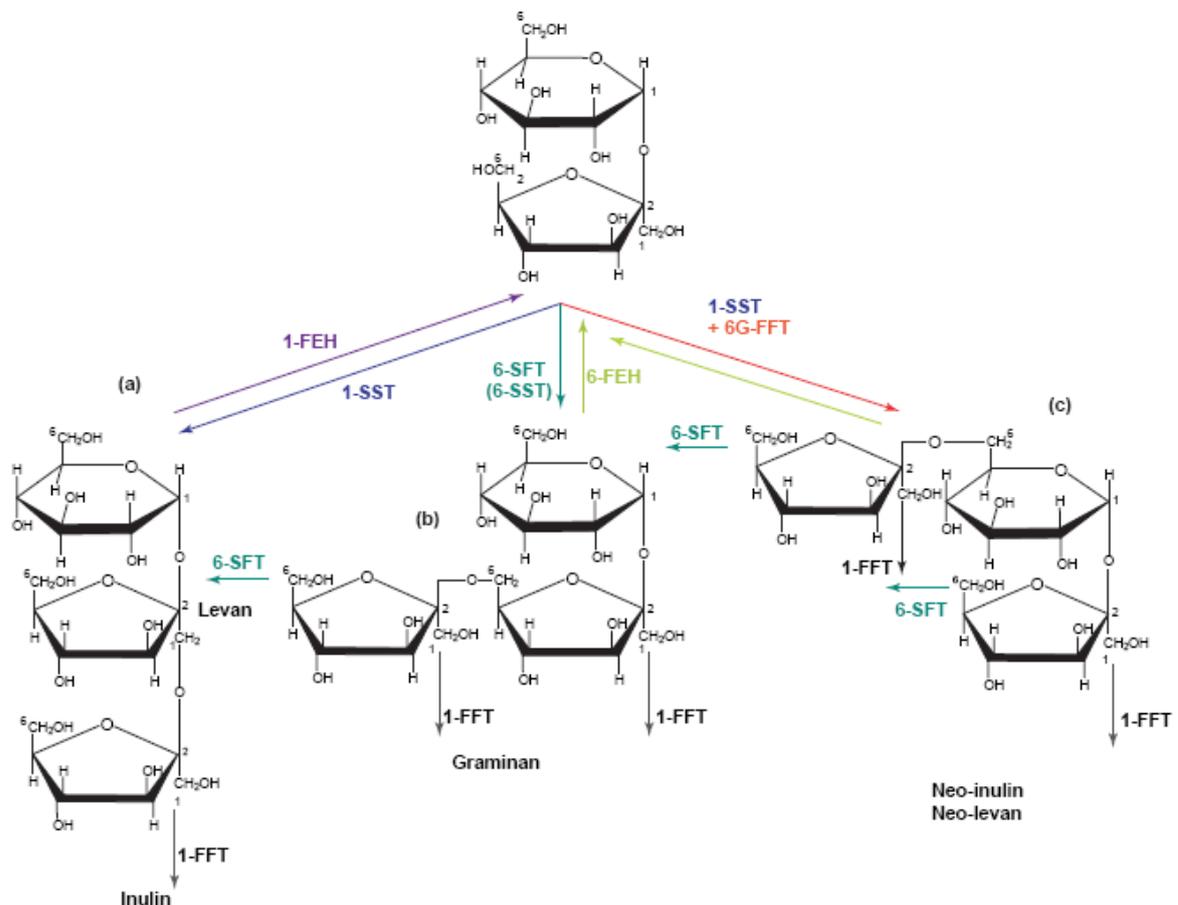


Figura 15. Modelo de la enzimología de la biosíntesis y degradación de fructanos en plantas. Los tres fructanos básicos que son los trisacáridos: (a) 1-kestosa, (b) 6-kestosa y (c) neokestosa, se producen por el enlace de una fructosa a uno de los tres grupos hidroxilos primarios de la sacarosa. Tomado de Van den Ende *et al.* 2004.

La variabilidad entre especies e incluso la especificidad de tejidos en la estructura de los fructanos y en su grado de polimerización, se puede atribuir principalmente a las diferencias en las fructosil transferasas (Hellwege *et al.* 2000; Pavis *et al.* 2001; Vergauwen *et al.* 2003). Los fructanos pueden ser considerados como una extensión de la sacarosa vacuolar (Wiemken *et al.* 1995), lo que se demostró cuando se sintetizaban fructanos en el azúcar de remolacha que es una especie que almacena sacarosa, tras la introducción de fructosil transferasas (Sévenier *et al.* 1998; Weyens *et al.* 2004). En plantas, la síntesis de fructanos a partir de sacarosa, necesitan la acción de dos o más fructosiltransferasas diferentes (ver proceso en Vijn & Smeekens 1999). El modelo clásico de Edelman & Jefford (1968) implica a dos enzimas en la síntesis de la forma más simple de fructanos, la inulina. La primera enzima (1-SST) cataliza la transferencia de un residuo fructosil de una molécula de sacarosa a otra molécula de sacarosa, formandose el trisacárido 1-kestosa, y la segunda enzima (1-FFT) transfiere residuos de fructosa desde una molécula de fructano con un grado de polimerización ≥ 3 a otra molécula de fructano o a la sacarosa. La acción de estas dos enzimas da como resultado una mezcla de fructanos con cadenas de distintas longitudes. Éste modelo se ha demostrado 30 años más tarde que es correcto (Koops & Jonker 1996; Lüscher *et al.* 1996; Van den Ende & Van Laere 1996).

Se han aislado los ADNc que codifican para 1-SST y 1-FFT de varias especies de plantas (ver revisión Vijn & Smeekens 1999). Recientemente se ha descrito la clonación y el análisis funcional de una 1-FFT de alto grado de polimerización de *Echinops ritro* (una Asterácea), mostrando que la enzima recombinante tiene propiedades similares a la enzima nativa, y que produce fructanos tipo inulina de elevado grado de polimerización *in vitro* parecidos a los producidos *in vivo* (Van den Ende *et al.* 2006). Una pregunta a resolver desde hace mucho tiempo, es cómo se determina la longitud de la cadena de los fructanos. Parece ser que el tamaño de los polímeros producidos por la planta, depende principalmente de la actividad enzimática de sus 1-FFTs (Vijn & Smeekens 1999), aunque no se puede excluir el papel de las fructoexohidrolasas en la definición del tamaño final de la cadena (Hellwege *et al.* 1998).

1-SST:	G1-2F sacarosa	+G1-2F +sacarosa	→	G1-2F1-2F 1-kestosa	+G +glucosa
1-FFT:	G1-2F(1-2F) _m + G1-2F(1-2F) _n		→	G1-2F(1-2F) _{m-1}	+ G1-2F(1-2F) _{n+1}
	Elongación de la cadena de fructano, m>0 y n≥0				
6-SFT:	G1-2F sacarosa	+ G1-2F1-2F + 1-kestosa	→	G1-2F1(6-2F)-2F bifurcosa	+G +glucosa
	G1-2F sacarosa	+ G1-2F + sacarosa	→	G1-2F6-2F 6-kestosa	+G +glucosa
6G-FFT:	G1-2F sacarosa	+ G1-2F1-2F + 1-kestosa	→	F2-6G1-2F neokestosa	+G1-2F +sacarosa
FEH:	G1-2F(1-2F) _n		→	G1-2F(1-2F) _{n-1}	+F
	Fructano, n >0		→	fructano	+fructosa

Figura 16. Actividades enzimáticas de las distintas fructosiltransferasas de planta implicadas en la síntesis de fructanos, y de la fructoexohidrolasa, enzima implicado en la degradación de fructanos.

Los fructanos pueden suponer más de 80% del peso seco de las plantas que los sintetizan (Edelman & Jefford 1968). Los enlaces finales fructosil-fructosa pueden ser degradados por fructano exohidrolasas (FEHs), que es lo que ocurre en bacterias, hongos y plantas que contienen fructanos. Pero inesperadamente, se ha encontrado, que plantas que no sintetizan fructanos como *Beta vulgaris* y *Arabidosis thaliana* que aparentemente carecen de fructanos endógenos, también tienen FEHs. La hidrólisis de todos los tipos de fructanos se lleva a cabo por la acción combinada de fructano-1-exohidrolasas ó inulinasa (1-FEH), y por fructano-6-exohidrolasas ó levanasa (6-FEH). Ambas enzimas degradan fructosas terminales. La mayoría de las FEHs de plantas carecen de actividad invertasa generando por tanto una molécula de sacarosa como producto final. Debido a que degradan los fructanos endógenos, las FEHs de plantas que contienen fructanos, desempeñan una gran variedad de funciones: (i) hidrolizan fructanos de reserva siempre que sea necesaria energía (Morvan-Bertrand *et al.* 2001; Van den Ende *et al.* 2001); (ii) aumentan rápidamente la presión osmótica (por ejemplo en la apertura de la flor de *Campanula*) (Vergauwen *et al.* 2000); (iii) incrementan las concentraciones de oligofructanos en condiciones de estrés (Van den Ende *et al.* 1996), con una posible contribución a la tolerancia al frío a través de la estabilización de membranas (Hincha *et al.* 2000; Vereyken *et al.* 2003; Michiels *et*

al. 2004); y (iv) deben hidrolizar parcialmente sustratos de fructanos durante el proceso de biosíntesis de fructanos en trigo (proceso de ajuste) (Ven den Ende *et al.* 2003). La mayoría de estas FEHs se inhiben por sacarosa *in vitro* (Van den Ende *et al.* 2001; Van den Ende *et al.* 2003) y por lo tanto, se deben inactivar en condiciones de no estrés *in vivo*.

3.4.1. Relación de las FEH y las fructosiltransferasas con las invertasas

Las primeras FEHs de plantas clonadas fueron las de la endibia (Van den Ende *et al.* 2000; Van den Ende *et al.* 2001) y la del trigo (Van den Ende *et al.* 2003). El retraso en la clonación de FEH probablemente se ha debido a que los biólogos moleculares estaban enfocando la idea de la búsqueda de candidatos para FEH en genes como las invertasas vacuolares. De hecho, la clonación de ADNc de una fructosil transferasa demostró que estaba estrechamente relacionada con las invertasas vacuolares (Ritsema & Smeekens 2003), y los experimentos de aislamiento de vacuolas demostraron que los fructanos y las enzimas implicadas en su metabolismo (fructosil transferasas y FEHs) estaban presentes en la vacuola (Wiemken *et al.* 1986; Darwen & John 1989). Sorprendentemente, con la purificación nativa de las FEHs de endibia y su posterior clonación, se encontró que las secuencias aminoacídicas de las FEHs estaban muy relacionadas con las invertasas de pared celular más que con las invertasas vacuolares, en contraste con su localización vacuolar (Wiemken *et al.* 1986; Darwen & John 1989). Esto pone de manifiesto que no se puede confiar solo en la información de la secuencia para predecir la localización de una proteína. Filogenéticamente, están en un subgrupo distinto entre los llamados invertasas del tipo de pared celular. El punto isoeléctrico característico de las FEHs es bajo (Ven den Ende *et al.* 2003b), en contraste con las invertasas de pared celular que tienen un punto isoeléctrico alto para unirse a los componentes ácidos de la pared celular.

Análisis bioquímicos de las fructosiltransferasas han mostrado que algunas de estas enzimas tienen incluso actividad para hidrolizar sacarosa (actividad invertasa) (por ejemplo la 6-sacarosa-fructosiltransferasa de cebada; Sprenger *et al.* 1995). También, a altas concentraciones de sacarosa, la mayoría de las invertasas tienen actividad 1-sacarosa-sacarosa-transferasa (Obenland *et al.* 1993; Vijn *et al.* 1998). Con estos datos, no sorprende que la comparación de las secuencias de amino ácidos de fructosiltransferasas e invertasas de plantas revelen un alto grado de identidad. La mayor homología se da entre las fructosiltransferasas y las invertasas ácidas. El aminoácido implicado en la hidrólisis de la sacarosa es el Asp (D) de la secuencia de unión a la sacarosa NDPNG y el Glu (E) en la secuencia WECP/VD. Estos aminoácidos están conservados en las invertasas y en las fructosiltransferasas de plantas, lo que sugiere que tienen un

mecanismo análogo para la hidrólisis de la sacarosa, aunque los aminoácidos implicados en la actividad fructosiltransferasa no se conocen todavía. La estrecha relación entre invertasas y fructosiltransferasas a nivel bioquímico y molecular, es una fuerte evidencia de que las fructosiltransferasas evolucionaron a partir de las invertasas por unas pocas mutaciones. Filogenéticamente, los grupos de fructosiltransferasas e invertasas vacuolares están juntos, mientras que las invertasas de pared celular forman un grupo separado.

3.4.2. FEHs en plantas que no sintetizan fructanos

La detección de elevados niveles de actividad FEH junto con la completa ausencia de fructanos en hojas de endibia (planta que sintetiza fructanos) etioladas (Van den Ende *et al.* 2001), sugería una función alternativa de estas enzimas. Éstos datos inspiraron en la búsqueda de actividades FEH en plantas que no contienen fructanos (Van den Ende *et al.* 2004). En esta línea, recientemente se ha demostrado que dos de los seis genes que posiblemente codificaban para invertasas de pared celular de *Arabidopsis thaliana* (AtcwINV3 y 6) en realidad tienen actividad FEH. La expresión heteróloga en *Pichia pastoris* demuestra que AtcwINV3 es una 6-FEH y AtcwINV6 es una FEH que puede degradar tanto fructanos tipo inulina como los tipo levanos (De Coninck *et al.* 2005). Van den Ende *et al.* (2003b) también describe la inesperada presencia de 6-FEHs en *Beta vulgaris* (azúcar de remolacha) que es una planta que no sintetiza fructanos mediante el análisis funcional de un gen que es como las invertasas de pared celular.

El papel de estas FEHs en las plantas que no sintetizan fructanos no está claro. Los sustratos de este tipo de FEHs probablemente no sean endógenos, ya que no hay evidencias de genes de fructosiltransferasa en el genoma de *Arabidopsis* y no se han detectado tampoco fructanos ni en *Arabidopsis* ni en el azúcar de remolacha (Van den Ende *et al.* 2003b). La función más convincente para una FEH en estas condiciones, podría ser la de degradar fructanos de microorganismos. Es posible que participen en la hidrólisis de los exudados que contienen levanos que rodean a las bacterias endofíticas o fitopatógenas como *Pseudomonas* ó *Erwinia* (Hettwer *et al.* 1995; Bereswill *et al.* 1997). Un papel como componente relacionado con la defensa parece convincente, ya que los levanos forman una capa que separa a la bacteria y a los polímeros de la pared celular de la planta durante las fases iniciales de la infección, lo que previene al patógeno de ser reconocido por la planta. De esta manera, la planta prevendría la formación de levanos y haciendo esto, la infección. Se ha hipotetizado también que la FEHs podrían estar implicadas en el establecimiento de la simbiosis entre las plantas las bacterias endofíticas (Tallgren *et al.* 1999; Hernandez *et al.* 2000). Se ha especulado que los derivados de la sacarosa u homólogos como la 6-kestosa y la

trealosa, actúan como señales que son capturadas por sensores específicos, por lo que esta señal tendría que ser destruida después de ser recibida, y esta función la podrían llevar a cabo enzimas altamente específicas como la 6-FEH.

3.4.3. Fructosiltransferasas

3.4.3.1. *En plantas*

Las fructosiltransferasas al igual que las invertasas vacuolares, pertenecen a la familia 32 de las glicosil hidrolasas. En las invertasas la secuencia llamada de unión a la sacarosa está muy conservada: H-X-X-P-X-X-X-X-[LIVM]-N-D-P-N-[GA]. El motivo NDPNG/A de dicha secuencia, es llamado motivo β -fructosidasa, que contiene el residuo esencial de Asp que probablemente actúa como nucleófilo. En las fructosiltransferasas la secuencia de unión a la sacarosa está presente aunque con algunas variaciones, especialmente en el motivo β -fructosidasa, donde la secuencia consenso es diferente: H-X-X-[PTV]-X-X-X-X-[LIVMA]- [NSCAYG]- [DE]-P-[NDSC]- [GA] (Pons *et al.* 2000). Las secuencias de unión a la sacarosa de enzimas procedentes de plantas diferentes pero codificando la misma especificidad enzimática, son a menudo más homologas que las que pertenecen a la misma planta pero codifican distintas actividades enzimáticas (Ritsema & Smeekens 2003). Ritsema *et al.* (2004) estudiaron la importancia del motivo β -fructosidasa de la 6G-FFT mediante el uso de mutantes, mostrando que dicho motivo es muy importante en la determinación del sustrato a utilizar y por lo tanto es específico del tipo de fructano que se sintetiza.

Recientemente, se han llevado a cabo muchos estudios con la clonación molecular de genes para investigar la evolución y la función de las fructosiltransferasas en la biosíntesis de fructanos, y para mejorar los potenciales biológicos de las plantas con enzimas como 1-SST (de Halleux & van Custsem 1997; Hellwege *et al.* 1997), 1-FFT (Hellwege *et al.* 1998; van der Meer *et al.* 1998), 6G-FFT (Vijn *et al.* 1997), y sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT; Sprenger *et al.* 1995; Kawakami & Yoshida 2002). Un ADNc codificante para una 6G-FFT de cebolla se había presentado como un gen de una 6G-FFT (Vijn *et al.* 1997). La enzima recombinante de cebolla tenía actividad 1-FFT con actividad 6G-FFT, lo que estaba de acuerdo con los resultados de la purificación nativa de la 6G-FFT de bulbos de cebolla (Fujishima *et al.* 2005). Sin embargo, la 6G-FFT purificada de raíces de espárrago (Shiomi 1981) mostraba actividad 6G-FFT aunque no mostraba actividad invertasa, 1-SST, ni 1-FFT. Más tarde, la clonación de un ADNc que codifica para una 6G-FFT de hojas de espárrago, demuestra que el sistema enzimático en espárrago es diferente al de cebolla (Ueno *et al.* 2005).

3.4.3.2. En hongos

Poco se conoce sobre el significado fisiológico de los fructanos en los hongos, aunque se han identificado varias cepas de hongos que sintetizan tanto fructanos de bajo como de elevado peso molecular. Se ha clonado una fructosiltransferasa de *Aspergillus foetidus* (Rehm *et al.* 1998) que produce el trisacárido 1-kestosa, y se ha puesto de manifiesto la producción de fructooligosacáridos por parte de *Aspergillus niger* (Hirayama *et al.* 1989) y *Fusarium oxysporum* (Patel *et al.* 1997). La síntesis de inulinas de elevado peso molecular fue demostrada para *Penicillium chrysogenum* (Olah *et al.* 1993) y *Aspergillus sydowi* IAM 2544 (Kawai *et al.* 1973; Harada *et al.* 1994).

La fructosiltransferasa de *A. sydowi* es particularmente interesante, ya que se ha observado que sintetiza distintos productos bajo diferentes condiciones experimentales. Heyer & Wenderburg (2001) demostraron tras la purificación de una fructosiltransferasa de las conidias de *A. sydowi* IAM 2455, la obtención de la secuencia peptídica y la correspondiente clonación del ADNc, que la expresión en varios sistemas heterólogos de ése ADNc, depende en gran medida de las condiciones experimentales.

3.4.4. Fructanos en micorrizas arbusculares

Un estudio del efecto de las micorrizas arbusculares sobre la acumulación de fructanos en cebada (*Hordeum vulgare*) muestra que las cantidades de estos polisacáridos de reserva se alteran de forma notable en las plantas micorrizadas (Müller *et al.* 1999). En las raíces de plantas micorrizadas no fertilizadas, las cantidades de fructanos eran significativamente mayores que en las correspondientes plantas no micorrizadas. Por el contrario, la fertilización causó un descenso general en las cantidades de fructanos en las raíces, mostrando que el efecto de la micorriza no se debe a la mejora en la nutrición de las plantas micorrizadas (Douds *et al.* 1988). El incremento de fructanos en raíces micorrizadas se corresponde con un descenso de la actividad invertasa, y un incremento en la cantidad de sacarosa, lo que indica que ese exceso de sacarosa podría ser utilizado por tanto para la síntesis de fructanos. En las hojas de cebada en general, las cantidades de fructanos son menores o no sufren cambios con la simbiosis micorrízica, sin embargo, mientras que en las plantas no micorrizadas las hojas jóvenes tenían un mayor contenido en fructanos que las más viejas como ya habían mostrado Roth *et al.* (1997), este gradiente se altera en plantas micorrizadas que tienen menos fructanos que las no micorrizadas, lo que indica efectos sistémicos de la micorriza sobre la distribución de asimilados en parte aérea. Sin embargo, cuando la planta de cebada micorrizada es atacada por patógenos, tiene mayor

contenido en fructanos, lo que compensa el ataque del patógeno, minimizando sus efectos sobre el rendimiento de la planta (Gernns *et al.* 2001)

La concentración de fructanos también aumentan en raíces de plantas micorrizadas con la fertilización inicial de fósforo aunque este aumento disminuye cuando la fertilización es muy elevada (Amijee *et al.* 1993).

También hay datos sobre el contenido de fructanos en plantas micorrizadas que son incapaces de formar fructanos, como por ejemplo en tabaco (Schellenbaum *et al.* 1999), que cuando es transformado con 6-Fructosiltransferasa acumula fructanos tanto en hojas como en raíces. Pero en condiciones de sequía, la acumulación de fructanos se afecta independientemente de la micorrización. Por lo tanto, la simbiosis no tiene un papel importante en la acumulación de fructanos cuando las plantas transgénicas son sometidas a estrés hídrico.

3.5. Transportadores de azúcares

En las plantas superiores, la fijación del CO₂ se produce principalmente en las células del mesófilo de las hojas maduras. Deben existir mecanismos que aseguren que todos los tejidos sumidero reciben una cantidad adecuada de azúcares para su crecimiento y desarrollo, y los transportadores de azúcares tienen un papel principal en el transporte a través de membrana de los azúcares y en su distribución en la planta. Las proteínas transportadoras de azúcares tienen un papel crucial en la distribución de azúcares en la planta tanto a larga distancia como entre célula-célula. En la última década de han identificado genes que codifican para transportadores de azúcares, se han expresado en sistemas heterólogos, y se han estudiado con respecto a su distribución espacial y temporal (ver revisión Williams *et al.* 2000).

La sacarosa representa la forma principal en que se transporta el carbono reducido, aunque algunas plantas también pueden transportar rafinosa, polioles..., solutos que están menos sujetos al metabolismo que la sacarosa.

Las plantas superiores tienen dos familias distintas de transportadores de azúcares: los transportadores de disacáridos que sobre todo catalizan el transporte de sacarosa, y los transportadores de monosacáridos que median en el transporte de una gran variedad de monosacáridos. Éstos transportadores tienen una gran variedad de funciones, algunos tienen un papel puramente nutricional abasteciendo a las células de azúcares para su desarrollo y crecimiento, mientras que otros están involucrados en la generación de gradientes osmóticos necesarios para el flujo. Algunos incluso deben estar implicados en señalización. Hay varios niveles que regulan el control de estos transportadores de azúcares durante el desarrollo de la planta y cuando se perturba el ambiente (Williams *et al.* 2000). Estudios fisiológicos

han puesto de manifiesto que el transporte de azúcares en plantas y el metabolismo están muy regulados por los azúcares, tanto a nivel transcripcional como a nivel post-transcripcional (revisado por Lalonde *et al.* 1999).

3.5.1. Transportadores de sacarosa

Aunque la sacarosa se sintetiza en el citosol, es la vacuola de las células del mesófilo donde se almacena principalmente durante el día en las especies que acumulan sacarosa durante el fotoperiodo (Gerhardt *et al.* 1987; Winter *et al.* 1994; Lohaus *et al.* 1996). En condiciones fisiológicas la sacarosa está excluida de cloroplastos y mitocondrias (Heldt & Sauer 1971), por lo que resulta sorprendente que la expresión heteróloga de una fructosiltransferasa bacteriana en el cloroplasto, tenga como consecuencia una acumulación de fructanos, sugiriendo la presencia de sacarosa en el cloroplasto aunque sea en bajas concentraciones (Smeekens 1998).

En la planta, la mayor concentración de sacarosa se encuentra en los tubos cribosos, a través de los cuales la sacarosa se transporta desde los tejidos fuente a los sumidero conducida por un gradiente osmótico. En los tubos cribosos, el rango de la concentración de sacarosa es de 200 a 1600 mM, mostrando incluso concentraciones mayores durante el periodo de luz, y concentraciones menores durante la noche (Kallarackal *et al.* 1989; Winzer *et al.* 1996). La compartimentación de la sacarosa necesita de su transporte a través de las membranas celulares tanto intra como extracelularmente, transporte que es llevado a cabo por proteínas transportadoras específicas.

El transporte a larga distancia de la sacarosa, depende de una familia de proteínas que actúan como portadores de sacarosa. De acuerdo con los distintos pasos a través de membrana mediados en plantas, los transportadores de sacarosa pueden ser de tres tipos: transportadores de influjo de membrana plasmática responsables de la entrada de sacarosa en el interior de las células y que son del tipo simporte protón/sacarosa; transportadores del tonoplasto propuestos para trabajar en el antiporte sacarosa/protón (Briskin *et al.* 1985) ya que la vacuola es ácida comparada con el citoplasma; y finalmente, transportadores de flujo de membrana plasmática como por ejemplo, para la descarga de la sacarosa en los tejidos sumidero ó para la salida de la sacarosa desde el mesófilo de las células que están en las inmediaciones del floema.

Estudios recientes, han demostrado que las proteínas transportadoras de sacarosa específicas tiene un papel esencial en la descarga de la sacarosa en el interior de los componentes del floema de las plantas vasculares (ver revisión Truernit 2001). La existencia de varias secuencias relacionadas ó ya conocidas como transportadores de sacarosa en la base de datos de *Arabidopsis*, indica que en una planta hay una familia génica de transportadores de sacarosa. El número

total de genes que la componen no se conoce todavía ya que irá creciendo al tiempo que se hallen nuevas secuencias. Como en el caso de los transportadores de hexosas, el patrón de expresión de algunos transportadores está muy restringido a ciertos tipos celulares ó fases de desarrollo, lo que hace más difícil su localización. Por todo esto, los estudios de estructura y función de los transportadores de sacarosa están aún en sus inicios (ver revisión Lemoine 2000).

Todos los transportadores de sacarosa (*SUT*) identificados hasta ahora, están codificados por la familia génica *SUT* (revisado en Lalonde *et al.* 1999), son dependientes de energía y son sensibles a los protonóforos, lo que indica que funcionan en simporte con protones. Los genes *SUT* codifican proteínas muy hidrofóbicas que contienen 12 dominios transmembrana, y están relacionados distantemente con la familia de transportadores de hexosas encontrada en muchos organismos tales como levaduras y plantas (revisado en Ward *et al.* 1997; Rentsch *et al.* 1998).

En hojas, la cinética de la absorción de sacarosa, implica componentes de alta y baja afinidad. Se ha identificado una familia de *SUT* con componentes de baja y alta afinidad: *SUT1*, transportador de alta afinidad esencial para la carga del floema y el transporte a larga distancia en solanáceas (Riesmeier *et al.* 1994; Kühn *et al.* 1997); *SUT4*, transportador de baja afinidad con un patrón de expresión similar a *SUT1* (Weise *et al.* 2000) localizándose ambos en los elementos de los tubos cribosos; y *SUT2* recientemente descrito (Barker *et al.* 2000) en tomate y *Arabidopsis*, y que debe estar implicado directamente en el control de la expresión, de la actividad y del reciclaje de los otros dos transportadores *SUT1* y *SUT4*, controlando el flujo de sacarosa a través de la membrana plasmática de los elementos de los tubos cribosos.

3.5.2. Transportadores de monosacáridos

Se han identificado actividades de transporte de monosacáridos en gran variedad de especies plantas (Maynard & Lucas 1982; Getz *et al.* 1987; Gogarten & Bentrup 1989; Tubbe & Buckhout 1992). Los sustratos que transportan eficientemente son: β -D-glucosa, 3-O-metil β -D-glucosa, 2-deoxi β -D-glucosa, α -D-manosa, y β -D-fructosa, mientras que β -L-glucosa y β -D-ribosa son sustratos pobres para el transporte (Gogarten & Bentrup 1989). Los primeros transportadores de monosacáridos de plantas clonados, fueron los de *Chlorella kessleri*, aprovechando que se inducían de forma rápida cuando se añadían hexosas al medio en el que crecía. En contraste con los transportadores de hexosas (HXTs) de levadura, que funcionan como uniportadores, el de *C. kessleri* tiene un mecanismo de transporte de simporte (Sauer *et al.* 1990; Aoshima *et al.* 1993). A excepción de esta diferencia en el mecanismo de transporte, los genes

transportadores de levadura y de *C. kesseri* son homólogos, codificando proteínas con 12 posibles dominios transmembrana.

La familia de los transportadores de monosacáridos en *Arabidopsis*, está formada por 26 genes, y múltiples genes se han aislado de otras especies de plantas (Lalonde *et al.* 1999). Los patrones de expresión de distintos transportadores de monosacáridos de plantas, sugieren que estas proteínas de membrana funcionan en la absorción de hexosas en los tejidos sumidero (Sauer & Stadler 1993). Los análisis de expresión muestran que los transportadores de monosacáridos de plantas están muy regulados, por ejemplo en respuesta a la infección por patógenos ó por heridas (Truernit *et al.* 1996; Fotopoulos *et al.* 2003), permitiendo así una relocalización flexible del carbono fijado. La expresión de los transportadores de monosacáridos en los tejidos sumidero también ayuda a un mecanismo apoplásmico para la descarga del floema ó post-floema (Sauer & Stadler 1993). En esta situación, los tejidos sumidero de las plantas, deben adquirir hexosas de una manera similar a cómo lo hacen las levaduras, que usan una invertasa extracelular para hidrolizar la sacarosa externa. Un requerimiento para este mecanismo en el caso de las plantas, es la expresión conjunta de invertasas y transportadores de monosacáridos (Ehness & Roitsch 1997).

3.6. Metabolismo de los carbohidratos en ectomicorrizas

En la simbiosis con ectomicorrizas, las plantas incrementan su capacidad fotosintética para responder a la demanda de carbohidratos del hongo. A parte del aumento de la formación de sacarosa en las hojas, se consideran tres puntos de control que podrían limitar el drenaje de carbohidratos desde la planta: la exportación de sacarosa desde el floema (que no es entendido aún completamente), la hidrólisis de la sacarosa en la interfase planta-hongo, y la competición entre las células de planta y el hongo por la absorción de monosacáridos. De los datos obtenidos hasta ahora, se deduce que la competición por hexosas no ocurre en la interfase planta-hongo. Además, la actividad de la invertasa ácida de la planta que es la que genera carbohidratos disponibles para el hongo, no parece ser la razón limitante de las ectomicorrizas de *Amanita muscaria*. Así, el control del drenaje de carbohidratos de la planta implica a la sacarosa que se transfiere directamente desde el floema (ver revisión Nehls *et al.* 2001b).

La generación de una fuerte fuerza sumidero de carbohidratos por las hifas del hongo, es un proceso crucial para sostener el aporte de hexosas al hongo en los tejidos simbióticos. Se conocen datos de cómo se genera esa fuerza sumidero y cómo se regula a nivel fisiológico en la planta. Sin embargo, la regulación y la

interacción entre las rutas del metabolismo de carbohidratos en el hongo, son aún desconocidas (ver revisión Nehls *et al.* 2001b).

La disponibilidad y la distribución de azúcares, tiene un papel principal en la regulación de las actividades fúngicas en los tejidos micorrizados. La expresión tejido-dependiente de los genes regulados por hexosas *AmMst1* y *AmPAL* en ectomicorrizas (Nehls *et al.* 2001a), es probablemente sólo un ejemplo de los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo de la simbiosis. La inducción en raíces de álamo de uno de los cinco posibles transportadores de monosacáridos (*PttMST3.1*) por la formación de micorrizas, sugiere que las células de las raíces son capaces de competir con las hifas del hongo por las hexosas del apoplasto, volviendo a dirigir el flujo de azúcares hacia las células de la planta siempre que el hongo no aporte suficientes nutrientes minerales (Grunze *et al.* 2004).

Respecto a la actividad invertasa, no se ha detectado en el micelio de distintos hongos ectomicorrícicos (Salzer & Hager 1991; Schaeffer *et al.* 1995; Wright *et al.* 2000), sin embargo si se detectó una estimulación de la actividad invertasa asociada a pared en *Betula pendula* Roth. (abedul) colonizado por el hongo ectomicorrícico *Paxillus involutus* (Wright *et al.* 2000). En el otro estudio en el que se ha medido la actividad invertasa (Schaeffer *et al.* 1995), se mostraba que la invertasa ácida era la principal enzima que hidroliza sacarosa en las raíces de *Picea abies*, pero su actividad no aumentaba con la infección por ectomicorrizas. Estos datos para ectomicorrizas contrastan con la estimulación descrita para las actividades de las invertasas citoplasmáticas y las asociadas a pared así como de la sacarosa sintasa en respuesta a la colonización micorrícico arbuscular (Wright *et al.* 1998).

Wright y colaboradores (2000), mostraron que los niveles de expresión de dos transportadores de hexosas y uno de sacarosa de la planta *Betula pendula* disminuían en raíces micorrizadas respecto a las no micorrizadas. Esta disminución de la expresión, particularmente la del transportador de sacarosa, parece incompatible con la estimulación del flujo de carbono hacia las raíces que se produce en respuesta al aumento de la fuerza sumidero cuando se produce la colonización fúngica. Posibles explicaciones para esta aparente discrepancia son que estos transportadores no están directamente implicados en el movimiento de carbono a la interfase simbiótica, que su expresión puede estar muy localizada en respuesta a las alteraciones en la asignación de carbono dentro de las raíces micorrizadas, ó que se inducen otros transportadores.

3.7. Metabolismo de los carbohidratos en tomate

A partir de cebadores degenerados basados en los motivos de aminoácidos conservados en distintas plantas, Godt & Roitsch (1997) mostraron que las isoenzimas de invertasas extracelulares en tomate (*Solanum esculentum* L.), estaban codificadas por una familia multigénica que estaba formada por cuatro miembros que no se habían descrito hasta entonces: *Lin5*, *Lin6*, *Lin7*, y *Lin8*. Previamente se había clonado la invertasa vacuolar TIV1 (Klann *et al.* 1992; Elliott *et al.* 1993). Las secuencias de aminoácidos deducidas de las cuatro invertasas clonadas (*Lin5*, *Lin6*, *Lin7*, y *Lin8*), muestran claramente una mayor relación filogenética con el grupo de las invertasas extracelulares (Godt & Roitsch 1997), además, se caracterizan porque en el dominio catalítico conservado en todas las invertasas WEC(V/P)D, muestran una prolina al igual que otras invertasas extracelulares. Sus puntos isoeléctricos (entre 8.4 y 10.4) son también característicos de isoenzimas extracelulares. El análisis genómico por Southern, demostró que la invertasa vacuolar TIV1 y las extracelulares *Lin5*, *Lin6*, *Lin7* y *Lin8*, están codificadas por cinco genes distintos presentes en una o muy pocas copias en el genoma haploide.

Mientras que el patrón de expresión de las invertasas extracelulares *Lin5*, *Lin6* y *Lin7* sugiere funciones específicas para estas isoenzimas en el metabolismo sumidero, el ARNm de *Lin8* que fue clonado a partir de ADN genómico, no se pudo detectar, con lo que hasta ese momento no se podía decidir si es que era un pseudogen o bien que era inducido solo bajo condiciones que no se habían probado hasta el momento. El análisis de la distribución de los ARNms de las invertasas en los distintos tejidos reveló, que *Lin7* está presente a elevadas concentraciones en flores y concretamente en estambres, los niveles más elevados de TIV1 y *Lin5* se encontraron dentro de las flores en pétalos y gineceo respectivamente, el ARNm de *Lin6* está presente en tejidos sumidero de crecimiento activo como raíces de las semillas en germinación, tumores y brotes de la flor, se expresa específicamente bajo condiciones en las que se requiere un elevado suministro de carbohidratos. Esta distribución tejido-específica y la regulación por estímulos internos y externos sugiere que *Lin6* tiene una importante función en la hidrólisis de sacarosa en el apoplasto en la regulación fuente-sumidero y en el aporte de carbohidratos a los órganos sumidero. Se induce por la fitohormona promotora del crecimiento zeatina, lo que apoya su elevada actividad en tejidos de crecimiento activo, ya que se sabe que estos tejidos contienen elevadas concentraciones de citokininas. Su inducción en respuesta a heridas (Ohyama *et al.* 1998) y tratamientos con elicitores, indica que *Lin6* es importante para inducir el metabolismo heterotrófico en respuesta a estímulos relacionados con estrés, ya que el aumento de carbohidratos disponibles

proporcionará energía metabólica para la activación de reacciones de defensa. Los niveles basales de *Lin6* en las hojas de plantas de tomate son muy bajas, aumentando sus niveles de ARNm tras la infección con distintos patógenos (Berger *et al.* 2004). Su inducción por glucosa está de acuerdo con la inducción de un número de enzimas sumidero-específicas (Koch & Nolte 1992) por este azúcar, que es el producto final de la reacción de la invertasa.

En cuanto a la expresión en fruto, Miron y colaboradores (2002) mostraron mediante estudios de expresión cuantitativa del gen TIV1 y de los genes de invertasas apoplásticas (Lins), que sólo la expresión génica de TIV1 tenía relación con las diferencias de actividad invertasa tanto soluble como insoluble en el pericarpo de dos especies distintas de tomate. La expresión de los genes Lin que codifican para invertasas de tomate apoplásticas no estaba relacionada con las diferencias en la actividad enzimática y no podía estar relacionada con el aumento en la actividad invertasa asociada a pared celular del fruto maduro de *S. esculentum*. Presentan pruebas de que esa actividad invertasa de tomate asociada a pared es producto del gen TIV1, estando claro que dicho gen sólo controla la relación de sacarosa y hexosas en frutos maduros de *S. esculentum* spp. (Chetelat *et al.* 1993; Klann *et al.* 1993, 1996; Hadas *et al.* 1995; Ohyama *et al.* 1995). Estos datos sobre TIV1 se confirmaron un poco más tarde por Husain y colaboradores (2003).

Respecto al otro tipo de enzimas que degradan sacarosa, el primer clon de sacarosa sintasa de tomate se aisló de una librería de ADNc, y se le llamó TOMSSF (Wang *et al.* 1993). La expresión constitutiva de su ARN en antisentido, inhibe de forma notable la actividad sacarosa sintasa en flores y fruto, de forma mínima en el endospermo, y no se detectó inhibición en el embrión, peciolo, tejidos sumidero, y tejidos de hojas (D'Aoust *et al.* 1999). La actividad de la sacarosa fosfato sintasa decrece en paralelo con la de la sacarosa sintasa, pero la actividad invertasa ácida no aumenta en respuesta a esa disminución de la actividad de la sacarosa sintasa. Así, el único efecto sobre el contenido en carbohidratos de frutos jóvenes, era una ligera reducción en la acumulación de almidón, sin embargo, si se afecta la cantidad de frutos que produce la planta, sugiriendo que TOMSSF participa en el control de la capacidad para importar sacarosa a los frutos jóvenes, lo que es determinante para la cantidad de frutos y su desarrollo. Las principales características de la regulación del metabolismo de azúcares en frutos de tomate, implica a cuatro ciclos principales estrechamente conectados en los que intervienen invertasas y sacarosa sintasa (revisión Nguyen-Quoc *et al.* 2001).

Por último, los transportadores de azúcares son también parte importante del metabolismo carbonado de las plantas. De tomate se conocen un clon completo

(*LeHT2*), y dos clones parciales (*LeHT1*, *LeHT3*) que codifican para transportadores de hexosas (Gear *et al.* 2000), aislados de librerías de ADNc de fruto y flor de *S. esculentum*, y que tienen características de la Superfamilia de los Facilitadores Mayores. Por análisis de Southern blot se confirmó la presencia de una familia génica de transportadores de hexosas en tomate que incluía al menos tres miembros. Respecto a su expresión en distintos órganos, *LeHT1* y *LeHT3*, se expresan en tejidos sumidero predominantemente, mostrando la más elevada expresión en fruto joven y en los ápices de las raíces. *LeHT2* se expresa a niveles relativamente elevados en hojas fuente y seguro en tejidos sumidero tales como las flores, y es un transportador de hexosas de alta afinidad que probablemente actúa en el simporte H⁺/hexosa (Gear *et al.* 2000). Por otro lado, para el transporte de sacarosa hasta ahora se han aislado tres genes que codifican para transportadores de sacarosa en tomate, *LeSUT1*, *LeSUT2*, y *LeSUT3* (Barker *et al.* 2000; Weise *et al.* 2000). Las proteínas de esos tres genes se ha demostrado que están co-localizadas en los elementos cribosos, mientras que el transcrito de *SUT1* se localiza en las células acompañantes (Barker *et al.* 2000; Kühn *et al.* 1996; Weise *et al.* 2000). Mientras que *LeSUT1* se expresa principalmente en el exporte de sacarosa en las hojas fuente, *LeSUT2* se expresa predominantemente en órganos sumidero (Barker *et al.* 2000), del mismo modo se expresan diferencialmente en el fruto del tomate ambos genes (Hackel *et al.* 2006). Es más, la inhibición de la expresión de ambos genes tiene efectos distintos sobre el desarrollo de la planta, mientras que el bloqueo de la expresión de *LeSUT1* tiene efectos fenotípicos sobre la carga del floema, el de *LeSUT2* afecta al desarrollo del fruto y de las semillas, (Hackel *et al.* 2006).

En tomate, los cambios en los niveles de azúcares en respuesta a la infección por patógenos dependen fundamentalmente del patógeno implicado en la infección. Así por ejemplo en tomate, el contenido de azúcares disminuye de forma muy acusada tras la infección con *Botrytis cinera* (Berger *et al.* 2004), mientras que en otros sistemas como en tabaco (Herbers *et al.* 2000), trigo (Wright *et al.* 1995), y *Arabidopsis* (Chou *et al.* 2000), los niveles de hexosas y sacarosa aumentan tras la infección con distintos patógenos.

Como se puede apreciar por la bibliografía, casi todos los estudios del metabolismo de carbohidratos en tomate están realizados en fruto, y sin embargo, se conoce muy poco de su regulación en órganos como la raíz. Precisamente éste órgano será objeto principal de estudio de la presente Tesis Doctoral, por ser el órgano en el que ocurre físicamente la interacción entre la planta y el hongo en la simbiosis micorrízica arbuscular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

1.1. Material vegetal

1.1.1. Planta utilizada

La planta utilizada para la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido tomate (*Solanum esculentum* Mill), cultivar 76R (Peto Seed Company, SA).

1.1.2. Cultivo de plantas

1.1.2.1. Substrato: composición y esterilización

El substrato en todos los experimentos estaba compuesto por una mezcla de arena:suelo en proporción 1:1 (v/v) ó 1:2 (v/v).

El suelo utilizado procedía de la Estación Experimental del Zaidín (Granada), y presentaba las siguientes características: pH de 8.1 (agua); 1.81% materia orgánica, unas concentraciones de nutrientes (mg kg^{-1}) de 2.5 para el N; 6.2 para el P (extraíble con NaHCO_3); y 132.0 para el K. La textura del este suelo, estaba formada por 35.8% arena, 43.6% limo y 20.5% arcilla.

La arena utilizada era de cuarzo ($< 2 \text{ mm}$), y previamente era lavada y esterilizada en autoclave 20 minutos a 120°C . El suelo era tamizado (2 mm) y esterilizado por tindalización en un autoclave a vapor fluente (100°C durante 1 h, 3 días consecutivos). De esta forma, el suelo queda libre de propágulos de micorrizas y otros organismos que puedan interferir en el experimento.

1.1.2.2. Esterilización, germinación y siembra de las semillas

Las semillas de tomate fueron esterilizadas en superficie con una solución de lejía al 10% durante 10 minutos. Luego, se lavaron varias veces con agua destilada para eliminar cualquier resto que pudiera interferir en la germinación. Posteriormente, las semillas se germinaron en vermiculita estéril a 28°C hasta que los cotiledones estaban fuera, momento en el que se trasladaron a invernadero. Cuando las plántulas desarrollaron la primera hoja verdadera, fueron transplantadas a macetas que contenían 500 ml de una mezcla de suelo:arena estéril.

1.1.2.3. Solución nutritiva para las plantas

Las plantas del experimento 1 recibieron tres veces por semana solución nutritiva Long Ashton (Hewitt) con un bajo contenido de fósforo (25%) (Hewitt 1952). La composición de la solución nutritiva con el 100% de fósforo, es la siguiente:

Hewitt 100% de P			
Compuestos	Concentración (uM)	Solución madre (g/l)	Para 1 litro (ml)
KNO ₃	3 x10 ³	30,3	10
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	9 x10 ³	101,54	20
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	300	18,4	2,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	150	18,4	20
EDTA-Fe	67	2,45	10
MnSO ₄ . 7H ₂ O	13	1,35	1
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1	2,4	0,1
ZnSO ₄ . 2H ₂ O	1	4,22	0,1
H ₃ BO ₃	30	18,6	0,1
Na ₂ Mo O ₄ . 2H ₂ O	0,15	0,35	0,1

Ajustar a pH 7

Las plantas del experimento 2 recibieron tres veces por semana solución nutritiva de Hoagland con la mitad de fuerza (0.5X) (Hoagland & Arnon 1950) y con diferentes contenidos de fósforo. La composición de la solución nutritiva Hoagland 0.5x es la siguiente:

Hoagland 0.5x			
Compuestos	Concentración (uM)	Solución madre (g/l)	Para 1 litro (ml)
Macronutrientes			
KH ₂ PO ₄	20	136,1	0,02
	100	136,1	0,1
	500	136,1	0,5
KNO ₃	2500	101,11	2,5
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	2500	236,15	2,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1000	246,48	1
Solución Micronutrientes			0'5

Solución micronutrientes	Concentración (uM)	Para 1 litro (ml)
H ₃ BO ₃	23,1	2,86
MnCl ₂ . 4H ₂ O	4,55	1,81
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,38	0,22
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,16	0,08
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,01	0,02
EDTA-Fe	2,24	1,645

1.1.2.4. Condiciones de crecimiento en invernadero

Todas las plantas crecieron en condiciones controladas en invernadero con un 60% de humedad relativa, temperaturas día/noche de 25/18° C, y un fotoperiodo de 16 horas.

1.1.2.5. Cosecha de distintos órganos

Se cosecharon muestras de distintos tejidos de plantas de tomate crecidas durante 3 meses en las condiciones de invernadero anteriormente mencionadas, y que habían sido regadas con agua durante todo el periodo de crecimiento. Los tejidos cosechados fueron: flores, sépalos, hojas jóvenes, hojas adultas, tallo, raíces, fruto verde y fruto maduro. Todas las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

1.1.2.6. Aplicación de fitohormonas y azúcares

Para este experimento, se crecieron durante 25 días semillas de tomate en vermiculita estéril según se ha descrito anteriormente, y fueron regadas con solución nutritiva Hoagland a la mitad de fuerza (0.5x). Pasado este tiempo, las plántulas se transfirieron a tubos falcon que contenían solución nutritiva suplementada con agua (control), $100\ \mu\text{M}$ de ácido salicílico, $100\ \mu\text{M}$ de ácido abscísico (ABA), $40\ \text{mM}$ de glucosa ó $20\ \text{mM}$ de sacarosa. Las raíces se cosecharon 12 y 24 horas después de la aplicación los tratamientos, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

1.1.3. Determinaciones fisiológicas

1.1.3.1. Producción de biomasa

En el momento de la cosecha, se determinó el peso fresco de raíz y parte aérea. El peso seco de la parte aérea se midió después de secarlo en un horno a 70°C durante 2 días.

1.2. Material fúngico

1.2.1. Hongos micorrícicos utilizados

Las especies de hongos micorrícico arbusculares utilizados en los distintos experimentos fueron: *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd y Trappe BEG 119 (*Gm*), *Glomus intraradices* (Schenck y Smith) BEG 121 y *Glomus intraradices* (Schenck y Smith) BEG 123. El inóculo de la micorriza de cada endosito, creció en cultivos de *Allium cepa* L. o *Zea mays*. En todos los casos dicho inóculo estaba basado en suelo-arena que contenía esporas, micelio y fragmentos de raíz infectados.

1.2.2. Determinación de la micorrización

Una vez obtenidas en el momento de la cosecha, las raíces fueron teñidas empleando la tinción basada en el uso del azul tripán (Phillips & Hayman 1970). El colorante azul tripán tiñe las estructuras que contienen quitina, principal

componente de las paredes celulares de algunos hongos, entre ellos los formadores de micorrizas arbusculares (Bartnicki-García 1968). Se observan así los componentes del hongo en el interior de la raíz, sin que ésta se coloree.

Procedimiento:

1. Las raíces se trocean y se sumergen en una solución de KOH 10% (p/v) y se mantienen durante 30 minutos al *baño maría*.
2. Se elimina el KOH y las raíces se lavan varias veces con agua.
3. Se les añade HCl 0,1 N durante 5 minutos a temperatura ambiente, con el fin de preparar las raíces para la entrada del colorante.
4. De nuevo se ponen a hervir al *baño maría* en una solución de 0.05% azul tripán en ácido láctico (v/v) durante 30 minutos.

Una vez teñidas, se elimina el exceso de colorante y se conservan en una solución de ácido láctico hasta su posterior observación al microscopio óptico.

1.2.3. Estimación de la colonización micorrícica

Para estimar el grado de colonización micorrícica, una vez teñidas las raíces se seleccionan fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, los cuales se montan sobre portaobjetos, se bañan en ácido láctico y se cubren con un cubreobjetos. La cuantificación de la colonización, se lleva a cabo con la ayuda de un microscopio óptico. Para dicha cuantificación, se asignan a cada trozo de raíz dos valores: el primero de ellos corresponde a la longitud de fragmento que está colonizada, y el segundo, a la intensidad de dicha colonización. Estos números toman el valor 0 cuando no hay colonización y 10 cuando ésta es máxima. La multiplicación de los dos valores da el porcentaje de micorrización presente en cada fragmento de raíz, y la media del porcentaje en todos los fragmentos, da una estimación de la colonización de la planta. De cada plántula de tomate se examinaron un mínimo de 50 fragmentos de raíz elegidos al azar.

1.2.4. Hongos patógenos utilizados, aplicación y determinación de la infección.

Se ha utilizado el hongo patógeno de raíz *Phytophthora parasitica* variedad *nicotianae* (Phy).

Para la inoculación con el patógeno, plantas controles crecidas durante 4 semanas, fueron regadas con una suspensión de micelio de *P. parasitica* como previamente había descrito Pozo *et al.* (1999).

La determinación de la infección se estimó evaluando las lesiones necróticas producidas por el patógeno en las raíces pasadas dos semanas desde la inoculación, según describe Pozo *et al.* (1999).

1.3. Experimentos

1.3.1. Experimento 1

Tras la esterilización y la germinación de las semillas, las plántulas se transplantaron a macetas que contenían una mezcla estéril de arena y suelo 1:2 (v/v), y crecidas en invernadero según se ha descrito anteriormente. En este caso, las plantas se regaron tres veces por semana con solución nutritiva de Hoagland al 50% y con distintas cantidades de fósforo.

Los tratamientos aplicados fueron: plantas controles no inoculadas (C) a las que se les suministró solución nutritiva que contenía 20, 100 ó 500 μM de fósforo, y plantas inoculadas con el hongo *G. mosseae* BEG119 (Gm) ó *G. intraradices* BEG123 (Gi). Las plantas inoculadas con hongos formadores de micorrizas arbusculares, se regaron con solución nutritiva que contenía 20 μM de fósforo. La inoculación micorrízica se llevó a cabo como está descrito por Benabdellah *et al.* (1999), y se aplicó en una proporción del 5% en volumen. Las plantas control recibieron un filtrado ($<20\mu\text{M}$) del inóculo fúngico que contenía las poblaciones microbianas sin poseer propágulos de micorrizas arbusculares. Las plantas se cosecharon a las 3, 4, 5 y 6 semanas después de la inoculación con el hongo MA. Y tras la determinación de los pesos frescos de parte aérea y raíz, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C .

1.3.2. Experimento 2

Las semillas de tomate fueron esterilizadas, germinadas y transplantadas como se ha descrito previamente a macetas con una mezcla estéril de arena:suelo 1:1 (v/v). Se aplicaron dos tratamientos distintos: plantas control no inoculadas (C) y plantas inoculadas con el patógeno *P. parasitica* (Phy). La inoculación con el patógeno se llevó a cabo como se describe en el apartado anterior. Las plantas fueron crecidas en invernadero, y regadas tres veces por semana con solución nutritiva Long Ashton (Hewitt) con un contenido en fósforo del 25%.

El tiempo de cosecha fue, dos semanas después de la inoculación con *P. parasitica* en plantas que ya tenían 4 semanas (tiempo total 6 semanas). Tras la determinación de los pesos frescos de parte aérea y raíz, las muestras de hojas y raíces fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su análisis.

1.4. Material bacteriano

1.4.1. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas

Las cepas de *E. coli* utilizadas en el presente estudio fueron las siguientes:

- XL1-Blue (*recA1endA gyrA96 thi-1hsdR17supE44relA1lac* [F' *proAB lacIqZ.M15Tn10(Tetr)*]): Cepa que permite transformaciones altamente eficientes de ADN metilado y no metilado y la selección de clones recombinantes mediante detección de actividad β -galactosidasa. El hecho de que sea *recA*, minimiza el riesgo de recombinaciones inespecíficas. Fue utilizada para la preparación de células quimiocompetentes para la transformación con plásmidos que contenían insertos de genes de interés.
- TOP10F' (F'*{lacI^q Tn10(Tet^R)}* *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *phi80lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*): Cepa de similares características a XL1-Blue usada para en las transformaciones con pYES2.1 TOPO TA (Clontech, EE.UU).*

Estas cepas se cultivaron en la oscuridad a 37°C.

1.4.2. Medios de cultivo

1.4.2.1. Medio LB (Luria-Bertani)

Es el medio usado habitualmente para el cultivo de *E. coli* y tiene la siguiente composición:

- 1 % Triptona
- 0.5 % Extracto de levadura
- 1 % NaCl

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH.

1.4.2.2. Medio SOC

Ha sido el medio de elección para optimizar el crecimiento de células transformadas por electroporación. Composición:

- 2 % Triptona
- 0.5 % Extracto de levadura
- 0.05 % NaCl
- 2.5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂

20 mM Glucosa

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH

Estos medios se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 117° C, y se gelificaron cuando resultó necesario con la adición de agar al 1.5 %.

1.4.3. Marcadores de selección

La selección de transformantes en los medios de cultivo descritos se realizó mediante la adición de 0.1 mg/ml de ampicilina a los mismos.

Para discriminar entre aquellas colonias con actividad β -galactosidasa y aquellas que no la tienen, se utilizaron como marcadores de selección de las colonias recombinantes, soluciones de IPTG y X-Gal, conservadas a -20 °C.

IPTG: (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) se usa para inducir la expresión del gen LacZ en *E.coli*.

La solución de trabajo se prepara a una concentración de 100 mM, se esteriliza por filtración y se conserva a -20° C. Se añaden 100 μ l a la placa unos 30 min antes de sembrar el cultivo.

X-gal: (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido) es un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa de modo que al ser hidrolizado forma precipitados azules.

El X-gal se prepara en dimetilformamida a una concentración de 50 mg/ml. Se debe proteger de la luz debido a su fotosensibilidad y no es necesario filtrarlo. Se añaden 35 μ l a la placa unos 30 min antes de sembrar.

Durante la siembra se usan tanto el IPTG como el X-gal para diferenciar las colonias recombinantes (blancas) de las no recombinantes (azules).

1.4.4. Preparación de células quimiocompetentes

La preparación de células competentes de *E.coli* se realizó según la técnica descrita por Hanahan (1983).

El procedimiento es el siguiente:

1. Inocular 2 ml de un precultivo de *E.coli* en 50 ml de medio LB suplementado con 10 mM de MgSO₄.
2. Incubar a 37 °C hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0.5 (1-2 horas).
3. Transferir el cultivo a tubos de centrifuga SS-34 y enfriar en hielo 15 min.
4. Centrifugar los tubos a 800 g durante 12 min a 4 °C.
5. Retirar sobrenadante suavemente y secar bien las paredes del tubo.

6. Resuspender las células en 16 ml de solución RFI y mantener durante 15 min en hielo.
 7. Centrifugar como en el paso 4 , resuspender las células en 2 ml de RFII e incubar 15 min en hielo.
 8. Hacer alícuotas de 100 μ l.
 9. Enfriar los tubos eppendorf rápidamente en N₂ líquido y congelar a -80 °C.
- Todo el material usado (puntas, tubos de centrifuga, eppendorf...) debe estar estéril y muy frío.

RFI: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM acetato potásico, 10 mM CaCl₂, 11.9% Glicerol. Ajustar a pH 5.8 con ácido acético 0.2 M. Esterilizar por filtración.

RFII: 10 mM MOPS, 1 mM RbCl, 100 mM CaCl₂, 11.9% Glicerol. Ajustar a pH 6.8 con NaOH 0.5 M. Esterilizar por filtración.

1.4.5. Preparación de células electrocompetentes

Para la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* se ha adaptado el orotocolo de Ausubel *et al.* (2005), siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Inocular 500 ml de LB a una DO₆₀₀ 0.02 e incubar a 37° C hasta que alcancen una DO₆₀₀ de 0.6 (aproximadamente 2.5 h).
2. Repartir entre tubos de centrifuga de 250 ml y centrifugar a 4000 xg durante 10 min.
3. Eliminar el sobrenadante.
4. Lavar las células con 200 ml de agua estéril y volver a centrifugar a 4000 xg durante 10 min.
5. Lavar el sedimento con 100 ml de agua estéril. Volver a cetrifugar (4000 xg, 10 min).
6. Lavar el sedimento con 50 ml de glicerol al 10 %. Volver a cetrifugar (4000 xg, 10 min).
7. Repetir el paso 6.
8. Retirar con cuidado el sobrenadante y añadir 2 ml de glicerol al 10 %.
9. Hacer alícuotas de 40 μ l por tubo y conservar a -80° C.

1.5. Cepas de levadura

1.5.1. Cepas de levadura utilizadas

Para el análisis funcional de los genes de tomate aislados en el presente estudio se han utilizado las siguientes cepas de levadura:

- EBY.VW4000 ($\Delta hxt1-17$, $\Delta gal2$, $\Delta stl1$, $\Delta agt1$, $\Delta mph2$, $\Delta mph3$) (Wieckzorke *et al.* 1999): Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que tiene deleccionados todos los genes que codifican para transportadores de azúcares. No puede crecer en medio mínimo cuando la fuente de carbono es glucosa. Crece muy poco cuando la fuente de carbono es la galactosa, y si crece bien cuando es maltosa.
- DBY746 ($MAT\alpha$, $leu2$, $his3$, $ura3$, $trp1$): Cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae*. Suministrada por el Dr. Scott D. Emr (Universidad de California, Berkeley, EE.UU). Utilizada como control positivo en la expresión heteróloga de genes que codifican para posibles invertasas.
- SEY 2102 ($MAT\alpha$, $leu 2-3$, $leu2-112$, $ura3-52$, $his4-519$, $gal2$, $suc2\Delta 9$) (Emr *et al.* 1983): Cepa de *S. cerevisiae* que tiene deleccionados todos los genes que codifican para invertasas, lo que la incapacita para crecer en medio mínimo cuando la fuente de carbono es sacarosa. Suministrada por el Dr. Scott D. Emr (Universidad de California, Berkeley, EE.UU). Utilizada en la expresión heteróloga de genes que codifican para posibles invertasas.

Todas las cepas se cultivaron en oscuridad a 30° C durante 3 días, en medio sólido, ó durante toda la noche si se utilizaba medio líquido.

1.5.2. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

1.5.2.1 Medio YPD (Yeast extract-Peptide-Dextrose)

Éste es un medio no selectivo, usado para el crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* que no portan plásmidos (Sherman *et al.* 1986). Composición:

1 % Extracto de levadura

2 % Peptona

2 % Glucosa

El medio se esterilizó en autoclave a 117° C durante 20 min.

1.5.2.2. Medio SD (Synthetic-Dextrose)

El SD es un medio selectivo que permite seleccionar en base a la auxotrofia que presenta la cepa a cultivar (Sherman *et al.* 1986). Se usa siempre que la cepa esté transformada con algún plásmido.

0.67 % Difco Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos

2 % Glucosa

0.01 % Adenina, arginina, cisteína, leucina, lisina, treonina, triptófano y uracilo

0.005 % Del resto de aminoácidos

El medio se esterilizó en autoclave a 117° C durante 20 min

La fuente de carbono, aminoácidos y bases nitrogenadas se escogerán en función de las necesidades auxotróficas de la levadura.

1.6. Mantenimiento de las cepas

Las cepas de levadura y de *E. coli* descritas anteriormente se conservaron a -80° C en glicerol al 20 %. Para ello se cultivan en medio líquido selectivo hasta el final de la fase de crecimiento exponencial (cultivo de 16 h). A 800 µl de estos cultivos, se le añaden 200 µl de glicerol al 80 % estéril, se agita vigorosamente y se almacenan a -80° C.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1. Plásmidos

Los plásmidos utilizados han sido los siguientes:

- pGEM-T Easy (Promega, EE.UU.): Vector de clonación de *E. coli* por colas de adenina típicas de PCR resultantes de la actividad transferasa terminal de la Taq polimerasa sin actividad correctora de prueba. El sitio de clonación se encuentra en el marco del gen LacZ, lo que permite la selección de los plásmidos portadores del inserto mediante un escrutinio de colonias blancas/azules cuando se cultivan en presencia de X-gal. La selección se realiza por la tolerancia al antibiótico ampicilina que confiere este plásmido.
- pYES 2.1 TOPO TA (Invitrogen, EE.UU.): Vector de clonación de *S. cerevisiae* por colas de adenina típicas de PCR con enzimas sin actividad correctora de prueba. Es un vector de alto número de copias (origen de replicación del plásmido de 2µ) seleccionable en cepas auxotróficas para uracilo. Asimismo presenta un origen de replicación de *E. coli*, y confiere resistencia a ampicilina
- pYES2 (Invitrogen, EE.UU.): Vector de expresión de alto número de copias de *S. cerevisiae*. La transcripción se logra al añadir galactosa como fuente de carbono, ya que ésta induce la transcripción a partir del promotor Gal1 que presenta el plásmido. Presenta el origen de

replicación del plásmido de 2 μ y un origen de replicación de *E. coli*. La selección se hace en base a auxotrofia para uracilo, cuando está en *S. cerevisiae*, y por resistencia a ampicilina, cuando se encuentra en *E. coli*.

- pFL61: Vector de expresión de *S. cerevisiae* de alto número de copia, dado que posee el origen de replicación del plásmido de 2 μ . El inserto se transcribe a partir de un promotor constitutivo de la fosfoglicerato kinasa (Minet *et al.* 1992). La selección de los transformantes se realiza mediante auxotrofia a uracilo. Este plásmido se puede replicar de forma estable en *E. coli*, a la que confiere resistencia a ampicilina. Suministrado por la Dra. M. Minet (Centre de Génétique Moléculaire, Gif sur Yvette, Francia).
- pLin9: pFL61 que contiene la secuencia de la invertasa vacuolar de tomate Lin9 completa bajo el control del promotor de la PGK.
- pGLin9: pFL61 que contiene la secuencia de la invertasa vacuolar de tomate Lin9 con 75 pb menos bajo el control del promotor de la PGK.
- pLin10: pFL61 que contiene la secuencia de la fructoexohidrolasa de tomate Lin10 bajo el control del promotor de la PGK.
- pFL61-LeST3: pFL61 que contiene la secuencia del posible transportador de azúcares de tomate LeST3 bajo el control del promotor de la PGK.

2.2. Aislamiento de ADN

2.2.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Se usó el kit QIAPREP Spin Miniprep kit de QIAGEN (EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.2. Extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*

Protocolo adaptado de Ausubel *et al.* (2005):

1. Crecer las células a 30 $^{\circ}$ C en agitación durante toda la noche en 10 ml de medio selectivo.
2. Sedimentar las células centrifugando a 3000 xg durante 5 min y lavar el sedimento con 0.5 ml de agua estéril.
3. Transferir a un tubo de microcentrífuga y centrifugar 15 seg a 10000 xg.

4. Eliminar el sobrenadante y añadir 0.2 ml de tampón de extracción, 0.2 ml de una solución de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y 0.3 ml de bolitas de vidrio de 425-600 μm (SIGMA).
5. Agitar vigorosamente con el vortex durante 3-4 min.
6. Añadir 0.2 ml de tampón TE y centrifugar a 10000 xg durante 5 min.
7. Transferir la fase superior acuosa a un tubo nuevo de microcentrífuga y añadir 1 ml de isopropanol. Incubar toda la noche a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 10000 xg durante 10 min y retirar el sobrenadante.
9. Lavar el sedimento con 1 ml de etanol al 70 %.
10. Retirar el etanol y dejar secar el sedimento a vacío durante 10 min.

Resuspender en 50 μl de agua destilada

El rendimiento de este procedimiento es normalmente bajo, por lo que para recuperar cantidad suficiente de ADN es necesario utilizar 1 μl de esta solución para transformar células electrocompetentes de *E. coli*. Posteriormente, se extrae el ADN plasmídico de las células transformadas de *E. coli* siguiendo el protocolo indicado en el apartado anterior.

Tampón de extracción: 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0.

Tampón TE: 10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0.

2.2.3. Extracción de ADN genómico de tomate

El ADN genómico de tomate se extrajo a partir de 2 g de tejido de hoja previamente almacenado a -80°C , siguiendo el protocolo adaptado de Murray & Thompson (1980). Procedimiento:

1. Triturar el tejido con nitrógeno líquido. Añadir 15 ml del tampón de extracción CTAB y dejar descongelar.
2. Añadir 1/6 volumen de 5% de sarkosil y mezclar invirtiendo el tubo.
3. Incubar 1 hora a 60°C mezclando de vez en cuando por inversión del tubo.
4. Añadir 10 ml de cloroformo:isoamílico (24:1), mezclar unas 20-30 veces por inversión del tubo, hasta que se forme una emulsión.
5. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 min.

6. Transferir la fase acuosa (fase superior) a un tubo limpio. Añadir cuidadosamente y poco a poco 3 ml de isopropanol frío. Mezclar cuidadosamente de manera que se formen las interfases. Repetir el proceso hasta añadir un total de 11.5 ml de isopropanol. El ADN debe precipitar en la interfase. Una vez que se ha añadido todo el isopropanol, mezclar invirtiendo el tubo.
7. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 min. Eliminar el sobrenadante.
8. Añadir 5 ml etanol al 76% con 10 mM NH₄OAc. Incubar a 4° C durante toda la noche.
9. Centrifugar 15 min. A 4000 rpm. Eliminar el sobrenadante con una pipeta y secar el precipitado a vacío.
10. Resuspender el ADN en 200 µl de tampón TE y calentar a 65° C durante 30 min. Mezclando de vez en cuando.

Tampón de extracción CTAB: 50 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.7 M NaCl, 1% CTAB (cetil trimethyl ammonium bromide), 1% β-mercaptoetanol (añadir justo antes de usar), 2% PVP (polyvinylpyrrolidone).

Tampón TE: 10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0.

2.2.3.1. Tratamiento con RNasa del ADN genómico de tomate

1. Añadir al ARN anteriormente resuspendido en tampón TE, 5 µl de RNasa libre de DNasa e incubar 2 horas a 37° C.
2. Centrifugar 5 min. a máxima velocidad y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.

2.2.4. Extracción de ADN genómico *Gomus mosseae*

El ADN genómico de *G. mosseae* se extrajo a partir de 1000 esporas usando el Kit DNeasy Plant Mini Extraction (QUIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, excepto que el paso de moler con nitrógeno líquido, fue sustituido por aplastar las esporas en el buffer de lisis del kit, usando un micropistilo.

2.3. Cuantificación del ADN

El ADN extraído se cuantificó con la ayuda de un espectrofotómetro. Para ello se utilizaron cubetas de cuarzo. La absorbancia de una alícuota de 5 µl de muestra diluida en 995 µl de agua milli-Q estéril se midió a 230, 260 y 280 nm.

Cada unidad de absorbancia a 260 nm se consideró como 50 µg/ml de ADN. Para poder conocer una posible contaminación por carbohidratos se calculó la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 y 230 nm, debiendo ser ésta superior a 2. Para considerar una muestra libre de proteínas y/o fenol la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm debía tomar un valor superior a 1.8.

2.4. Visualización del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa

La separación electroforética del ADN se realizó en geles de agarosa al 1.6% en tampón TBE. La electroforesis se realizó en tampón TBE a 100 V. Las muestras se prepararon en tampón de carga 1x. La visualización del ADN en los geles se realizó mediante tinción con bromuro de etidio y fotografía del gel expuesto a luz UV (260 nm).

Tampón TBE: 89 mM Tris Base, 89 mM Ácido bórico, 2 mM EDTA. Ajustar a pH 8.0 con HCl.

Tampón de carga (6x): 50% sacarosa, 0.3% azul de bromofenol.

2.5. Southern blot

2.5.1. Digestión del ADN genómico

Hay que digerir el ADN genómico a analizar con enzimas de restricción que no corten el fragmento de ADN que se va a utilizar como sonda. En el caso del presente trabajo, se digirieron 15 µg de ADN genómico de tomate durante toda la noche con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Incubar los 15 µg de ADN genómico durante 1 h a 65° C para desnaturalizar el ADN.
2. Poner los tubos en hielo durante 5 min, dar una centrifugación corta, volver a poner los tubos en hielo y adicionar tampón y la enzima correspondiente hasta tener un volumen final de 20 µl.
3. Dar una centrifugación corta e incubar durante 2 h a 37° C.
4. Transcurridas las 2 h añadir:
 - 1 µl 10x Tampón del enzima
 - 1 µl Enzima

8 μ l H₂O

5. Dar una centrifugación corta e incubar durante toda la noche a 37° C.

2.5.2. Electroforesis en gel de agarosa y transferencia a membrana

Procedimiento:

1. Las muestras de ADN digerido se cargan en un gel de agarosa al 0.8% (p/v). La electroforesis se desarrolló en tampón TBE 1x a un voltaje constante de 40 V durante aproximadamente 4 h.
2. Para la visualización del gel, se tiñe con bromuro de etidio, y se expone a luz ultravioleta.
3. Incubar el gel durante 15 minutos en 0.25 M HCl para depurar el ADN.
4. Lavar el gel con H₂O destilada un par de veces para eliminar los restos de ácido clorhídrico.
5. Incubar el gel en solución de desnaturalización durante 15 min dos veces.
6. Lavar el gel con agua destilada un par de veces.
7. Incubar el gel en solución de neutralización durante 15 minutos dos veces.
8. Durante este último lavado preparar la membrana de nylon cargada positivamente (Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza) a la que se va a transferir el ADN:
 - Cortar la membrana del tamaño del gel.
 - Lavar la membrana durante 5 minutos en agua destilada.
 - Lavar la membrana durante 30 minutos en 20 x SSC.

Transferencia:

- Poner 10 x SSC en una caja de plástico y poner una placa de vidrio en la parte superior.
- Cortar una tira de papel Whatman nº 3 y ponerla encima de la placa de vidrio de manera que quede sumergida por los bordes en la caja que contiene el SSC.
- Mojar el papel con 10 x SSC. Quitar las burbujas.
- Poner el gel encima del papel con cuidado de que no se formen

- burbujas. En caso de que se formen, eliminarlas.
- Poner encima del gel la membrana previamente incubada en SSC.
 - Eliminar las posibles burbujas que se formen entre la membrana y el gel.
 - Rodear el gel con parafilm.
 - Poner encima de la membrana dos trozos del papel Whatman del mismo tamaño que la membrana.
 - Poner encima una torre de papel, una placa de vidrio y un peso.
 - Dejar la transferencia toda la noche.
 - Desmontar el sistema de transferencia y marcar los pocillos del gel en la membrana.
 - Lavar la membrana durante 5 minutos en 2 X SSC. Dejar secar al aire. Poner la membrana entre dos trozos de papel Whatman y fijar el ADN a la membrana a 120° C durante 30 minutos en vacío.
 - Guardar la membrana en papel de aluminio en un lugar seco hasta que se vaya a utilizar.

SSC 20x: NaCl 3M, citrato sódico 0.3M. Ajustar a pH 7 con NaOH 10N. Autoclavar a 120 °C durante 20 min.

Solución desnaturalizante: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

Solución neutralizante: 0.5 M Tris pH 7.5, 1.5 M NaCl

2.5.3. Síntesis de la sonda marcada radiactivamente mediante PCR

La mezcla de reacción fue la siguiente:

- 2 µl ADN (10 ng de plásmido conteniendo el inserto de ADN a marcar)
- 5 µl Tampón de la Taq polimerasa (10x)
- 1.5 µl MgCl₂ 50 mM
- 5 µl dATP (100 µM)
- 5 µl dGTP (100 µM)
- 5 µl dTTP (100 µM)
- 1.5 µl dCTP (30 µM)
- 5 µl ³²P -dCTP (10 µCi/µl)
- 1 µl Cebador 1 5' 10 µM
- 1 µl Cebador 2 3' 10 µM
- 0.5 µl Taq Polimerasa

17.5 µl H₂O destilada estéril

El programa de PCR seguido fue el que se muestra a continuación:

(95 °C, 5 min) x 1 ciclo

(94 °C, 30 seg; 55°C, 30 seg; 72 °C, 1 min) x 35 ciclos

(72 °C, 7 min; 4 °C, ∞) x 1 ciclo

2.5.4. Purificación de las sondas marcadas radioactivamente

Para purificar las sondas marcadas se utilizó el kit comercial Mini Quick SpinTM Columns, (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) que retiene el exceso de nucleótidos no incorporados y purifica el ADN marcado.

2.5.5. Pre-hibridación e hibridación

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

1. La membrana se coloca en un tubo de hibridación con el ADN hacia arriba y se pre-hibridó durante al menos 2 h con la solución de hibridación a 65 °C y agitación.
2. Paralelamente, la sonda se desnaturaliza calentando a 100 °C durante 5 min e incubándola inmediatamente en hielo durante 5 min.
3. La solución de hibridación se elimina del tubo y se añade nueva solución de hibridación que contiene la sonda previamente desnaturalizada.
4. La membrana hibrida toda la noche a 65 °C en agitación.
5. La solución de hibridación se elimina y se llevan a cabo los siguientes lavados para retirar los enlaces no específicos de la sonda:
 - 2 lavados de 15 min con 6x SSC + 0.1% SDS a 65° C y agitación.
 - 2 lavados de 15 min con 0.1x SSC + 0.1% SDS a 65° C y agitación.

Solución de hibridación: SDS 7% (p/v), 500 mM NaH₂PO₄ pH 7.2, y 1 mM EDTA pH 8 (Church & Gilbert 1984).

2.5.6. Detección y revelado

Las señales de hibridación se visualizaron usando un Phosphor imager (Bio-Rad, Hercules, CA).

2.6. Reacción en cadena de la polimerasa

En tubos de 0.2 ml se preparó la siguiente mezcla de reacción:

ADN molde (10-100 ng)
 2.5 µl Tampón 10x de la Taq DNA polimerasa termostable
 0.75 µl MgCl₂ 50 mM
 5 µl dNTPs 1mM
 0.5 µl Cebador 5' (10 µM)
 0.5 µl Cebador 3' (10 µM)
 0.5 µl Taq DNA polimerasa termostable (5 U/ml)
 Agua bidestilada estéril hasta 25 µl

También se preparó un tubo de microcentrífuga sin ADN como control negativo para poder descartar posibles artefactos o contaminaciones.

Los tubos se colocaron en un termociclador (Perkin-Elmer Mod 2400) y se utilizó un programa estándar de 35 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 94°C durante 30 seg, una fase de hibridación a 55 °C durante 30 seg y una extensión a 72 °C durante 45 seg/kb en caso de polimerasas termostables sin actividad correctora de prueba y 90 seg/kb si presentan dicha actividad. Al final se realizó una extensión a 72 °C durante 7 min.

Los cebadores usados en las diferentes PCRs realizadas en este estudio se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de cebadores usados. La temperatura de alineamiento usada para todos ellos se indica entre paréntesis.

Nombre	Secuencia	Uso
InvF	YYTNTTYTAYCARTAYAAAYCC	Búsqueda de invertasas de tomate (55° C)
InvR	ARAARTCNRSRCAYTCCCA	Búsqueda de invertasas de tomate (55° C)
1Lin9	GGCCGACCCATCTGACCCTCTATT	3' RACE de Lin9 (60° C)
2Lin9	CTGCCAGTGGATTAGGTCTCTTGA	5' RACE (60° C), y PCR Cuantitativa (58° C) de Lin9, y paseo cromosómico
3Lin9	ATGTCGATCCCTAATTCAGAAACAAACA	Clonación de la secuencia completa (65° C), y PCR Cuantitativa (58° C) de Lin9
4Lin9	CAAAAAACATACTCTTCACTGATTTCTT	Clonación de la secuencia completa de Lin9 (65° C)
5Lin9	AAAAATAACAAAAATGCCACCAGACCGG	Paseo cromosómico
6Lin9	GGTCCGCTACCATAGCCACTGG	PCR Cuantitativa GLin9 (58° C)

Tabla 1 (continuación). Lista de cebadores usados. La temperatura de alineamiento usada para todos ellos se indica entre paréntesis.

Nombre	Secuencia	Uso
7Lin9	TCATCAGTACCGTCGTTGTTA	PCR Cuantitativa para los dos transcritos de Lin9 (58° C)
1Lin10	GTTAGGGCCTGATGGGATTTGGAGAGT	3' RACE de Lin10 (60° C)
2Lin10	CTGAAGGCAAAAGAGCGGGAGGATGAA	5' RACE de Lin10 (60° C), y paseo cromosómico
3Lin10	ATGGCTCAGCCTACAGAACTGCTTATC	Clonación de la secuencia completa de Lin10 (65° C)
4Lin10	CTGCGTAAGAATGACAAGTAAAAAGGG	Clonación de la secuencia completa (65° C), y PCR Cuantitativa (58° C) de Lin10
5Lin10	AATTATGGAGCCTTTTTGGACA	PCR Cuantitativa de Lin10 (58° C)
6Lin10	TTCATCCTCCCGCTCTTTTGCCTTCAG	Obtención clon genómico de Lin10
Lin10G	TTCATCCTCCCGCTCTTTTGCCTTCAG	Búsqueda clon genómico de Lin10
NS31	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	Control interno del ARNr 18S en levadura (52° C)
NS41	CCCGTGTTGAGTCAAATTA	Control interno del ARNr 18S en levadura (52° C)
PTOMSSF	CATTCAGTTTGTCTTTGTTCATCTTGG	Paseo Cromosómico
FTOMSSF	GGATTGAAAGCCACGGAAAAGG	PCR Cuantitativa de TOMSSF (58° C)
RTOMSSF	ACCAGGCCTCAAACGAATAGCA	PCR Cuantitativa de TOMSSF (58° C)
Tiv1F	TCCGCCTCTCGTTACACTACTC	PCR Cuantitativa de TIV1 (58° C)
Tiv1R	CGGTGACTGGTTGTTGAGGATAGG	PCR Cuantitativa de TIV1(58° C)
Lin6F	AGCACATTTATTTCGCCTTCAACAA	PCR Cuantitativa de Lin6 (58° C)
Lin6R	TTTGTGACGTGGCATAATAAGAT	PCR Cuantitativa de Lin6 (58° C)
Lin5F	GGTACTTGGTCTGGATCATCAACT	PCR Cuantitativa de Lin5 (58° C)
Lin5R	TCTCAATCCCTTCCAACCATCAATT	PCR Cuantitativa de Lin5 (58° C)
Lin7F	GAACCTGCAATTTACCCATCAAAGCC	PCR Cuantitativa de Lin7 (58° C)
Lin7R	AAGTCTCAACCCCTTCCAACCATCGA	PCR Cuantitativa de Lin7 (58° C)
Lin8F	CAAACTATGCAATCCCAGCG	PCR Cuantitativa de Lin8 (58° C)
Lin8R	CAATGACCATCCTGACCCAAC	PCR Cuantitativa de Lin8 (58° C)
SPSF	GGTGGTCTACGCAAGGCTGTCAT	PCR Cuantitativa de SPS (58° C)
SPSR	CGGTGCTGCTACATTCCTCGTCT	PCR Cuantitativa de SPS (58° C)
RBCF	TTGCACCCTTCACTGGACTCA	PCR Cuantitativa de RuBisCo (58° C)
RBCR	ACTGACTCTTCCACCGTTGCT	PCR Cuantitativa de RuBisCo (58° C)
R1	AAAAGGTCGACGCGGGCT	Control interno del ARNr 18S de tomate para PCR Cuantitativa (58° C)

Tabla 1 (continuación). Lista de cebadores usados. La temperatura de alineamiento usada para todos ellos se indica entre paréntesis.

Nombre	Secuencia	Uso
R2	CGACAGAAGGGACGAGAC	Control interno del ARNr 18S de tomate para PCR Cuantitativa (58° C)
SUG1	CCIGARWCHCCIM	Búsqueda de transportadores de hexosas (40° C)
SUG2	ARICCYTTIGTYTGIGG	Búsqueda de transportadores de hexosas (40° C)
SUG4	TGCAGCATACAGAACGAACGT	5' RACE de LeST3 (55° C), sonda en Southern y PCR Cuantitativa (58° C)
SUG5	GGTCTATATCGGTTCTTTTCA	3' RACE de LeST3 (55° C), sonda en Southern y PCR Cuantitativa (58° C)

2.7. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones del ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas de tampón y temperatura, siguiendo las indicaciones recomendadas por el proveedor (New England Biolabs, EE.UU.).

2.8. Desfosforilación de vectores de clonación

Para evitar la ligación entre dos moléculas del vector y su posible circularización, los vectores digeridos con endonucleasas de restricción se desfosforilaron mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (Roche, EE.UU.). Para ello se incubó a 37° C durante 30 min la siguiente mezcla de reacción:

- 10 µl Vector digerido (1 µg/µl)
- 2 µl Tampón de fosfatasa alcalina (10x)
- 1 µl Fosfatasa alcalina (1 U/ µl)
- 17 µl Agua miliQ

Tras la desfosforilación se purificó el ADN usando el protocolo de "CleanUp" del kit QiaexII Gel Extraction kit de Qiagen (EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.9. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para ello, se empleó el kit QiaexII Gel Extraction kit de Qiagen (EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.10. Ligación en vectores de clonación

La ligación entre un fragmento de ADN y el vector de clonación adecuado se realizó usando una relación molar inserto:vector de 3:1 y teniendo en cuenta los ng de vector que se necesitan en cada caso.

2.10.1. Ligación de productos de PCR

2.10.1.1. Ligación en pGEM-T Easy

En un tubo de microcentrífuga se incubó durante toda una noche a 4°C la siguiente mezcla de reacción:

X μ l Inserto
1 μ l Ligasa
1 μ l Vector (50ng/ μ l)
X+2 μ l Tampón (2x)

2.10.1.2. Ligación en pYES 2.1 TOPO TA

La razón de elegir este vector es su promotor gal4 eucariótico, de modo que al transformar una bacteria no se corre el peligro de que el fragmento del gen resulte tóxico. Es especialmente indicado para la clonación de genes que codifican proteínas transportadoras. Para ello se incubó durante 30 min a temperatura ambiente la siguiente mezcla de reacción:

0.5-4 μ l producto de PCR
1 μ l Solución salina
1 μ l Vector (10 ng/ μ l)
Completar hasta 6 μ l con agua miliQ

2.10.2. Ligación de fragmentos de restricción

Los productos de una digestión con extremos compatibles se incubaron en un tubo de microcentrífuga durante toda una noche a 4°C con la siguiente mezcla de reacción:

X μ l Inserto
50 ng Vector

1 μ l Tampón ligasa T4

1 μ l T4 DNA ligasa 1 U/ μ l (Roche, EE.UU.)

Completar hasta 10 μ l con agua miliQ.

2.11. Transformación

2.11.1. Transformación de células de *E. coli*

Tiene por objeto introducir plásmidos con el inserto deseado en cepas de *E. coli*.

2.11.1.1. Transformación de células quimiocompetentes

Para transformar las células quimiocompetentes se utilizó la metodología descrita por Rodríguez y Tait (1983), siguiendo el protocolo que se indica a continuación:

1. Mantener una alícuota de 100 μ l de células competentes 15 min en hielo.
2. Añadir 25 ng de plásmido, agitar suavemente e incubar en hielo durante 30 min.
3. Incubar durante 90 seg a 42° C.
4. Enfriar en hielo 5 min.
5. Añadir 1 ml de LB e incubar 1 h 30 min en agitación a 37° C.
6. Sembrar las células en placas de medio selectivo que contiene el antibiótico de selección según el vector utilizado, e incubar las placas toda la noche a 37° C.

2.11.1.2. Transformación de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes se transformaron usando un electroporador EC-100 (Krakeler Scientific Inc.), siguiendo las intrucciones del fabricante. El proceso se llevó acabo según describe el siguiente protocolo:

1. Colocar las células electrocompetentes y las cubetas en hielo.
2. Encender el generador de corriente y cargar a 1500 V.
3. Mezclar 40 μ l de células con el ADN y pasar a la cubeta sin dejar burbujas. Secar la cubeta y poner en la cámara de descarga.
4. Realizar la descarga.

5. Colocar las células inmediatamente en hielo y añadir 900 μ l de medio SOC.
6. Transferir las células a un tubo de microcentrífuga e incubar 1 h a 37°C en agitación.
7. Sembrar en medio selectivo e incubar las placas toda la noche a 37° C.

2.11.2. Transformación de *S. cerevisiae*

En este caso se utilizó la metodología siguiente descrita por Schiestl y Gietz (1989):

1. Inocular 10 ml de medio YPD con células en fase estacionaria, de modo que la D.O.₆₀₀ sea próxima a 0.1. Incubar a 30° C en agitación hasta que alcance una D.O.₆₀₀ de 0.4 (unas 4 h).
2. Sedimentar las células mediante centrifugación a 3000 xg durante 5 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 5 ml de Solución de litio.
3. Centrifugar de nuevo (3000 xg, 5 min), eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 100 μ l de Solución de litio.
4. Mientras se centrifugan las células, hervir el esperma de salmón (10 mg/ml) durante 10 min y poner en hielo inmediatamente.
5. Añadir a un tubo de microcentrífuga ADN plasmídico (0.1-1 μ g), 60 μ l de las células resuspendidas en el paso 3, y 7 μ l de esperma de salmón. Agitar vigorosamente.
6. Añadir 0.45 ml de Solución PEG. Agitar vigorosamente.
7. Incubar las células a 30° C durante 30 min.
8. Dar un choque de calor de 42° C durante 15 min.
9. Sembrar 200 μ l en placas de medio selectivo. Incubar a 30° C durante 2-3 días.

Solución de litio: 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1 M Acetato de litio.

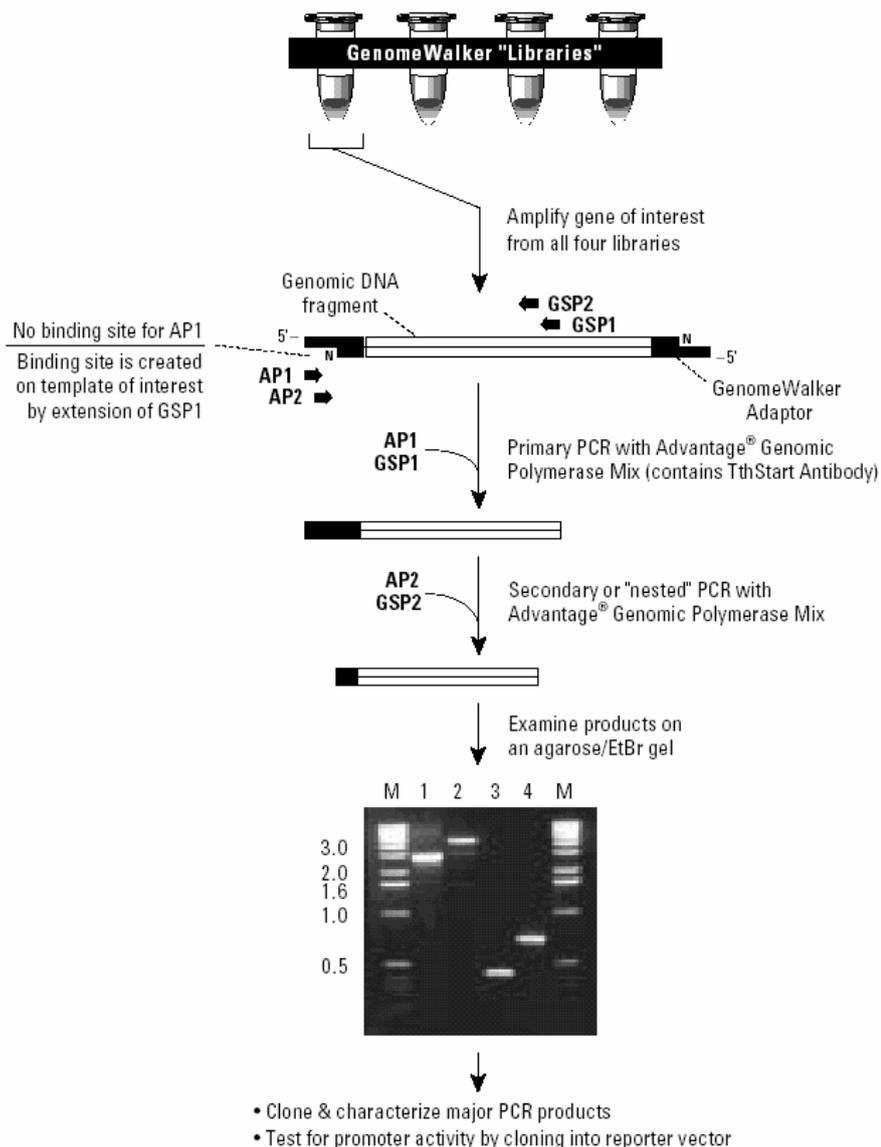
Solución PEG: 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1 M Acetato de litio, 40% PEG (4000 o 3350).

2.12. Purificación del ADN plasmídico

La purificación del ADN del plásmido se llevó a cabo usando el kit QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.13. Paseo cromosómico

Se empleó el kit Universal GenomeWalker de Clontech siguiendo las instrucciones del fabricante, y partiendo de 2.5 μg de ADN genómico de tomate. Para el paseo cromosómico, consistente en una PCR, se emplearon 6.6 ng de ADN digerido por reacción. El procedimiento se esquematiza a continuación.



2.14. Extracción de ARN

2.14.1. Extracción de ARN de tomate

La extracción de ARN se hizo tanto en raíz como en hoja partiendo de 1 g de peso fresco de tejido congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Homogeneizamos en un mortero con nitrógeno líquido el material de partida.
2. Añadir 1800 μl de tampón REB y seguir homogeneizando.
3. Dejar descongelar y añadir rápidamente 1800 μl de fenol:cloroformo:isoamílico en proporción 50:24:1.
4. Traspasar el material a tubos estériles de 2 ml, agitar varias veces de forma no agresiva. Mantener en hielo.
5. Centrifugar 10 min a 12 000 rpm a 4°C . Recoger la fase acuosa y reextraer con 900 μl de fenol:cloroformo:isoamílico en proporción 25:24:1.
6. Centrifugar 10 min a 12 000 rpm a 4°C . Recoger la fase acuosa y reextraer con 900 μl de cloroformo:isoamílico (24:1).
7. Recoger la fase acuosa y pasarla a un nuevo tubo. Medir el volumen y adicionar 1/3 del volumen de la muestra de LiCl 8M, poco a poco en el vórtex a baja velocidad para ir adquiriendo la concentración final de 2 M.
8. Incubar en hielo durante toda una noche.
9. Centrifugar a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 30 min a 4°C .
10. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 300 μl de LiCl 2M frío. Centrifugar de nuevo durante 10 min en las mismas condiciones.
11. Recoger el precipitado en 200 μl de tampón TE y precipitar de nuevo con 2.5 volúmenes de etanol 100% y 0.1 volumen de acetato sódico 3M pH 5.2 (preparado en agua-DEPC).
12. Incubar toda una noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
13. Recoger por centrifugación a máxima velocidad durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
14. Lavar el precipitado con 300 μl de etanol 75% y volver a centrifugar 5 min en las mismas condiciones.
15. Secar el tubo con mucho cuidado y resuspender el precipitado en 50-60 μl de agua-DEPC.

Agua-DEPC: Añadir 1 ml de dietil-pirocarbonato por cada litro de agua destilada. Agitar durante toda una noche. Se autoclava y se agita con el tapón abierto dentro de una campana extractora para eliminar gases tóxicos durante 30 min.

Tampón REB: Tris-HCl 25 mM, EDTA 25 mM, NaCl 75 mM, SDS 1%, β -mercaptoetanol 1M. Preparar en agua-DEPC.

Tampón TE: Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8.0. Preparar en agua-DEPC.

Notas: Usar guantes durante todo el proceso para evitar el contacto del ARN con RNasas que puedan degradarlo. Todo el material utilizado ha de estar completamente estéril. Los reactivos tienen que estar fríos. Autoclavar todos los reactivos salvo el tampón REB que se autoclava antes de añadir β -mercaptoetanol

2.14.2. Extracción de ARN de *Sacharomices cerevisiae*

Se empleó el kit RNeasy Mini (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de ARN total de levadura mediante lisis enzimática, partiendo de 5×10^7 células de levadura en cada cultivo.

2.14.3. Cuantificación del ARN

La cuantificación del ARN se realizó espectrofotométricamente siguiendo la metodología descrita por Sambrook *et al.* (1989). Para ello se utilizaron cubetas de cuarzo. La absorbancia de una alícuota de 5 μ l de muestra diluida en 745 μ l de agua DEPC fue medida a 230, 260 y 280 nm. Cada unidad de absorbancia a 260 nm fue considerada como 40 μ g/ml de ARN. Para poder conocer una posible contaminación por carbohidratos se calculó la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 y 230 nm, debiendo ser ésta superior a 2. Para considerar una muestra libre de proteínas y/o fenol la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm debía ser superior a 1.8.

2.14.4. Visualización del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa

Para determinar la calidad del ARN extraído se procedió a la separación electroforética de 1 μ g de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa conteniendo formaldehído. Para ello se diluyó la muestra en tampón de muestra 1x y tampón de carga 1x. A continuación, se desnaturalizó el ARN incubando esta solución a 65°C durante 15 min. La separación se realizó en geles de agarosa al 0.6% en tampón 1x MOPS estéril que contenía un 1.85% de formaldehído. La electroforesis se desarrolló en tampón 1x MOPS a un voltaje constante de 80V. Para visualizar el ARN se expuso el gel a luz ultravioleta.

Tampón de muestra: 50 % Formamida desionizada, 14% Formaldehído. Esta solución se prepara en tampón MOPS 1x.

Tampón de carga (10x): 50% Sacarosa, 0.3% Azul de bromofenol, 1 μ g/ml Bromuro de etidio. Esta solución se prepara en tampón MOPS 1x.

Tampón MOPS (10x): 200 mM MOPS pH 7.0, 50 mM Acetato sódico, 10 mM EDTA.

2.14.5. Tratamiento del ARN con DNasa

Se tratan 20 μ g de ARN en un volumen final de 40 μ l, para lo que en un tubo de microcentrífuga, se añaden los siguientes componentes:

X μ l de ARN (20 μ g)

33-X μ l de H₂O DEPC

4 μ l buffer 10X

1 μ l Inhibidor de la RNasa (40 U/ μ l)

2 μ l DNasa

Vf = 40 μ l

1. Incubar la mezcla a 37°C durante 30 min
2. Añadir 210 μ l de H₂O DEPC (Vf = 250 μ l)
3. Añadir un volumen (250 μ l) de Fenol:Cloroformo:isoamílico en proporción 25:24:1.
4. Centrifugar 1min a 13400 g.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Repetir la extracción con Fenol:Cloroformo:isoamílico.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio midiendo el volumen.
7. Precipitar el ARN con 0.1vol de 3M NaAc pH 5.2 y 2.5vol de EtOH 100%.
8. Incubar overnight a -20°C.
9. Centrifugar 30min a 15700 g a 4° C.
10. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500 μ l de EtOH al 80%.
11. Centrifugar durante 10min a 13400 g a 4° C.
12. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente y secar el pellet en un desecador.
13. Resuspender el precipitado en 30 μ l de H₂O-DEPC. Conservar el ARN a -80° C.

2.15. Técnicas de RACE

Para la obtención de la secuencia completa de aquéllos genes de los que sólo se conocía una parte del mismo, se utilizaron técnicas de RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*). Con este fin, se ha empleado el kit SMART RACE (Clontech, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante con las dos modificaciones que se detallan a continuación:

- La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN total previamente tratado con DNasa.

- La temperatura a la que se realizó el paso de hibridación fue de 62° C, y los ciclos de la PCR fueron 35.

2.16. Análisis de la expresión génica mediante técnicas de PCR cuantitativa a tiempo real.

2.16.1. Retrotranscripción *in vitro*: síntesis de ADNc

La síntesis del ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN total usando la reversotranscriptasa SuperscriptII (Invitrogen, EE.UU.) por el método de los cebadores aleatorios, usando las condiciones que recomienda el fabricante y que se detallan a continuación:

1. Se mezclan en un tubo de microcentrífuga:

1 µg de ARN total

1 µl dNTPs 10 mM

1 µl de cebadores aleatorios (100 ng/ µl, Boehringer, Alemania)

hasta 12 µl H₂O-DEPC.

2. Mezclar por pipeteo e incubar la mezcla a 65° C durante 5 min.

3. Pasar al hielo inmediatamente y añadir:

4 µl Tampón de primera cadena (5x)

2 µl DTT 0.1 M

1 µl Inhibidor de RNasa RNaseOUT (Invitrogen, 40U/ µl)

4. Mezclar suavemente e incubar a 42° C durante 2 min.

5. Añadir 1 µl del enzima SuperScript II RT (200U/ µl) y mezclar pipeteando suavemente.

6. Incubar a 25° C durante 10 min.

7. Incubar a 42° C durante 50 min.
8. Inactivar la reacción incubando a 70°C durante 15 min.
9. El tubo de microcentrífuga con al ADNc se mantiene a -20° C.

2.16.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Las PCRs cuantitativas a tiempo real se realizaron en el termociclador iCycler (Biorad).

Cada reacción contenía lo siguiente:

- 1 µl de una dilución 1:10, 1:100, o sin diluir de ADNc (dependiendo del gen objeto de estudio)
- 2.5 µl de Tampón 10x sin Mg
- 1.5 µl MgCl₂ 50mM
- 5 µl dNTPs 10 mM
- 0.5 µl Cebador 5' 10 µM
- 0.5 µl Cebador 3' 10 µM
- 2.5 µl Solución SyBr Green 1x en agua Milli-Q
- 0.1 µl Taq Platinum (Invitrogen, 5U/ µl)
- Completar con agua hasta alcanzar los 25 µl

Solución de SyBr Green (500x): 18 µl DMSO, 1 µl Fluoresceína (Molecular Probes), 1 µl SyBr Green (Molecular Probes). Guardar en la oscuridad y desechar tras 7-10 días.

El programa de PCR consistió en 5 min de incubación a 95°C para activar la Taq de "arranque caliente" (*Hot Start*), seguido de 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 45 seg a 58°C y 45 seg a 70°C. La fluorescencia emitida por el SyBr Green se midió al final de la extensión de cada ciclo.

La eficiencia de la PCR se determinó mediante una curva patrón de PCRs a tiempo real, para lo que se empleó como molde diluciones (normalmente entre 1:100 y 1:100000) de ADN plasmídico que contenía el amplicón a estudiar. Se consideraron válidas aquellas parejas de cebadores cuya eficiencia estuviera entre el 90 y el 100%.

La especificidad de la amplificación por PCR se comprobó mediante la realización de una curva de desnaturalización del amplicón una vez finalizada la PCR. Para ello se efectuó un calentamiento desde 70°C a 100°C incrementando la temperatura 1°C cada minuto.

Las cuantificaciones se realizaron a partir de tres reacciones de PCR independientes por cada muestra biológica, analizándose la expresión de los genes de interés al menos en dos muestras biológicas independientes. En cada una de estas reacciones de PCR, cada muestra se determinó por triplicado. El ciclo umbral (Ct) es calculado por el software que acompaña al equipo de la PCR cuantitativa en tiempo real, y es el ciclo en el que comienza a detectarse el amplicón. Los resultados obtenidos se estandarizaron a los niveles del ARNr 18S (cebadores R1 y R2 de la Tabla 1). Los niveles relativos de transcrito se calcularon usando el método del $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001), que se resume en la siguiente expresión algebraica:

$$\text{Inducción} = 2^{[\Delta Ct(\text{muestra}) - \Delta Ct(\text{control})]}$$

$$\Delta Ct(\text{muestra}) = Ct(R)_m - Ct(C)_m$$

$$\Delta Ct(\text{control}) = Ct(R)_c - Ct(C)_c$$

Donde $Ct(R)_m$ y $Ct(R)_c$ son el valor de Ct para los genes ribosómicos (u otro gen tomado como estándar) en el tratamiento analizado y en el que se considera como control, respectivamente. De modo análogo, $Ct(P)_m$ y $Ct(P)_c$ son el valor de Ct del gen estudiado (problema) en el tratamiento analizado y en el que se considera como control, respectivamente.

2.17. Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se realizaron en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología López Neyra (CSIC, Granada). Las secuencias se determinaron mediante secuenciación de cadena única, usando un secuenciador automático Perkin-Elmer ABI Prism 373. Cada reacción consistía de 100-200 ng de ADN molde y 6.4 pmoles de cebador.

3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

3.1 Técnicas bioquímicas

3.1.1. Extracción de proteínas totales de levadura

Se empleó el Kit RNasy de Quiagen, siguiendo el protocolo de extracción de ARN de levadura con alguna modificación.

Procedimiento:

1. Centrifugar un máximo de 5×10^7 células de un precultivo crecido en medio selectivo a 1000 g durante 5 min a 4° C.

2. Retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 400µl de tampón Y1.
3. Incubar 30 min a 30° C en agitación (se forman esferoplastos).
4. Directamente se utilizan esos extractos como proteínas totales.

Tampón Y1: 1 M Sorbitol, 0.1 M EDTA pH 7.4, 0.1% β-Mercaptoetanol, 50 U de liticasa por cada 1×10^7 células de partida.

3.1.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976) que permite determinar espectrofotométricamente el contenido de proteínas mediante la medida del complejo que éstas forman con un colorante. Se empleó un reactivo comercial de Bio-Rad "Dye Reagent Protein Assay", y albúmina de suero bovina (BSA) como proteína de referencia para preparar la curva patrón de proteínas (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 µg BSA ml⁻¹). Se adicionaron 200 µl de reactivo Bio-Rad a 800 µl de un volumen compuesto por la muestra o BSA, convenientemente diluidas, y agua destilada, y se midió la absorbancia a 595 nm, de 5 min a 1 h tras la adición del reactivo (período de estabilidad del complejo). Conocidos los valores de absorbancia, se elaboró una recta de regresión lineal con los datos de la curva patrón de albúmina y se calculó la concentración de proteínas interpolando los valores de absorbancia de las muestras.

3.2 Determinaciones enzimáticas

3.2.1. Determinación de la actividad invertasa en extractos proteicos de levadura

El método utilizado para determinar la actividad invertasa consistió en poner en contacto los extractos de proteínas totales de levadura con el substrato (sacarosa), de manera que si había actividad invertasa, la sacarosa se hidrolizaría en glucosa y fructosa. A continuación la glucosa y la fructosa formadas se cuantificaron con un sistema enzimático de reacciones acopladas, usando el Kit Sucrose/D-Glucose/D-Fructose de Boehringer (Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit puede ser utilizado para medir cualquiera de los tres azúcares, sacarosa, glucosa y fructosa.

Procedimiento:

1. Se utilizaron 5 µg de proteínas totales para la determinación. Para eliminar interferencias con la actividad invertasa de la propia levadura,

independiente de la que le aporta el gen con el que se ha transformado, se utilizaron como controles internos las muestras hervidas durante 1 min a 100° C para inactivar todas las enzimas. Se realizaron al menos tres repeticiones por muestra (hervida y sin hervir).

2. Añadir a los 5 µg de proteínas tampón acetato potásico 0.1M pH 4.5, hasta un volumen final de 80 µl.
3. Añadir 20 µl de sacarosa 0.5 M en tampón acetato potásico 0.1M pH 4.5. Incubar 20 min a 30° C.
4. Medir la glucosa liberada con el kit anteriormente mencionado con la modificación de que se ajustó el volumen final de reacción a 1 ml.

3.2.2. Determinación de la actividad fructoexohidrolasa en extractos proteicos de levadura

Esta determinación se basa en la liberación de fructosa cuando existe actividad fructoexohidrolasa (FEH) en presencia de fructanos como sustrato. En este estudio se han utilizado como sustratos un fructano con enlaces β-(2-1) (inulina de *chicory*, SIGMA), y un fructano con enlaces β-(2-6) (levano de *Erwinia herbicola*, SIGMA).

Procedimiento:

1. Se utilizaron 5 µg de proteínas totales para la determinación. Para corregir la fructosa presente en la propia levadura antes de poner en contacto las proteínas con los sustratos, se utilizaron como controles internos las muestras hervidas durante 1 min a 100° C para inactivar todas las enzimas. La fructosa presente en esas muestras inactivadas se restó a la fructosa liberada en las muestras. Se realizaron al menos tres repeticiones por muestra (hervida y sin hervir).
2. Completar los 5 µg de proteínas hasta un volumen de 20 µl con tampón acetato sódico.
3. Añadir 80 µl de tampón acetato sódico con 3% (p/v) de inulina ó 5 mM de levano.
4. Incubar a 30° C durante 15, 30 y 45 min.
5. Medir la fructosa liberada con el Kit Sucrose/D-Glucose/D-Fructose de Boehringer (Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, con la modificación de que se ajustó el volumen final de reacción a 1 ml.

Tampón acetato sódico: 50 mM acetato sódico pH 5.0, 0.2% (p/v) azida sódica.

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.1. Determinación de azúcares solubles totales

Los azúcares totales fueron obtenidos a partir de 1 g de peso fresco de muestra congelada a -80°C (hoja y raíz) siguiendo el siguiente procedimiento descrito por Bligh y Dyer (1959):

1. Triturar la muestra con N_2 líquido y transferirla a un tubo falcon.
2. Homogenizar la muestra con 3.75 ml de metanol mediante vórtex durante 1 min.
3. Repetir la homogenización durante 1 min con 3.75 ml de metanol.
4. Añadir 7.5 ml de cloroformo y homogenizar durante 1 min con vórtex.
5. Homogenizar con 3.75 ml de una solución de H_2O salada al 0.88% (p/v).
6. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 min a 0°C en una centrífuga refrigerada.
7. Usar el extracto metanólico (superior) para la determinación de azúcares.

La determinación de los azúcares totales se llevó a cabo según el método propuesto por Irigoyen *et al.* (1992). Se hicieron reaccionar 100 μl de la muestra obtenida como se ha mencionado anteriormente con 3 ml de reactivo de antrona. Se hierve 10 min a 100°C . Dejar enfriar y medir absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 (Shimadzu, Tokio, Japón) usando como curva patrón glucosa a unas concentraciones 20-400 $\mu\text{g/ml}$ y como blanco agua destilada.

El resultado se expresa como $\text{mg TSS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$

Reactivo de antrona: 200 mg antrona + 100 ml H_2SO_4 al 72% (v/v). Es un reactivo extemporáneo. Tener mucha precaución con los vapores tóxicos.

4.2. Determinación de sacarosa, glucosa y fructosa.

La medida de estos tres azúcares se hizo a partir de los mismos extractos metanólicos obtenidos para la medida de azúcares solubles totales.

Procedimiento:

1. Evaporar hasta sequedad un volumen de extracto metanólico fijo para todas las muestras (1.5 ml) con ayuda de una bomba de vacío.

2. Resuspender el precipitado en 300 μl de agua Milli-Q estéril.
3. Determinar la sacarosa, glucosa y fructosa presentes utilizando el Kit Sucrose/D-Glucose/D-Fructose de Boehringer (Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, pero ajustando el volumen final de reacción a 1 ml.

El resultado se expresa como $\text{mg gluc/fruc/sac} \cdot \text{g}^{-1} \text{ pf}$

5. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

5.1. Identificación de secuencias de interés en las bases de datos

Con el fin de encontrar genes implicados en el metabolismo del carbono en plantas micorrizadas, se analizaron las bases de datos públicas de ESTs o de ADN genómico disponibles en la red (<http://srs.ebi.ac.uk>). Las secuencias allí encontradas se compararon con las secuencias aminoacídicas de genes de otros organismos disponibles en las bases de datos usando el algoritmo Blastx (Altschul *et al.* 1990).

5.2. Diseño de cebadores

Los cebadores se diseñaron empleando el programa Oligo Primer Analysis (Molecular Biology Insights, Inc).

5.3. Comparación de secuencias

El grado de homología de las secuencias obtenidas en este estudio con las de otros organismos presentes en las bases de datos se determinó usando el programa BESTFIT del Genetics Computer Group (Wisconsin, EE.UU.). Los alineamientos múltiples se llevaron a cabo con el programa CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994).

5.4 Análisis de promotores

Para estudiar la presencia de posibles motivos de unión de factores de transcripción en las regiones no codificantes del extremo 5' del gen, se emplearon los programas PLACE (Higo *et al.* 1999) y PlantCARE (Lescot *et al.* 2002). Estos programas permite la búsqueda en una determinada secuencia de motivos de regulación registrados en numerosas bases de datos de factores de transcripción.

Se aceptaron como más probables los motivos que se obtuvieron a partir de ambas bases de datos.

5.5. Obtención de la secuencia aminoacídica

La determinación de la secuencia aminoacídica a partir de la secuencia nucleotídica se realizó con la herramienta Translate de Expasy (<http://expasy.org>).

5.6. Predicción de la topología de proteínas transmembrana

La identificación de dominios transmembrana se hizo mediante SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html><http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>) (Hirokawa *et al.* 1998).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de todas las gráficas y tablas presentadas en esta Tesis Doctoral se sometieron a un ANOVA. Cuando se detectaron diferencias significativas como consecuencia de los tratamientos aplicados, se procedió a calcular estas mediante el test de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) Protegida de Fisher a un nivel de significación $P \leq 0.05$.

En los experimentos de regulación de la expresión génica, la cuantificación de la expresión se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Los experimentos se repitieron tres veces y el valor del Ct de cada muestra se determinó por triplicado. Se calculó la media de los tres experimentos y el error estándar de la misma.

RESULTADOS

1. DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR EL DESARROLLO DE LA SIMBIOSIS EN LA CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE LA PLANTA HOSPEDADORA.

Como se ha explicado anteriormente, el desarrollo de la simbiosis MA implica una transferencia de carbohidratos desde la planta al hongo, con lo que previsiblemente, los niveles de carbohidratos en las plantas micorrizadas deben de estar alterados respecto a las no micorrizadas debido a la demanda adicional que supone la presencia del hongo durante la simbiosis. Para obtener datos a este respecto, se midió la cantidad de azúcares solubles totales, así como los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa en plantas control regadas con 500 μM de P (C), inoculadas con *G. intraradices* (Gi) e inoculadas con *G. mosseae* (Gm) (20 μM de P para ambos hongos), tanto en raíces como en hojas de plantas de tomate después de 4 y 6 semanas desde la inoculación con el hongo MA donde la colonización micorrícica era de alrededor del 10% a las 4 semanas y del 30% a las 6 semanas. Se analizaron los tres azúcares sacarosa, glucosa y fructosa por separado, ya que son los carbohidratos implicados en las reacciones de hidrólisis de la sacarosa, paso indispensable para la utilización de la misma como fuente de carbono y energía tanto para la planta como para el hongo.

1.1 Efecto de la colonización micorrícica sobre el contenido de azúcares solubles totales.

En raíces, la concentración de azúcares solubles totales, es menor en las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas, siendo esta disminución más acusada en plantas de 4 semanas. Sin embargo, en las hojas, a las seis semanas después de la inoculación con los hongos MA, no había prácticamente diferencias en la concentración de azúcares solubles totales entre plantas control y plantas inoculadas con ambos hongos *G. mosseae* y *G. intraradices*, mientras que a las cuatro semanas después la inoculación, la concentración de azúcares solubles totales es similar en las plantas control y en las inoculadas con *G. mosseae*, y mayor en las plantas inoculadas con *G. intraradices* (Fig. 17).

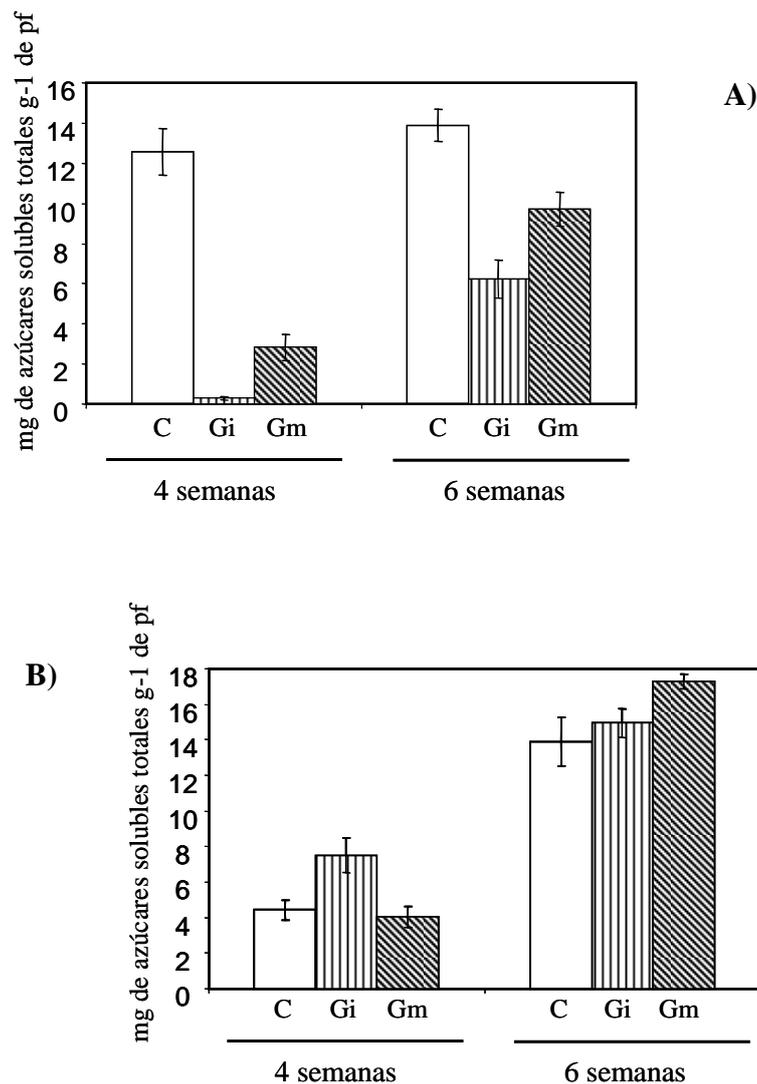


Figura 17. Contenido en azúcares solubles totales en raíces (A) y hojas (B) de plantas micorrizadas y no micorrizadas. Los carbohidratos se extrajeron de raíces y hojas de plantas de tomate regadas con 500 μ M de P (C), plantas micorrizadas con *G. intraradices* (Gi) y *G. mosseae* (Gm) cosechadas a cuatro y seis semanas después de la inoculación con el hongo MA. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

1.2 Efecto de la colonización micorrícica sobre el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa.

Cuatro semanas después de la inoculación, la concentración de sacarosa en las **raíces** era menor en las plantas micorrizadas (con ambos hongos *G. mosseae* y *G. intraradices*) que en las plantas control. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de sacarosa entre las plantas colonizadas por *G. mosseae* y las plantas no micorrizadas dos semanas más tarde (Fig. 18). En los dos tiempos analizados, tanto las concentraciones de glucosa

como las de fructosa fueron significativamente menores en las raíces colonizadas por ambos hongos, respecto a las correspondientes plantas no micorrizadas.

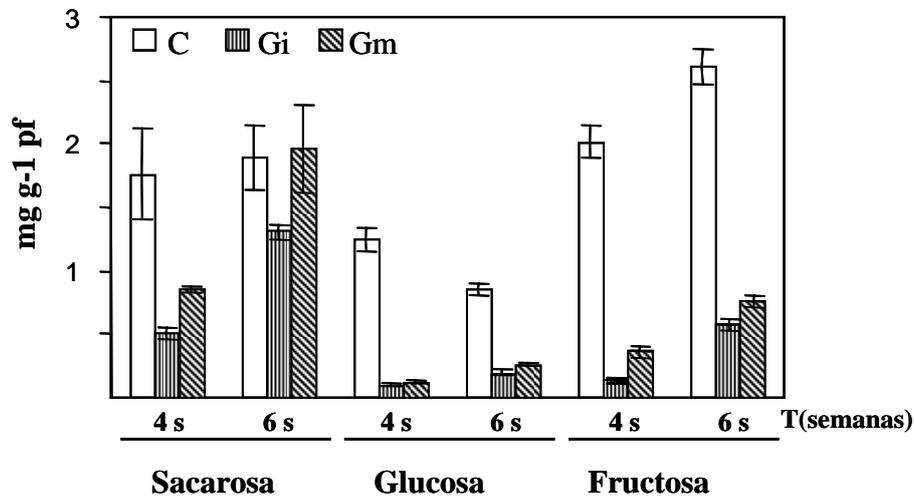


Figura 18. Contenido en sacarosa, glucosa y fructosa en raíces de plantas micorrizadas y no micorrizadas. Los carbohidratos se extrajeron de raíces de plantas de tomate regadas con 500 μ M de P (C), plantas micorrizadas con *G. intraradices* (Gi) y *G. mosseae* (Gm) cosechadas a cuatro y seis semanas después de la inoculación con el hongo MA. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

En **hojas**, cuatro semanas después de la inoculación, la concentración de sacarosa es mayor en las plantas inoculadas con *G. intraradices*, y no se encontraron diferencias significativas entre las plantas control y las inoculadas con *G. mosseae*. Dos semanas más tardes, sin embargo, no se detecta contenido de sacarosa en las plantas inoculadas con ambos hongos (Fig. 19). Las concentraciones de los otros dos azúcares, glucosa y fructosa, siguen el mismo patrón, a las cuatro semanas, las concentraciones son un poco mayores en las plantas micorrizadas (con ambos hongos *G. mosseae* y *G. intraradices*) que en las plantas controles, y a las seis semanas, la concentración de ambos azúcares es menor en las plantas inoculadas con *G. intraradices*, y es muy parecida en las plantas no inoculadas y en las inoculadas con *G. mosseae*.

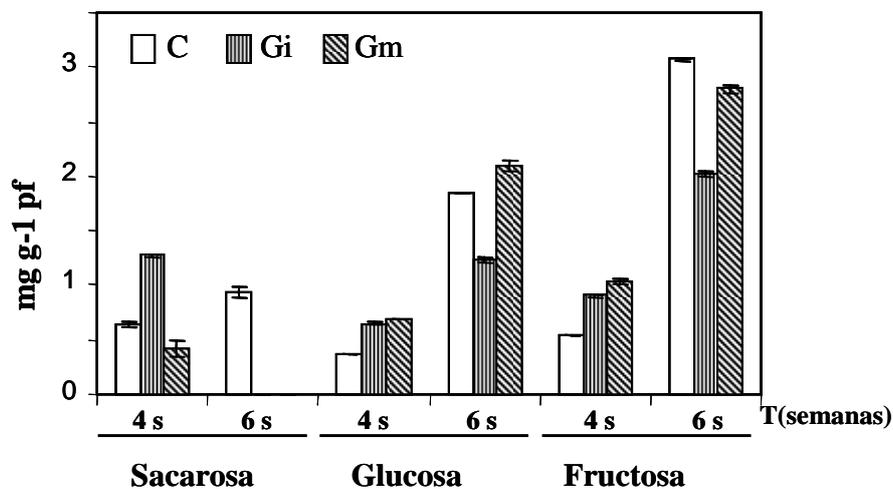


Figura 19. Contenido en sacarosa, glucosa y fructosa en hojas de plantas micorrizadas y no micorrizadas. Los carbohidratos se extrajeron de hojas de plantas de tomate regadas con 500 μ M de P (C), plantas micorrizadas con *G. intraradices* (Gi) y *G. mosseae* (Gm) cosechadas a cuatro y seis semanas después de la inoculación con el hongo MA. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

1.3 Efecto de la colonización micorrícica sobre las enzimas implicadas en la fijación de carbono.

Puesto que la simbiosis micorrícica arbuscular supone una demanda adicional de compuestos carbonados a la planta, es lógico pensar, que tanto la fotosíntesis como forma de fijar CO₂ de la atmósfera para formar compuestos carbonados, como la síntesis de sacarosa que es la forma principal de transporte de ese carbono fijado en las plantas superiores, puedan alterarse en mayor o menor medida por el establecimiento de la simbiosis. Para obtener datos de cómo se alteran estos dos procesos, se analizó la expresión de una enzima clave para cada uno. Para estudiar la fijación del CO₂ se analizó la expresión del gen que codifica la enzima clave de este proceso que es la ribulosa bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCo) (Nº acceso X05985), responsable del primer paso de fijación de CO₂ hasta triosa fosfato en el Ciclo de Calvin. Y para el estudio de la síntesis de sacarosa, se analizó la expresión del gen que codifica para la sacarosa-fosfo-sintasa (SPS) (Nº acceso AF071786), que cataliza la primera reacción responsable de la formación de sacarosa a partir de fructosa-6-P y UDP-glucosa. El análisis de estas dos enzimas se llevó a cabo en hojas de plantas de tomate control regadas con 500 μ M de P (C), inoculadas con *G. intraradices* (Gi) e inoculadas con *G. mosseae* (Gm) (con alrededor del 30% de micorrización en ambos casos), 6

semanas después de la inoculación con el hongo MA, mediante PCR Cuantitativa en Tiempo Real.

Como se puede apreciar en la figura 20, hay una inducción de los niveles de transcripción de ambos genes (SPS y RuBisCo) en las plantas micorrizadas con ambos hongos, con respecto a las plantas control no inoculadas. Estos datos, sugieren una activación de la producción de productos carbonados como consecuencia del aumento de la demanda de dichos productos hacia la raíz de la planta cuando se establece la simbiosis.

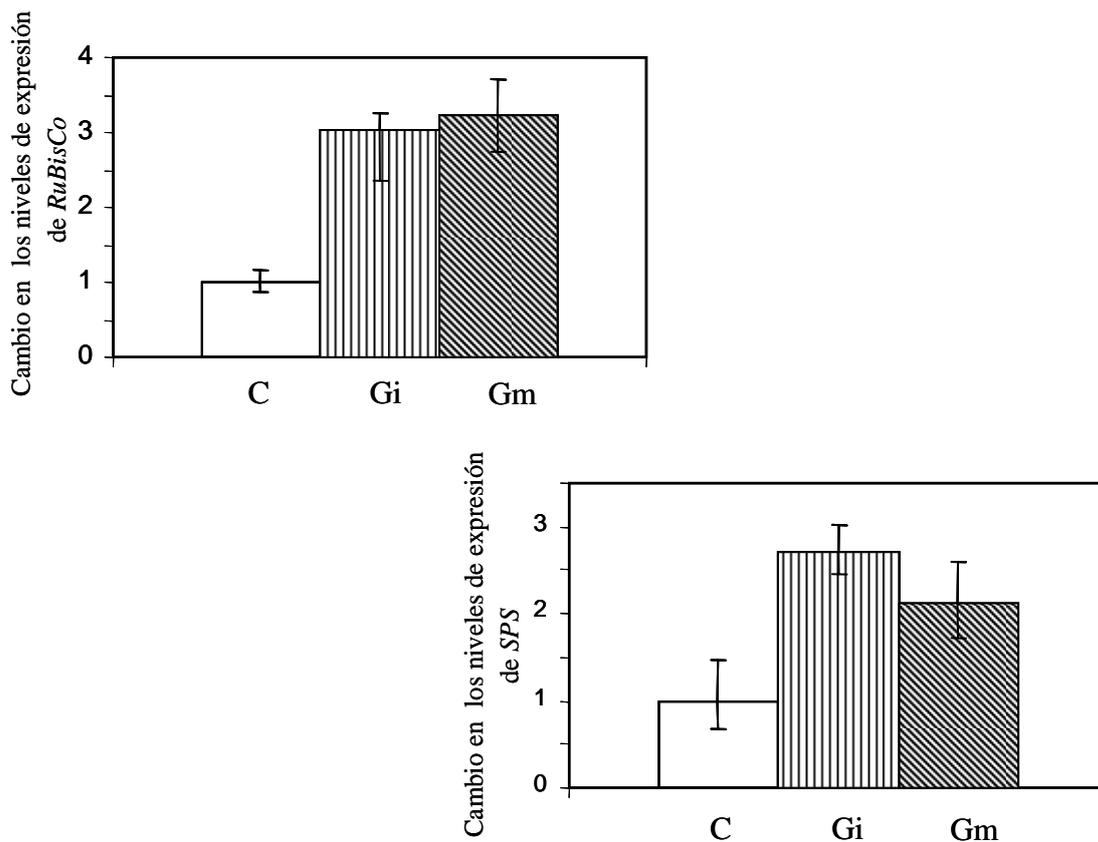


Figura 20. Efecto de la colonización por micorrizas sobre la expresión génica de *RuBisCo* y *SPS* en hojas de tomate. El ARN se extrajo de hojas de plantas de tomate control (C), inoculadas con *G. intraradices* (Gi), e inoculadas con *G. mosseae* (Gm). Los ARNs fueron reverso transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para *RuBisCo* (RBCF y RBCR) y *SPS* (SPSF y SPSR) y los del ARNr 18S (R1 y R2). El cambio inducido en la expresión génica de ambos genes por la colonización micorrízica se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS IMPLICADAS EN LA HIDRÓLISIS DE SACAROSA (invertasa y sacarosa sintasa).

Como ya se ha mencionado, debido al carácter de simbioses obligados de los hongos micorrízicos arbusculares, dependen del carbono proporcionado por la planta para su crecimiento. Como la sacarosa es la principal forma en que se transporta el carbono fijado en la planta, su utilización como fuente de energía por los tejidos sumidero depende de su hidrólisis en hexosas por sacarosa sintasa ó invertasa. Estudios *in vivo* usando resonancia magnética nuclear asociada con marcaje isotópico en raíces colonizadas por hongos MA (Shachar-Hill *et al.* 1995), y medidas de radiorespirometría sobre hifas intraradicales aisladas (Solaiman & Saito 1997), mostraron que la fase interna del hongo micorrízico arbuscular solo puede tomar hexosas, principalmente glucosa. Por tanto, la sacarosa debe hidrolizarse en la interfase planta-hongo para que éste pueda tomar las hexosas liberadas. Para conseguir un mejor entendimiento sobre la regulación del metabolismo carbonado en la planta huésped por la simbiosis, y habiendo mostrado en el apartado anterior que en dicha planta huésped se produce una alteración de los niveles de azúcares así como de las enzimas responsables de la formación de sacarosa, en esta sección, se analizará la regulación transcripcional y la caracterización de los genes que codifican para enzimas implicadas en la hidrólisis de la sacarosa en plantas de tomate colonizadas por *Glomus mosseae* ó *Glomus intraradices*. Dicho análisis, se ha realizado, tanto en genes presentes en la base de datos como en genes clonados por primera vez para esta Memoria de Tesis Doctoral.

2.1 Clonación de genes que codifican invertasas en raíces micorrizadas.

Para la búsqueda de nuevos genes que codificaran invertasas en tomate, se diseñaron dos cebadores degenerados en base a dos motivos conservados de aminoácidos presentes en la mayoría de las invertasas de planta: H(L/F)FYQYN (modificado de Roitsch *et al.* 1995), y WEC(P/V)DF (modificado de Ohyama *et al.* 1998) respectivamente (Fig. 21). Ambos cebadores, InvF e InvR, se usaron para la amplificación por PCR de la primera cadena de ADNc procedente de raíces de *S. esculentum* inoculadas con *G. intraradices* (BEG123). Tras ésa amplificación por PCR, se obtuvo una banda del tamaño esperado de aproximadamente 500 pb.

```

A. sativum -----
Lin5 -----
Lin7 -----
S. tuberosum MATQYHSSYDPENSASHYTFPLDQPDPSGHRKSLKIIISGIFLSSFLFTLLSVAFFPILNNQ
Inv1-1 MGGRDLESSTP-----LLHHEPYSPRKTITTTIVSSIVAAALLLSLITLLNFTTKHEA
B.vulgaris -----
C.rubrus -----MASYKLPKQVIL
C.intybus -----

A. sativum -----
Lin5 -----
Lin7 -----
S. tuberosum SPDLQSNRSRSPAPPSRGVSGVSDKTFRDVVNASHVSYAWSNAMLSFTWQRTAYHFQPK
Inv1-1 D---HHPPDVAFPMSRGVFEVSEKSTASLIG-SAAFPPWTDAML--EWQRTGFHFQPEK
B.vulgaris -----
C.rubrus LLVSLFFFCYGVVELQAAQSPPSNQPYR-----TAYHFFTQP
C.intybus -----MSNSSNASESLFPATSEQPYR-----TAFHFQ--P

A. sativum -----LHLFYQYNPKGS-VWGNIIWAHSVSKDLINW--IHLEPAIY
Lin5 -----LHLFYQYNPKGS-VWGNIIWAHSVSKDLINW--IHLEPAIY
Lin7 -----LHLFYQYNPNGS-VWGNIIWAHSVSKDLINW--INLEPAIY
S. tuberosum --NWMNDPNGPLYHKG--WYHHLFYQYNPDSA-IWGNITWGHAVSKDLIHWLYFTLPFAMV
Inv1-1 FTNWMNDPDGPMFYKG--WYHIFLYQYNPVSA-VWGNITWGHAVSRNLIHW--FHLPIAFV
B.vulgaris -----LHLFYQYNPNGV-IWGPVWGHSTSKDLVNW--VPQPLTME
C.rubrus RKNWINDPNGPMLFKG--IYHHLFYQYNPNGVKLRGPPVWGHSTSKDLVNW--MPQPLTME
C.intybus PQNWMNDPNGPMCYNVFTYHHLFYQYNPFGPLWNLRMVWAHSVSHDLINW--IHLDLAFA
* :***** . *.:*.:*.:*.:* . :

A. sativum P--SKKFDKFTYGTWSGSSTILPN--NKPVIIYTGVDVSYNNQVQNYAIPANLSDPFRLR-
Lin5 P--SKKFDKFTYGTWSGSSTILPN--NKPVIIYTGVDVSYNNQVQNYAIPANLSDPFRLR-
Lin7 P--SKPFDQFTFGTWSGSATILPG--NKPVILYTGIDANQTQVQNYAIPANLSDPYLR-
S. tuberosum P--DQWYDI--NGVWTGSATILPD--QIMMLYTGDTDDY-VQVQNLAYPTNLSDPDLLD
Inv1-1 P--DQWYDFTANGALTGSATFLPD--GRIAMLYTGITTEF-VQVQCQVYEDVDDPLLL-
B.vulgaris P--EMAANIFTNGSWSGSATILPG--NKPAILFTGLDPKY-EQVQVLAYPKDTSDPNLK-
C.rubrus PFTEMAANI--NGSWSGSATILPG--NKPAILFTGLDPNY-EQVQVLAYPKDLNDPYLK-
C.intybus P----TEPFDINGCLSGSATVLPGF-TNKPIMLYTGIDTEN-RQVQNLAVPKDLSDPYLR-
* * :*:*:*:* . : :*:* * * * . * : * * *

A. sativum -KWIKPNNN--PLIVPF--TDNSINRTEFRDPT--TAWMG-QDGLWRILIASMRKH-RGM
Lin5 -KWIKPNNN--PLIVPF--TDNSINRTEFRDPT--TAWMG-QDGLWRILIASMRKH-RGM
Lin7 -EWIKPDNN--PLIIAF--TDESINKTKFRDPT--TAWMG-KDGHWRIVMGLSRKHRSRGL
S. tuberosum FTWVKYKGN--PVLVP---PPGIVKDFRDPT--TAWTGPQNGQWLLTIGSKIG-KTGI
Inv1-1 -KWFKSDAN--PILVFP--TPPGIGSKDFRDPT--TAWYDVAEASWKLAIKSKDEQHNGI
B.vulgaris -EWFAPQ--PVMFPTFTPNQINATSFRXPT--TAWRL-PDGVWRLIG-SKRGQRGL
C.rubrus -EWFAPKNFTPVMPF--TPQNQINATSYRDPT--TAWML-PDGNWRVLIKSKRRQRGL
C.intybus -EWKHTGN-----PIISLPEEIQPDDFRDPTTFTTWLE-EDGTWRLLVG-SQDKTGI
* . * . * . : * * * * : * . : * : *

A. sativum ALLYRS--RDFMKWIK--QHPLHSSTFTN-TGNWECPDFFPVL--FNSTNGLDVS-YR-
Lin5 ALLYRS--RDFMKWIK--QHPLHSSTFTN-TGNWECPDFFPVL--FNSTNGLDVS-YR-
Lin7 AIMYRS--KDFMKWKA--KHPLHS-TFTNGTGNWECPDFYFVPS--SKGTDGLDQ---Y-
S. tuberosum ALVYETSNFTFTSFKLL--DEVLHA--VPG-TGMWECVDFYFVPS--TEKTNGLDTS-YN-
Inv1-1 SLIYRT--YDFVSYELL--PILLHAFTVEG-TGMWECVDFYFVPS--TNSTVGLDTS-VPP
B.vulgaris SLLFRS--RDFVHVQA--KHPLYSDFTKL-SGMWECPDFFPVYANGD-QMGVDTSIIGS
C.rubrus SLLYRS--RDFVHVKAFTKHPLYS--YER-SGMWECPDFFPVYKNGN-TMGIDT SVIGP
C.intybus AFLYHS--GDFVNWTKS--DSPHKG--VSG-TGMWECVDFFPVWFTVDSTNGVDTSIINP
::: . : * : * : * : * * * . * : * *

A. sativum GKNVKYVLKNSLDVARFDYY--TIGMYHTKIDRYIFTPNNNSIDGWKGLRIDYGNF----
Lin5 GKNVKYVLKNSLDVARFDYY--TIGMYHTKIDRYIFTPNNNSIDGWKGLRIDYGNF----
Lin7 GEEHKYVLKNSMDLTRFEYY--TLGKYDTKKDRYVPTDPDSDVSLKGLRLDYGNFYASK
S. tuberosum GPGVKHVLKASLDDNKQDHYFTAIGTYDLTK--NKCTPDNPELDCGIGLKLIDYGYASK
Inv1-1 GPGVRHVLKASLDDDKHDYY--AIGTYDVVSGFTTWIPDDVEADVIGWRYDYGYASK
B.vulgaris --HVKHVLKNSLDITKHDIY--TIGDYNIKKDAFTYTPDIGYMNDS--LRYDYGYASK
C.rubrus --NIKHVLKVSLSLVSKHDVY--TIGGFYDTKKDAYTPDVGFMNDS--LRYDYGYASK
C.intybus SNRVKHVLKLGIQDHGKDCY--LIGKYSADKENYVPEDEL-TLSTLR-LFTDYGYASK
:*** . : : * : * : : * : * : * :

```

```

A. sativum -----
Lin5 -----
Lin7 -----
S. tuberosum TFYDPPKQRRVVLGWIGETDSESFADLQKGWASVQS--IPRTVLYDKKTGTHLL-QWPV
Inv1-1 TFFDWAKGRRVLFGFTGETDSE--QNNRLKGWASVFTLPIPRITILFDQKTGSNLL-LWPV
B. vulgaris TFFE-----
C. rubrus TFYDGAKKERILLGWANESSEEDDAKKFTGWSGIHT--IPRTIWLKSGNQLI--QWPI
C. intybus SFFDPVKNRRIMTAWVNESDSEADVIAR--GWSGVQS--FPRSLWLDKNQKQLLFTQWPI

A. sativum -----
Lin5 -----
Lin7 -----
S. tuberosum EEIESLRGGDPPIVKQVNLQPGSIELLHFTVDSAAELDIEASFEVDKVALQGIIEADHVGF
Inv1-1 EEVERLRFNRQDFENIDIGIGAVVPLDIGRAIQLDIVFTAEFEIDGATLEASVEAD-LGY
B. vulgaris -----
C. rubrus SNIEKLRQKSPVFKLYGKLIKGGSLNEVSGITAFQAQADVEISFKIKDLENVEKFDASWT
C. intybus EEIEMLHQNEVSFHN--KKLDGSSLEVLGITAS--QADVKISFKLANLEEAEELDPSWF

A. sativum -----
Lin5 -----
Lin7 -----
S. tuberosum S-----CSTSGGAASRGILGPPFVVVIADQKLSFTDVTVPVYFYIS--KGADGRAETHFCA
Inv1-1 N-----CSTSGGTFGRGVLGPFGLVLSDEDLS--EQTAIFYVGRFTKVDGALQTFFCQ
B. vulgaris -----
C. rubrus --NPQLLCSQKGGSVKGGGLGPFGLMTFQASKGLEEYFTTAVFFR-IFKAYDNKYVVLMS
C. intybus TVDPQLICSENDASKKGFPGFGLLALASSDLREQ---TAIFFR-VFRK-NGRYVVLMS

```

Figura 21. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de distintas invertasas de plantas.

El producto de PCR fue subclonado en el vector pGEMT-Easy, y la secuenciación de varios clones permitió la identificación de dos clones parciales que codificaban una posible invertasa vacuolar (Lin9) y una posible invertasa asociada a pared celular (Lin10) de tomate. Los extremos 3' y 5' de ambos genes se obtuvieron mediante técnica de RACE usando cebadores específicos de cada gen: 1Lin9 y 2Lin9 para la posible invertasa vacuolar, y 1Lin10 y 2Lin10 para la posible invertasa asociada a pared celular.

El ADNc completo de Lin9 mostró un polipéptido de 652 aminoácidos con 73 kDa de peso molecular predicho y un punto isoeléctrico de 6.34. La proteína también contiene cinco sitios potenciales de glicosilación, y el extremo N-terminal muestra la característica típica de una secuencia señal de corte con un posible sitio de corte en la posición 57 (Fig. 22).

acgcgggatgcaaaatcaaaaaaaaaaaaa

atgctgatccctaattcagaacaacaacggcggtccgtacactcatttaccggagtcg
M S I P N S E T N N G V P Y T H L P E S
gataacgactccggcaataactccggcaagatgccggaaaaccaacagatccacgttcata
D N D S G N T P A R C R K T N R S T F I
atattaaccggctctggtggcatttttgttatttttgtggccgtgaaatacggtaacaac
I L T G L V A F L L F F V A V K Y G N N
gacggctactgatgatataattccgggaccgggtaccaccgcgatgaaacgggtgtgcaacatg
D G T D D I I P G P V P P H E T V C N M
atcggttcgaatctaataccggttaaccaccatgaggacgggtggcgcgtgggggtggaggaa
I G S N L M P L T T M R T V A R G V E E
ggcgtctccgccaagtccacacggacatttttgggtgtacggccggtttccggtggaccocaa
G V S A K S H G H F L G V R P F P W T Q
aaaatgttggccttggaagaacatcattccattttcaacctaagaagaattggatgaat
K M L A W Q R T S F H F Q P K K N W M N
gatcctaattggtccattataactacaaggatgggtatcatttgttctatccatacaaatcca
D P N G P L Y Y K G W Y H L F Y P Y N P
gaggcagctgatggggaatattgtatggggccatgcagctcaagagacctaatccac
E A A V W G N I V W G H A V S R D L I H
tggcagcatttggcagtggtctatggttagcggaccaatgggtatgatatcaacgggtgtctgg
W Q H L P V A M V A D Q W Y D I N G V W
actggatccgctacctttttacctaattggtgaccttatcatgttatataactgggtcaacc
T G S A T F L P N G D L I M L Y T G S T
aacgaatcgattcaggtccaaaatcttgcgtaccggccgacctctgacctctatta
N E S I Q V Q N L A Y P A D P S D P L L
agaaaatggatcaagatgagggcaaccgggtcccatcccaccaccgggaattgggctc
R K W I K Y E G N P V P I P P P G I G L
aaggacttccgctgatcccaccaccgcgtggaccacaccggaaggcaaatggcgtattact
K D F R D P T T A W T T P E G K W R I T
attggttccgaaaattaataaaaccggaatctcattggtctatgacacaattgattttaaa
I G S K I N K T G I S L V Y D T I D F K
aaatttgaattggtgaagggtatggtacatggtgtaccgggtacgggtatgtgggaatgt
K F E L L K G M L H G V P G T G M W E C
gtggattttaccgggtttctaaaattgctgaaaatgggcttgatacttcagaaaatggg
V D F Y P V S K I A E N G L D T S E N G
cctgcagtgaaacatgttttgaagtccagctcgcacgatgatcgaatgactaattgccc
P A V K H V L K S S L D D D R N D Y Y A
cttggaaacttataatgcaggggaggaatgggtacctgataatccaataattgatggt
L G T Y N A G A G K W V P D N P I I D V
ggatttggattaagatatgattatggtaatttttatgcatcaaaatcattttatgatcaa
G I G L R Y D Y G N F Y A S K S F Y D Q
gaaaaaagagaagagttctttgggcttggtatgaagaaactgatagtgaagctgctgat
E K K R R V L W A W I K E T D S E A A D
atttgcaggggttgggctcacttcagccaattccaaggacgatacagtatgataagaag
I C R G W A S L Q P I P R T I Q Y D K K
acaggtagcaacttaattacctggcccggtggaagttgataatgtgagatccaataac
T G S N L I T W P V A E V D N L R S N N
aatgaatttaacaagggtttagttaaaccagggtcaattgtcccactagaagttggttcc
N E F N K V V V K P G S I V P L E V G S
gccaccagttggacataatggctgaatttgaagtggatcaaaatatggtgaagaaagta
A T Q L D I M A E F E V D Q N M L K K V
gatggaagtaagtctacatatgattgtataaagagtggtggatctggtgaacgtrgggca
D G S N A T Y D C I K S G G S G E R G A
ttaggaccatttggttttagtggttaacagataatagcttatcagaacaaactccaatt
L G P F G L L V L T D N S L S E Q T P I
tattcttacattgctaaagatcttactggcaatttcaacacatttttctgcaatgatctc
Y S Y I A K D L T G N F N T F F C N D L
acaaggtcatctgaagcatcagacgtacgaaaattaatctatggaagcacagttccagtt
T R S S E A S D V R K L I Y G S T V P V
ctccaaggagaaaaactttctctaaggacactgggttgatcattcgatagtagaaagtttt
L Q G E K L S L R T L V D H S I V E S F

```

gcgcaaaatggaaggacagcaataacatcaagggatatatccgacaaaagcaatatatgaa
A Q N G R T A I T S R V Y P T K A I Y E
aatgctaagatctatatttcaataatgcaacagacatttagcgttactgcaacaatcaag
N A K I Y L F N N A T D I S V T A T I K
atttggcaaatgaattctgcaaatataaaatctaattaaattttaaatgtacctagattac
I W Q M N S A N I K S N -
attttttaaattttttcagcatgtattggtttgtgtcattctttttatttttttgtaatttt
tattatttctcccaatttttctattcttctctccatttatgtaatggaaataatgaaga
aatcagtgaagagtatgttttttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figura 22. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de Lin9. Las secuencias diana para una potencial glicosilación están en rojo. Las zonas 3' y 5' no traducidas están subrayadas, y los motivos conservados de las invertasas ácidas de plantas están en azul.

La comparación de la secuencia aminoacídica deducida de Lin9 con la base de datos GenBank, descubre una similitud determinante con conocidas invertasa vacuolares ácidas de distintas plantas, presentando la identidad más elevada (63%) con una invertasa vacuolar de *Cichorium intybus* (Van Den Ende *et al.* 2002), la isoforma II de una beta-fructosidasa soluble de *Daucus carota* (64%) (Sturm A 1996), otras invertasas vacuolares de *Citrus unshiu* (63%), *Beta bulgaris* (61%), y al precursor de invertasa vacuolar de *Lycopersicon esculentum* (57%) (Elliot *et al.* 1993). Como se muestra en la figura 22, Lin9 posee la secuencia de los dos motivos conservados presentes en todas las invertasas ácidas de plantas: (i) el motivo β -fructosidasa NDPNG, y (ii) el sitio catalítico de cisteína WECXDF, donde X es una valina en Lin9 como ocurre en las secuencias de las invertasas vacuolares, mientras que en las secuencias de las invertasas extracelulares se encuentra una prolina en esa misma posición. Todos estos datos sugieren que Lin9 codifica una posible invertasa vacuolar. El análisis mediante Southern blot de ADN genómico de tomate, indica que Lin9 es un gen de bajo número de copia, probablemente con una ó muy pocas copias en el genoma (Fig. 23).

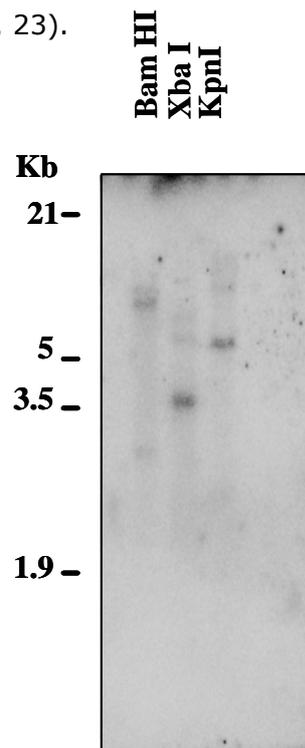


Figura 23. Análisis mediante Southern blot de Lin9 en el genoma de tomate. Membrana lavada tras la hibridación bajo condiciones de alta astringencia.

En el caso del otro gen identificado, Lin10, su ADNc completo mostró un polipéptido de 531 aminoácidos con un peso molecular teórico de 59,7 kDa, y un punto isoeléctrico de 4.96 (Fig. 24). La proteína también tiene cinco secuencias susceptibles de ser glicosiladas comunes con las descritas por Van den Ende *et al.* (2005) en una fructoexohidrolasa de trigo, y el extremo N-terminal muestra la característica típica de una secuencia señal de corte con un posible sitio de corte entre la posición 64 y la 65. La comparación de la secuencia aminoacídica deducida de Lin10 con la base de datos, muestra una similaridad con invertasas asociadas a pared celular, beta-fructosidasas, y fructan-exohidrolasas de distintas plantas. La identidad más elevada (57%) es con una invertasa asociada a pared celular II de *Vicia faba* (Weber *et al.* 1995), con beta-fructofuranosidasas de *Glicine max* (58%) y *Arabidopsis thaliana* (57%), con invertasas de *Lycopersicon esculentum* en un 55% (Fridman & Zamir 2003), y un 54% de identidad con Lin6 (Ohyaama *et al.* 1998), pero lo más sorprendente fue la elevada identidad (57%) mostrada con la fructan-exohidrolasa de *Beta vulgaris* (Van den Ende *et al.* 2003), mostrando una identidad incluso mayor que con invertasas. Como en el caso de Lin9, la secuencia aminoacídica de Lin10 posee, como se puede observar en la Fig. 24, los dos motivos conservados en todas las invertasas ácidas de plantas: el motivo NDPNG, y el motivo WECXDF, donde X en este caso es una prolina, que como ya se ha mencionado, es característica de las secuencias de invertasas extracelulares.

```

tgcaatatatcatatacaaaaagaaaaagaaagtaaaaactctcctcatgggctcagccttac
                                     M A Q P Y
agaactgcttatcatttccaacctcccaagaattggataaatgatcctaattggaccaatg
R T A Y H F Q P P K N W I N D P N G P M
atctacaaggggaatttaccattttattttaccagtacaatcctgaaagtgcagaatgggga
I Y K G I Y H L F Y Q Y N P E S A A E W G
aacatagcatggggccattctacttcaactgatcttgtcaactggactattcatcctccc
N I A W G H S T S T D L V N W T I H P P
gctcttttgccttcagacgcatatgatatcaacggttggttggtcaggttctgcgacgac
A L L P S D A Y D I N G C W S G S A T I
ctccaagatggcacaccagctatactctataaccggaggcaattcacaaaaagttcaactt
L Q D G T P A I L Y T G G N S Q K V Q L
caaatctagctgtgcctaaagatccatccgacccttaccttgtcgagtgggttaaactct
Q N L A V P K D P S D P Y L V E W V K S
cctgataatccaatcatgataccgaatgaagatgagaaagaatcgtttagagaccaacc
P D N P I M I P N E D E K E S F R D P T
accgcgtgggttagggcctgatgggatttggagagttggttataggaaatgaaagagaaaac
T A W L G P D G I W R V V I G N E R E N
agaggaactgctgttttatataagagtgaagattttattcgttggactgaagcagagcgg
R G T A V L Y K S E D F I R W T E A E R
cctctgcattcgtccagtgaaactacaatgtgggaatgcacctgatttttccctgtctta
P L H S S S E T T M W E C P D F F P V L
gttgacggggaaaatggacttgacatttcagagatttttccagggataaaaacacgtgctt
V A D G E N G L D I S E I F S G I K H V L
aaaaatagcgtggctcgttccatttggttgattattatactggtggagcgtatgaccatcac
K N S V A R S F V D Y Y T V G A Y D H H
aacgatgtgtatacaccagatgagggatcggttagacaatgaatcaggattacgattggat
N D V Y T P D E G S V D N E S G L R L D

```

```

tatggaaggtattacgcttccaaatcttttttgatagtgagaagaagaggagaatcttc
Y G R Y Y A S K S F F D S E K K R R I F
attgcttgggtaatgagctacaagtaaggaaatcgatttaattaaaggatggctgggt
I A W V N E S T S K E I D L I K G W S G
cttcagtcgtttcctagggaaatgggctggataaaggtggaaagcaattggttcaatgg
L Q S F P R K I W L D K G G K Q L V Q W
cctggtgaagaaatcgaaatgctgaggacaaacaaagttgatttacaataataacactc
P V E E I E M L R T N K V D L Q N I T L
gaagctgggtttaaaacgtgagatttgggtgctcactgctgcacaggctgatgtagaatc
E A G L K R E I C G V T A A Q A D V E I
tccttctcaattccaattgcggtgcttgagcagggcagaggtgctggaatcaaattggacg
S F S I P I A V L E Q A E V L E S N W T
aatccacaagagatagctaaccaaaagtggttcattagccaacactgggtggtggacctttt
N P Q E I A N Q S G S L A N T G V G P F
gggttgctagttttggcctcaaataaaattgaagaatatacagcaatattctttagaatt
G L L V L A S N K I E E Y T A I F F R I
ttcaaaaagaatgacaagtttggtggttaatgggctgtgacaaaaaaggtcatctgtg
F K K N D K F V V L M G C D Q K R S S V
ggccttgaatatgataaaaaccaattatggagcctttttggacattgatcctcttacagaa
G L E Y D K T N Y G A F L D I D P L T E
aaattatcactaagaactttgattgatcattcgattgtagaaagctttggcggagggtgga
K L S L R T L I D H S I V E S F G G G G
aaagcttgcatacaacaagagcttatccaactttggccatcaatgataatgcccatatt
K A C I T T R A Y P T L A I N D N A H I
tttgttttcaacaatggatcccaacatggtgacatctccactttgagtgcttggagccta
F V F N N G S Q H V D I S T L S A W S L
aaccaggctcacatcaattgaaatcattaattcaaaatgtaatttttaaaattttcaacca
N Q A H I N -
ccaaaacatttggagaagtctttgccattttgttcatttttaagtttggttgaaatcgttt
actgctccttgcatttatgtaactacaactacatacttgcccttttttacttgtcattctt
acgcagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figura 24. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de Lin10. Las secuencias diana para una potencial glicosilación están en rojo, y las zonas 3' y 5' no traducidas están subrayadas.

El análisis por Southern blot del ADN genómico de tomate hace pensar que Lin10 es un gen de bajo número de copia, probablemente dos (por las dos bandas observadas en la digestión del ADNg con XbaI) ó pocas copias por genoma (Fig. 25).

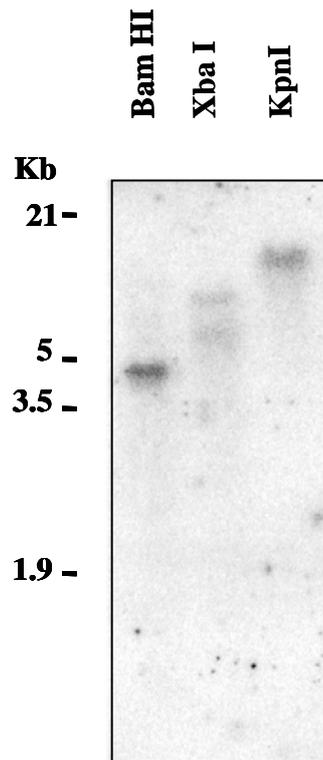


Figura 25. Análisis mediante Southern blot de Lin10 en el genoma de tomate. Membrana lavada tras la hibridación bajo condiciones de alta astringencia.

2.1.1. Clon genómico de Lin10

Las estructuras de los genes de invertasas son bastante similares, conteniendo cada uno entre seis y ocho exones (Tymowska-Lalanne & Kreis 1998). Muchos de los genes como ya se ha mencionado anteriormente, contienen un exón extremadamente pequeño (exon II) que codifica el triplete altamente conservado DNP, siendo uno de los exones más pequeños publicados hasta ahora. Burnay y colaboradores (1996) demostraron el *splicing* alternativo de este mini-exón en genes de invertasas de patata durante la inducción por frío, y propusieron un papel fisiológico para la delección del motivo β -fructofuranosidasa DNP.

Dado que Lin10 muestra homología tanto con invertasas asociadas a pared celular, como con fructan-exohidrolasas, y que curiosamente, en contra de lo esperado por la localización vacuolar de los fructanos de que los ADNc de 1-FEHs de plantas estuviesen más estrechamente relacionados con las invertasas vacuolares se demostrase inesperadamente, que basándose en los alineamientos de secuencias, la 1-FEH es más similar a las invertasas asociadas a pared celular que a invertasas vacuolares (Van den Ende *et al.* 2000, 2001), se decidió estudiar su estructura génica, para comprobar si coincidía con la anteriormente descrita. Para ello, se utilizaron los cebadores 6Lin10 y Lin10G en ADN genómico de tomate digerido para el paseo cromosómico siguiendo las instrucciones del fabricante (kit Universal GenomeWalker de Clontech). Como resultado, se obtuvo un fragmento genómico de 2617 nucleótidos (Fig. 26). Lin10 está organizado en ocho exones y

siete intrones, conteniendo además un mini-exón de 9 nucleótidos (exón II) que codifica el tripéptido DPN de la región WINDPNG de la figura 24. Este mini-exón, está conservado en muchas invertasas de plantas, excepto en la invertasa asociada a pared *InvDC1* de zanahoria que tiene la región DPN incorporada en el exón principal (Sturm 1995). Tiene particular interés el hecho de que en los genes de invertasas asociadas a pared celular, el mini exón está seguido de un corto intrón ó, como en el caso de *InvDC1* no exista tal intrón. En contraposición, las invertasas vacuolares tienen segundos intrones mucho más largos (mayores de 1000 pb) cómo es el caso de *InvLe31* (Elliott *et al.* 1993), e incluso de algunas fructan-exohidrolasas como *FEHIIa* de endibia (Michiels *et al.* 2004). Lin10 es más similar a las invertasas asociadas a pared celular ya que posee un segundo intrón corto de sólo 187 nt.

**ATGGCTCAGCCTTACAGAACTGCTTATCATTTC AACCTCCCAAGAATTGGA
TAAATG**GTACATTCTTAACACACTCATTCTTCTTCAGAAATATAATTAATTTT
GTGTAATCTAGTCGAAGTTAATTCTTTTAAATTGATTTATGTTCCGATGAATC
GTGTGATTGACTTGTAAATGCTGATGAACTGGGAATACATGGCATGTCGTTGA
ATTTACA**GATCCTAAT**GGTAAGTTTCCAGTCTAATCATCAATGTTCTGTTT
AGAGAACTTACAATTTTATTACATTGATCTACCTTTTAAATAGCAATATAAT
GTCAAGTAATAGTAGTAGCAAATTGTTTTGCCAATTTTACCCTCCGTGTTTG
TTGAAAAAAATACCTTCTTCACGAACACTTGTCATTATATTTGCAG**GGACC**
AATGATCTACAAGGGAATTTACCATTTATTTTACCAGTACAATCCTGAAAGT
GCAGAAATGGGGAAACATAGCATGGGGCCATTCTACTTCAACTGATCTTGTC
AACTGGACTATTCATCCTCCCGCTCTTTTGCCTTCAGACGCATATGATATCA
ACGGTTGTTGGTCAGGTTGTTACGATTTTTGTGAAAATATTTTGTTTATTATT
TCAGGAGATAGATCGATATCATTATATCAAGTATAAATAAAAAATTCATTTCC
TTCACAGGTT**CTGCGACGATCCTCCAAGATGGCACACCAGCTATACTCTATA**
CCGGAGGCAATTCACAAAAGTTCAACTTCAAATCTAGCTGTGCCTAAAG
ATCCATCCGACCCTTACCTTGTCGAGTGGGTTAAATCTCCTGATAATCCAAT
CATGATACCGAATGAAGATGAGAAAGAATCGTTTAGAGACCCAACCACCGC
GTGGTTAGGGCCTGATGGGATTTGGAGAGTTGTTATAGGAAATGAAAGAGA
AAACAGAGGAACTGCTGTTTTATATAAGAGTGAAGATTTTATTCGTTGGACT
GAAGCAGAGCGGCCTCTGCATTCTGTCAGTGAACTACAATGTGGGAATGC
CCTGATTTTTTCCCTGTCTTAGTTGACGGGGAAAATGGACTTGACATTTTCA
AGATTTTTTTCAGGGATAAAACACGTGCTTAAAAATAGCGTGGCTCGTTCATT
TGTTGATTATTATACTGTTGGAGCGTATGACCATCACAAACGATGTGTATACA
CCAGATGAGGGATCGGTAGACAATGAATCAGGATTACGATTGGATTATGGA
AGGTATTACGCTTCCAAATCTTTTTTTGATAGTGAGAAGAAGAGGAGAATCT
TCATTGCTTGGGTTAATGAGTCTACAAGTAAGGAAATCGATTTAATTAAGG
ATGGTCTGGTCTTCAGGTAATAATTCGTTTAGGTGACCATTTATTTTTATCCC
AAAGACAAATTTAATTTTGAATTTCTCATTTTTCCGTCAAACTAAAGTTCA
ATATCCTTGTACTATTACAGTCGTTTTCCTAGGAAAATTTGGCTGGATAAAGG
TGGAAAGCAATTGGTTCAATGGCCTGTTGAAGAAATCGAAATGCTGAGGAC
AAACAAAGTTGATTTACAAAATATAACACTCGAAGCTGGTTTAAAACGTGA
GATTTGTGGTGTCACTGCTGCACAGGTATAATTCTTCCTATGCAAAAGCTTG
TCAATTTCTTTTGTGATATTATTCGTCCAATCCAAAACAACCTTGCTAATTT

GACTCATAATACGACAGGCTGATGTAGAAATCTCCTTCTCAATTCCAATT
 GCGGTGCTTGAGCAGGCAGAGGTGCTGGAATCAAATTGGACGAATCCACAA
 GAGATAGCTAACCAAAGTGGTTCATTAGCCAACACTGGTGTGGACCTTTTG
 GGTGCTAGTTTTGGCCTCAAATAAAATTGAAGAATATACAGCAATATTCTT
 TAGAATTTTCAAAAAGAATGACAAGTTTGTGTGTTAATGGGCTGTGACCAA
 AAAAGGTACAAAATCACCTGGATTTGGTTTTACATTGATAACCAATAAA
 TTTTGTCTTCTACTTGTAGATTTATAGATTGAGAGTAAATTTTTTGAAATGC
 AGGTCATCTGTGGGCCTTGAATATGATAAAACCAATTATGGAGCCTTTTTGG
 ACATTGATCCTCTTACAGAAAAATTACTACTAAGAACTTTGGTAAGTTTCAC
 TATCGAATTAATTATACATATCAGCGAGAGAGAAATAAAGTGAGAGCTCCT
 GGGGAGGAGTCTAATAAAAAGGATCTATTTTTTCAGATTGATCATTTCGATTG
 TAGAAAGCTTTGGCGGAGGTGGAAAAGCTTGCATCACAACAAGAGCTTATC
 CAACTTTGGCCATCAATGATAATGCCCATATTTTTGTTTTCAACAATGGATC
 CCAACATGTTGACATCTCCACTTTGAGTGCTTGGAGCCTAAACCAGGCTCAC
 ATCAATTGAATCATTAATTCAAAATGTAATTTTTTAAAATTTTCAACCACCAA
 AACATTTGGAGAAGTCTTTGCCATTTTGTTCATTTTAAAGTTTGTGTTGAATCG
 TTTACTGCTCTTGCATTTATGTAACTACAACACTACATACTTGCCCTTTTTACT
 TGTCATTCTTACGCAGA PolIA

Figura 26. Estructura genómica de Lin10. Los exones están en rojo y los intrones en negro. El mini-exón DPN está subrayado.

2.2 Análisis funcional de los genes clonados Lin9 y Lin10.

2.2.1. *Expresión heteróloga de Lin9 y Lin10 en Saccharomyces cerevisiae.*

Para la caracterización de los productos génicos de Lin9 y Lin10, se obtuvieron las secuencias completas de Lin9 y Lin10 mediante PCR, usando ADNc de tomate como ADN molde, y juegos de cebadores que flanqueaban la pauta abierta de lectura completa (cebadores 3Lin9/4Lin9 y 3Lin10/4Lin10 respectivamente). Para Lin10 se obtuvo la secuencia esperada según se había obtenido mediante la técnica de RACE, pero para Lin9, se obtuvieron dos secuencias: una que correspondía con la obtenida mediante RACE, y otra que tenía 75 pb menos que la anterior (ver secuencia en negrita en la fig. 22), sin que por ello se vea alterada la pauta de lectura. A ésta nueva isoforma de Lin9 se la llamó GLin9, y ambas isoformas del gen se utilizaron para el análisis funcional mediante expresión heteróloga.

Las secuencias completas de ambos genes Lin9, Lin10 y GLin9, se clonaron en el sitio *NotI* del vector pFL61, puente entre *E. coli/S. cerevisiae* (Minet *et al.* 1992), obteniendo así los vectores pLin9, pGLin9 y pLin10 que contenían respectivamente el ADNc de Lin9, GLin9 y Lin10 aguas abajo del promotor constitutivo de *S. cerevisiae* de la fosfoglicerato kinasa. La cepa de levadura mutante deficiente en actividad invertasa SEY 2102 (Emr *et al.* 1983), y la cepa control positivo DBY746, fueron transformadas con los plásmidos pLin9, pGLin9, pLin10 y sólo con pFL61

(vector vacío) usando el método del Cloruro de Litio, para comprobar si las proteínas codificadas por los tres genes funcionaba como invertasas. Los transformantes Ura⁺ fueron identificados mediante su crecimiento a 30°C sobre placas de medio selectivo SD con glucosa como fuente de carbono, y suplementadas con leucina e histidina en el caso de SEY 2102, y con leucina y adenina en el caso de DBY746. Los transformantes seleccionados, se sembraron sobre placas que contenían sacarosa como fuente de carbono para comprobar la funcionalidad de los genes Lin9, GLin9 y Lin10. Sin embargo, dichos transformantes, no fueron capaces de crecer en presencia de sacarosa. Para determinar si las construcciones génicas eran aceptadas por la maquinaria transcripcional de *S. cerevisiae*, se aisló ARN de dos de las levaduras transformadas con cada uno de los tres genes y se ensayó la expresión de los transcritos de Lin9, GLin9 y Lin10 mediante RT-PCR, usando cebadores específicos de cada gen. En la figura 27 se puede ver como Lin9, GLin9, y Lin10 se expresaban intensamente en la levadura mutante transformada con el vector pFL61 que contenía dichos genes, mientras que no se detectaba señal en la levadura mutante transformada con el vector vacío.

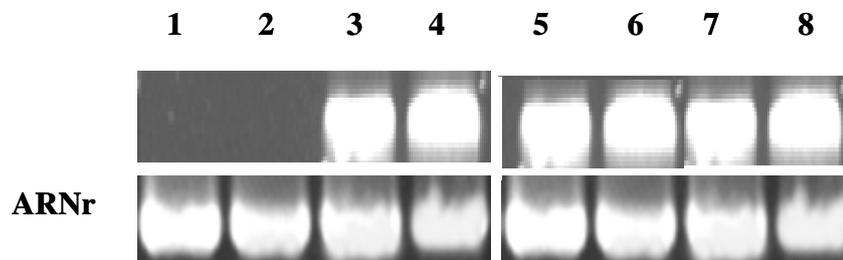


Figura 27. Análisis de la expresión de Lin9, GLin9, y Lin10 en *S. cerevisiae*. La expresión génica se analizó por RT-PCR. El ARN aislado de dos de los transformantes de levadura con pFL61 (calles 1 y 2), y sus derivados pLin10 (calles 3 y 4), pLin9 (calles 5 y 6), y pGLin9 (calles 7 y 8), fueron reverse transcritos y amplificados mediante PCR con cebadores específicos de cada uno de los genes: para Lin9, 2Lin9 y 3Lin9; para GLin9, 3Lin9 y 6Lin9; y para Lin10, 4Lin10 y 5Lin10. El ARN ribosómico 18S se usó como control de la expresión génica utilizando los cebadores NS31 y NS41.

El hecho de que los genes no sean funcionales en la levadura, puede deberse a distintos factores, pero el principal sería que la estructura nativa de las proteínas sea distinta en las células de levadura que en las de tomate, anulando así su funcionalidad en la levadura viva.

2.2.2. Determinación de la actividad invertasa en extractos proteicos de levadura.

Para comprobar si las proteínas codificadas por Lin9, GLin9 y Lin10 tenían actividad invertasa, se determinó actividad invertasa a partir de extractos proteicos obtenidos de las levaduras transformadas. Para ello, se extrajeron proteínas totales de cada una de las ocho colonias de levadura donde previamente se había analizado la expresión de los transcritos de cada uno de los genes, y también se obtuvieron proteínas de la cepa control DBY746 que sí tiene actividad invertasa. Para las determinaciones, se utilizaron 5 μg de proteínas totales que se incubaron con sacarosa en un pH ácido que es el óptimo para las invertasas vacuolares y asociadas a pared celular. Por último, se determinó glucosa liberada según se describe en material y métodos. Según mostraron las determinaciones, ni las proteínas codificadas por GLin9, ni por Lin10 fueron capaces de degradar sacarosa ya que no había liberación de glucosa tras la incubación, lo mismo que ocurría con las proteínas de las levaduras transformadas con el vector vacío. Sin embargo, los extractos proteicos de las levaduras transformadas con pLin9, si mostraron actividad invertasa mostrando valores de degradación de sacarosa que se aproximan a los de la cepa control DBY746 como se puede apreciar en la Figura 28.

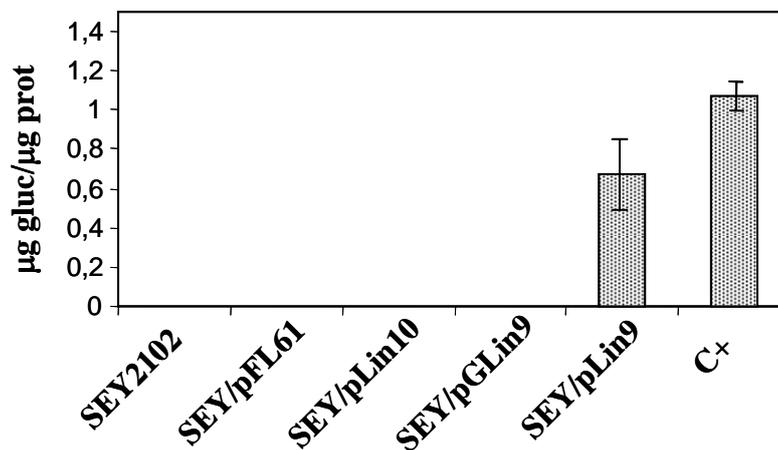


Figura 28. Determinación de la actividad invertasa en extractos proteicos de levadura. Barras de error, DS (desviación estándar).

El hecho de que la isoforma de Lin9 a la que le faltan 75pb no tenga actividad invertasa, y la isoforma inicial obtenida que tiene esos 75pb más si

muestra actividad invertasa, hace pensar en algún fenómeno de regulación mediante *splicing* alternativo para regular la funcionalidad del gen Lin9.

Como Lin10 no mostraba actividad invertasa, y debido a que muestra homología tanto con invertasas asociadas a pared celular, como con fructan-exohidrolasas, se llevó a cabo la determinación de la actividad fructoexohidrolasa en los extractos proteicos de levadura transformada con pLin10, ya que como ya se ha mencionado, en los últimos tiempos ha habido algunos descubrimientos de enzimas que se habían descrito como invertasas asociadas a pared celular y recientemente se ha demostrado que en realidad son fructo-exohidrolasas, y de esta manera, poder comprobar si Lin10 es uno de estos casos.

2.2.3. Determinación de la actividad fructo-exohidrolasa en extractos proteicos de levadura transformada con pLin10.

Para ésta determinación, se utilizaron los extractos de proteínas totales de la levadura mutante SEY2102 sola, transformada con el vector de expresión pFL61 vacío, y con la construcción pLin10 (pFL61-Lin10). Al igual que para la actividad invertasa, se utilizaron 5 µg de proteínas en cada medición, los cuales se incubaron en presencia de los dos principales tipos de fructanos: inulina y levanos, que difieren en los tipos de enlaces por los que se une las unidades de fructosa que los componen. En este caso, se midió fructosa liberada a varios tiempos de incubación. Como resultado se obtuvo, que en presencia de levanos, Lin10 no presentaba actividad fructoexohidrolasa, ya que no se detectó fructosa liberada en presencia de este sustrato, lo que era similar a lo que ocurría cuando las proteínas procedían de la cepa de levadura mutante sola, o transformada con el vector vacío. Sin embargo, cuando el sustrato presente en la reacción fue inulina, ni en el caso de la cepa mutante sola, ni cuando estaba transformada con el vector vacío se detectó fructosa liberada, pero cuando la cepa de levadura SEY2102 estaba transformada con pLin10 se detectó fructosa liberada en todos los tiempos ensayados, lo que se ilustra en la figura 29. La cantidad de fructosa liberada aumenta con el tiempo de incubación hasta los 45min donde alcanza un valor que se mantiene en tiempos mayores (datos no mostrados en la figura). En vista de estos resultados, se confirma que Lin10, aún a pesar de tener la mayor homología con invertasas asociadas a pared celular no tiene tal actividad enzimática, sino que en lugar de degradar sacarosa directamente, degrada fructanos (otro tipo de carbohidratos de reserva), y concretamente, fructanos tipo inulina (con enlaces β -(2-1)), necesitando posteriormente la actuación de una invertasa para degradar completamente el compuesto de reserva.

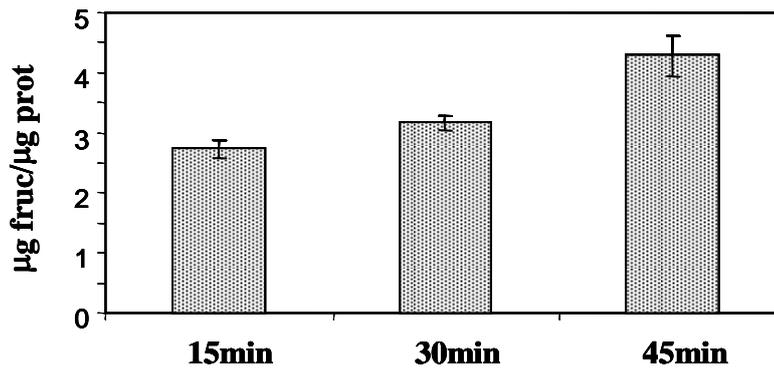


Figura 29. Actividad fructoexohidrolasa de Lin10. Fructosa liberada tras 15, 30 y 45 min de incubación de los extractos de proteínas totales de la levadura SEY2102 transformada con pLin10 con 3% (p/v) de inulina. Barras de error, DS (desviación estándar).

2.3 Regulación por el desarrollo de la simbiosis de la expresión de los genes aislados y de otras isoformas presentes en la base de datos.

Dado que se asume que la sacarosa sintetizada en la parte aérea de la planta debe de ser hidrolizada en la raíz antes de poder ser utilizada por el hongo micorrícico arbuscular como fuente de carbono, la simbiosis debe alterar el patrón de expresión de las enzimas implicadas en dicha degradación, siendo unas de ellas las invertasas. Por esta razón, se estudió la expresión de dichas enzimas, tanto la aislada y caracterizada (Lin9) durante esta Memoria de Tesis Doctoral, como otras isoformas presentes ya en la base de datos. Al mismo tiempo, se analizó la regulación por la simbiosis del gen Lin10, que aunque como se ha mostrado anteriormente, no posee actividad invertasa, presenta una actividad muy relacionada con ella, ya que con su actuación se liberan azúcares que podrían ser tomados por el hongo y sacarosa, que es el sustrato de las invertasas. Además y más importante, se ha hipotetizado con diversas funciones de las fructoexohidrolasas en las interacciones planta-microorganismo, por lo que se planteó elucidar si son importantes en la simbiosis planta-hongoMA.

La regulación de la expresión génica en todos los casos se analizó mediante PCR Cuantitativa a tiempo real en ARN aislado de plantas micorrizadas y no-micorrizadas. Con éste fin se realizó el experimento 1 descrito en material y métodos (apartado 1.3.1), en el cual teníamos plantas control regadas con distintas cantidades de fósforo, para comprobar si la regulación de los distintos genes, se debía realmente a la simbiosis de la planta con el hongo, ó era consecuencia solamente de la mejor nutrición fosforada que suelen tener las plantas micorrizadas respecto a los no micorrizadas. Las plantas controles a las que se le aportaba igual cantidad de fósforo que a las plantas micorrizadas (20 μ M), fueron incapaces de

crecer durante el desarrollo del experimento. En la figura 30 se muestran los datos de crecimiento de las distintas cosechas en peso fresco, así como la micorrización de las plantas en los distintos tiempos de cosecha.

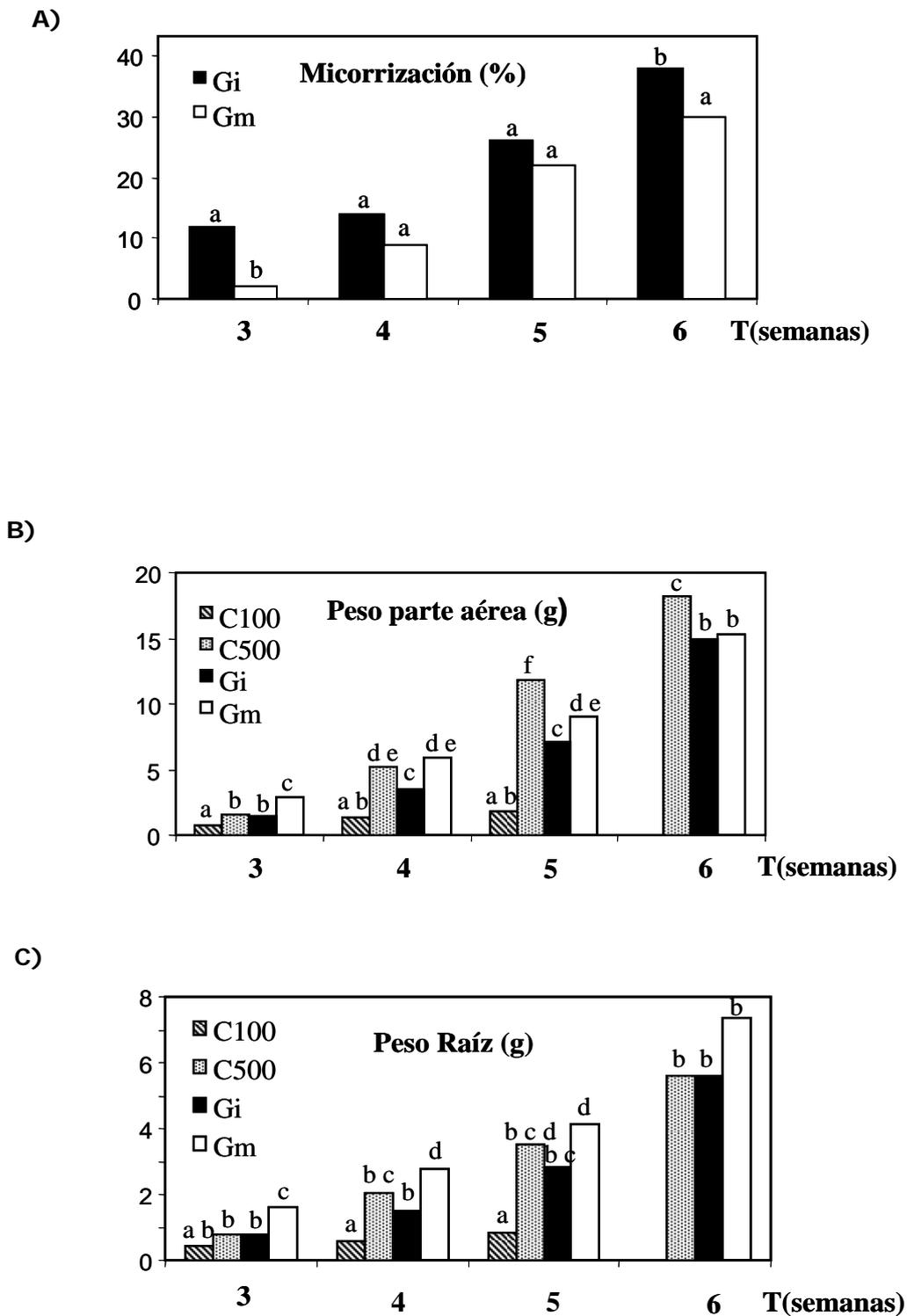


Figura 30. A) Datos del porcentaje de micorrización de las plantas. B) Pesos frescos de la parte aérea de las plantas expresado en gramos. C) Peso fresco de las raíces de

las plantas expresados en gramos. Las letras iguales dentro de cada tiempo, significa que los valores no difieren significativamente ($P \leq 0.05$) según el test de Fisher LSD. Gi corresponde a las plantas inoculadas con *Glomus intraradices* y Gm a las inoculadas con *Glomus mosseae*.

En nuestros estudios, nos interesaba comparar los cambios inducidos por el desarrollo de la simbiosis en el metabolismo carbonado de las raíces hospedadoras, más aún, si podíamos distinguir entre los cambios producidos en un estadio inicial de la colonización, con los inducidos cuando la simbiosis ya está bien establecida. En base a esto, se eligió el tiempo de 4 semanas como representativo de una fase inicial de la colonización donde había un 14% para *G. intraradices* (Gi) y un 9% para *G. mosseae* (Gm) de la longitud de la raíz micorrizada, y el tiempo de 6 semanas para el estudio en un estado de la simbiosis bien establecida donde se encontró una media de un 38% y un 30% de longitud de raíz micorrizada para plantas inoculadas con Gi y Gm respectivamente. Y como plantas controles se seleccionaron para los estudios de expresión, el tratamiento C500 μM de fósforo, ya que como se puede apreciar en las figuras anteriores, es el que tiene un estado fisiológico más parecido a las plantas micorrizadas, con lo que se minimizaban así factores de variación en la expresión génica. Las plantas controles a las que se le aportaron una cantidad de fósforo más parecida a la de las plantas micorrizadas (100 μM), tenían un desarrollo mucho menor que las inoculadas, por lo que la comparación entre estas dos plantas no era adecuada, ya que el distinto estado fisiológico también influye en la expresión génica.

Los genes de tomate analizados fueron: las invertasas vacuolares Lin9 (descrita en la presente Tesis Doctoral, N° acceso AM050394) y TIV1 (Lin4) (N° acceso AF4656131), las invertasas asociadas a pared celular Lin5 (N° acceso X91389), Lin6 (N° acceso AB004583), Lin7 (N° acceso X91391), la invertasa Lin8 (N° acceso X91392), y la fructoexohidrolasa Lin10 (descrita en la presente Tesis Doctoral).

2.3.1. Regulación de la expresión génica en raíces.

La expresión génica de las **invertasas vacuolares** Lin9 (ambas isoformas) y TIV1, una invertasa vacuolar de tomate previamente clonada (Klann *et al.* 1992), se ensayó mediante PCR Cuantitativa en Tiempo Real en ARN aislado de raíces micorrizadas y no-micorrizadas. Como se muestra en la Fig. 31A), la colonización por ambos hongos no afectó a los niveles de transcritos de Lin9 (isoforma funcional) en ninguno de los dos tiempos analizados, obteniéndose idénticos resultados cuando se utilizaron cebadores (3Lin10 y 7Lin10) que cuantificaban la expresión de ambas isoformas (funcional y no funcional), pero no se detectaron transcritos de GLin10 cuando se utilizaban cebadores específicos de la isoforma no

funcional (3Lin10 y 6Lin10). De esta manera, dado que la isoforma funcional de Lin9 es la única que se expresa en nuestro sistema experimental, todos los análisis posteriores se hicieron ya solo sobre dicha isoforma. Sin embargo, si se observó una inducción de TIV1 en las raíces colonizadas tanto por *G. mosseae* (Gm) como por *G. intraradices* (Gi) que mostraban alrededor de un 30% de colonización micorrícica. El incremento de los niveles de expresión génica de TIV1 fue mayor en las raíces colonizadas por *G. mosseae* (una inducción de 4.4 veces), que en las colonizadas por *G. intraradices* (una inducción de 2.2 veces) (Figura 31B).

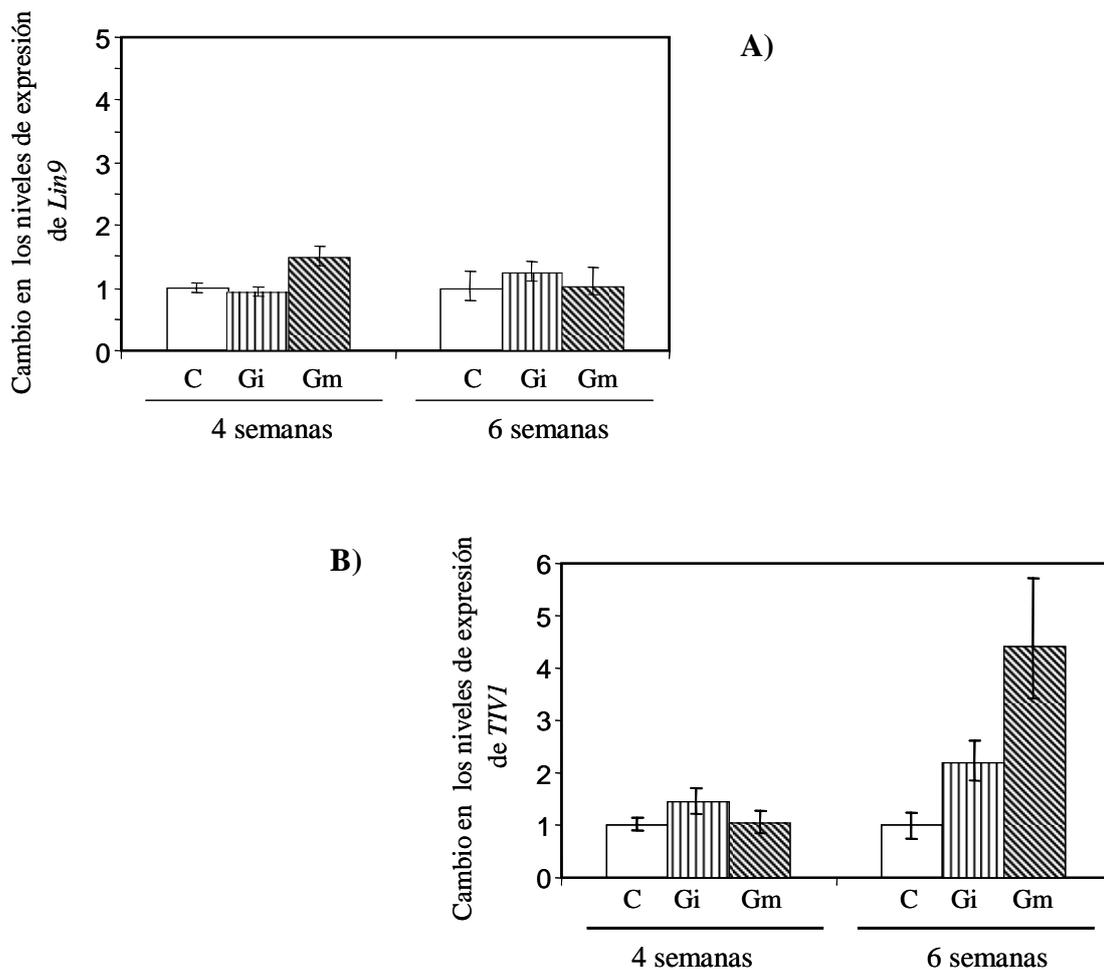


Figura 31. Efecto de la colonización por micorrizas sobre la expresión génica de *Lin9* (A) y *TIV1* (B) en raíces de tomate. El ARN se extrajo de raíces de plantas de tomate control (C), inoculadas con *G. intraradices* (Gi), e inoculadas con *G. mosseae* (Gm). Los ARNs fueron reverso transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para *Lin9* (2Lin9 y 3Lin9 ó 3Lin10 y 7Lin10) y *TIV1* (TIV1F y TIV1R) y los del ARNr 18S (R1 y R2). El cambio inducido en la expresión génica de ambos genes por la colonización micorrícica se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

Respecto a las **invertasas asociadas a pared** celular estudiadas, solo Lin6, que es la única invertasa asociada a pared celular que se expresa en raíces de tomate (Godt & Roitsch 1997), fue detectada en las raíces de nuestro sistema experimental. Los niveles de ARNm de Lin6 fueron más elevados en las plantas micorrizadas que en las plantas control (Fig. 32). La expresión de Lin6 fue la misma en las raíces colonizadas por Gm y por Gi y no se afectó por el nivel de colonización micorrízica de la raíz.

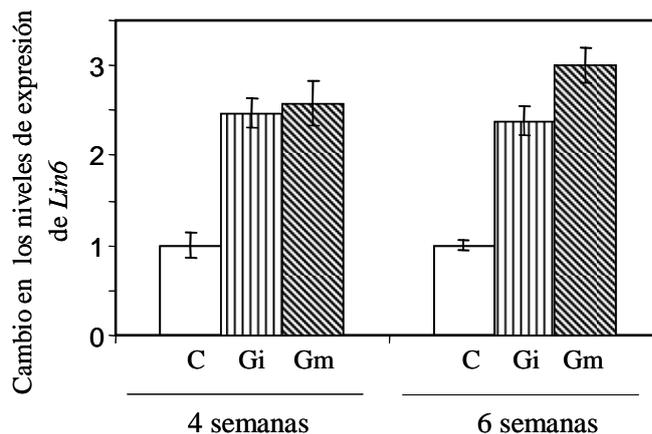


Figura 32. Efecto de la colonización por micorrizas sobre la expresión génica de *Lin6* en raíces de tomate. El ARN se extrajo de raíces de plantas de tomate control (C), inoculadas con *G. intraradices* (Gi), e inoculadas con *G. mosseae* (Gm) recogidas cuatro y seis semanas después de la inoculación. Los ARNs fueron reverso transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para *Lin6* (Lin6F y Lin6R) y los del ARNr 18S (R1 y R2). El cambio inducido en la expresión génica de este gen por la colonización micorrízica se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

El estudio de la regulación por el desarrollo de la simbiosis de la **fructo-exohidrolasa Lin10**, mostró que los niveles de expresión de Lin10 eran mucho más elevados en plantas micorrizadas que en plantas control a los dos tiempos analizados (Fig. 33). A las cuatro semanas después de la inoculación, el incremento de los niveles de expresión génica de Lin10 eran similares en las raíces colonizadas por Gm y Gi (una inducción de alrededor de 4 veces), sin embargo, dos semanas más tarde, los niveles de ARNm de Lin10 eran mucho más elevados en las plantas micorrizadas con Gi (una inducción de 30.9 veces) que en las micorrizadas con Gm donde los niveles se mantienen prácticamente igual que dos semanas antes (una inducción de 4.3 veces).

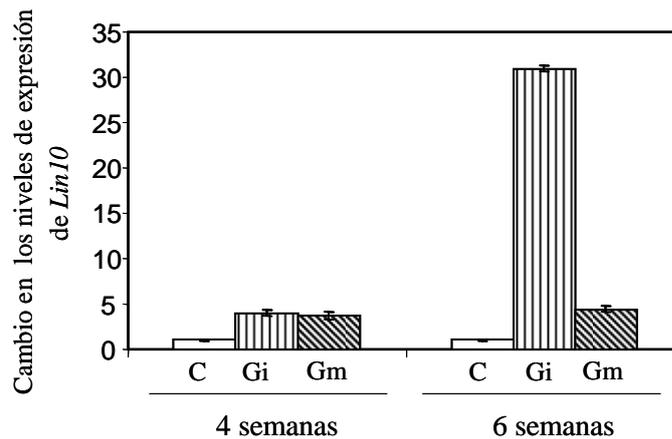
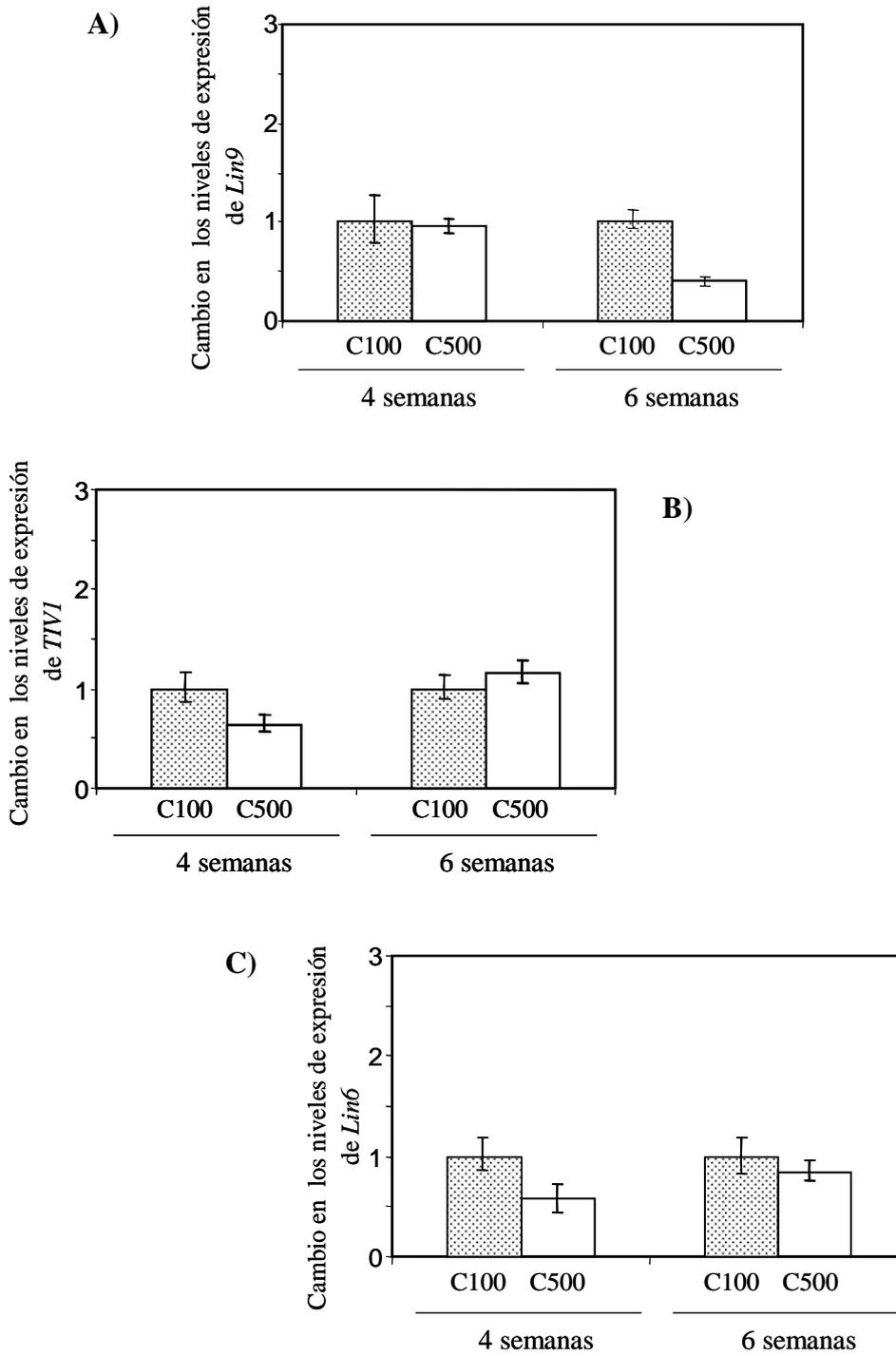


Figura 33. Efecto de la colonización por micorrizas sobre la expresión génica de *Lin10* en raíces de tomate. El ARN se extrajo de raíces de plantas de tomate control (C), inoculadas con *G. intraradices* (Gi), e inoculadas con *G. mosseae* (Gm) recogidas cuatro y seis semanas después de la inoculación. Los ARNs fueron reverse transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para *Lin10* (4Lin10 y 5Lin10) y los del ARNr 18S (R1 y R2). El cambio inducido en la expresión génica de este gen por la colonización micorrízica se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

2.3.2. Regulación de la expresión génica por el fósforo suministrado.

Para determinar si la regulación de los genes estudiados era debido a un efecto directo de la colonización de las raíces por los hongos MA, o a un efecto secundario por el aumento de la nutrición fosforada, se determinaron los niveles de expresión de los genes en raíces de plantas no micorrizadas con 4 y 6 semanas que habían crecido en presencia de 100 y 500 μM de fósforo. Como muestra la figura 34, TIV1 y Lin6 no manifestaron cambios significantes en respuesta al fosfato. Esto indica, que las alteraciones que ocurren en los niveles de transcritos de ARN de las raíces micorrizadas en estos experimentos, se deben directamente al hongo y no a un efecto indirecto por un aumento del fosfato disponible. Sin embargo, la expresión de Lin9, un gen que no estaba regulado por el desarrollo de la simbiosis, disminuyó en las raíces de plantas con 6 semanas cuando la nutrición fosforada era mayor. Respecto a Lin10, sus niveles de ARNm disminuyen significativamente tanto en raíces de 4 como de 6 semanas, cuando hay una mejor nutrición fosforada, lo que significa que la fuerte inducción de la expresión génica en presencia de hongos MA se debe al establecimiento de la simbiosis, ya que por el efecto de la mejor nutrición fosforada debería ocurrir todo lo contrario (inhibición de la expresión).



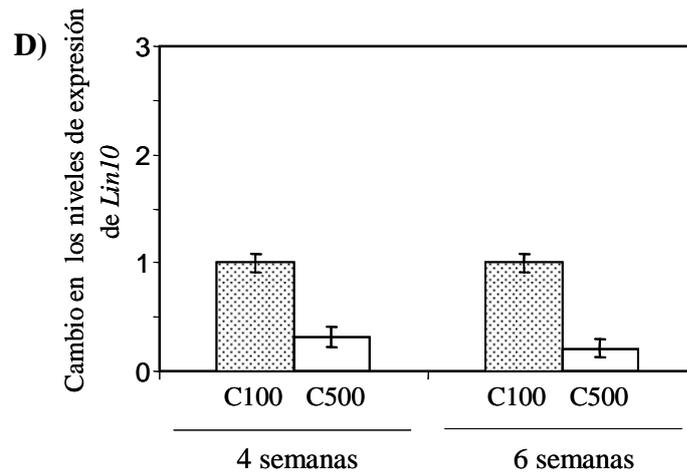


Figura 34. Efecto de la fertilización con fosfato sobre la expresión génica de Lin9 (A), TIV1 (B), Lin6 (C) y Lin10 (D) en raíces de tomate. El ARN se extrajo de raíces de plantas control regadas con solución nutritiva de Hoagland a la mitad de fuerza que contenía 100 ó 500 μM de P. Los ARNs fueron reverso transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para cada uno de los genes y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica por la fertilización con P en cada uno de los tiempos de cosecha, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

2.3.3. Regulación de la expresión génica en raíces por el patógeno de raíz *Phytophthora parasitica* (Phy).

Para determinar si el efecto observado en algunas invertasas de tomate (Lin9, TIV1 y Lin6) y en la FEH Lin10, era una respuesta específica de la simbiosis MA, la expresión de estos genes se analizó también en plantas inoculadas con el patógeno de raíz *P. parasitica* (experimento 2 descrito en el punto 1.3.2. de material y métodos). Las plantas tenían cuatro semanas cuando fueron inoculadas con el patógeno ó no inoculadas (control), y se cosecharon dos semanas después (6 semanas en total). Las raíces de las plantas inoculadas con *P. parasitica*, mostraban claramente áreas necróticas (un promedio de nivel 2, que es un nivel medio de síntomas). Como se muestra en la figuras 35 y 36, los niveles de Lin9, Lin6 y Lin10 se inducen en las raíces de las plantas infectadas con *P. parasitica*, mientras que los niveles de expresión de TIV1 no se afectan.

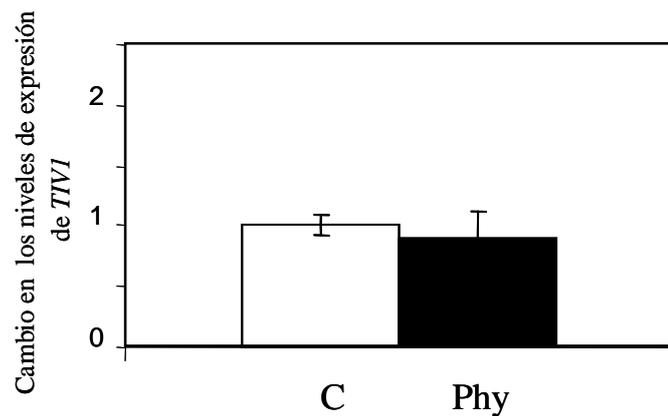
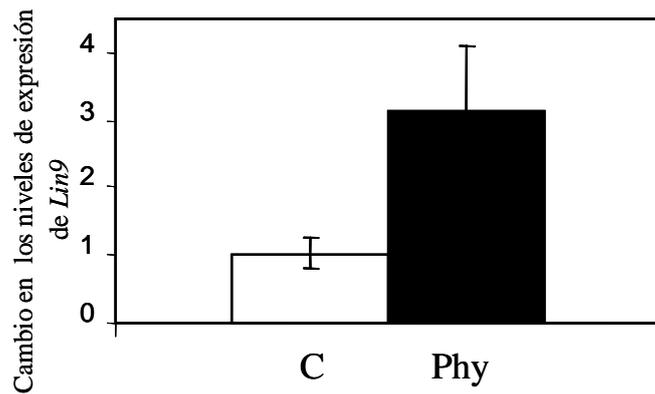
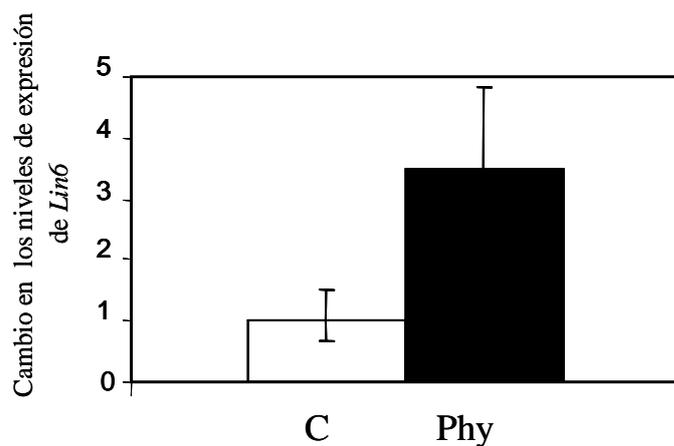


Figura 35. Efecto de *P. parasitica* sobre la expresión génica de las invertasas vacuolares Lin9 y TIV1. El ARN se extrajo de raíces de plantas de tomate control (C), y plantas inoculadas con *P. parasitica* (Phy). Los ARNs fueron reverse transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para cada gen y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica de ambos genes en la raíces por *P. parasitica*, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).



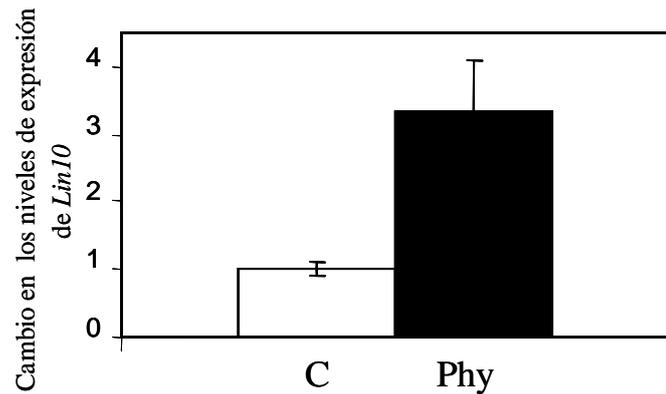


Figura 36. Efecto de *P. parasitica* sobre la expresión génica de la invertasa asociada a pared celular Lin6 y la fructo-exohidrolasa Lin10. El ARN se extrajo de raíces de plantas de tomate control (C), y plantas inoculadas con *P. parasitica* (Phy). Los ARNs fueron reverso transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para cada gen y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica de ambos genes en las raíces por *P. parasitica*, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

2.4 Búsqueda y análisis de los promotores de los genes que se regulan por la simbiosis.

Para comprender mejor las causas de la activación transcripcional en las plantas micorrizadas de Lin6, TIV1 y Lin10, se decidió analizar la secuencia de sus promotores en busca de elementos reguladores similares a elementos ya conocidos mediante el alineamiento de secuencias. Con este propósito, se recuperaron las secuencias de los promotores de Lin6 (Nº acceso AF506004) y TIV1 (Nº acceso Z12027) de la base de datos Genbank, y se aisló el posible promotor de Lin10 mediante amplificación por PCR a partir de una genoteca de ADN genómico de tomate utilizando el cebador 2Lin10. Mediante paseo cromosómico se lograron aislar 3594 pb aguas arriba del codón de inicio de la transcripción de Lin10. La comparación de esa secuencia genómica obtenida como posible promotor de Lin10 con la base de datos, reveló que la zona perteneciente a la secuencia promotora de Lin10 era de 989 pb. El análisis informático de esta secuencia nos ha permitido identificar entre otros, varios dominios de respuesta a micorrizas arbusculares (Karandashov *et al.* 2004), el dominio GAAAAA implicado en la respuesta frente a patógenos (Park *et al.* 2004), y secuencias comunes con el promotor de FEH IIa (Michiels *et al.* 2004) (Fig. 37).

```

+ TGATCTGCTTG ACCTTTTGA GAGGAGTGTC GCTTGCTTAA TTTTTCAT TATCTGGTTT TAGCCCTTTT
- ACTAGACGAAC TGGAAAAACT CTCCTCACAG CGAACGAATT AAAAAACGTA ATAGACCAAA ATCGGGAAAA

+ ATCTTGAAC ATTCAGCTGT TTACAATTTT GAACAAC TAG TTTTGTATTT GAAGTATCCA TGTCTTCT
- TAGAACTTTG TAAGTCGACA AATGTTAAA CTTGTTGATG AAAACATAAA CTTTCATAGGT ACAAGAACGA

+ GAACGAGTCT CTGAACTTA AAACAATAGT TTCTAGTAAA ATTTTGTGTT GAAAGTATAC ATTTCTTCTG
- CTTGCTCAGA GAACTTGAAT TTTGTTATCA AAGATCATT TAAAACACAA CTTTCATATG TAAAGGAACG

+ AGTGATCGAG TTTCTTGAAT CTCAAACAAA TAAAATCTA GTAGATTGTG TTGAAGTATC CCTTTTCATG
- TCACTAGCTC AAAGAACTTA GAGTTTGTG ATTTTAAGAT CATCTAACAC AACTTCATAG GAAAAAGTAC

+ CAGAGATGGG GTTGCGTTCG AACTCAAGCA ATAGATGTTG GATGTTACAT GAAACTTGGG ACCAAGGTTT
- GTCTCTACCC CAACGCAAGC TTGAGTTCGT TATCTACAAC CTACAATGTA CTTTGAACCT TGTTTCCAAG

+ AATACATFGA TATGAGGTGT CCGGTAACGT AACAAATTTA AAAAGTATCCAA TAACTATGT TAAAGTGAAC
- TTATGTAAT ATACTCCACA GGCCATTGCA TTGTTTAAAT TTTTCATAGGTT ATTGATACA ATTTCACTTG

+ AAAACCATCC TAAGTTTAAAT AATTTTCACC CCTCTTAATA ATTTGCTACA TATACTTGTG AAATAAATGA
- TTTTGGTAGG ATTCAAATTA TTAAGAGTGG GGAGAATTAT TAAACGATGT ATATGAACAA TTTATTTACT

+ AGAATCAAAA TGTGTTATGA AATTAACATT TTTATCTCAT ATAATATGTG AACAAATTTT ATTTTAAAG
- TCTTAGTTTT ACACAATACT TTAATTGTAA AAATAGAGTA TATTATACAC TTGTTTAAA TAAAAATTTT

+ AATAGTTAGG GATGTGAATG ACTTCTACTC GTTGAATATA TACAAACAAG TTGGAGTATA ATATTTTGCC
- TTATCAATCC CTACACTTAC TGAAGATGAG CAACTTATAT ATGTTTGTTC AACCTCATAT TATAAACCG

+ CCGTGAATAT AATATTTTGA CTGTGACACG ATAAATGGAA GTCTGAATAT ATTATTATGA CCGGTGAATA
- GGCACTTATA TTATAAACT GAACATGTGC TATTTACCTT CAGACTTATA TAATAATACT GGCCACTTAT

+ TAATATTTTA ACTTGTACAC GATAAATGAA AGTCTGAATA TATTATTATG ACCACTGAAT ATAATAGATA
- ATTATAAAAT TGAACATGTG CTATTTACTT TCAGACTTAT ATAATAATAC TGGTGACTTA TATTATCTAT

+ AAGGGAAGAC TTAGCCGCTT TGGTTTGGTT TGGATCATAT TCTATGGAAT TAATTAGAAT GTATTATTTT
- TTCCCTTCTG AATCGGCAGA ACCAAACCAA ACCTAGTATA AGATACCTTA ATTAATCTTA CATAATAAAA

+ GGATTAATTG GAATATATTA TGACTTACTT GTAATAAAA TATTTTGACC TGTACAAGAG AGAGTATGAT
- CCTAATTAAC CTATATAAAT ACTGAATGAA CATTTATTTT ATAAAACGTT ACATGTTCTC TCTCATACTA

+ GGAAATTA TATATACACC TCTTCAGTTG TAGCAATAT ATCATATACA AAAGAAAAAG AAAGTAAAC
- CCCTTAAT ATATATGTGG AGAAGTCAAC ATACGTTATA TAGTATATGT TTTCTTTTTC TTTTCAATTTG

+ TCTCCTCATG
- AGAGGAGTAC

```

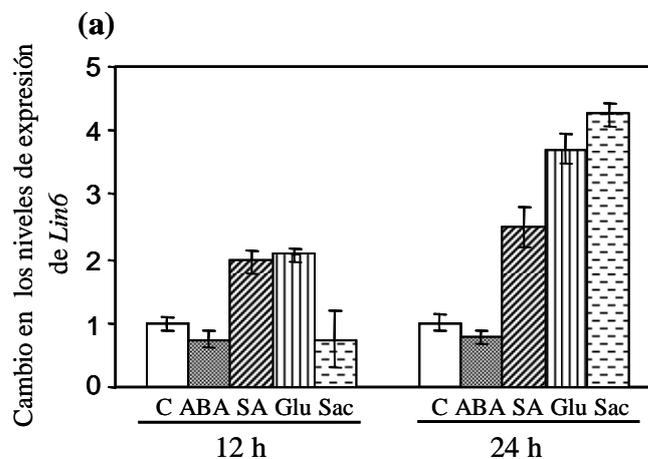
Figura 37. Secuencia nucleotídica del promotor de Lin10. El codón de inicio de la transcripción está marcado rojo, mientras que la zona 5' que es transcrita pero no traducida está en amarillo. En turquesa están los dominios de respuesta a MA, y en verde la secuencia común con el promotor de FEH IIa.

El análisis informático de las secuencias promotoras de los genes Lin6, TIV1 y Lin10, mostró que contenían varios elementos idénticos al elemento específico de raíz ATATT (Elmayan & Tepfer 1995), los motivos de la secuencia consenso de los elementos órgano-específico OSE1 (AAAGAT) y OSE2 (CTCTT) en Lin6 y TIV1, característicos de los promotores que se activan en las células infectadas de los nódulos de raíz (Stougaard *et al.* 1987), y varios motivos con similitud a elementos de respuesta a hormonas. El motivo Wbox (TTGAC) encontrado en los promotores de genes que responden a ácido salicílico (Yu *et al.* 2001), se identificó en las regiones promotoras de los tres genes. Los elementos de respuesta a ácido abscísico (ABA) también se encontraron en las secuencias promotoras de Lin6 y Lin10. Mientras que el elemento de respuesta a ABA MYCR (CACATG) se encontró

en ambos promotores (Abe *et al.* 2003), el motivo ABRE (ACGTG) sólo se identificó en el de Lin10 (Hattori *et al.* 1995). Los promotores de Lin6 y Lin10 también contenían el elemento de respuesta a sacarosa SURE1 (AATAGAAAA), reconocido como un motivo conservado en un número de genes que responden a sacarosa (Grierson *et al.* 1994).

2.4.1. Regulación de los genes de invertasas y fructo-exohidrolasa de tomate por azúcares y hormonas.

Para validar el análisis *in silico* de los promotores de Lin6, TIV1 y Lin10, se analizó la expresión de estos genes y también la de Lin9, en raíces de plántulas de tomate expuestas durante 12 y 24 horas a glucosa, sacarosa, ABA ó ácido salicílico (SA), sustancias que están involucradas en las rutas de transducción de señales en plantas y en la formación de micorrizas. La aplicación de 100 μ M de ABA tuvo como resultado un aumento en los niveles de ARNm para la invertasa vacuolar TIV1. En contraste, los niveles de ARNm de Lin6 no se afectaron, y los de Lin10 y Lin9 disminuyeron sobre todo tras 24h de la aplicación de la hormona (Figura 38). La aplicación externa de ácido salicílico, aumentó los niveles de expresión de Lin6, TIV1, y sobre todo de Lin10 donde hay un aumento de casi 50 veces a las 24h. Los niveles de expresión de Lin9 sin embargo, se vieron disminuidos en presencia de ácido salicílico a las 12h para no verse afectados al siguiente tiempo de estudio (24 h). La aplicación de glucosa aumentó los niveles de expresión de todos los genes excepto de Lin9. El aporte de sacarosa aumento los niveles de expresión de Lin6 y Lin10, para no afectar a los de TIV1, y disminuir los niveles de ARNm de Lin9. Todos estos datos vienen a confirmar el análisis informático de las regiones promotoras de los genes.



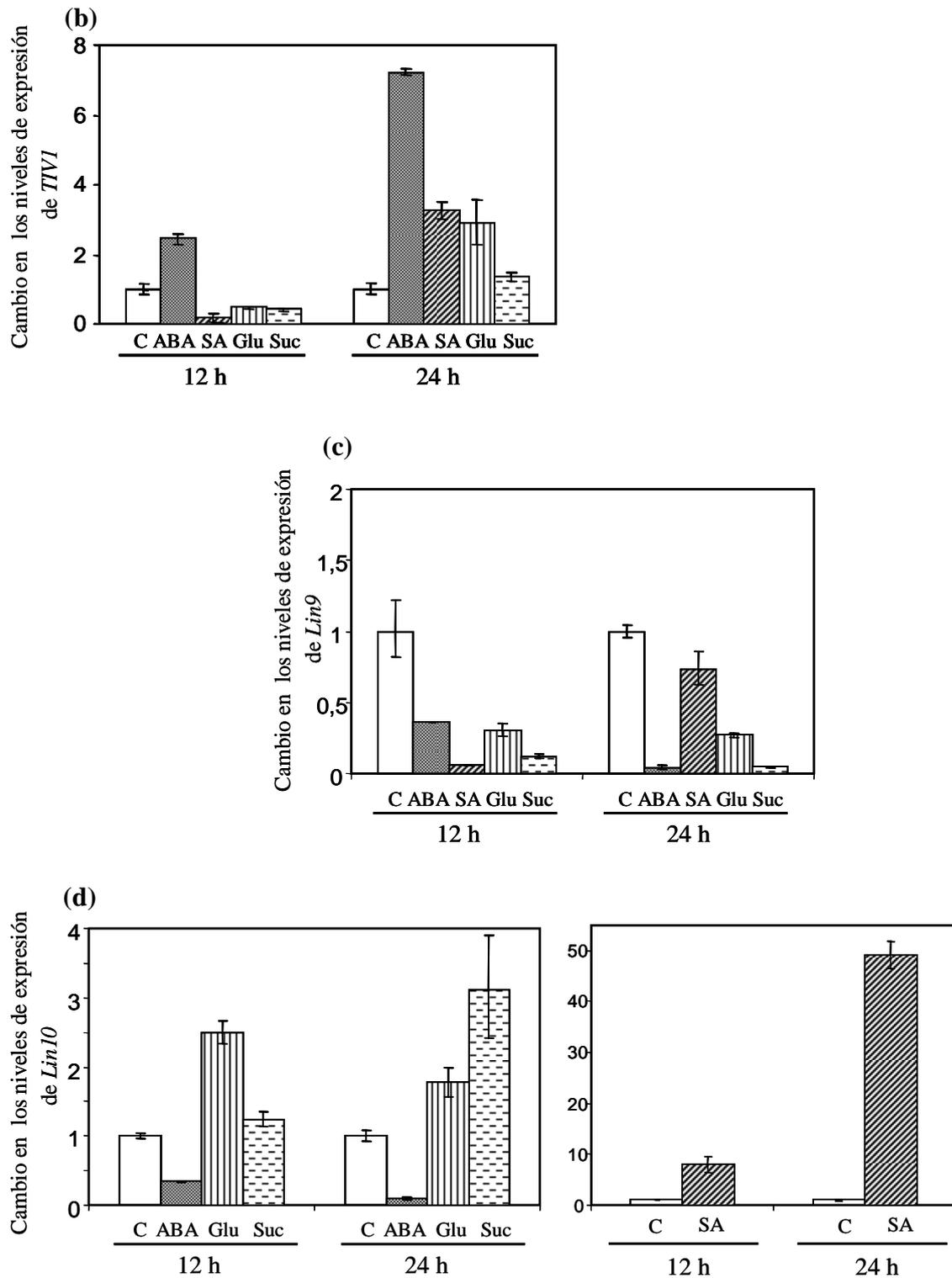


Figura 38. Efecto de glucosa, sacarosa, ácido salicílico (SA) y ácido abscísico (ABA) sobre la expresión génica de Lin6 (a), TIV1 (b), Lin9 (c) y Lin10 (d). El ARN se extrajo de raíces de plántulas de tomate expuestas durante 12 y 24 h a agua (control), 100 μ M de ácido abscísico, 100 μ M de ácido salicílico, 40 mM de glucosa ó 20 mM de sacarosa. Los ARNs fueron reverso transcritos y los niveles de expresión analizados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para cada gen y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los

datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

2.5 Análisis de la regulación de la expresión de genes que codifican la sacarosa sintasa de tomate durante la simbiosis micorrícica.

La sacarosa sintasa (EC 2.4.1.13) es la otra enzima que puede hidrolizar la sacarosa en hexosas, de lo que depende se utilización como fuente de energía en los tejidos sumidero como las raíces. La acumulación de transcritos de sacarosa sintasa en células colonizadas por arbusculos y en las que las rodean, ha permitido hipotetizar que estas enzimas suministran metabolitos y generan fuerza sumidero durante la fase activa de la simbiosis micorrícica (Blee & Anderson 2002, Hohnjec *et al.* 2003). Debido a este papel activo de la sacarosa sintasa en la simbiosis, se decidió analizar la regulación transcripcional del gen de sacarosa sintasa TOMSSF (Nº acceso L19762) presente en la base de datos, en las raíces de las plantas donde anteriormente se ha estudiado la regulación de invertasas y de la fructoexohidrolasa Lin10.

2.5.1. Regulación de la expresión génica en raíces.

La abundancia relativa de los transcritos del gen de la sacarosa sintasa de tomate TOMSSF (Wang *et al.* 1993), se analizó en raíces de plantas micorrizadas y no micorrizadas. Con respecto a las raíces no micorrizadas, los niveles de transcripción de TOMSSF fueron ligera pero consistentemente inducidos en raíces colonizadas por ambos hongos *G. mosseae* y *G. intraradices* en el primer tiempo (4 semanas después de la inoculación). Dos semanas más tarde, se detectó una inducción de TOMSSF de 5.7 veces en las raíces colonizadas por *G. intraradices*, y una inducción de 4.5 veces en las colonizadas por *G. mosseae* (Fig. 39).

2.5.2. Regulación de la expresión génica de TOMSSF por el fósforo suministrado.

Como se muestra en la Figura 39, los niveles de ARNm de TOMSSF no sufrieron cambios significantes en respuesta al fosfato, lo que indica, que el incremento observado de los niveles de ARNm de TOMSSF en las raíces de las plantas micorrizadas, no se debe a la mejora de la nutrición fosforada.

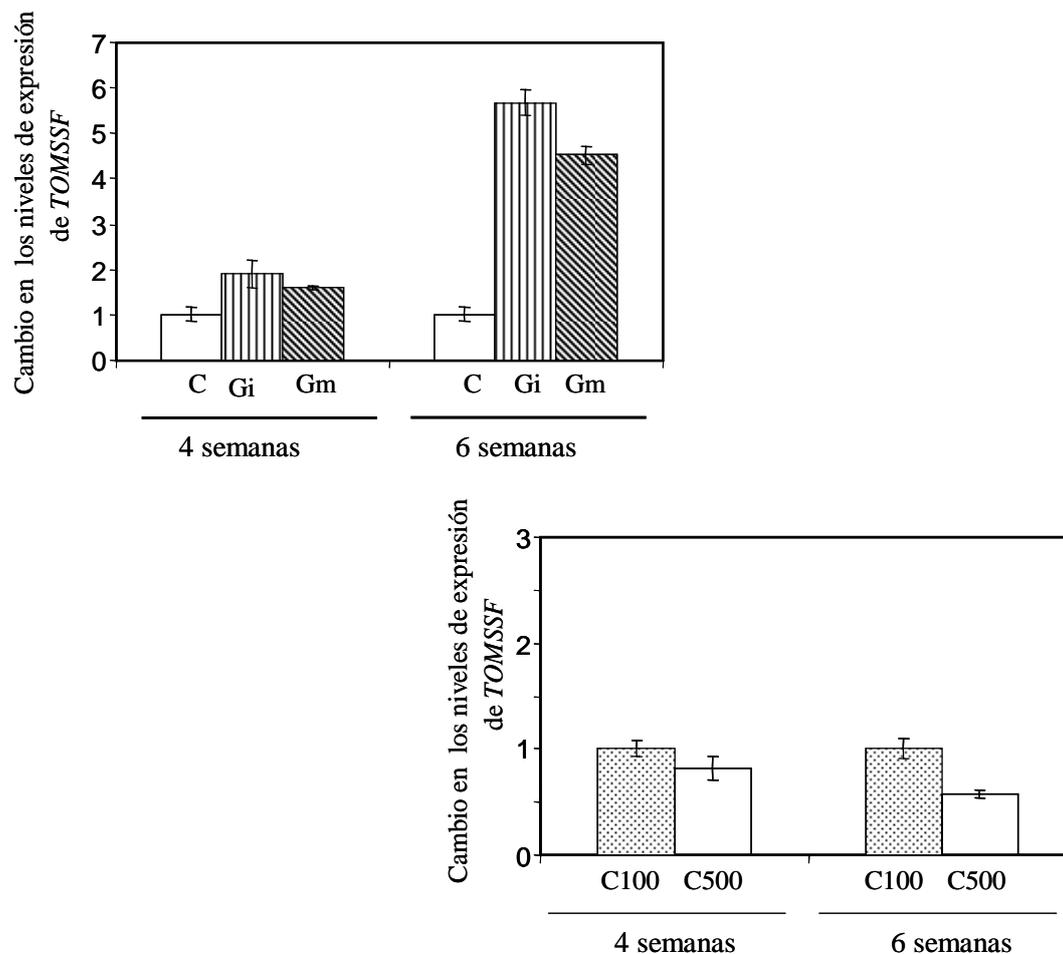


Figura 39. Efecto de la colonización micorrícica y de la fertilización con P sobre la expresión génica de la sacarosa sintasa (TOMSSF) en raíces de tomate. Los ARNs se extrajeron de raíces de plantas de tomate no micorrizadas nutridas con 100 (C100) ó 500 μ M de P (C y C500), plantas micorrizadas con *G. intraradices* (Gi) ó *G. mosseae* (Gm), cosechadas cuatro y seis semanas después de la inoculación con el hongo MA. Los ARNs fueron reverso transcritos y los niveles de expresión se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para TOMSSF (FTOMSSF y RTOMSSF) y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica de TOMSSF a cada uno de los tiempos de cosecha por la colonización micorrícica por, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ usando las plantas regadas con 500 μ M de P como referencia. Los datos representados son promedio de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

2.5.3. Regulación de la expresión génica en raíces por el patógeno de raíz *Phytophthora parasitica* (Phy).

Los niveles de expresión de TOMSSF no se vieron afectados en las raíces de las plantas inoculadas con *P. parasitica* (Fig. 40), lo que demuestra que la inducción de este gen es específica de la simbiosis MA, al no verse afectada sus niveles de ARNm en la interacción con otro microorganismo.

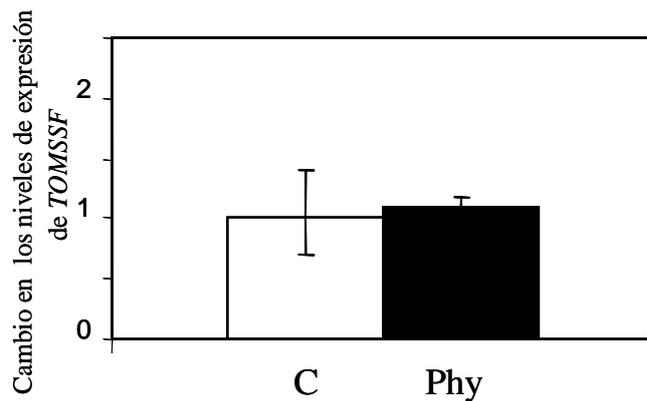


Figura 40. Efecto de *P. parasitica* sobre la expresión génica de la sacarosa sintasa TOMSSF. El ARN se extrajo de raíces de plantas de tomate control (C), y plantas inoculadas con *P. parasitica* (Phy). Los ARNs fueron reverse transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando los cebadores gen-específico FTOMSSF y RTOMSSF y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica en las raíces por *P. parasitica*, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

2.5.4. Búsqueda y análisis del promotor de TOMSSF.

Para aislar la secuencia 5' no codificante de TOMSSF, al igual que se hizo en el caso de Lin10, se recurrió a una librería de ADN genómico de tomate utilizando el cebador PTOMSSF para una amplificación por PCR de dicha librería. De este modo se obtuvo una secuencia genómica de 3395 pb para el posible promotor de TOMSSF (AM408346) (Fig. 41), aguas arriba del codón de inicio de la transcripción ATG. La comparación de dicha secuencia genómica con el ADNc de TOMSSF, reveló la presencia de un líder intrón de 1573 pb en la región 5' no traducida, lo que es una característica típica de los genes de las sacarosas sintasas (Fu *et al.* 1995).

```

+ CTGCCAATTG TAATAGGGAT CAGAGTGAAG CTTTTCTTTT TTTTTTTTTA ACTTTGAATA TTCATATGA
- GACGGTTAAC ATTATCCCTA GTCTCACTTC GAAAAGAAAA AAAAAAAAAA TGAAACTTAT AAGTATACT

+ AAAATCCGAT TAAATATGAA TTTATAGAAA AAGTTAACT AAATTTTTTTT GATAAAAA TAGAAAAATAT
- TTTTAGGCTA ATTTATACTT AAATATCTTT TTCAAATTGA TTTAAAAAAA CTATTTTT ATCTTTTATA

+ TTATATTAGT TATTTTTTTA TACTAATTTA TGTGAGGGAG GTTTATGGA AAAATTATAT AAACAAATAC
- AATATAATCA ATAAAAAAAT ATGATTAAAT ACACTCCCTC CAAATACCT TTTTAAATATA TTTGTTTATG

+ ATTTAAAAAT AATTACTGAT TTTAGCGATA TTTTTTGT TATTACCACT TATAGTAATA TTATGATAAA
- TAAATTTTTA TTAATGACTA AAATCGCTAT AAAAAACAA ATAATGGTGA ATATCATTAT AATACTATTT

+ TCTGTAATAT ATATTAAAA GAAATTATG TATGCAATAT ATTTGAATTA TAATGTTTTT TGAAATATAT
- AGACATTATA TATAATTTTC ACTTAATAC ATACGTTATA TAACTTAAT ATTAACAAAA ACTTTATATA

+ AATGTTTGT TGGTAAAAA ATTGTCTTGT ATTATAAGTG TATTAATG TGTGATAAAT GTATTATCAA
- TTACAAACAA ACCATTTTT TAACAGAACA TAATATTCAC ATAATTTTAC ACACTATTTA CATAATAGTT

+ TCATTA AAA CTGTATTAT ATTTGAATAA TAAATTTATC TTTGTAATAT ATATTAAAT TGTATTATA
- AGTAAT TTT GAACATAATA TAAACTTATT ATTTAAATAG AAACATTATA TATAATTTAA ACATAATAT

+ AATGAATTAA AAATGGTCAA GTGAAAAAAA ATGTTATTGC TATAAATGAT AAATATTTT TTTATTATAG
- TTACTTAATT TTTACCAGTT CACTTTTTTT TACAATAACG ATATTTACTA TTTATAAAG AAATAATATC

+ TATATTTATG TAAATTTTCC AAAAAATAAA GTCTCAATTT TGAGCAAGA AATACTAAAT TTCTTTATTT
- ATATAAATAC ATTTAAAAGG TTTTTATTTT CAGAGTTAAA ACTCGTTCT TTATGATTTA AAGAAATAAA

+ TTATCCCTTT TTTTTATTAT GATCATAATG TTCGGATTAA TTTACATAT TTCAATTAAT ATAAATAATA
- AATAGGGAAA AAAAATAATA CTAGTATTAC AAGCCTAATT AAATGTATA AAGTTAATTT TATTTATTAT

+ ATGAATAAAC CTATACAATG GAGTATTTAT AATTTATTG ATCAAATTT TAAAATTCAC TTATTTTAAA
- TACTTATTTG GATATGTTAC CTCATAAATA TTAAATAAC TAGTTTTAAA ATTTTAAAGT AATAAAATTT

+ AATGCTTTTT AGAAGTTTCT AAAAAATTAG CGATTTGATG TTTGATTAAT TTATCACTGA CACAACAAC
- TTACGAAAAA TCTTCAAAGA TTTTAAATC GCTAACTAC AAACATAATA AATAGTGACT GTGTTGTTGA

+ TAATCTTTAA ATTATTTTT TAAAAATAA TACTTATGAC TTTAAAAAG CTTGATTTAA CCACCTAATT
- ATTAGAAATT TAATAAAAA ATTTTTATAT ATGAATACTG AAATTTTTTC GAACTAAAT GGTGATTA

+ ATATAATCA AAATCTTAC CATGTATCA AATAATGTTT GTATAATTGA AAAAAAATG ACCAGTCAT
- TATATTAGT TTTAAGAATG GTAACATAGT TTATTACAAA CATATTAAT TTTTTTAAAC TGGTCAGTA

+ TGA CTGTAC ACACTTTAAC TTATCCAAAT TAATAGTTAG ATATTTCAAT TTTGTAATA TACAAATATA
- ACTGACAATG TGTGAAATTG AATAGGTTTA ATTATCAATC TATAAAGTTA AAACATTTT ATGTTTATAT

+ AATATTTCAA TTGTTTTTTA CTATCTTTAA ATAATTTGAT TTATAAAG AAAAAAATAA TAAATATATT
- TTATAAAGTT AAACAAAAAT GATAGAAAT TATTAACATA AATATTTTC TTTTTTTATT ATTTATATAA

+ TCGAATTATC GTAAATGATT TGTAGATATA TACTTTTGA CAATGGATCA CGTTGTCCAA AAATTAGAGT
- AGCTTAATAG CATTTACTAA ACATCTATAT ATGAAAACT GTTACCTAGT GCAACAGGTT TTTAATCTCA

+ ATATATATCG TTCACTTTA CTGAAGGAT AAGTAGAAAA ATCTTATTCG TTGATCCGAT ATTTAATAAA
- TATATATAGC AAGTGAGAAAT GACTTCCTA TTCATCTTTT TAGAATAAGC AACTAGGCTA TAAATATTTT

+ TGTGCGCTAG GCGAATAAGA CTATATCAT GTGTTTATCT GTTAGTATAT AGGTAGTTTT TGAACGGTAG
- ACAGCGGATC CGCTTATTCT GATATAGTA CACAAATAGA CAATCATATA TCCATCAAAA ACTTGCCATC

+ AGACACCAAT GTCCAAGAA TGATAGGGGT ATCTACATAT CATTTATGAT ATTCAAAGAT ATATTATCCT
- TCTGTGGTTA CAGGTCTT ACTATCCCA TAGATGTATA GTAATACTA TAAGTTTCTA TATAATAGGA

+ TTTTTTCTT AAAATAATAA TTATTTAGAC ATTTTCAAAA ATTTACGTGT AACAATAAGA ATGATTTAA
- AAAAAAGAA TTTTATTATT AATAAATCTG TAAAAGTTTT TAAATGCACA TTGTATTCT TACTAAAT

+ TATGTTTACA TATGTATTTT AAAAAATTGAC TTCGTCCAAT TGTCAACTGA GATC AAGTT AATAGGTTCA
- ATACAAATGT ATACATAAAA TTTTTAACTG AAGCAGGTTA ACAGTTGACT CTAG TTCAA TTATCCAAGT

+ ACTAGATATT GATTTTTTTT TCTTACTCAC TAAACCAAAA GCCATCATT AGCATATAGT TTATGATTA
- TGATCTATAA CTAAAAAAA AGAATGAGTG ATTTGGTTTT CGGTAGTAA TCGTATATCA AATACTAATT

+ TTAAGATCCT TCACCTAATT AATTAACACT TGCCACAAT TTCCACTTTT TTTTGGCTA TAAAAAGGCG
- AATTCTAGGA AGTGGATTA TTAATGTGA ACGGTGTTA AAGGTGAAAA AAAAACCGAT ATTTTCCCG

+ TCCTCTAGCT TTGCTTTCTT CACCATTCA CAAGCAAAAC TCTTTCATTT GCTTCTTTCA TTCATACACT
- AGGAGATCGA AACGAAAGAA GTGGTAAGT GTTCGTTTTG AGAAAGTAAA CGAAGAAAGT AAGTATGTGA

```

```

+ CATTTCACA TTTTCTCA TTTTTCTTT TTTCATTCT TTCCTCTCAA AGGTAAAGCT ACAATTTTT
- GTAAAGTTGT AAAAGAGGT AAAAAAGAAA AAAGTAAAGA AAGGAGAGTT TCCATTTTCA TGTAAAAAA

+ TTTAATTTT TTTTATATGC TAGTTAATTT CCACATGCAA AAATAGTCTT TTTTTTGGTG TTTGGTTCAA
- AAATTAATAA AAAATATACG ATCAATTAAG GGTGTACGTT TTTATCAGAA AAAAAACCAC AAACCAAGTT

+ ATTAGTTC AAAGTTTGA TCTGGGGGA AAATGTGAT CTTATCTTTA AAGGGTGTTA AAGATCTTG
- TAAATCAAG TTTCAAACT AGAACCCCT TTTACAATA GAATAGAAAT TTCCACAAT TTCTAGAAC

+ AATTTTTCTT ACAGAAATTT CCATTTAAG TTGAGTCTAT TACTCTAAAAC CCAGAAA AAAGAAGTTA
- TTAAAAAGAA TGTCTTTAAA GGTAAAATTC AACTCGAGTA AATGAGATTTG GGTCTTT TTTCTTCAAT

+ TTTTTTGATA TTTTAGCTAA AGATTCCAAC TTTTTTAGTA GTAGAAAAGT GATTTAAGAA CAACAAGAA
- AAAAACTAT AAAATCGATT TCTAAGGTTG AAAAAATCAT CATCTTTCA CTAATTTCTT GTTTGTTCTT

+ STAATCTTC TGAAAAAGT TTTGTCTTG ATCACCCTC AAGAGGTGTG AAGTGTAAA GATGACATT
- CATTAGAAAG ACCTTTTCA AAACAAGAAC TAGTGGGGG TTCTCCACAC TTCACAATTT CTACTGTAAA

+ TTGTGGTTTT TTTTTTTGA ATTTGTAGA AAGTGATCAA GAACAAAGTA GAAGTAATCT TTCTTGAAA
- AACACCAAAA AAAAAAACT TAAACATCT TTCACTAGTT CTTGTTTCAT CTTCATTAGA AAGAACTTTT

+ AGTTTTGTTT TGAATCTT GATCATGATC ATAATCACCC CAAGAGGTGT AAAGATTACA TTTTGAGGT
- TCAAAACAAG AACTTAGAA CTAGTACTAG TATTAGTGGG GTTCTCCACA TTTCTAATGT AAAACTCCAA

+ TGTTTTTGT GTCACATAG TTTTGTGAC CTTTGTCTCA AACTGTTTT TGTTCTGTTT TGTTCTCAT
- ACAAAAACA CAAGTGTATC AAAACAGTG GAAACAGAGT TTTGACAAA ACAAGACAAG ACAAGAGTA

+ TTGTTTTGTG GGGTGGGGT GGGGTGGTCT TGTTTGTGG TGTCAAAAT CTTAGTTTT TAAGTATACC
- AACAAACACC CCCACCCCA CCCACCAGA ACAAACAACC ACAGTTTTAA GAATCAAAA ATTCATATGG

+ TCATTTTAA GACAAATCTA TCTTCATGAC ATAGTGAAG TAGTTCATGT TTGCTTTAG TCATCAATTC
- AAGTAAAATT CTGTTTAGAT AGAAGTACTG TATCGACTTC ATCAAGTACA AACGAAATC AGTAGTTAAG

+ TTGTTTTGTT TTTTCATAGT ACATTGCTA TTTTTCTAAT GAAAAACTT ACTTGGGGT TTCTTAAAGA
- AACAAAACA AAAAGTATCA TGTAACGAT AAAAAAGATTA CTTTTTGAA TGAACCCCA AAGAATTTCT

+ TCTTGTTTG TTAAGTTTT AACTAAGATT TGATGTTTT GATTAATCA AGATTGAGAA ATGTAGTCCA
- AGAACAAAAC AATTCAAAA TTGATTCTAA ACTACAAA CTAATTTAGT TCTAACTCTT TACATCAGGT

+ TTTTGTAACA GAAAGTTTAC TGTAGATTC TGTTTGTGG GTCTTCATTG AGTTATTTT TTATATATA
- AAAACATTGT CTTTCAAATG ACATCTAAG AACACACCC CAGAAGTAAC TCAATAAAA AATATATATA

+ ATTTGTAGT TTAGTCTT GTGTAGTCT TGGTTGTAAC GCATAGGCGT TGTGCTTTG CCTCAAACGT
- TAAAACATCA AATCAGAAA CAACATCAGA ACCAACATTG CGTATCCGCA ACACGAAAAC GGAGTTTCCA

+ ATTGAGTA AGAAATGTA CTAATGTCAT CCTCTTGGT TGGTTTGGT TTTATTAGTA CTATAGTAT
- TAAACTCAT TCTTTACATT GATTACAGTA GGAGAAACCA ACCAAAACCA AAATAATCAT GATATCATA

+ TATACTCAGT AGCGGAGCCA GAATTTTTAG TTAATGAATT TTGGTCTAG ATTCCGGAT ACATTAAAAA
- ATATGAGTCA TCGCCTCGGT CTTAAAATC AATTACTTAA AACCCAGATC TAAGGCCTA TGTAATTTTT

+ AAGAAAAAC CCTTTAGACG TATTACAGTA GAAGCTTGT AGGTAGTA GAGTGTGAGA ATGCTTTGTT
- TTCTTTTGTG GGAAATCTGC ATAATGTCAT CTTGAAAACA TCCATCAT CTCACAAGTCT TACGAAAACA

+ ATGTATTTTT TCATGGCTCC TTCACTGTC TTTATTCTT TTTTGAACT GTTTTCTTG AGCGGAGGGT
- TACATAAAA AGTACCGAGG AAAGTGACAG AAATAAGA AAAAACTTGA CAAAAGGAAC TCGGCTCCCA

+ CTATTGGACG CAACTTCTT ACCTTCAAGG TAGAGGTA GGTTTGTGGA CATTCTACCC TCCCGGACTT
- GATAACCTGC GTTGAAGAGA TGGAAGTTCC ATCTCCATT CCAAACACCT GTAAGATGGG AGGGGCTGAA

+ CACTTTGGTG AGACTACAGC GGGTATGTT GTGGCTCCG CCCTTGACTA TATTAGGTGA AAGGTATGAA
- GTGAAACCAC TCTGATGTGC CCCATACAA CAACCGAGGC GGAAGTGTAT ATAATCCACT TTCCATACTT

+ AATTTGAAGT GGTAACATT GTGGATGTTG AAAATTTAAG TGATTCAGTG AGTTTTTATG TTTGTCAATT
- TTAAACTTCA CCATTGTAA CACCTACAAC TTTTAAATTC ACTAAGTCAC TCAAAAAATC AAACAGTAAA

+ TCAATTTTT CAGTGGTTGT ACTAATGTA TGCTATATA AATTTTGTTT GGTATTCGGA TAAG CTGAG
- AGTTAAAAA GTCACCAACA TGATTACATT ACGATATATT TTAAACAAA CCATAAGCCT ATTC GACTC

+ GTGGGCTCTT CTACTAAGT CACCAGTGA TGTTTTGGTT GTTTACAT GAACCTTGT CTGAGGATT
- CACCCGAGAA GATGATTGAC GTGGTCACAT ACAAACCAA CAAATGTCAA CTTGAAACA GACTCCTAAA

+ CCCATCTGCT GAATCAACTA TAATG
- GGGTAGACGA CTTAGTTGAT ATTAC

```

Figura 41. Secuencia nucleotídica del promotor de Lin10. El codón de inicio de la transcripción está marcado rojo, mientras que la zona 5' que es transcrita pero no traducida está en amarillo, y el leader intrón está marcado en verde.

Al igual que se hizo con las secuencias promotoras de Lin6, TIV1 y Lin10, la secuencia promotora de TOMSSF se analizó en búsqueda de elementos reguladores. Este análisis, reveló que la secuencia promotora de TOMSSF también contenía elementos ATATT específicos de raíz, los elementos característicos de los promotores activados en células infectadas de nódulos de raíz OSE1 y OSE2, y varios motivos de elementos hormona-específicos. Se identificó el motivo Wbox de respuesta a ácido salicílico, así como elementos de respuesta a ácido abscísico como MYCR y ABRE, y también el elemento de respuesta a sacarosa SURE1.

Para validar el análisis *in silico*, se analizó la expresión génica de TOMSSF en el mismo sistema experimental que previamente se ha utilizado para el análisis de los promotores de Lin6, TIV1 y Lin10 (apartado 2.4.1.). Los niveles de ARNm de TOMSSF aumentaron con la aplicación de todos los tratamientos, ácido salicílico, ácido abscísico, glucosa y sacarosa (Fig. 42).

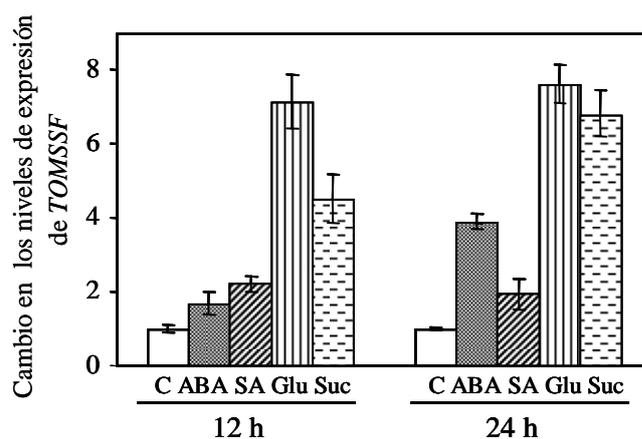


Figura 42. Efecto de glucosa, sacarosa, ácido salicílico (SA) y ácido abscísico (ABA) sobre la expresión génica de TOMSSF. El ARN se extrajo de raíces de plántulas de tomate expuestas durante 12 y 24 h a agua (control), 100 μ M de ácido abscísico, 100 μ M de ácido salicílico, 40 mM de glucosa ó 20 mM de sacarosa. Los ARNs fueron reverse transcritos y los niveles de expresión analizados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

2.6 Análisis de la expresión de los genes Lin9 y Lin10 en los distintos órganos de la planta de tomate.

Para obtener más información sobre los dos genes de tomate clonados por primera vez durante la presente Memoria de Tesis Doctoral, la invertasa vacuolar Lin9 y la fructo-exohidrolasa Lin10, se analizó la expresión de ambos genes en los distintos órganos de la planta de tomate. De este modo, se ha obtenido información

sobre el patrón de expresión de Lin9 y Lin10. Los órganos en los que se ha analizado la mencionada expresión génica (descritos en el punto 1.1.2.5 de material y métodos) son: flores, sépalos, hoja joven, hoja adulta, tallo, raíz, fruto inmaduro (verde) y fruto maduro (rojo). Como se muestra en la figura 43, Lin9 se expresa principalmente en flores, siendo los sépalos y el fruto inmaduro los siguientes órganos donde se expresa mayoritariamente, y es de destacar la ausencia de ARNm de Lin9 en el fruto maduro. Lin10, sin embargo, tiene sus niveles de expresión más elevados en tallo y raíz, y no se expresa en hojas jóvenes.

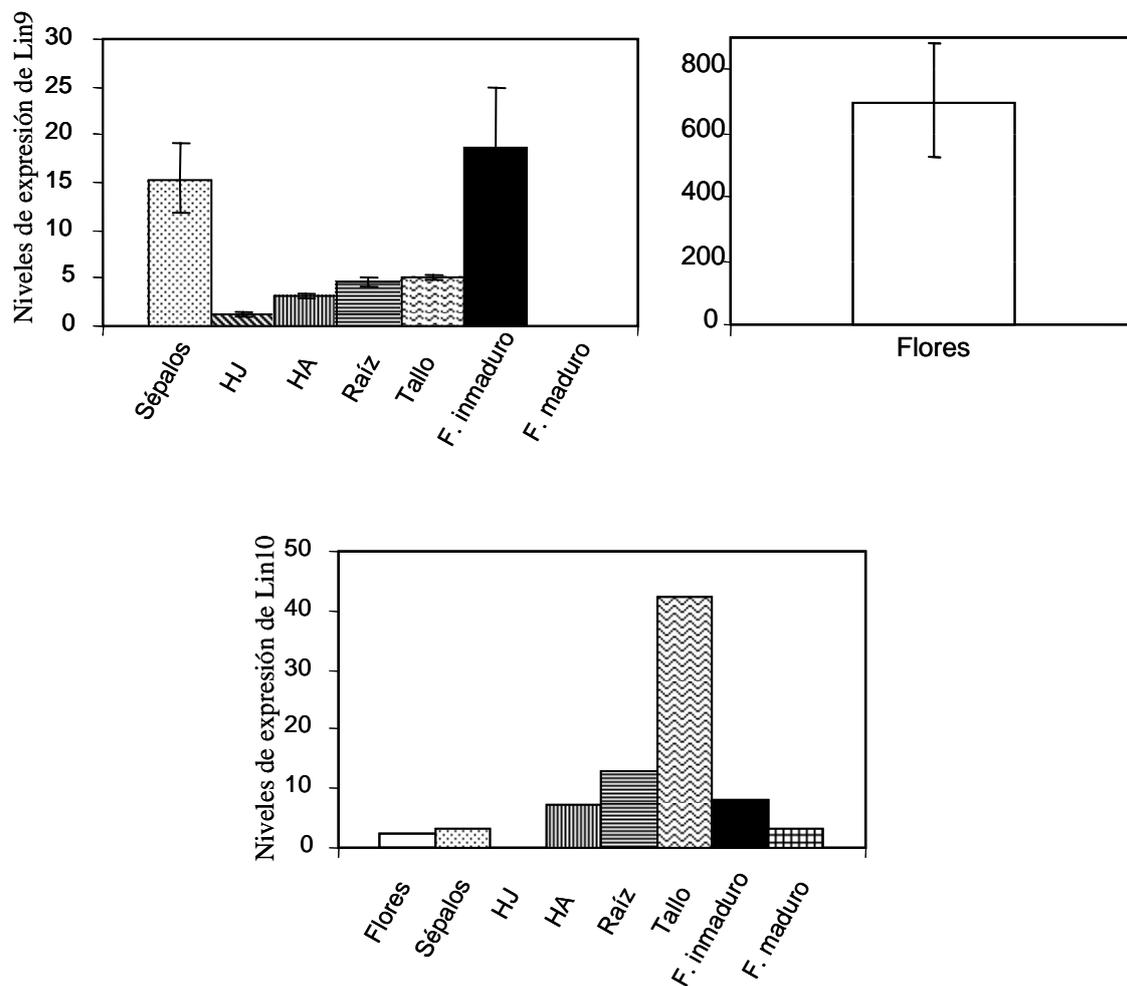


Figura 43. Niveles de expresión de Lin9 y Lin10 en los distintos órganos de la planta de tomate: flores, sépalos, hoja joven (HJ), hoja adulta (HA), raíz, tallo, fruto inmaduro y fruto maduro. Los ARNs se extrajeron de los distintos órganos, fueron reverso transcritos y los niveles de expresión analizados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específicos y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica se calculó usando el método de $2^{\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

2.7 Análisis de la expresión de los genes analizados en hojas.

Aunque ya se han analizado los cambios de expresión como consecuencia de la formación de la simbiosis micorrízico arbuscular de los distintos genes de invertasas, sacarosa sintasa, y la fructo-exohidrolasa Lin10 en raíces, que es el órgano de la planta donde se establece la simbiosis MA, también se decidió analizar si esos cambios se reflejaban en la parte aérea de la planta. Para ello, se analizó la expresión de los genes previamente analizados en raíces en las muestras de hojas en las que previamente se analizó la expresión de sacarosa-fosfato-sintasa y RuBisCo, hojas de plantas de tomate control regadas con 500 μ M de P (C), inoculadas con *G. intraradices* (Gi) e inoculadas con *G. mosseae* (Gm) 6 semanas después de la inoculación con el hongo MA. Análisis que se realizó también mediante PCR Cuantitativa en Tiempo Real.

De las invertasas analizadas, sólo Lin6 se detectó en hojas de plantas minorizadas y no micorrizadas. Los niveles de ARNm de Lin6 fueron más elevados en las plantas micorrizadas con ambos hongos *G. mosseae* y *G. intraradices* que en las plantas control (Fig. 44).

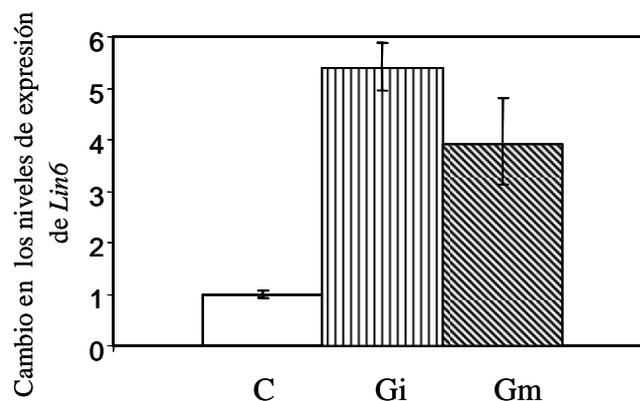


Figura 44. Efecto de la colonización por micorrizas sobre la expresión génica de *Lin6* en hojas de tomate. El ARN se extrajo de hojas de plantas de tomate control (C), inoculadas con *G. intraradices* (Gi), e inoculadas con *G. mosseae* (Gm). Los ARNs fueron reverso transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para *Lin6* y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica de este gen por la colonización micorrízica, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

Con respecto a los dos genes nuevos identificados en la presente Memoria de Tesis Doctoral, Lin9 y Lin10, ninguno se expresó en la parte aérea de las plantas de nuestro sistema experimental.

La abundancia relativa de transcritos del gen de la sacarosa sintasa TOMSSF se analizó en las hojas de plantas micorrizadas y no micorrizadas. Los niveles de

ARNm de TOMSSF fueron inducidos consistentemente en hojas colonizadas por ambos hongos *G. mosseae* (2 veces) y *G. intraradices* (aproximadamente 3 veces) (Fig. 45).

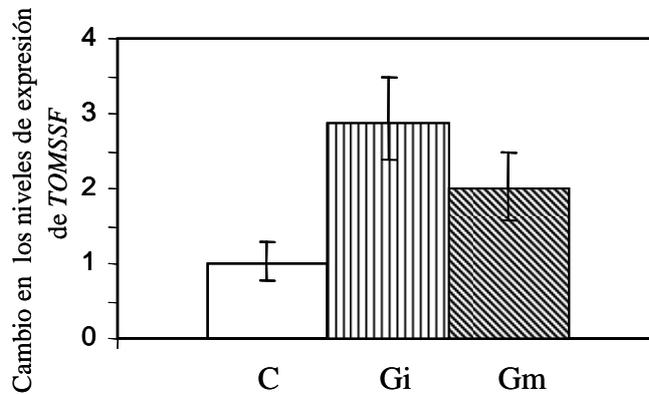


Figura 45. Efecto de la colonización por micorrizas sobre la expresión génica de TOMSSF en hojas de tomate. El ARN se extrajo de hojas de plantas de tomate control (C), inoculadas con *G. intraradices* (Gi), e inoculadas con *G. mosseae* (Gm). Los ARNs fueron reverso transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para TOMSSF y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica de este gen por la colonización micorrízica, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN TRANSPORTADORES DE AZÚCARES EN PLANTAS MICORRIZADAS.

Dado que los transportadores de azúcares juegan un papel fundamental en la distribución de azúcares a través de la planta, es lógico pensar que esos transportadores estén regulados por el desarrollo de la simbiosis MA. Más aún, habiendo comprobado que la concentración de azúcares se altera por la simbiosis, esto debe reflejarse en los transportadores de dichos azúcares. Para obtener más datos en este sentido, se siguió una aproximación basada en la técnica de PCR para la identificación de genes que codificaran para transportadores de azúcares y que aumentaran su expresión ó se activaran específicamente en plantas micorrizadas. Se identificó un gen que codificaba un posible transportador de azúcares en tomate, que aumenta su expresión en hojas pero no en raíces de plantas micorrizadas. También se determinó la regulación de este gen en plantas infectadas con el patógeno de raíz *Phytophthora parasitica*, para determinar si la expresión de este gen se regulaba específicamente por la simbiosis micorrícico abuscular.

3.1 Clonación de genes que codifican transportadores de hexosas en raíces micorrizadas.

En base a los dominios de aminoácidos conservados PESPR y PETKG, presentes en todos los transportadores de azúcares de la base de datos, se diseñaron el par de cebadores degenerados SUG1 y SUG2. La amplificación mediante PCR de ADNc de cadena simple procedente de raíces micorrizadas con los cebadores degenerados, tuvo como resultado una banda de aproximadamente 850 pb. La clonación del ADN amplificado y la secuenciación de varios clones, permitió la identificación de un clon parcial que codifica para un posible transportador de azúcares de tomate. El resto de la secuencia codificante se obtuvo mediante las técnicas de 5' y 3'RACE usando los cebadores SUG4 y SUG5 respectivamente. De este modo, se obtuvo un gen completo de 1699 pb llamado *LeST3* (Número de acceso AJ278765), con unos pocos nucleótidos en la zona 5' por encima del posible codón de inicio ATG, y una cola de 210 pb (Fig. 46). El origen vegetal del gen clonado, se demostró mediante la amplificación por PCR de ADN genómico de tomate y de *Glomus mosseae* con los cebadores específicos del gen SUG4 y SUG5 (Fig. 47), y por el análisis mediante Southern blot del ADN genómico de tomate (Fig. 48). Además, la existencia de un gen que muestra un 99.79% de identidad con *LeST3* en el fichero de genes de tomate TIGR (TC número 164118), proporciona más evidencias del origen vegetal del gen identificado. El análisis mediante Southern blot reveló incluso, que la sonda de *LeST3* hibridó en una sola banda en cada uno de los ADNs genómicos digeridos, lo cual sugiere la presencia de una sola copia de *LeST3* en el genoma del tomate.

ggcctaagaagaaaaaaaaattatgaaggaagatatagagcacagtgagaacagagtaaat
M K E D I E H S E N R V N
gaagaaataacaactcctcttataattcaacaataaaagagtaaaagaagaaaatgga
E E I T T P L I I Q T N K R V K E E N G
tgttatgagaagaaacaagataggtgcatggtttaccttagcacattagtggtggttagg
C Y E K K Q D R C M V Y L S T L V A V R
ggttcatattcattgggatcttgtgctggatattcatcaccaacacaatccgccatcaga
G S Y S L G S C A G Y S S P T Q S A I R
gaggatcttaacttatctatagcacagatctcgcctctttggttcaatatggacatttggg
E D L N L S I A Q I S L F G S I W T F G
gcaatgattggagcaatcacaagtggtccaatcgctgattatattggctcgaaaggggca
A M I G A I T S G P I A D Y I G R K G A
atgagaatgtcaagtggtttctgtgttgctggatggtagctatcttctcgctcagggga
M R M S S G F C V A G W L A I F F A Q G
gcacttgctctggacattggaagattggcaacaggatatggaatgggagtttctcttat
A L A L D I G R L A T G Y G M G V F S Y
gtgggtgcccgtatctatagctgaaattgcacctaagatttacgaggagctttgacaacc
V V P V F I A E I A P K D L R G A L T T
ataaaccagctgatgatatgttgtggagtctcagtttccttcattataggaactatgatg
I N Q L M I C C G V S V S F I I G T M M
acatggaggacgttggcgtaacaggattaattccatgtgctattctgcttttcgggtcta
T W R T L A L T G L I P C A I L L F G L
tttatcattccagagtcacctaggtgggtggcaaaaataggacatcaaaaggagtttgaa
F I I P E S P R W L A K I G H Q K E F E
cttgactacgtaaaacttcgaggcaagatgctgatatactgaggaggcagctgaaatc
L A L R K L R G K D A D I S E E A A E I
aaggattatatagaacacttgaaaagcttccgaaagtgaacttgtttgattgttccaa
K D Y I E T L E K L P K V N L F D L F Q
agaagatactcgagctcacttatagtgaggagttggacttatgggtgtttcaacagtttggg
R R Y S S S L I V G V G L M V F Q Q F G
ggaatcaatggaatctgtttctacaccggtagcatatgttgagtcctcaggtttctcctct
G I N G I C F Y T G S I F E S S G F S S
gatattggaactataatctatgcaattatacaggttcccatcaccgcggtgggtgcagcc
D I G T I I Y A I I Q V P I T A L G A A
ttaatcgacagaactggaagaaaactccttttattggtttcaggaacaggacttgtcata
L I D R T G R K P L L L V S G T G L V I
ggctgtataactaacaggaatctcattctatatgaagggacatgaaatggcaataaaggca
G C I L T G I S F Y M K G H E M A I K A
gcaccgatacttgctgtaacaggcactggtctatatcggttccttttcagtaggaatg
A P I L A V T G I L V Y I G S F S V G M
ggagcagttccgtgggttgtgatgctcagagatatacctataaatattaaggtgctgct
G A V P W V V M S E I Y P I N I K G A A
gggagccttgcaacactagtgaaattggttcggagcatgggctgctcctacactttcaac
G S L A T L V N W F G A W A C S Y T F N
ttcctcatgacctggaattccttttggtacgttcgttctgtatgctgcagtgaatgcactg
F L M T W N S F G T F V L Y A A V N A L
tccatattatgtgataaaaaatagctgaaaccaaaggaagaactttggaacaaatc
S I L F V I K I V P E T K G R T L E Q I
caggctgctatcaatgcatcatgaaataccttagccttcacgattcatctttcgtactg
Q A A I N A S -
aaatttactttatcagagagagttgacacaattcatgttgcgtttgaaactacattcga
tctgattctcatcctcaaatttaagacatttgagtgtttgttatcatggatcacatat
tttcatattgtactcattgattcatctcacttaaaaaaggagaattttaagtttaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

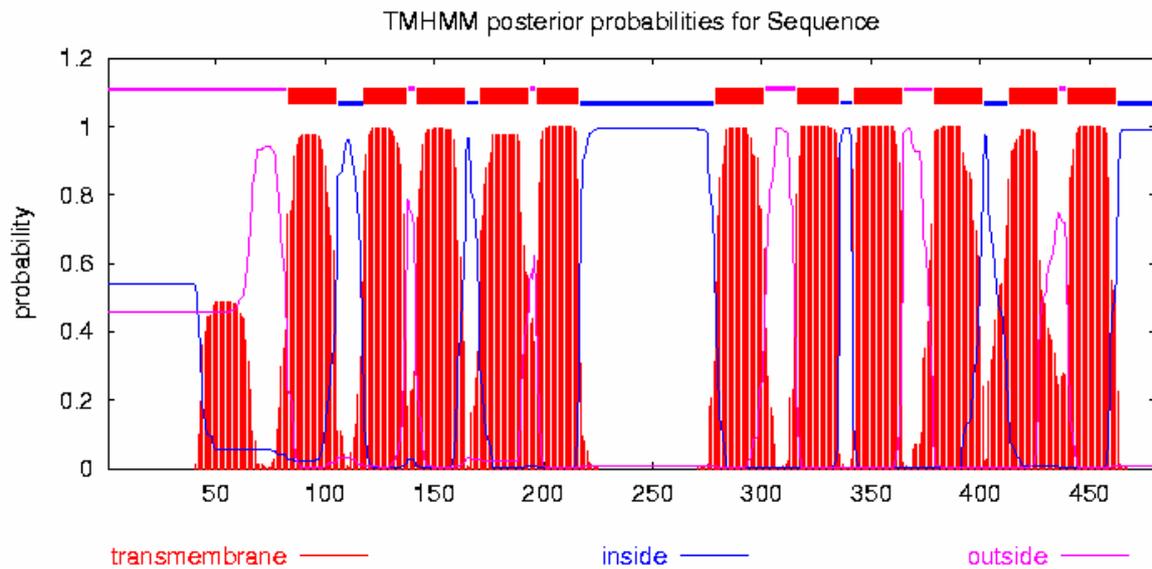


Figura 46. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de *LeST3*, y topología predicha de *LeST3* mediante SOSUI.

La pauta de lectura abierta de *LeST3* codifica un polipéptido de 480 aminoácidos con un peso molecular calculado de 52 kDa. El análisis hidrofóbico usando el algoritmo de Kyte-Doolittle (Kyte & Doolittle 1982), reveló que la proteína codificada por el gen clonado, posee 12 posibles dominios transmembrana ordenados en dos grupos de seis dominios cada uno separados por un lazo hidrofílico de 62 aminoácidos (Fig. 46). Este perfil hidrofóbico es característico de proteínas que pertenecen a la superfamilia de los facilitadores mayores. La comparación de la secuencia de *LeST3* con las que hay en el GenBank, reveló una similitud definitiva con un ADNc de un fragmento AFLP de un gen de tabaco inducido por peróxido de hidrógeno (92%), y a un número de transportadores de azúcares conocidos de diferentes organismos, con los niveles más elevados de identidad a posibles transportadores de azúcares no publicados de *Arabidopsis* (81-68%), al gen inducido por deshidratación y frío *ERD6* de *Arabidopsis* (60%), y al posible transportador de azúcar localizado en la vacuola de la remolacha (59%). La secuencia aminoacídica predicha de *LeST3* es más similar a transportadores de azúcares de otras plantas y a transportadores de glucosa de mamíferos que a transportadores de azúcar de tomate. Todos estos genes pertenecen a la familia de transportadores de monosacáridos de la familia de portadores de azúcares de la superfamilia de los facilitadores mayores.

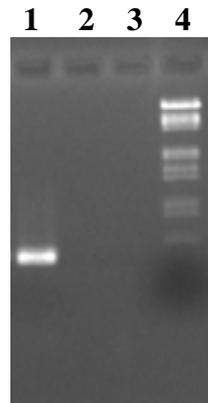


Figura 47. Gel teñido con Bromuro de Etidio de los productos de PCR obtenidos después de la amplificación del ADN genómico de tomate (calle 1) y *G. mosseae* (calle 2) con los cebadores específicos SUG4 y SUG5. Las calles 3 y 4 son el control negativo de la PCR y el marcador de ADN respectivamente.

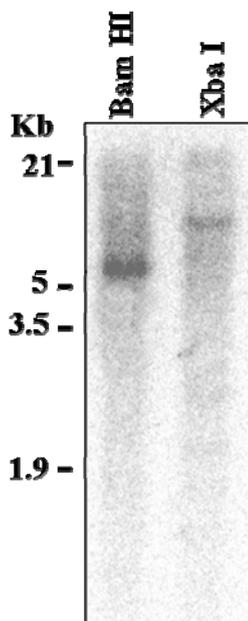


Figura 48. Análisis genómico por Southern blot de *LeST3*. 10 μ g de ADN genómico de tomate se digirieron con las enzimas de restricción que se indican, se separaron por electroforesis, y posteriormente transferidos a una membrana de nylon. La membrana se hibridó con la región SUG4-SUG5 del ADNc de *LeST3* marcada con 32 P, y se lavó bajo condiciones de alta astringencia.

La secuencia aminoacídica deducida de *LeST3* fue alineada con otras de distintos transportadores de monosacáridos de plantas superiores, y con esos datos se construyó un árbol filogenético (Fig. 49). Este análisis, mostró la existencia de tres subfamilias génicas principales dentro de los transportadores de monosacáridos de plantas: los transportadores de membrana plasmática, los transportadores

cloroplastidiales, y una tercera subfamilia que incluye al gen *LeST3*, al transportador de la remolacha localizado en la vacuola, y a algunos transportadores de *Arabidopsis* sin caracterizar.

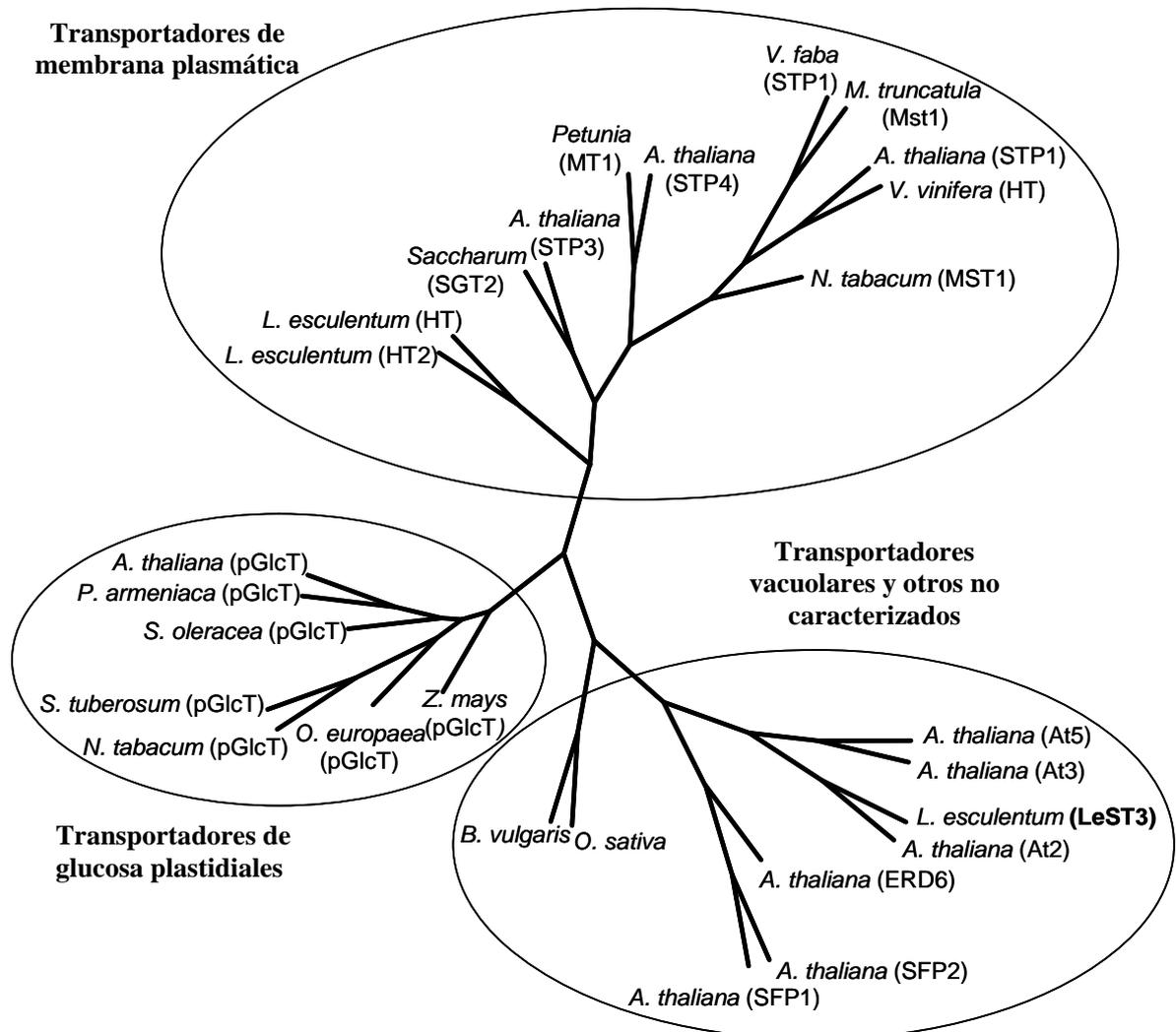


Figura 49. Árbol filogenético sin raíz que muestra las relaciones a lo largo de la evolución de los transportadores de hexosas de plantas. Los transportadores que pertenecen a las familias de la membrana plasmática y la plastidial, y la vacuolar y otros transportadores de hexosas no caracterizados están rodeados por un círculo. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos GenBank con los siguientes números de acceso: *Arabidopsis thaliana* (At2: NM_130369, At5: NM_121889, At3: NM_111387; ERD6: D89051, pGlcT: AF215855, SFP1: NM_122617; SFP2: NM_122618, STP1: X55350, STP3: AJ002399, STP4: X66857), *B. vulgaris* (U43629), *S. esculentum* (HT2: AJ132224, HT: AJ010942; ST3: AJ278765), *M. truncatula* (MST1: U38651), *N. tabacum* (pGlcT: AF215852, MST1: X66856), *O. europaea* (pGlcT: AY036055), *O. sativa* (pGlcT: AC007858), *P. armeniaca* (AF215853), *Petunia x hybrida* (MT1: AF061106), *Saccharum hybrida* (SGT2: L21753), *S. oleracea* (pGlcT: AF215851), *S. tuberosum* (pGlcT: AF215853), *V. faba* (STP1: Z93775), *V. vinifera* (HT: AJ001061), *Z. mays* (pGlcT: AF215854).

3.2 Expresión heteróloga de *LeST3* en levadura.

Para la caracterización del producto génico de *LeST3*, se utilizó el mutante de *S. cerevisiae* deficiente en el importe de hexosas EBY.VW4000 (Wieczorke *et al.* 1999), el cual se transformó con el vector de expresión pFL61 vacío y con su derivado pFL61-*LeST3* que contenía el ADNc de *LeST3* aguas abajo del promotor constitutivo de la fosfoglicerato kinasa de *S. cerevisiae* para comprobar si la proteína codificada por el gen *LeST3* funcionaba como un transportador de monosacáridos. Los transformantes Ura⁺ se identificaron mediante su crecimiento en placas de medio SD donde la fuente de carbono era maltosa. Y para comprobar la funcionalidad del gen objeto de estudio, dos de los transformantes seleccionados, se sembraron sobre placas que como fuentes de carbono contenían glucosa, fructosa, manosa o galactosa. Sin embargo, los transformantes seleccionados, no fueron capaces de crecer en la presencia de esos azúcares como fuentes de carbono. Para determinar si la construcción génica era aceptada por la maquinaria transcripcional de *S. cerevisiae*, se aisló ARN de dos de las levaduras transformadas y se ensayó la expresión del transcrito de *LeST3* mediante RT-PCR, usando cebadores específicos del gen. Como se puede apreciar en la figura 50, el gen *LeST3* se expresaba intensamente en el mutante de levadura transformado con el vector pFL61 que contenía el gen de *LeST3*; sin embargo, no se detectó señal en el mutante de levadura transformado con el vector vacío.

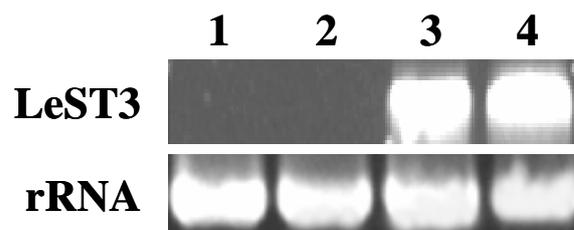


Figura 50. Análisis de la expresión de *LeST3* en *S. cerevisiae*. La expresión génica se analizó por RT-PCR. El ARN aislado de dos de los transformantes de levadura con pFL61 (calles 1 y 2), y sus derivados pFL61- *LeST3* (calles 3 y 4), fueron reverso transcritos y amplificados mediante PCR con los cebadores específicos de *LeST3* SUG4 y SUG5. El ARN ribosómico 18S se usó como control de la expresión génica.

3.3 Análisis de la regulación por la simbiosis del gen identificado.

3.3.1. *Regulación de la expresión génica en raíces.*

El análisis de la expresión de *LeST3* se ensayó en raíces que procedían del experimento 1 descrito previamente en material y métodos (punto 1.3.1.) y en el

que anteriormente se ha analizado la expresión de invertasas y otros genes de tomate. La colonización micorrícica no afectó a los niveles transcripcionales de *LeST3* en las raíces a ninguno de los dos tiempos analizados (Fig. 51).

3.3.2. Regulación de la expresión génica en raíces por el fósforo suministrado.

LeST3 no mostró cambios en sus niveles de ARNm cuando la nutrición fosforada aumenta desde 100 hasta 500 μM de fosfato. (Fig. 51)

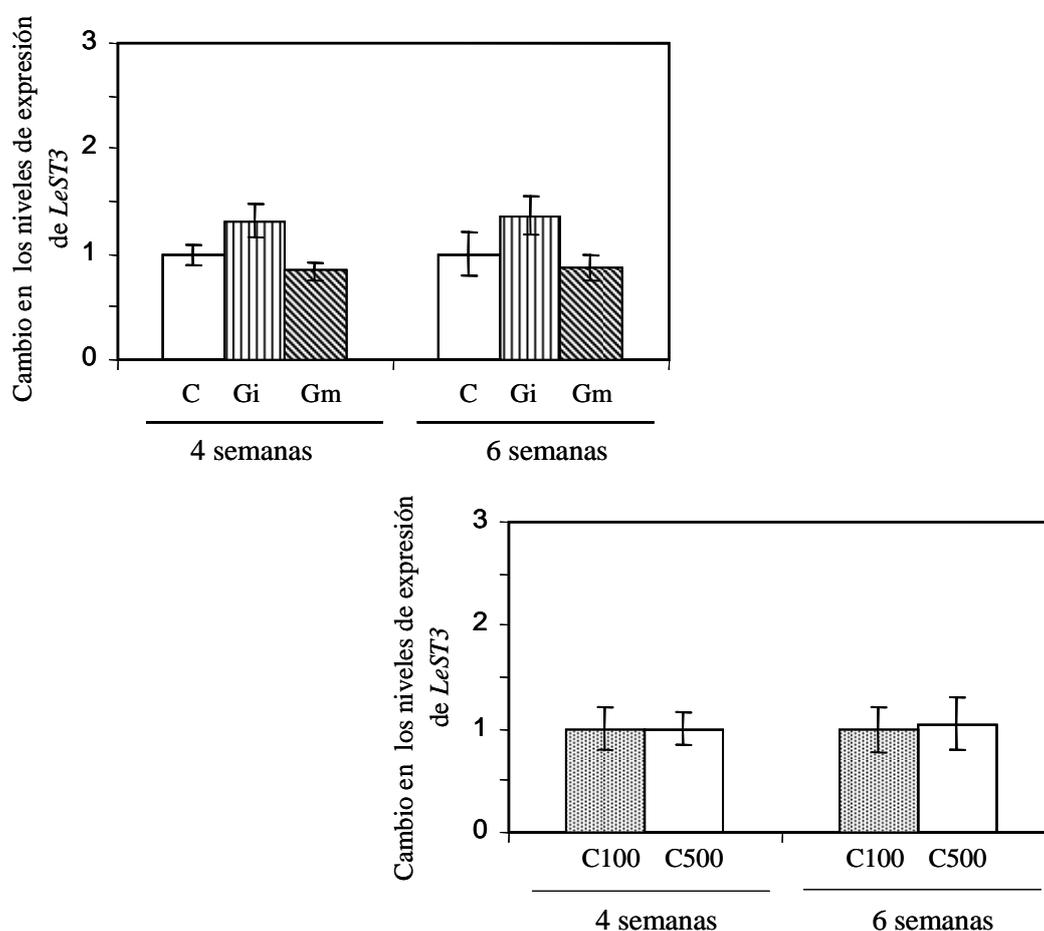


Figura 51. Efecto de la colonización por micorrizas y de la nutrición fosforada sobre la expresión génica de *LeST3* en raíces de tomate. El ARN se extrajo de raíces de plantas de tomate control con 100 μM de P (C100), control con 500 μM de P (C500 ó C) inoculadas con *G. intraradices* (Gi), e inoculadas con *G. mosseae* (Gm). Los ARNs fueron reverso transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para *LeST3* (SUG4 y SUG5) y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica de *LeST3* por la colonización micorrícica, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

3.3.3. Regulación de la expresión génica en hojas.

Ya que la expresión de *LeST3* no se regulaba en raíces, se decidió mirar su expresión en hojas de plantas de seis semanas de las mismas plantas en las que se miró la expresión en hojas de los genes en el apartado 2. En este caso, sí se observó una clara inducción de los niveles de ARNm de *LeST3* en las hojas colonizadas tanto por *G. mosseae* (4 veces) como por *G. intraradices* (casi 5 veces) (Fig. 52).

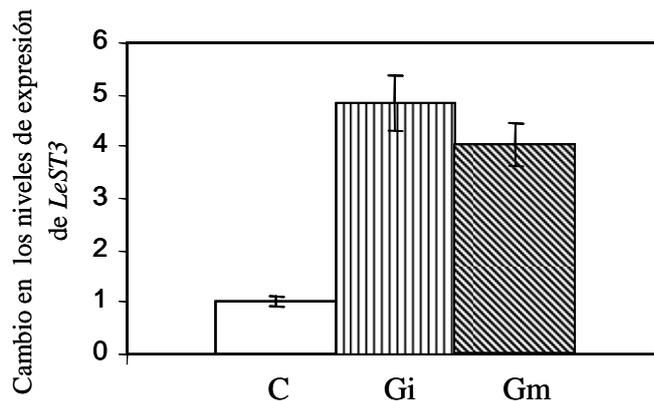


Figura 52. Efecto de la colonización por micorrizas sobre la expresión génica de *LeST3* en hojas de tomate. El ARN se extrajo de hojas de plantas de tomate control con 500 μ M de P (C) inoculadas con *G. intraradices* (Gi), e inoculadas con *G. mosseae* (Gm). Los ARNs fueron reverso transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para *LeST3* y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica de *LeST3* por la colonización micorrízica, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

3.3.4. Regulación de la expresión génica por el patógeno de raíz *Phytophthora parasitica*.

Para determinar si los efectos observados en la expresión de *LeST3* eran una respuesta específica de la simbiosis, se analizó la expresión de *LeST3* en plantas inoculadas con el patógeno de raíz *P. parasitica* (experimento 3 descrito en el punto 1.3.2. de material y métodos). Las plantas tenían cuatro semanas cuando fueron inoculadas con el patógeno ó no inoculadas (control), y se cosecharon dos semanas después (6 semanas en total). Las raíces de las plantas inoculadas con *P. parasitica*, mostraban claramente áreas necróticas (un promedio de nivel 2, que es un nivel medio de síntomas). Como se muestra en la figura 53, los niveles del transcrito de *LeST3*, se inducen también en las hojas de las plantas infectadas con *P. parasitica*, mientras que en las raíces no se afectan.

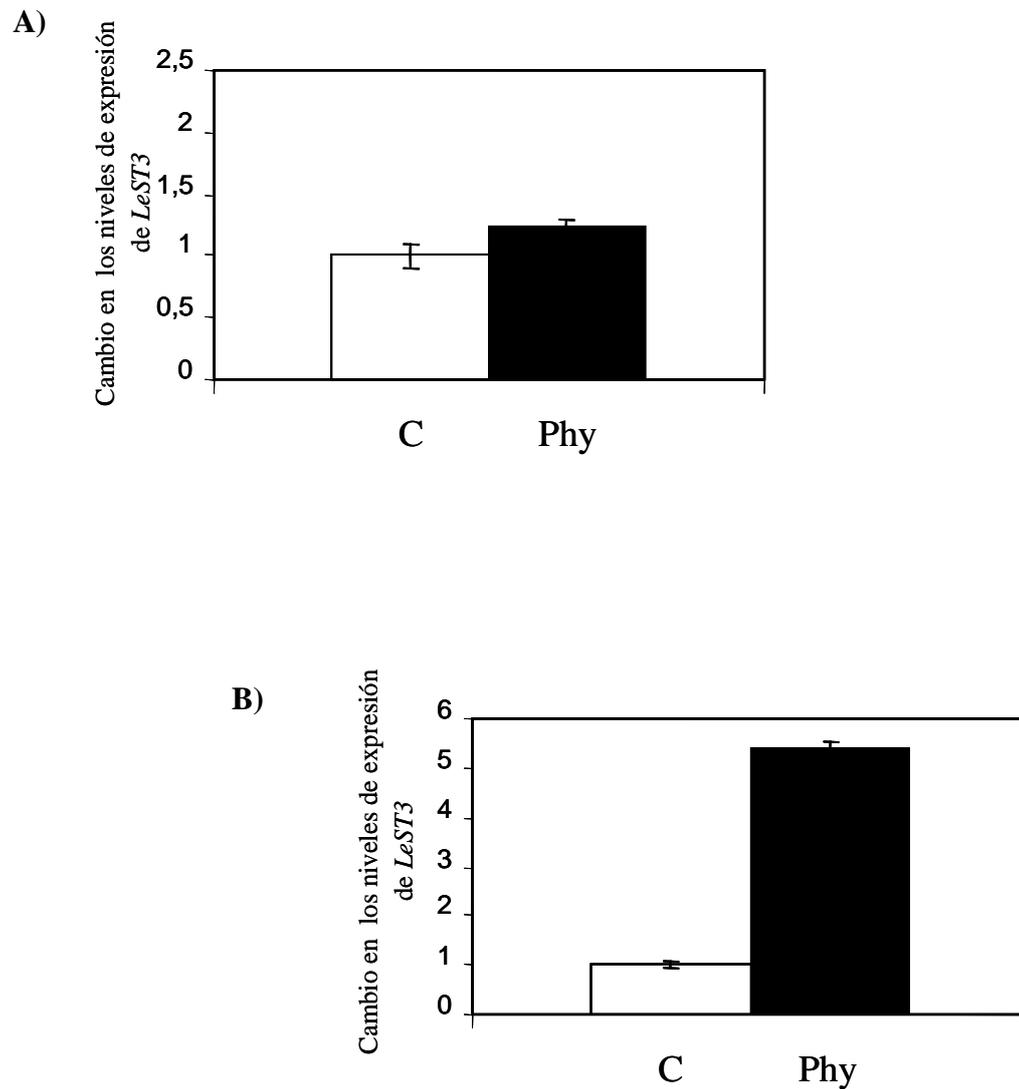


Figura 53. Efecto de *P. parasitica* sobre la expresión génica de *LeST3*. El ARN se extrajo de raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate control (C), y plantas inoculadas con *P. parasitica* (Phy). Los ARNs fueron reverse transcritos y la expresión se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando cebadores gen-específico para *LeST3* y los del ARNr 18S. El cambio inducido en la expresión génica de *LeST3* en cada tejido por *P. parasitica* se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Los datos que se representan son media de tres réplicas biológicas independientes. Barras de error, DS (desviación estándar).

DISCUSIÓN

El trabajo que se resume en la presente Memoria de Tesis Doctoral, ha tenido como objetivo principal profundizar en el estudio de los cambios inducidos por el desarrollo de la simbiosis en el metabolismo carbonado de las raíces hospedadoras, con el fin de obtener evidencias sobre los mecanismos que controlan la transferencia de nutrientes de la planta al hongo. Para esta investigación, se ha utilizado el tomate como planta modelo, ya que es una planta que se ha usado como modelo en distintos campos de la biología de plantas y de la que se dispone un elevado nivel de información. Además, presenta numerosas ventajas al tener un ciclo de vida corto, ser fácil de crecer y de micorrizar. Por otra parte, es una planta con un interés agronómico muy importante, ya que es la hortaliza más extendida en el mundo, su demanda aumenta continuamente y con ello su cultivo, producción y comercio.

La demanda extra de carbohidratos que supone la presencia del hongo a la planta durante la simbiosis, se refleja en las concentraciones de azúcares medidas en plantas control y plantas micorrizadas. En raíces, en las plantas micorrizadas de 4 semanas, los azúcares solubles totales son mucho menores que en las plantas control lo que se refleja en los menores niveles tanto de sacarosa, glucosa y fructosa que se detectan en dichas raíces. Dos semanas más tarde, los niveles de azúcares solubles totales, aunque siguen siendo menores en las plantas micorrizadas han aumentado respecto a las raíces de 4 semanas, a lo que contribuye el aumento del contenido en sacarosa hasta igualarse a las plantas control que se aprecia en las raíces de 6 semanas. Estos datos, sugieren que en el segundo tiempo de cosecha, se transporta más sacarosa a las raíces de las plantas micorrizadas, para compensar el coste extra debido a la presencia del hongo. Además, las menores concentraciones encontradas de glucosa y fructosa en las raíces micorrizadas en los dos tiempos de cosecha, indican el mayor consumo de los productos derivados de la hidrólisis de la sacarosa en dichas raíces micorrizadas. Al encontrarse que en el primer tiempo de cosecha, tanto el contenido en sacarosa como la relación raíz/parte aérea disminuyen en las plantas micorrizadas, se sugiere, que en ese estado de desarrollo, el aporte de carbono hacia el hongo ocurre a expensas de la producción de raíz, mientras se conserva un efecto global neutro sobre la distribución del carbono en el interior de la planta. La disminución de los contenidos de glucosa y fructosa en las raíces micorrizadas, se pueden interpretar como un resultado de su conversión en componentes hongo-específicos tales como trehalosa y lípidos. Como los hongos MA toman de forma preferente glucosa (Shachar-Hill *et al.* 1995), la fructosa debe ser metabolizada por

las células huésped. Ya en las células corticales de la raíz, la fructosa sería fosforilada inmediatamente por la hexokinasa y posteriormente metabolizada. Las hexosas liberadas por la acción de las enzimas que hidrolizan sacarosa, se podrían usar no solo como fuente de carbono y energía, sino que también pueden jugar un papel importante en señalización. Azúcares simples como sacarosa y glucosa, son eficientes moduladores de la expresión génica (Sinha *et al.* 2002).

En hojas, la ausencia de sacarosa en las plantas micorrizadas a las seis semanas, se corresponde con su aumento en raíces debido a la mayor demanda por la presencia del hongo, por lo que la sacarosa será transportada desde las hojas hasta las raíces de las plantas micorrizadas. Los niveles de glucosa y fructosa no sufren grandes cambios, ya que el azúcar principal que se transporta a través de la planta, y por tanto el que mayoritariamente responde a demanda de los distintos tejidos, es la sacarosa.

La inducción de los niveles transcripcionales de las primeras enzimas implicadas en la fijación de carbono (RuBisCo), y en la síntesis de sacarosa (SPS) en las plantas micorrizadas, es una muestra más del aumento de la demanda de carbohidratos que supone el establecimiento de la simbiosis. Demanda que se refleja en el aumento de la tasa fotosintética. Estudios previos en pepino, atribuyen el incremento de la tasa fotosintética en las hojas de plantas micorrizadas, a un incremento en el estatus de fósforo que proporciona la micorriza a la planta, más que al aumento de la demanda de asimilados (Black *et al.* 2000). Sin embargo, los datos obtenidos en esta Memoria muestran, que aún a pesar de que las plantas control recibieron bastante más fósforo (500 μ M) que las micorrizadas (20 μ M), seguía habiendo inducción de la tasa fotosintética y de la síntesis de sacarosa, por lo que dicha inducción no se puede atribuir solo a la mejora del estatus de fósforo, sino que debe deberse al aumento de la demanda de carbono en las raíces micorrizadas.

Como conclusión, se puede decir que el establecimiento de la simbiosis MA altera el contenido de carbohidratos de la planta hospedadora para hacer frente al aumento de la demanda de los mismos en las raíces micorrizadas. La sacarosa se transporta en mayor proporción a las raíces donde las hexosas resultantes de su hidrólisis, son rápidamente utilizadas como fuente de energía en las raíces micorrizadas. Tanto la enzima responsable de la fijación de CO₂, como la responsable de la síntesis de sacarosa, se inducen en las hojas de las plantas micorrizadas, para poder responder a la mayor demanda de carbohidratos de la raíz micorrizada.

Una vez comprobada la alteración de las concentraciones de azúcares, así como de la síntesis de sacarosa en las plantas micorrizadas, el siguiente paso era ver cómo se modificaba la expresión de las enzimas responsables de la hidrólisis de sacarosa (invertasa y sacarosa sintasa), paso necesario para la utilización de las hexosas resultantes como fuente de energía por parte del hongo en las raíces micorrizadas. En este sentido, basándonos en motivos conservados de aminoácidos presentes en la mayoría de invertasas de plantas, se clonaron dos cDNAs nuevos (Lin9 y Lin10). Tomando como referencia la similitud de las secuencias y los motivos conservados, Lin9 y Lin10 se han clasificado miembros de la familia génica de las invertasas ácidas. Ambos genes, contienen los dominios conservados de invertasas DPNG y WEC(X)D (Roitsch *et al.* 1995), donde se conoce que el aminoácido Asp (D) del primero y el Glu (E) del segundo, están involucrados en la hidrólisis de la sacarosa (Reddy & Maley 1996). En concordancia con todas las invertasas de plantas, Lin9 y Lin10 tiene un péptido señal predicho y un pro-péptido N-terminal el cual es susceptible de ser hidrolizado durante el transporte y la maduración (Yiallourous *et al.* 2002). Los análisis de las secuencias muestran que Lin9 codifica una invertasa vacuolar más que una inverasa de pared celular, mientras que Lin10 tiene mayor similaridad con invertasas de pared celular y con fructan-exohidrolasas. Mientras que Lin9 contiene una valina en el motivo WECXD presente en todas las invertasas vacuolares, Lin10 posee en la misma posición una prolina, al igual que todas las isoenzimas de pared celular (Roitsch *et al.* 1995). Por otra parte, tanto Lin9 como Lin10 se predice que codifiquen para péptidos con puntos isoeléctricos (pI) ácidos, característica de las invertasas vacuolares, porque las invertasas de pared celular tienen puntos isoeléctricos más elevados para unirse a los componentes ácidos de la pared celular. Los datos proporcionados por el análisis del clon genómico de Lin10, muestran una estructura típica de los genes de invertasas (Tymowska-Lalanne & Kreis 1998) y de fructan-exohidrolasas (Michiels *et al.* 2004), incluyendo el mini exón que codifica el tripéptido DPN seguido de un intrón corto, a diferencia de algunas de las enzimas con las que da homología (fructan-exohidrolasas), en las que el mini exón está seguido de un intrón más largo.

En el intento de estudiar la función de Lin9 y Lin10 *in vivo* mediante expresión heteróloga en un mutante de *S. cerevisiae* deficiente en actividad invertasa, se utilizaron dos "isoformas" de Lin9 identificadas (Lin9 y GLin9), que se diferencian en 75pb. La expresión heteróloga, en ninguno de los casos tuvo éxito, lo que puede deberse a distintos factores, pero el principal sería el cambio de la estructura de las proteínas en las células de levadura viva con respecto a la que tienen en las células de tomate. Sin embargo, cuando se ensaya la actividad

invertasa en extractos de proteínas aisladas de levadura, sólo se detecta actividad invertasa en los extractos de proteínas aislados de la levadura transformada con la "isoforma" de Lin9 de mayor número de nucleótidos (Lin9), lo que significa que el DNAC de GLin9 codifica una proteína no funcional.

Debido a la alta homología de Lin10 además de con invertasas con fructoexohidrolasas, el siguiente paso, fue la medida de esa actividad enzimática en los extractos proteicos de levadura. Como resultado se obtuvo que Lin10 posee actividad β -(2-1)-fructoexohidrolasa. Estos datos coinciden con descubrimientos recientes, en los que genes clasificados por homología de secuencia con invertasas asociadas a pared, se ha mostrado que funcionalmente son fructo-exohidrolasas (Van den Ende *et al.* 2003b; De Coninck *et al.* 2005), a pesar de tener como sustrato compuestos de reserva que se almacenan en la vacuola (fructanos), por lo que sería lógico pensar que por su localización tuviesen más homología con invertasas vacuolares (Wiemken *et al.* 1986; Darwin & John 1989).

Se ha aislado y caracterizado por primera vez un gen de tomate que codifica para una fructan-exohidrolasa (FEH) y que está regulado por la simbiosis MA (Lin10). La planta de tomate no sintetiza fructanos, pero hay información reciente de la presencia de FEHs en este tipo de plantas (Van den Ende *et al.* 2003b; Van den Ende *et al.* 2004; De Coninck *et al.* 2005). El papel de las FEHs en estas plantas no sintetizadoras de fructanos no está del todo claro, pero una posibilidad, es que los sustratos de este tipo de enzimas no sean endógenos, sino que degradarían fructanos procedentes de otros microorganismos, siendo un ejemplo los exudados que contienen fructanos de bacterias endofíticas y fitopatógenas (Hettwer *et al.* 1995; Bereswill *et al.* 1997). Dichos fructanos de los exudados, prevendrían al patógeno de ser reconocido por la planta, con lo que la actividad FEH de la planta, prevendría la infección. Otra hipótesis, es que las FEHs podrían estar implicadas en el establecimiento de la simbiosis entre las plantas y las bacterias endofíticas (Tallgren *et al.* 1999; Hernandez *et al.* 2000), por lo que se puede pensar, que la gran inducción de Lin10 en las plantas micorrizadas, se podría deber a que los hongos micorrízicos tuviesen entre sus componentes de la pared fructanos, y la planta mediante la actuación de Lin10, sería responsable de la respuesta de defensa (aunque más débil) que se da en el establecimiento de la simbiosis MA. Sí hay datos sobre la alteración de las cantidades de estos polisacáridos de reserva en plantas micorrizadas (Müller *et al.* 1999), siendo mayores en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas. Por el contrario, la fertilización causó un descenso general en las cantidades de fructanos en las raíces, mostrando que el efecto de la micorriza no se debe a la mejora en la nutrición de

las plantas micorrizadas (Douds *et al.* 1988). Por todo esto, se podría concluir que el establecimiento de la simbiosis induce la producción de fructanos.

Aunque está por determinar si los hongos MA producen fructanos, sí hay datos sobre varias cepas de hongos que los sintetizan, aunque no se conozca el papel fisiológico que desempeñan. Se ha puesto de manifiesto la síntesis de fructanos en hongos como *Aspergillus foetidus* (Rehm *et al.* 1998), *Aspergillus niger* (Hirayama *et al.* 1989) y *Fusarium oxysporum* (Patel *et al.* 1997). La síntesis de inulinas de elevado peso molecular fue demostrada para *Penicillium chrysogenum* (Olah *et al.* 1993) y *Aspergillus sydowi* IAM 2544 (Kawai *et al.* 1973; Harada *et al.* 1994). Con todos estos datos se podría pensar que los hongos formadores de micorrizas también formasen este tipo de compuestos de reserva.

Otra posibilidad con la que se especula, es que los derivados de la sacarosa u homólogos como la 6-kestosa y la trehalosa formados en la hidrólisis de fructanos, actúen como señales que son capturadas por sensores específicos, por lo que esta señal tendría que ser destruida después de ser recibida, y esta función la podrían llevar a cabo enzimas altamente específicas como las FEHs. Por lo tanto, si los hongos MA produjesen fructanos, otra posible función de Lin10 sería la de mediar en los posibles procesos de señalización mediados por las sustancias derivadas de su actuación enzimática.

Las plantas tienen una familia de genes de invertasas ácidas, cuyos miembros se expresan independientemente en tiempos y en tejidos específicos durante el desarrollo de la planta (Sturm 1999). Se ha analizado la regulación de los genes aislados (Lin9 y Lin10) así como de otras isoformas de invertasas de tomate presentes en la base de datos (TIV1, Lin5, Lin6, Lin7 y Lin8) por el desarrollo de la simbiosis con dos hongos MA. En dicho análisis, se ha encontrado que de los cuatro genes que codifican invertasas de pared celular, sólo Lin6 se detectó en raíces micorrizadas, indicando que el desarrollo de la simbiosis no induce la síntesis *de novo* de las isoformas de invertasas de pared celular de tomate de las que se tenían noticias (Godt & Roitsch 1997). La estimulación de la expresión de un gen que codifica para una invertasa de pared celular por la colonización MA en raíces de tomate, está de acuerdo con los resultados de Wright y colaboradores (1998), quien informó de la mayor actividad de la invertasa de pared celular en plantas de trébol micorrizadas, en comparación con las plantas no micorrizadas. En un estudio previo, Blee & Anderson (2002), no detectaron aumento de los niveles transcripcionales de una invertasa de pared celular en las raíces micorrizadas de zanahoria. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que las invertasas de pared celular, están codificadas por familias multigénicas, cuyos

miembros presentan una regulación órgano-, desarrollo-, y medio ambiente-específica.

La inducción de los niveles de Lin6 en las raíces micorrizadas en ambos tiempos de cosecha, sugiere que la proteína codificada por este gen, tiene una función importante en la hidrólisis de la sacarosa en el apoplasto durante la asociación MA. La distribución tejido-específica de Lin6 y su regulación por estímulos internos y externos, ha permitido proponer una función importante para esta invertasa apoplástica en la regulación fuente-sumidero, y en el suministro de carbohidratos a los tejidos sumidero (Goetz *et al.* 2000). La activación de la expresión génica de Lin6 en las raíces micorrizadas, podría representar un mecanismo que contribuiría al aumento de la fuerza sumidero que se produce en la colonización micorrícica (Graham 2000). Como las estructuras intraradicales de los hongos MA no pueden tomar sacarosa (Shachar-Hill *et al.* 1995; Solaiman & Saito 1997), Lin6 podría ser responsable de la hidrólisis de la sacarosa liberada en el apoplasto de la interfase simbiótica, para liberar hexosas que tomaría el hongo para su crecimiento y metabolismo. Alternativamente, las hexosas liberadas de la hidrólisis de la sacarosa, también las podrían absorber las células de las raíces huésped para hacer frente al aumento de su actividad metabólica. Esta hipótesis, es apoyada por la observación de Harrison (1996), donde la formación de la simbiosis MA se acompaña de una inducción de un transportador de hexosas, que potencialmente funciona para suministrar azúcares a las células de la raíz involucradas en la asociación simbiótica. En esta Memoria, se ha demostrado por primera vez, la inducción de una invertasa de pared celular en una asociación MA, lo que apoya el supuesto generalizado de que la transferencia de carbono a través de la interfase simbiótica, requiere la hidrólisis de la sacarosa del huésped mediante una invertasa de pared celular (Ferrol *et al.* 2002a). La importancia de la invertasa de pared celular del huésped para proporcionar hexosas al compañero fúngico se ha demostrado en ectomicorrizas. La expresión heteróloga de una invertasa de levadura altamente activa en híbridos de álamo, tuvo un profundo efecto sobre la disponibilidad de hexosas y como consecuencia, sobre el metabolismo y el desarrollo fúngico después de la formación de la micorriza (Guttenberger 1998).

Las invertasas vacuolares determinan el nivel de la sacarosa almacenada en la vacuola, y juegan un papel importante en la movilización de la sacarosa para los procesos metabólicos (Roitsch & González 2004). El análisis de expresión de las dos invertasas vacuolares (Lin9 y TIV1), reveló que estos genes se regulaban de forma diferente durante la simbiosis. Mientras que Lin9 no se regulaba por el desarrollo de la simbiosis, TIV1 estaba inducido en raíces de tomate donde la simbiosis estaba bien establecida. La inducción de los niveles de ARNm de la isoenzima de invertasa

vacuolar TIV1 en las raíces de tomate micorrizadas, está de acuerdo con las observaciones previas de Blee & Anderson (2002), quienes encontraron una acumulación de transcritos de la invertasa vacuolar en células corticales de *Phaseolus vulgaris* que contenían arbuscúlos. Estos datos, sugieren que TIV1 podría suministrar hexosas para hacer frente a la elevada actividad metabólica y tasa de respiración de los tejidos colonizados en una raíz micorrizada (Gianinizzi-Pearson 1996). La diferente regulación de TIV1 en las raíces colonizadas por *G. mosseae* ó *G. intraradices*, evocan que la utilización del carbono en las raíces de tomate depende probablemente de la especie de hongo MA que esté implicado en la simbiosis.

La activación del gen de una sacarosa sintasa (TOMSSF) durante la simbiosis MA en raíces de tomate, está de acuerdo con observaciones previas en otras especies de plantas como *P. vulgaris* (Blee & Anderson 2002), *Medicago truncatula* (Hohnjec *et al.* 2003) y *Zea mays* (Ravnskov *et al.* 2003), y con el aumento de actividad invertasa encontrada en raíces micorrizadas de trébol y soja (Wright *et al.* 1998; Schubert *et al.* 2003). Experimentos de hibridación *in situ* en *P. vulgaris*, mostraron que los transcritos para la sacarosa sintasa, estaban localizados en los tejidos del floema y en las células corticales que contenían arbuscúlos fluorescentes (Blee & Anderson 2002). En *M. truncatula*, de los cinco genes de sacarosa sintasa analizados, sólo *MtSucS1* estaba inducido en las raíces micorrizadas, y una fuerte expresión *GusA* impulsada por el promotor de *MtSucS1* se detectaba en el cilindro central de la raíz, así como en las células corticales que contenían arbuscúlos y en las células corticales circundantes, sin consideración de un contacto directo con las estructuras fúngicas (Hohnjec *et al.* 2003). Basándonos en estas observaciones, se propone, que la sacarosa sintasa genera fuerza sumidero durante la fase activa de la simbiosis, lo que está apoyado porque la inducción del gen TOMSSF en tomate, aumenta con los niveles de colonización del sistema radical por ambos hongos *G. mosseae* ó *G. intraradices*. Como la sacarosa sintasa se localiza en el citosol, es más probable que esta enzima participe suministrando hexosas para hacer frente al aumento de actividad metabólica de las células de la raíz, más que en el suministro de compuestos carbonados al hongo.

La inducción transcripcional de las enzimas que hidrolizan sacarosa en las raíces de plantas micorrizadas de cuatro semanas, coincide con la disminución de los niveles de sacarosa detectados en esas raíces. En el segundo tiempo de cosecha como se mencionó anteriormente, el contenido de sacarosa en las raíces micorrizadas aumenta, sugiriendo que se está digiriendo más sacarosa a las raíces de las plantas micorrizadas, probablemente para compensar el coste extra debido a la presencia del hongo. En las plantas de tomate, se produce la inducción de la

invertasa de pared celular sumidero-específica Lin6 y de genes de defensa, en respuesta a la infección por el patógeno *Pseudomonas syringae* (Berger *et al.* 2004). Se ha propuesto, que una elevada actividad invertasa en interacciones planta-patógeno, podría satisfacer tanto el aumento de la demanda de carbohidratos como fuente de energía para los tejidos invadidos, como para generar una señal que induzca la expresión de los genes de defensa (Roitsch *et al.* 2003). Nuestros datos sugieren que los genes Lin6, TOMSSF y TIV1, podrían ser incluso un componente de la ruta de transducción de señales que modula las respuestas de defensa inducidas por los hongos MA (Pozo *et al.* 2002).

Los datos de regulación de la expresión génica en raíces por el fósforo suministrado, muestran, que ninguna de las inducciones observadas por el desarrollo de la simbiosis de los genes TIV1, Lin6, Lin10 y TOMSSF se debe a la mejora de la nutrición fosforada que proporciona la formación de la simbiosis a la planta (Raghotama 1999, Smith *et al.* 2004). Los genes TIV1, Lin6 y TOMSSF no se regulan por la cantidad de fosfato suministrada a las plantas, y Lin10 se inhibe cuando la nutrición fosforada es mayor, lo que indica que la fuerte inducción de su expresión génica en plantas micorrizadas, se debe al establecimiento de la simbiosis, ya que si sólo tuviese efecto la mejor nutrición fosforada proporcionada por los hongos MA, la expresión génica de Lin10 debería inhibirse respecto a las plantas control. Sin embargo, la expresión de la invertasa vacuolar Lin9 no regulada por la simbiosis MA, sí se regula por fósforo a las seis semanas, donde se inhibe su expresión cuando el aporte de fósforo aumenta. Como conclusión, se puede decir, que los genes estudiados que están regulados por la simbiosis MA y presentan una inducción de la expresión génica, dicha inducción es consecuencia directa del establecimiento de la simbiosis y no de efectos de nutrición de dicha simbiosis sobre la planta hospedadora.

La inducción de Lin6 y Lin10 en las raíces de las plantas infectadas con *P. parasitica*, indica que la regulación de estos genes podría ser una respuesta generalizada en interacciones planta-microorganismo. TIV1 y TOMSSF sin embargo, no alteran sus niveles de ARNm cuando las plantas se infectan con el hongo patógeno de raíz, por lo que su regulación es específica de las interacciones planta-hongo micorrízico arbuscular. Y en nuestro estudio, también encontramos el gen Lin9, que no se regula por la simbiosis MA, y sí por la interacción planta-patógeno. Las invertasas de las plantas, se inducen con la infección de hongos biotrófos (Chou *et al.* 2000; Fotopoulos *et al.* 2003), lo que es indicativo de que el patógeno actúa como un sumidero adicional que compite en cierto modo con los órganos sumidero de la propia planta. La observación de que la expresión de una isoforma de invertasa vacuolar disminuye mientras que la de una invertasa asociada a pared

aumenta en raíces de *V. faba* cuando se infecta con el patógeno *Uromyces fabae* (Voegelé *et al.* 2006), está de acuerdo con nuestros resultados donde se induce la expresión de la invertasa asociada a pared celular Lin6, mientras que la invertasa vacuolar TIV1 no altera su expresión cuando está presente el patógeno. En arroz, también se inducen algunas de las isoformas de invertasas de pared celular en presencia de patógenos (Cho *et al.* 2005), lo que sugiere que dichos genes pueden participar en el encendido metabólico para resistir la invasión del patógeno. La inducción mediada por patógeno y no por micorrizas de la otra isoforma estudiada de invertasa vacuolar (Lin9), es un dato más de que dentro de las familias multigénicas como es el caso de las invertasas, cada isoforma puede tener un patrón de expresión diferente frente el mismo estímulo, por lo que se le podría asignar a Lin9 una función en el encendido metabólico para resistir a la invasión por *P. parasitica* en la planta de tomate. Sin embargo, no hay datos de lo que ocurre con la expresión de sacarosa sintasa y fructan-exohidrolasa en plantas infectadas con patógenos. La sacarosa sintasa TOMSSF al no regularse en presencia de patógeno, indica que su respuesta es planta-hongo MA específica, mientras que Lin10 si da una respuesta generalizada en las interacciones planta-microorganismo.

Como conclusión, dado que Lin10 es una enzima que también libera hexosas, contribuiría junto con Lin6, a cubrir la demanda de carbohidratos por parte de las raíces colonizadas por *G. mosseae*, *G. intraradices*, ó infectadas con *P. parasitica*, para cubrir el aumento de la actividad metabólica de las células colonizadas ó infectadas, así como para proporcionar carbohidratos al hongo MA. Sin embargo, TIV1 y TOMSSF, solo contribuirían a cubrir la demanda de carbohidratos y el aumento de la actividad metabólica de las células colonizadas por los hongos MA, y Lin9 participaría en el abastecimiento de carbohidratos sólo de las células infectadas con el patógeno y no de las colonizadas con los hongos micorrícicos.

El análisis de la abundancia relativa de los transcritos de todos los genes analizados previamente en raíces, se llevo a cabo también en hojas, donde solo se detectó expresión de Lin6 y TOMSSF, teniendo ambos genes inducida su expresión por la presencia de ambos hongos MA, Gi y Gm. En estudios anteriores, se ha puesto de manifiesto, que ni la invertasa apoplástica Lin6 ni la sacarosa sintasa TOMSSF, se expresa en hojas de tomate (Godt & Roitsch 1997) en condiciones normales, por lo que el aumento de expresión encontrado en esta Memoria en hojas de plantas micorrizadas, es una consecuencia directa de la formación de la simbiosis. Ambos genes proporcionarían hexosas a partir de la sacarosa acumulada en las hojas, para hacer frente al aumento de la demanda de carbohidratos de los tejidos sumidero. La inducción de Lin6 y TOMSSF en respuesta a heridas y

tratamientos con elicitores (Godt & Roitsch 1997; Ohyama *et al.* 1998) en hojas, indica que estos genes son importantes en el metabolismo de respuesta frente a estímulos relacionados con el estrés, ya que el aumento de carbohidratos resultantes de su acción, proporcionan energía metabólica para la activación de una cascada de respuestas de defensa. Incluso en zanahoria se ha mostrado la inducción de la invertasa vacuolar como respuesta a situaciones de estrés como heridas e infección con patógenos (Sturm & Chrispeels 1990). Por lo tanto, es lógico que frente al establecimiento de la simbiosis MA, que no deja de ser una situación de estrés, se de también la inducción de estos genes.

El análisis del ARNm de la invertasa vacuolar Lin9 y la fructan-exohidrolasa Lin10, indica, que ambos genes se expresan de forma diferencial en los distintos tejidos de la planta. El ARNm de Lin9 está presente fundamentalmente en flores, mientras que la otra isoforma conocida de invertasa vacuolar de tomate (TIV1) se expresa fundamentalmente en los pétalos dentro de ese órgano. TIV1 se expresa intensa y preferencialmente en fruto maduro (Godt & Roitsch 1997), donde esta ausente Lin9, que sin embargo, a diferencia de TIV1 si se expresa en fruto inmaduro. También es de destacar la expresión de Lin9 en sépalos, donde esta ausente el ARNm de TIV1. La distribución tejido-específica de las dos isoformas de invertasa vacuolar de tomate (TIV1 y Lin9), muestra que tienen un patrón de expresión distinto en los distintos tejidos, lo que suele ocurrir dentro de los genes que están compuestos por familias multigénicas. La expresión génica preferencial de Lin9 en flores, coincide con Lin7 (invertasa extracelular), que se expresa exclusivamente en flores y sépalos (Godt & Roitsch 1997), lo que sugiere una función específica de ambos genes en el metabolismo de los tejidos sumidero, suministrando carbohidratos a los órganos florales. No hay datos sobre la distribución tejido-específica de las FEH. Los niveles más altos de Lin10 se detectaron en tallo y raíz, lo que confirma la función de este gen en los tejidos sumidero, no se detectan niveles de ARNm de este gen en hojas jóvenes, y la expresión es muy baja en flores, sépalos y fruto maduro.

La regulación de los genes Lin6, Lin9, Lin10, TIV1 y TOMSSF por azúcares, está de acuerdo con observaciones previas que dan un papel central a las hexosas o la sacarosa en el control de las enzimas metabólicas en las plantas superiores (Rolland *et al.* 2002). La inducción de estos genes, excepto en el caso de Lin9, en raíces de plántulas de tomate expuestas a glucosa, sugiere que la concentración más elevada de hexosas resultante de la hidrólisis de la sacarosa, induce sus expresiones mediante una regulación de retroalimentación positiva. La inducción por glucosa está de acuerdo con la inducción de un número de enzimas sumidero-específicas (Koch & Nolte 1995) por este azúcar. Además, ya había datos de la

inducción de la expresión génica de alguno de los genes estudiados como Lin6, por la adición de glucosa en cultivos celulares en suspensión tras 12h (Godt & Roitsch 1997), mientras que el ARNm de la sacarosa sintasa no se afectaba, lo que puede deberse a los distintos sistemas experimentales utilizados y a la variación de las concentraciones utilizadas (20mM frente a los 40mM que utilizamos en nuestro estudio). Sin embargo, las concentraciones más bajas de glucosa y fructosa que se han encontrado en las raíces micorrizadas, apoyan la existencia de un mecanismo alternativo para la regulación de estos genes en las raíces en simbiosis. Se tienen noticias de la acumulación del componente de señalización ácido salicílico (Blilou *et al.* 1999), y de la fitohormona ácido abscísico (ABA) en raíces micorrizadas (Dannenger *et al.* 1992; Meixner *et al.* 2005). Por lo tanto, la inducción de la expresión de Lin6, Lin10, TOMSSF y TIV1 por ácido salicílico, y la de TOMSSF y TIV1 por ácido abscísico, sugiere que estos compuestos deben estimular la inducción de la expresión de esos genes en las raíces micorrizadas. Recientemente, se ha puesto de manifiesto de forma evidente, la estrecha relación entre ABA y el control del metabolismo de carbohidratos, basada en resultados de aproximaciones genéticas para identificar componentes de las rutas de respuesta a azúcares (revisado en Rook & Bevan 2003).

En conclusión, todos estos datos indican que el desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular, induce genes del metabolismo de la sacarosa, reflejando un aumento del catabolismo y de la utilización de la sacarosa en las raíces de tomate micorrizadas. Futuros detalles del análisis de los promotores usando fusiones GUS, y el análisis de plantas *knock out* para Lin6, Lin10, TIV1 y TOMSSF mediante ARN de interferencia, proporcionarían datos sobre sus funciones específicas en la simbiosis, así como cuáles son los elementos reguladores que son necesarios para sus activaciones transcripcionales en las raíces micorrizadas.

Dando un paso más en el estudio de los mecanismos que subyacen en la transferencia de carbono en las micorrizas arbusculares, se ha identificado un gen que codifica para un posible transportador de azúcares (LeST3), que aumenta su expresión en hojas, aunque no en raíces, de plantas micorrizadas. Basándonos en la similitud de su secuencia, los motivos conservados que presenta y su topología de membrana predicha, el gen de tomate LeST3 se ha clasificado como un posible transportador de monosacáridos, de la familia de los portadores de azúcares, incluida en la superfamilia de los facilitadores mayores (Saier *et al.* 1999). Sin embargo, el análisis filogenético sugiere que aunque son homólogos, LeST3 es claramente diferente de los transportadores de monosacáridos de membrana plasmática que se han caracterizado funcionalmente.

El intento de estudiar su función *in vivo* mediante expresión heteróloga en un mutante de *S. cerevisiae* deficiente en el transporte de hexosas no tuvo éxito. En este caso, es interesante apuntar, que la proteína LeST3 está estrechamente relacionada con la proteína ERD6 de *Arabidopsis* y con un posible transportador de azúcares del azúcar de la remolacha cuya actividad tampoco se detectó en células de levadura (Chiou & Bush 1996; Kiyosue *et al.* 1998). Se pueden argumentar diferentes posibilidades para explicar estos hechos: (1) que la estructura nativa de la proteína LeST3 en las células de levadura sea diferente de la que posee en tomate, (2) que la proteína codificada por el gen LeST3 esté involucrada en la salida de azúcares más que en el importe ó (3) que la proteína se dirija a una membrana intracelular. Aunque en la secuencia de aminoácidos deducida de LeST3 no se han encontrado señales para la dirección intracelular de la proteína, se ha observado que este gen tiene mayor homología con los transportadores de azúcares localizados en el tonoplasto del azúcar de la remolacha y con los transportadores intracelulares de glucosa de mamíferos que con los transportadores de membrana plasmática de plantas, lo que sugiere que la proteína codificada por LeST3 podría estar localizada en el tonoplasto. Los sistemas de transporte para la entrada y salida de azúcares en las vacuolas de las células de las plantas están aún a la espera de ser identificados y caracterizados (Lalonde *et al.* 2004). Se ha propuesto que la sacarosa almacenada en la vacuola es hidrolizada por una invertasa vacuolar para generar hexosas, las cuales se liberan lentamente al citosol donde constituyen una fuente de carbono fácilmente accesible (Sturm & Tang 1999). Por tanto, el papel de un transportador de hexosas del tonoplasto, podría ser el de suministrar la cantidad adecuada de carbono al citosol cuando hay un incremento de la demanda de carbohidratos por parte de las células. Si la proteína codificada por LeST3 está localizada en el tonoplasto, como sugiere su análisis filogenético, podría estar implicada en la salida de glucosa desde la vacuola. Se necesitaran futuros experimentos para localizar la proteína codificada.

El análisis de la regulación de LeST3 durante la colonización por dos hongos MA diferentes, ha mostrado que el desarrollo de la simbiosis aumenta los niveles de expresión de LeST3 en hojas pero no en raíces de las plantas de tomate. Los hongos MA, como simbiontes obligados, dependen para su crecimiento y para su actividad, de los componentes carbonados suministrado por el compañero fotosintético (Jennings 1995), y previamente se ha observado que la distribución de carbono aumenta en las raíces durante la asociación micorrízica (Douds *et al.* 1988; Wrigth *et al.* 1998). Por tanto, la inducción de LeST3 por el desarrollo de la simbiosis, puede estar relacionada con el incremento de la distribución del carbono que ocurre en las asociaciones micorrícicas. En un trabajo previo, la inducción de

dos isoformas de H⁺-ATPasa en hojas de plantas micorrizadas, se asoció con el incremento en la actividad de distribución de asimilados (Ferrol *et al.* 2002c). Anterior al trabajo de esta Memoria, Harrison (1996) ya observó, que la colonización de raíces de *Medicago truncatula* por el hongo micorrícico *G. vermiforme*, inducía la expresión del gen transportador de monosacáridos MtST1 en las zonas del córtex de la raíz que se encontraban colonizadas en un alto grado por el hongo micorrícico. En este caso, se propuso que dicha inducción podría ser una consecuencia de la necesidad por parte de las células huéspedes colonizadas de adquirir más hexosas para hacer frente a su incrementado metabolismo. Que LeST3 no se regule en las raíces por la simbiosis no es sorprendente, ya que los transportadores de azúcares se presentan como familias multigénicas en las plantas superiores, y hay evidencias de que las distintas isoformas se expresan de forma específica según la célula, el tejido, y el estado de desarrollo de la planta, lo que proporciona mecanismos potenciales para la regulación local de los transportadores de azúcares (Barrer *et al.* 2000; Gear *et al.* 2000).

La inducción de LeST3 en las hojas de las plantas infectadas con *P. parasitica*, indica que la regulación de este gen podría ser una respuesta generalizada en las interacciones planta-microorganismo. Cuando las plantas son sometidas a la infección por patógenos, normalmente, el metabolismo de la planta responde aumentando la respiración, sintetizando componentes reparadores de heridas, reforzando la pared celular, y produciendo compuestos de defensa (Baker *et al.* 2000; Moershbacher & Mendgen 2000). Esa actividad metabólica incrementada, se alimenta probablemente por un aumento del flujo de azúcares hacia los sitios de infección. Se ha informado que en hojas de *Arabidopsis* infectadas con el patógeno *Erysiphe cichoracearum*, la absorción de glucosa en los tejidos huésped aumenta tras la infección fúngica, y esto coincide con la inducción de la expresión del gen del transportador de monosacáridos AtSTP4 (Fotopoulos *et al.* 2003). El transportador de monosacáridos AtSTP4 inducido por heridas y sumidero-específico, se induce también (aproximadamente cuatro veces) en plántulas de *Arabidopsis* infectadas con *Alternaria brassicicola*, *Fusarium axyפורum* y en suspensión de cultivo células de *Arabidopsis* tratadas con elicitores bacterianos ó fúngicos, por lo que se ha propuesto que este transportador regula el importe de monosacáridos al interior de los tejidos sumidero para hacer frente al aumento de la demanda de las células que responden a los estreses medioambientales (Truernit *et al.* 1996). Nuestros datos sugieren que LeST3 responde al aumento de la demanda de carbohidratos por parte de las raíces colonizadas por *G. mosseae*, *G. intraradices*, ó infectadas con *P. parasitica*, para

cubrir el aumento de actividad metabólica de las células colonizadas/infectadas, ó para proporcionar carbohidratos al hongo MA.

Se ha descrito que los azúcares juegan un papel importante en señalización (Koch 2004). Una hipótesis alternativa sería considerar a LeST3 como un componente de la ruta de transducción de señales que desencadena la respuesta de defensa en una asociación micorrícica con éxito (Pozo *et al.* 1998), y en una interacción planta-patógeno (Herbers *et al.* 1996). Aunque los hongos MA son capaces de inducir respuestas de defensa en las raíces de sus plantas huésped, se acepta que estas reacciones son transitorias, localizadas y más débiles que las inducidas por los hongos patógenos (Pozo *et al.* 2002). La inducción de LeST3 por la simbiosis se detectó en la parte aérea seis semanas después de la inoculación micorrícica, pero no se conoce todavía el papel de la simbiosis en la inducción de resistencia en la parte aérea del tomate.

Como conclusión, se puede decir que el gen LeST3 codifica un posible transportador de azúcares, cuya expresión aumenta en hojas de una planta bien colonizada por un hongo MA ó por uno patógeno de raíz. La regulación de este gen por la interacción entre la raíz de la planta y ambos tipos de hongos en las hojas de la planta, sugiere que dicho gen podría estar implicado en la distribución de los compuestos carbonados desde los tejidos fuente a los sumidero. Para el entendimiento del papel preciso de este gen, es necesaria la localización de este transportador y el análisis de su expresión en otras interacciones planta-microbio.

CONCLUSIONES

1. Se ha aislado y caracterizado un gen que codifica para una invertasa vacuolar, Lin9, cuya expresión no se regula por el establecimiento de la micorriza. Se expresa principalmente en flores, pero no se detecta expresión en fruto maduro. La expresión de este gen aumenta en raíces infectadas con el patógeno de raíz *P. parasitica*.
2. Se ha aislado y caracterizado por primera vez un gen de tomate (Lin10) que codifica para una fructan-exohidrolasa, cuya expresión está fuertemente inducida en las raíces micorrizadas y, en menor grado, en las infectadas con *P. parasitica*, por lo que podría ejercer un papel importante en el abastecimiento de carbohidratos en las interacciones planta-microorganismo. Sus niveles de expresión más elevados se producen en tallo y raíz.
3. La invertasa de pared celular Lin6, aumenta sus niveles de expresión en plantas micorrizadas ó infectadas con *P. parasitica*, lo que sugiere que la proteína codificada por este gen tiene una función importante en la hidrólisis de la sacarosa en el apoplasto para el funcionamiento de la micorriza y para hacer frente al sumidero adicional que supone el patógeno para la planta.
4. La expresión de la invertasa vacuolar de tomate TIV1 aumenta exclusivamente en raíces de tomate con un determinado nivel de micorrización y su expresión no se regula en la interacción planta-patógeno. La diferente regulación de TIV1 en las raíces colonizadas por *G. mosseae* ó *G. intraradices*, sugiere que la utilización del carbono en las raíces de tomate depende de la especie de hongo micorrícico implicado en la simbiosis.
5. La activación del gen de una sacarosa sintasa (TOMSSF) durante la simbiosis micorrícica aumenta con los niveles de colonización del sistema radical por *G. mosseae* y *G. intraradices*, mientras que no se regula por la presencia del patógeno *P. parasitica*. Este gen proporciona metabolitos y genera fuerza sumidero durante la fase activa de la simbiosis.
6. Las inducciones observadas por el desarrollo de la simbiosis en los genes TIV1, Lin6, Lin10 y TOMSS) se deben directamente al establecimiento de la simbiosis y no a la mejora de la nutrición fosforada de la planta como consecuencia de la formación de la micorriza.
7. De todos los genes estudiados sólo se expresan en hojas Lin6 y TOMSSF. La inducción de su expresión en plantas micorrizadas es consecuencia directa de la formación de la simbiosis.

8. La expresión de Lin6, Lin9, Lin10, TIV1 y TOMSSF es regulada por glucosa, ácido abscísico y ácido salicílico.
9. Se ha aislado el gen de tomate LeST3, que codifica un posible transportador de azúcares cuya expresión aumenta en hojas de una planta bien colonizada por hongos micorrícicos ó por un patógeno de raíz. La regulación de este gen por la interacción de la planta con ambos tipos de hongos sugiere que pudiera estar implicado en la distribución de los compuestos carbonados desde los tejidos fuente a los sumidero.

En resumen se puede concluir que el establecimiento de micorrizas arbusculares regula el metabolismo carbonado de la planta hospedadora para hacer frente al aumento en la demanda de carbohidratos en raíces micorrizadas. Aumenta el transporte de sacarosa a las raíces micorrizadas y la hidrólisis de la misma, lo que está apoyado por la inducción transcripcional de las enzimas responsables de dicha hidrólisis. Las hexosas resultantes son rápidamente utilizadas como fuente de energía. Tanto la enzima responsable de la fijación de CO₂ (RuBisCo), como la responsable de la síntesis de sacarosa (SPS), se inducen en las hojas de las plantas micorrizadas para poder responder a la mayor demanda de carbohidratos de la raíz micorrizada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003)** *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15:63-78
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005)** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824-827
- Albrecht G, Mustroph A (2003)** Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. *Planta* 217(2):252-260
- Alexander T, Meier R, Toth E, Weber HC (1988)** Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol* 110:363-370
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990)** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Amijee F, Stribley DP, Tinker PB (1993)** The development of endomycorrhizal root systems. *New Phytol* 123:297-306
- Andersen MN, Asch F, Wu Y, Jensen CR, Naested H, Mogensen VO, Koch KE (2002)** Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. *Plant Physiol* 130:591-604
- Aoshima H, Yamada M, Sauer N, Komor E, Schobert C (1993)** Heterologous expression of the H⁺/hexose cotransporter from *Chlorella* in xenopus oocytes and its characterization with respect to sugar specificity, pH and membrane-potential. *Journal of Plant Physiol* 141 (3):293-297
- Arnold T, Schultz J (2002)** Induced sink strength as a prerequisite for induced tannin biosynthesis in developing leaves of *Populus*. *Oecologia* 130:585-593
- Asano T, Kunieda N, Omura Y, Ibe H, Kawasaki T, Takano M, Sato M, Furuhashi H, Mujin T, Takaiwa F, Wu CY, Tada Y, Satozawa T, Sakamoto M, Shimada H (2002)** Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: Phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. *Plant Cell* 14 (3):619-628
- Aono T, Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ, Saito M (2004)** Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas. *New Phytol* 162:525-534

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (2005) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc.

Azcón-Aguilar C, Bago B, Barea JM (1998) Saprophytic growth of arbuscular-mycorrhizal fungi. In A Varma, B Hock, eds Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology. Springer, Heidelberg, pp 391-408

Azcón-Aguilar C, Bago B (1994) Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture. ALS, Birkhäuser, pp. 47-60

Azcón-Aguilar C, Barea JM (1997) Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. Scientia Horticulture 68: 1-24

Azcón-Aguilar C, Díaz-Rodríguez RM, Barea JM (1986) Effect of free-living fungi on the germination of *G. mosseae* on soil extract. In V Gianinazzi-Pearson, S Gianinazzi, eds Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. INRA, Paris, pp 515-519

Azcón-Aguilar C, Jaizme-Vega MC, Calvet C (2002) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In Mycorrhizal technology in agriculture. Birkhäuser Verlag, Germany, pp 187-197

Azcón R (1987) Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* *in vitro*: effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. Soil Biol Biochem 19: 417-419

Bago B (2000) Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 226: 263-274

Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piché Y (1998b) Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 139: 375-388

Bago B, Azcón-Aguilar C, Piché Y (1998a) Architecture and development dynamics of the external mycelium at the arbuscular mycorrhizal *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. Mycologia 90: 52-62

Bago B, Chamberland H, Goulet A, Vierheilig H, Lafontaine JG, Piché Y (1996) Effect of nikkomycin Z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular-mycorrhizal fungi. Protoplasma 192: 80-92

Bago B, Pfeffer P, Abubaker J, Jun J, Allen J, Brouillette J, Douds D, Lammers P, Shachar-Hill Y (2003) Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. Plant Physiol 131: 1496-1507

- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000)** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol* 124:949-957
- Bago B, Pfeffer P, Shachar-Hill Y (2001)** Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytol* 149:4-8
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2002)** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol* 128:108-124
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Piché Y (1999)** Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by in vivo two-photon microscopy. *Protoplasma* 209:77-89
- Balestrini R, Hahn MG, Faccio A, Mendgen K, Bonfante P (1996)** Differential localization of carbohydrate epitopes in plant cell walls in the presence and absence of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol* 111:203-213
- Balestrini R, Romera C, Puigdomenech P, Bonfante P (1994)** Location of a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein, cellulose and β -1,3-glucans in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots. *Planta* 195:201-209
- Balibrea ME, Cuartero J, Bolarin MC, Perez-Alfocea F (2003)** Sucrolytic activities during fruit development of *Lycopersicon* genotypes differing in tolerance to salinity. *Physiol Plantarum* 118(1):38-46
- Barea JM (1991)** *Advances Soil Science*. Springer Verlag. pp 1-10
- Barea JM (2000)** Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. *Biological Resource Management Connecting Science and Policy* (OECD). In: JP Toutant, E Balazs, E Galante, JM Lynch, JS Schepers & PA Werry eds. INRA. Editions and Springer
- Barea JM, Azcon-Aguilar C (1983)** Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Adv. Agron* 36:1-54
- Barea JM, Azcon-Aguilar C, Ocampo JA, Azcón R (1991)** Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En J Olivares, JM Barea eds *Fijación y Movilización biológica de Nutrientes*. Vol. LL. *Fijación de N y Micorrizas*. CSIC, Madrid pp 149-173
- Barea JM, Jeffries PJ (1995)** Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems. In A Varma, B Hock, eds *Mycorrhiza*. Springer-Verlag, Berlin, pp 521-560
- Barker L, Kühn 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

- Bartinicki-García A (1968)** Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol* 22:87-108
- Baumert A, Mock HP, Schmidt J, Herbers K, Sonnewald U, Strack D (2001)** Patterns of phenylpropanoids in non-inoculated and potato virus Y-inoculated leaves of transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase. *Phytochemistry* 56(6):535-541
- Baylis GTS (1967)** Experiments on the ecological significance of phycomycetous mycorrhizas. *New Phytol* 66:231-243
- Bécard G, Doner LW, Rolin DB, Doude DD, Pfeffer PE (1991)** Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *in vivo* ¹³C NMR and HPLC analyses. *New Phytol* 118:547-552
- Bécard G, Fortin JA (1988)** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108:211-218
- Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C (2004)** Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can J Bot* 82:1186-1197
- Bécard G, Piché Y (1989)** Fungal growth-stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 55:2320-2325
- Bécard G, Pfeffer PE (1993)** Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma* 174:62-68
- Beilby JP (1980)** Fatty acids and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora laevis*. *Lipids* 15:949-952
- Beilby JP, Kidby DK (1982)** The early synthesis of RNA, protein, and some associated metabolic events in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonius*. *Can J Microbiol* 28:623-628
- Benabdellah K, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (1999)** Plasma membrane ATPase and H⁺ transport activities in microsomal membranes from mycorrhizal tomato roots. *J Exp Bot* 337:1343-1349
- Bereswill S, Jock S, Aldridge P, Janse JD, Geider K (1997)** Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiol and Molecular Plant Pathol* 51(4):215-225
- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T (2004)** Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiol Plantarum* 122(4):419-428

- Berreck M, Hanselwandter K (2001)** Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis upon uptake of cesium and other cations by plants. *Mycorrhiza* 10:275-280
- Bi Y, Li X, Christie P (2003)** Influence of early stages of arbuscular mycorrhiza on uptake of zinc and phosphorus by red clover from a low-phosphorus soil amended with zinc and phosphorus. *Chemosphere* 50:831-837
- Biemelt S, Sonnewald U (2006)** Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *Journal of Plant Physiol* 163:307-318
- Black KG, Mitchell DT, Osborne BA (2000)** Effect of mycorrhizal-enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber. *Plant, Cell and Environment* 23:797-809
- Blee KA, Anderson AJ (1996)** Defense-related transcripts accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenk & Smith. *Plant Physiol* 110:675-688
- Blee KA, Anderson AJ (2002)** Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Mol Biol* 50:197-211
- Bligh EG, Dyer WJ (1959)** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917
- Blilou I, Ocampo JA, García-Garrido JM (1999)** Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. *J Exp Bot* 50:1663-1668
- Bonfante P (2001)** At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. The mycota IX, Fungal Associations Hock (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 45-61
- Bonfante P, Perotto S (1995)** Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting plants. *New Phytol* 130:3-21
- Bonfante-Falsolo P (1984)** Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In Powell CL, Bagyaraj DJ eds VA Mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 35-46
- Bonfante-Fasolo P, Gianinazzi-Pearson V, Scannerini S, Gianinazzi S (1986)** Ultracitological analysis of cellular interactions between fungus and plant in mycorrhizae. *Physl. Veget.* 24:245-252

- Bonfante-Fasolo P, Fontana A (1985)** VAM fungi in *Ginkgo biloba* roots - their association at the cellular level. *Symbiosis* 1:53-67
- Bonfante-Fasolo P, Peretto R, Perotto S (1992)** Cell surface interaction in endomycorrhizal symbiosis. In JA Callow, JR Green, eds *Perspectives in plant cell recognition*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 239-255
- Borisjuk L, Rolletschek H, Wobus U, Weber H (2003)** Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *J Exp Bot* 54:503-512
- Borisjuk L, Walenta S, Rolletschek H, Mueller-Klieser W, Wobus U, Weber H (2002)** Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *Plant J* 29:521-530
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brechenmacher L, Weidmann S, van Tuinen D, Chatagnier O, Gianinazzi S, Franken P, Gianinazzi-Pearson (2004)** Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza* 14:253-262
- Breuninger M, Requena N (2004)** Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genet Biol* 41:794-804
- Breuninger M, Trujillo CG, Serrano E, Fischer R, Requena N (2004)** Different nitrogen sources modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genet Biol* 41:542-552
- Briskin DP, Thornley WR, Wyse RE (1985)** Membrane transport in isolated vesicles from sugar beet tap root: evidence for a sucrose/H⁺ antiport. *Plant Physiol* 78:871-875
- Bosch S, Grof CPL, Botha FC (2004)** Expression of neutral invertase in sugarcane. *Plant Sci* 166:1125-1133
- Bournay AS, Hedley PE, Maddison A, Waugh R, Machray GC (1996)** Exon-skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. *Nucleic Acids Research* 24(12):2347-2351
- Büttner M, Sauer N (2000)** Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim Biophys Acta* 1465:263-274

- Castleden CK, Aoki N, Gillespie VJ, MacRae EA, Quick WP, Buchner P, Foyer CH, Furbank RT, Lunn JE (2004)** Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiol* 135:1753-1764
- Chabaud M, Venard C, Defaux-Petras A, Becard G, Barker DG (2002)** Targeted inoculation of *Medicago truncatula in vitro* root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 156:265–73
- Chávez-Bárceñas AT, Valdez-Alarcón JJ, Martínez-Trujillo M, Chen L, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ, Herrera-Estrella L (2000)** Tissue-specific and developmental pattern of expresión of the rice *sps1* gene. *Plant Physiol* 124:641-653
- Chelius MK, Triplett EW (1999)** Rapid detection of arbuscular mycorrhizae in roots and soil of an intensively managed turfgrass system by PCR amplification of small subunit rDNA. *Mycorrhiza* 9:61-64
- Chen JQ, Black CC (1992)** Biochemical and immunological properties of alkaline invertase isolated from sprouting soybean hypocotyls. *Arch Biochem Biophys* 295:61-69
- Chen YC, Chourey PS (1989)** Spatial and temporal expression of the two sucrose synthase genes in maize: immunohistological evidence. *Theor Appl Genet* 78:5553-559
- Chen BD, Christie P, Li XL (2001)** A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. *Chemosphere* 42(2):185-192
- Chen S, Hajirezaei M, Börnke F (2004b)** Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiol* 139:1163-1174
- Chen BD, Liu Y, Shen H, Christie P (2004a)** Uptake of cadmium from an experimentally contaminated calcareous soil by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.). *Mycorrhiza* 14:347-354
- Chen S, Hajirezaei M, Peisker M, Tschiersch H, Sonnewald U, Börnke F (2005)** Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth. *Planta* 221:479-492
- Cheng WH, Taliercio EW, Chourey PS (1996)** The Miniature1 seed locus of

maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell* 8(6):971-983

Cheng WH, Taliercio EW, Chourey PS (1999) Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96 (18):10512-10517

Chetelat RT, Klann E, DeVerna JW, Yelle S, Bennett AB (1993) Inheritance and genetic mapping of fruit sucrose accumulation in *Lycopersicon chmielewskii*. *Plant J* 4:643-650

Chiou T-J, Bush DR (1996) Molecular cloning, immunochemical localization to the vacuole, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet. *Plant Physiol* 110:511-520

Cho JI, Lee SK, Ko SH, Kim HK, Jun SH, Lee YH, Bhoo SH, Lee KW, An GH, Hahn TR, Jeon JS (2005) Molecular cloning and expression analysis of the cell-wall invertase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports* 24 (4): 225-236

Chopra J, Kaur N, Gupta AK (2003) Changes in sugar content and activities of sucrose metabolizing enzymes in roots and nodules of lentil. *Biol Plant* 46(1):89-93
2003

Chou H, Bundock N, Rolfe S, Scholes J (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* causes a reprogramming of host metabolism. *Mol Plant Pathol* 1:99-113

Chourey PS, Taliercio EW, Carlson SJ, Ruan YL (1998) Genetic evidence that the two isoenzymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol Gen Genet* 259:88-96

Clapp JP, Helgason T, Daniell T, Young JPW (2002) Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. MGA van der Heijden, I Sanders eds, *Mycorrhizal ecology* vol 157:201-224

Clapp JP, Rodriguez A, Dodd JC (2001) Inter- and intra-isolate rRNA large subunit variation in spores of *Glomus coronatum*. *New Phytol* 149:539-554

Cooke JC, Gemma JN, Koske RE (1987) Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 79:331-333

Cress WA, Throneberry GO, Lindsey DL (1979) Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato roots. *Plant Physiol* 64:484-487

- Cumming JR, Ning J (2003)** Arbuscular mycorrhizal fungi enhance aluminium resistance of broomsedge (*Andropogon virginicus* L.). *J Exp Bot* 54:1447-1459
- Daft MJ, Nicolson TH (1966)** Effect of *Endogone* mycorrhiza on plant growth *New Phytol* 65:343-350
- D'Aoust M-A, Yelle S, Nguyen-Quoc B (1999)** Antisense Inhibition of Tomato Fruit Sucrose Synthase Decreases Fruit Setting and the Sucrose Unloading Capacity of Young Fruit. *The Plant Cell* 11:2407-2418
- Danneberg G, Latus C, Zimmer W, Hundeshagen B, Schenninger-Poetsch HJ, Botthe H (1992)** Influence of vesicular arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *J Plant Physiol* 141: 33-39
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (2001)** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36:203-209
- Darwen CWE, John P (1989)** Localisation of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiol* 89:658-663
- David R, Itzhaki H, Ginzberg I, Gafni Y, Galili G, Kapulnik Y (1998)** Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus? *Glomus intraradices*. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:489-97
- De Coninck B, Le Roy K, Francis I, Clerens S, Vergauwen R, Halliday AM, Smith SM, Van Laere A, Van den Ende W (2005)** Arabidopsis AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant Cell Environ* 28(4):432-443
- de Halleux S, van Cutsem P (1997)** Cloning and sequencing of the 1-SST cDNA from chicory root (accession, U81520) (PGR97-036). *Plant Physiol* 113:1003.
- Déjardin A, Rochat C, Wuillem S, Boutin JP (1997)** Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant Cell Environ* 20:1421-1430
- de la Providencia IE, de Souza FA, Fernández F, Delmas NS, Declerck S (2005)** Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytol* 165: 261-271
- Diaz G, Azcón-Aguilar C, Honrubia M (1996)** Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metals (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum*

and *Anthyllis cytisoides*. Plant Soil 180:241-249

Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, Delmer DP (2002) Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. Plant cell Physiol 43(12):1407-1420

Douds DD Jr, Johnson CR, Koch KE (1988) Carbon cost of the fungal symbiont relative to net leaf P accumulation in a split-root VA mycorrhizal symbiosis. Plant Physiol 86:491-496.

Douds DD, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000) Application of in vitro methods to study carbon uptake and transport by AM fungi. Plant and Soil 226 (2):255-261

Dunne MJ, Fitter AH (1989) The phosphorus budget of a field-grown strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Hapil) crop: evidence for a mycorrhizal contribution. Ann App Biol 114:185-193

Edelman J, Jefford T (1968) The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. New Phytol 67:517-531

Ehneß R, Roitsch T (1997a) Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. Plant J 11:539-548

Ehneß R, Roitsch T (1997b) Differential effect of D-glucose on the level of mRNAs for three invertase isoenzymes of *Chenopodium rubrum*. J Plant Physiol 150:514-519

Ehness R, Roitsch T (1997) Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. Plant Journal 11(3):539-548

Elliott KJ, Butler WO, Dickinson CD, Konno Y, Vedvick TS, Fitzmaurice L, Mirkov TE (1993) Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from 2 tomato species and temporal differences in messenger RNA levels during fruit ripening. Plant Mol Biol 21(3):515-524

Elmayan T, Tepfer M (1995) Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *roID* promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. Transgen Res 4: 288-396

Emr SD, Schekman R, Flessel MC, Thorner J (1983) An MF α 1-*SUC2* (α -factor-invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. Proc Natl Acad Sci USA Vol. 80 pp 7080-7084

Entry JA, Watrud LS, Reeves M (1999) Accumulation of ^{137}Cs and ^{90}Sr from contaminated soil by three grass species inoculated with mycorrhizal fungi. Environ

Poll 104: 449-457

Eachrich W (1980) Free space invertase, its possible role in phloem unloading. Ber Dtsch Bot Ges 93:363-378

Edelman J, Jefford TG (1968) The mechanism of fructosan metabolism in plants as exemplified in *Helicantus tuberosis*. New Phytol 67:517-531

Elmayan T, Tepfer M (1995) Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. Transgenic Res. 4:288-396.

Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith SE, Smith FA, Ohtomo R (2004) Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. New Phytol 161:387-392

Fernie AR, Willmitzer L, Trethewey RN (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. TRENDS in Plant Science Vol.7 No.1

Ferrol N, Barea JM, Azcón-Aguilar C (2002a) Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. Plant Soil 244: 231-237

Ferrol N, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2002b) Arbuscular mycorrhiza induces ATPases and membrane nutrient transport mechanisms. In Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter, K (Eds.) Mycorrhizal technology in agriculture: From genes to bioproducts. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser, pp 113-122

Ferrol N, Pozo MJ, Antelo M, Azcón-Aguilar C (2002c) Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants. J Exp Bot 53:1683-1687.

Fitter AH (2001) Specificity, links and networks in the control of diversity in plant and microbial communities. In Press MC, Huntly NI, Levin S eds Ecology Achievement and Challenge. Blackwell, Oxford, pp 95-114

Fitter AH, Graves JD, Watkins NK, Robinson D, Scrimgeour C (1998) Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhiza. Func Ecol 12:406-412

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 β fruct1, are induced in Arabidopsis during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. Plant Physiol 132:821-829

Frank B (1885) Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser

Bäume durch unterirdische Pilze. Ber Dtsch Bot Ges 3:128-145

Frey B, Schüepp H (1993) Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. New Phytol 124:221-230

Fridman D, Zamir D (2003) Functional divergence of a syntenic invertase gene family in tomato, potato, and *Arabidopsis*. Plant Physiol 131:603–609

Frommer WB, Sonnewald U (1995) Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. J. Exp. Bot 46(287):587-607

Fu H, Kim SY, Park WD (1995) A potato *sus3* sucrose synthase gene contains a context-dependent 3' element and a leader intron with both positive and negative tissue-specific effects. Plant Cell 7:1395-1403

Fujishima M, Sakai H, Ueno K, Takahashi N, Onodera S, Benkeblia N, Shiomi N (2005) Purification and characterization of a fructosyltransferase from onion bulbs and its key role in the synthesis of fructooligosaccharides in vivo. New Phytol 165:513-524

Fukushima E, Arata Y, Endo T, Sonnewald U, Sato F (2001) Improved salt tolerance of transgenic tobacco expressing apoplastic yeast-derived invertase. Plant Cell Physiol 42(2):245-249

Galtier N, Foyer CH, Huber J, Voelker TA, Huber SC (1993) Effects of elevated sucrose phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var. UC82B). Plant Physiol 101:535-543

Galtier N, Foyer CH, Murkie E, Alred R, Quick P, Voelker TA, Thepenier C, Lasceve G, Betsche T (1995) Effects of light and atmospheric carbon dioxide enrichment on photosynthesis and carbon partitioning in the leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants overexpressing sucrose phosphate synthase. J Exp Bot 46:1335-1344

García-Garrido JM, Ocampo JA (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. J Exp Bot 53:1377-1386.

García-Garrido JM, Tribak M, Rejón-Palomares A, Ocampo JA, García-Romera I (2000) Hydrolytic enzymes and ability of arbuscular mycorrhizal fungi to colonize roots. J Exp Bot 51:1443-1448

García-Romera I, García-Garrido JM, Martínez-Molina E, Ocampo JA (1990) Possible influence of hydrolytic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections of alfalfa. Soil Biol Biochem 22:149-152

- García-Romera I, García-Garrido JM, Ocampo JA (1991)** Pectolytic enzymes in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. FEMS Microbiol Lett 78: 343-346
- Gear ML, McPhillips ML, Patrick JW, McCurdy DW (2000)** Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization. Plant Mol Biol 44: 687-697
- Geiger DR, Servaites JC (1994)** Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C-3 plants. Annu Rev Plant Physiol 45: 235-256
- Genre A, Bonfante P (1998)** Actin versus tubulin configuration in arbuscule-containing cells from mycorrhizal tobacco roots. New Phytol 140: 745-752
- George E, Haussler K, Vetterlein G, Gorgus E, Marschner H (1992)** Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. Can J Bot 70: 2130-2137
- Gerdemann JW (1964)** The effect of mycorrhizas on the growth of maize. Mycologia 56: 342-349
- Gerdemann JW, Trappe JM (1974)** The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycologia, memoir no.5
- Gerhards R, Stiit M, Heldt HW (1987)** Subcellular metabolite levels in spinach leaves. Plant Physiol 83: 399-403
- Gernns H, von Alten H, Poehling H-M (2001)** Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf psthogen-is a comepensation posible?. Mycorrhiza 11: 237-243
- Getz H, Knauer D, Willenbrink J (1987)** Transport of sugars across the plasma membrane of beet root protoplast. Planta 171: 185-196
- Gianinazzi-Pearson V (1996)** Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. Plant Cell 8: 1871-1883
- Gianinazzi-Pearson V, Arnold C, Oufattole M, Arango M, Gianinazzi S (2000)** Differentiated activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. Planta 211: 609-613
- Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S (1989)** *In vitro* enhacement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. Symbiosis 7: 243-255
- Gianinazzi-Pearson V, Dumas-Gaudot E, Gollotte A, Tahiri-Alaoui A, Gianinazzi S (1996)** Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 133: 45-57

Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1978) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiol Plant Pathol* 12: 45-53

Gianinazzi-Pearson V, Smith SE, Gianinazzi S, Smith FA (1991) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mucorrhizas. Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? *New Phytol* 117:61-74

Grierson C, Du J-S, de Torres Zabala M, Beggs K, Smith C, Holdsworth M, Bevan MW (1994) Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J* 5:815-826

Giovannetti M (2000) Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. In Kapulnik Y, Douds D eds *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 47-68

Giovannetti M, Avio L, Sbrana C, Citernesi AS (1993) Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus? *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. *New Phytol* 123:115–22

Giovannetti M, Azzolini D, Citeresini AS (1999) Anastomosis formation and nuclear protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* 65:5571-5575

Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Nuti MP (2001) The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytol* 151:717-724

Giovannetti M, Sbrana C, Avio L (2002) Arbuscular mycorrhizal fungal mycelium: from germlings to hyphal networks. In Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K, Birkhauser eds *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. pp 49-58

Giovannetti M, Sbrana C, Logi C (1994) Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 127:703-709

Giovannetti M, Sbrana C, Strani P, Agnolucci M, Rinaudo V, Avio L (2003) Genetic diversity of isolates *Glomus intraradices* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69:616-624

Godt DE, Roitsch T (1997) Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiol* 115(1):273-

Goetz M, Godt DE, Guivarc'h A, Kahmann U, Chriqui D, Roitsch T (2001) Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(11):6522-6527

Goetz M, Godt DE, Roitsch T (2000) Tissue-specific induction of the mRNA for an extracellular invertase isoenzyme of tomato by brassinosteroids suggests a role for steroid hormones in assimilate partitioning. *Plant J* 22:515-522

Goetz M, Roitsch T (2000) Identification of amino acids essential for the enzymatic activity of plant invertases. *J Plant Physiol* 157:581-585

Goetz M, Roitsch T (1999) The different pH optima and substrate specificities of extracellular and vacuolar invertases from plants are determined by a single amino-acid substitution. *Plant J* 20:707-711

Gogarten JP, Bentrup F (1989) Substrate specificity of the hexose carrier in the plasmalemma of *Chenopodium* suspension cells probed by transmembrane exchange diffusion. *Planta* 178:52-60

Gordon AJ, Minchin FR, James CL, Komina O (1999) Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol* 120(3):867-877

Govindarajulu M, Pfeffer P, Hairu J, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bücking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435:819-823

Graham JH (2000) Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis agroecosystems fungi. In: Podila GK, Douds DD Jr. eds. *Current Advances in Mycorrhizae Research*. St. Paul: APS Press, pp 127-140

Griffioen WAJ, Ietswaart JH, Ernst WHO (1994) Mycorrhizal infection of an *Agrostis capillaris* population on a copper contaminated soil. *Plant Soil* 158:83-89

Grunze N, Willmann M, Nehls U (2004) The impact of ectomycorrhiza formation on monosaccharide transporter gene expression in poplar roots. *New Phytol* 164(1):147-155

Guttenberger M, Ecke M, Hamp R (1998) Transgenic poplar trees expressing an acid invertase in the root apoplast show altered pools of soluble carbohydrates in root mycorrhizas. *Proceedings of the Botanikertagung, Germany*. University of Bremen

Hadas R, Schaffer A, Miron D, Fogelman M, Granot D (1995) PCR-generated molecular markers for the invertase gene and sucrose accumulation in tomato.

Theor Appl Gen 90:1142–1148

Hackel A, Schauer N, Carrai F, Fernie AR, Grimm B, Kühn C (2006) Sucrose transporte LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *The Plant Journal* 45:180-192

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580

Harada T, Suzuki S, Taniguchi H, Sasaki T (1994) Characteristics and applications of a polyfructan synthesized from sucrose by *Aspergillus sydowii* conidia, p. 77–82. In Nishinari K, Doi E eds, *Food hydrocolloids: structure, properties, and functions*. Plenum Press, New York, N.Y.

Harn C, Khayat E, Daie J (1993) Expression dynamic of genes encoding key carbon metabolism enzymes during sink to source transition of developing leaves. *Plant Cell Physiol* 34:1045-1053

Harrier LA, Wright F, Hooker JE (1998) Isolation of the 3-phosphoglycerate kinase gene of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd) Gerdemann & Trappe. *Curr Genet* 34:386-392

Harrison MJ (1996) A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant J* 9:491-503

Harrison MJ (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 59:19-42

Harrison M, Dewbre G, Liu J (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14:2413-2429

Harrison MJ, Dixon RA (1993) Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* 6:643–54

Harrison MJ, van Buuren ML (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378:626-629

Hattori T, Terada T, Hamasuna S (1995) Regulation of the Osem gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of *cis*-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1. *Plant J* 7:913-914

Hause B, Fester T (2005) Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* 221:184-196

- Hawkins HJ, Johansen A, George E (2000)** Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226:275-285
- Heiland S, Radovanovic N, Hofer M, Winderickx J, Lichtenberg H (2000)** Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 182(8):2153-62
- Heldt HW, Sauer R (1971)** The inner membrane of the chloroplast envelope as the site of specific metabolite transport. *Biochim Biophys Acta* 234:83-91
- Hellwege EM, Czapla S, Jahnke A, Willmitzer L, Heyer AG (2000)** Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8699–8704
- Hellwege EM, Gritscher D, Willmitzer L, Heyer AG (1997)** Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. *Plant J* 12:1057–1065.
- Hellwege EM, Raap M, Gritscher D, Willmitzer L, Heyer AG (1998)** Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. *FEBS Lett* 427:25-28
- Hendry G (1993)** Evolutionary origins and natural functions of fructans. A climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol* 123:3-14
- Hepper CM (1981)** Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytol* 88:641-647
- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Metraux JP, Sonnewald U (1996)** Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8:793-803
- Herbers K, Takahata Y, Melzer M, Mock HP, Hajirezai M, Sonnewald U (2000)** Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol Plant Pathol* 1:51-59
- Hernandez L, Sotolongo M, Rosabal Y, Menendez C, Ramirez R, Caballero-Mellado J, Arrieta J (2000)** Structural levansucrase gene (IsdA) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol* 174:120-124
- Hettwer U, Gross M, Rudolph K (1995)** Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv *Phaseolicola*. *Journal of*

bacteriology 177:2834-2839

Hewitt EJ (1952) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. In: Technical communication , vol. 22. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, UK.

Heyer AG, Wendenburg R (2001) Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. Appl Environ Microbiol 67:363-370

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Research 27, 297-300

Hincha DK, Hellwege EM, Heyer AG, Crowe JH (2000) Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. Eur J Biochem 267:535–540

Hijri M, Sanders IR (2004) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. Fungal Genet Biol 41:253-261

Hijri M, Sanders IR (2005) Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. Nature 433:160-163

Hildebrandt U, Janetta K, Bothe H (2002) Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. Appl Environ Microbiol 68: 1919-1924

Hirayama M, Sumi N, Hidaka H (1989) Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing beta fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric Biol Chem 53:668–674

Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S (1998) SOSUI: Classification a secondary structure prediction system for membrane proteins. Bioinformatics 14:378-379

Hirose T, Takano M, Terao T (2002) Cell wall invertase in developing rice caryopsis: Molecular cloning of *OscIN1* and analysis of its expression in relation to its role in grain filling. Plant Cell Physiol 43:452-459

Ho I, Trappe JM (1975) Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia 67:886-888

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Calif Agric Exp Stn Circ 347.

Hodge A, Campbell CD, Fitter AH (2001) An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. Nature 413:297-299.

- Hohnjec N, Perlick AM, Pühler A, Küster H (2003)** The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene *MtSucS1* is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol Plant-Microbe Interact* 16:903-915.
- Hosny M, de Barros JPP, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H (1997)** Base composition of DNA from glomalean fungi: high amounts of methylated cytosine. *Fungal Genet Biol* 22:103-111
- Hosny M, Gianninazzi-Pearson V, Dulieu H (1998)** Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome* 41:422-428
- Huang JW, Chen TJ, Yu Wp, Shyr LG, Wang AY, Sung HY, Lee PD, Su JC (1996)** Complete structures of three rice synthase isogenes and differential regulation of their expressions. *Biosci Biotechnol Biochem* 60:233-239
- Huber Sc, Huber JL (1996)** Role and Regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:431-444
- Huber Sc, Huber JL, Pharr DM (1993)** Assimilate partitioning and utilization in source and sink tissues. In: Buxton DR, Shibles R, Forsberg RA *et al.* Eds International Crop Science I. Crop Science Society of America, Inc. Madison, WI, pp 789-797
- Husain S, N'Tchobo H, Nguyen-Quoc B, Kingston-Smith AH, Thomas BJ, Foyer CH (2003)** Changes in activities of acid invertase isoforms affect sugar accumulation and composition during ripening of tomato fruit. *J Hort Sci Biotechnol* 78:182–192
- Husain SE, Thomas BJ, Kingston-Smith AH, Foyer CH (2001)** Invertase protein, but not activity, is present throughout development of *Lycopersicon esculentum* and *L. pimpinellifolium* fruit. *New Phytol* 150:73–81
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M (1992)** Water stress induced changes in concentrations of praline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol Plant* 84:67-72
- Jakobsen I (1996)** Phosphorus inflow into roots of mycorrhizal and non-mycorrhizal peas under field conditions. In V Gianinazzi-Pearson, S Gianinazzi, eds Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. INRA, Paris, France, pp 317-321
- Jakobsen I, Rosendahl L (1990)** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal *Cucumber* plants. *New Phytol* 115:77-83
- Jennings DH (1995)** The physiology of fungal nutrition. Cambridge University Press, Cambridge, UK

- Jeffries P, Barea JM (2001)** Arbuscular mycorrhiza - a key component of sustainable plant-soil ecosystems. In B Hock, ed The Mycota vol. IX. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. Germany, pp 95-113
- Jia Y, Gray VM, Straker CJ (2004)** The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Ann Bot* 94:251-258
- Johansen A, Finlay RD, Olsson PA (1996)** Nitrogen metabolism of the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol* 133:705-712
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES (1992)** Hyphal transport of ¹⁵N-labelled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N. *New Phytol* 122:281-288
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES (1993)** Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biol Fert Soils* 16:66-70
- Jolicoeur M, Germette S, Gaudette M, Perrier M, Bécard G (1998)** Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol* 116:1279-1288
- Joner EJ, Briones R, Leyval C (2000)** Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226:227-234
- Journet EP, El-Gachtouli N, Vernoud V, de Billy F, Pichon M, et al. (2001)** *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:737-48
- Kaldorf M, Schmelzer E, Bothe H (1998)** Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:439-448
- Kallarackal J, Orlich G, Schobert C, Komor E (1989)** Sucrose transport into the phloem of *Ricinus communis* L. Seedlings as measured by the analysis of sieve tube sap. *Planta* 177:327-335
- Kapulnik Y, Volpin H, Itzhaki H, Ganon D, Galili S, et al. (1996)** Suppression of defence responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots. *New Phytol* 133:59-64
- Karandashov V, Nagy R, Wegmüller S, Amrhein N, Bucher M (2004)** Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101:6258-6290

- Karandashov V, Bucher M (2005)** Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Science* 10(1):22-29
- Kawai G, Taniguchi H, Nakamura M (1973)** Polyfructan and oligofructan synthesized from sucrose by conidia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Agric Biol Chem* 37:2111–2119
- Kawakami A, Yoshida M (2002)** Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose: fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. *Biosci Biotech and Bioch* 66:2297–2305.
- Kim JY, Mahe A, Guy S, Brangeon J, Roche O, Chourey PS, Prioul JL (2000)** Characterization of two members of the maize gene family, *Incw3* and *Incw4*, encoding cell-wall invertases. *Gene* 245:89-102
- Kingston-Smith AH, Walker RP, Pollock CJ (1999)** Invertase in leaves: conundrum or control point?. *J Exp Bot* 50 (335):735-743
- Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Shinozake K, Shinozaki K (1998)** ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of *Arabidopsis*, encodes a putative sugar transporter. *Biochim Biophys Acta* 1370:187-191
- Klann E, Chetelat R, Bennett AB (1993)** Expression of acid invertase gene controls sugar composition in tomato (*Lycopersicon*) fruit. *Plant Physiol* 103:863–870
- Klann E, Hall B, Bennett AB (1996)** Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiol* 112:1321–1330
- Klann E, Yelle S, Bennett AB (1992)** Tomato fruit acid invertase complementary-DNA - nucleotide and deduced amino-acid-sequences. *Plant Physiol* 99(1):351-353
- Klein RR, Craftsbrandner SJ, Salvucci ME (1993)** Cloning and developmental expression of the sucrose-phosphate synthase gene from spinach. *Planta* 190:498-510
- Kling M, Gianinazzi-Pearson V, Lherminier J, Jacobsen I (1996)** The development and functioning of mycorrhizas in pea mutants. In: First International Conference on Mycorrhizae, Program and abstract, Berkeley, CA, USA, p 71
- Knudson JA, Meikle T, DeLuca TH (2003)** Role of mycorrhizal fungi and phosphorus in the arsenic tolerance of basin wildrye. *J Environ Qual* 32: 2001-2006
- Koch K (1996)** Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann Rev Plant*

Physiol Plant Mol Biol 47:509-540

Koch K (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7:235-246

Koch KE, Nolte KD, Duke ER, Mccarty DR, Avigne WT (1992) Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* 4(1):59-69

Koch KE, Ying Z, Wu Y, Avigne WT (2000) Multiple paths of sugarsensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *J Exp Bot* 51:417-427.

Koch KE, Zeng Y (2002) Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism. *J Amer Soc Hort Sci* 127:474-483.

Komatsu A, Takanokura Y, Omura M, Akihama T (1996) Cloning and molecular análisis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthase isoforms from a citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc). *Mol Gen Genet* 252:346-351

Komatsu A, Takanokura Y, Moriguchi T, Omura M, Akihama T (1999) Differential expression of three sucrose-phosphate synthase isoforms during sucrose accumulation in citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc). *Plant Sci* 140:169-178

Koops AJ, Jonker HH (1996) Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase. *Plant Physiol* 110:1167–1175

Kosuta S, Chabaud M, Loughon G, Gough C, Denarie J, et al. (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 131:952–62

Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R, Frommer WB (1997) Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 275:1298-1300

Kühn C, Hajirezaei MR, Fernie AR, Roessner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer WB (2003) The sucrose transporter *StSUT1* localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol* 131:102-113

Kühn C, Quick WP, Schulz A, Sonnewald U, Frommer WB (1996) Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transport SUT1. *Plant Cell Environ* 19:115-1123

Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T3. *Nature* 227:680-685

Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999) The dual function of sugars carriers: Transport and sugar sensing. *The 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

Lanfranco L, Novero M, Bonfante P (2005) The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume hosts. *Plant Physiol* 137:1319-1330

Langenkämper G, Fung RWM, Newcomb RD, Atkinson RG, Gardner RC, MacRae EA (2002) Sucrose phosphate synthase genes in plants belongs to three different families. *J Mol Evol* 54:322-332

Lambais MR, Mehdy MC (1993) Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Mol Plant-Microbe Interact* 6:75-83

Lee HS, Sturm A (1996) Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. *Plant Physiol* 112(4):1513-1522

Lemoine R (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta* 1465:246-262

Lerchl J, Geigenberger P, Stitt M, Sonnewald U (1995) Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *Plant Cell* 7(3):259-270

Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S (2002) PlatCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research* 30:325-327

Li X-Q (2001) Potato EST sequencing and analysis: Which genes involved in carbohydrate metabolism are most active in immature potatoes? 85th Annual

Meeting of the Potato Association of America. St Augustine, FL, April 22-26. Abstract No. 26.

Linderman RG (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In GJ Bethlenfalvay, RG Linderman, eds Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA, Madison, Wisconsin, USA, pp 45-70

Livak K, Schmittgen T (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:592-603

Lohaus G, Winter H, Riens B, Heldt HW (1996) Further studies of the phloem loading process in leaves of barley and spinach. *Bot Act* 108:270-275

López-Pedrosa A, González-Guerrero M, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N, (2006) *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 43:102-110

Lorenz K, Lienhard S, Sturm A (1995) Structural organization and differential expression of carrot b-fructofuranosidase genes: identification of a gene coding for a flower bud-specific isozyme. *Plant Mol Biol* 28:189–194

Lunn JE, MacRae E (2003) New complexities in the synthesis of sucrose. *Curr Opin Plant Biol* 6:208-214

Lüscher M, Erdin C, Sprenger N, Hochstrasser U, Boller T, Wiemken A (1996) Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Lett* 385:39–42

Macdonald RM, Lewis M (1978) The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol* 80:135-140

Madi L, McBride SA, Bailey LA, Ebbole DJ (1997) *rco-3*, a gene involved in glucose transport and conidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 146(2):499-508

Malcová R, Rydlová J, Vosátka M (2003) Metal-free cultivation of *Glomus* sp. BEG 140 isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. *Mycorrhiza* 13:151-157

Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:1140-1148

Matsubara Y, Uetake Y, Peterson RL (1999) Entry and colonization of

Asparagus officinalis roots by arbuscular mycorrhizal fungi with emphasis on changes in host microtubules. Can J Bot 77:1159-1167

Maynard JW, Lucas WJ (1982) Sucrose and glucose uptake in *Beta vulgaris* leaf tissue. A case for a general (apoplastic) retrieval system. Plant Physiol 70:1436-1443

Meixner C, Ludwig-Müller J, Miersch O, Gresshoff P, Stachelin C, Vierheilig H (2005) Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant *nts1007*. Planta 222:709-715

Merryweather J, Fitter A (1995) Phosphorus and carbon budgets: mycorrhizal contribution in the obligately mycorrhizal *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard ex Rothm. under natural conditions. New Phytol 129:619-627

Micallef BJ, Haskins KA, Vanderveer PJ, Roh KS, Shewmaker CK, Sharkey TD (1995) Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that have an increased capacity for sucrose synthesis. Planta 196:327-334

Michiels A, Van Laere A, Van den Ende W, Tucker M (2004) Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. J Exp Bot 5(401):325-333

Miller EM, Chourey PS (1992) The maize invertase-deficient miniature-1 seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. The Plant Cell 4:297-305

Minet M, Dufour ME, Lacroue F (1992) Complementation of *Sacharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. Plant J 2:417-422

Miron D, Petreikov M, Carmi N, Shen S, Levin I, Granot D, Zamski E, Schaffer AA (2002) Sucrose uptake, invertase localization and gene expression in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* and the sucrose-accumulating *Lycopersicon hirsutum*. Physiol Plant 115(1):35-47

Moerschbacher B, Mendgen K (2000) Structural aspects of defence. In: Slusarenko AJ, Fraser RS, van Loon LC (eds) Mechanisms of resistance to plant diseases. Kluwer, Dordrecht, pp 231-277

Morton JB, Benny JL (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae, with an emendation of glomaceae. Mycotaxon 37:471-491

Morvan-Bertrand A, Boucaud J, Le Saos J, Prud'homme MP (2001) Roles of the fructans from leaf sheaths and from the elongating leaf bases in the regrowth

following defoliation of *Lolium perenne* L. *Planta* 213:109–120

Mosse B (1957) Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. *Nature* 179:349-362

Muller J, Mohr U, Sprenger N, Bortlik K, Boller T, Wiemken A (1999) Pool sizes of fructans in roots and leaves of mycorrhizal and non-mycorrhizal barley *New Phytol* 142(3):551-559

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325

Nakai T, Tonouchi N, Konoshi T, Tsuchida T, Yoshinaga F, Sakai F, Hayashi T (1999) Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14-18

Nehls U, Bock A, Ecke M, Hampp R (2001a) Differential expression of hexose-regulated fungal genes *AmpAL* and *AmMst1* within *Amanita/Populus* ectomycorrhizas. *New Phytol* 150:583–589.

Nehls U, Mikolajewski S, Magel E, Hampp R (2001b) The role of carbohydrates in ectomycorrhizal functioning: gene expression and metabolic control. *New Phytol* 150:533–541

Nehls U, Wiese J, Guttenberger M, Hampp R (1998) Carbon allocation in ectomycorrhizas: identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. *Mol Plant-Microbe Interact* 11(3):167-76

Nguyen-Quoc B, Foyer CH (2001) A role for “fructile cycles” involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *J Exp Bot* 52:881-889

Newman EI, Redell P (1987) The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytol* 106:745-51

Obeland DM, Simmen U, Boller T, Wiemken A (1993) Purification and characterization of three soluble invertases from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Plant Physiol* 107:125-130

Ohyama A, Ito H, Sato T, Nishimura S, Imai T, Hirai M (1995) Suppression of acid invertase activity by antisense RNA modifies the sugar composition of tomato fruit. *Plant Cell Physiol* 36:369–376

Ohyama A, Nishimura S, Hirai M (1998) Cloning of cDNA for a cell wall-bound acid invertase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and expression of soluble and cell wall-bound invertases in plants and wounded leaves of *L. esculentum* and *L. peruvianum*. *Genes Genet Syst* 73:149-157

- Olah A, Papp Z, Szentirmai A (1993)** Inulin formation of penicillin producing industrial penicillium chrysogenum strains. *Acta Microbiol Hungarica* 40: 379–386.
- Olsson PA, van Aarle IM, Allaway WG, Ashford AE, Rouhier H (2002)** Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiol* 130: 1162-1171
- Pagny S, Denmat-Ouisse LA, Gomord V, Faye L (2003)** Fusion with HDEL protects cell wall invertase from early degradation when N-glycosylation is inhibited. *Plant Cell Physiol* 44: 173-182
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee SH, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC, Cho MJ (2004)** Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol* 135: 2150-2161
- Parniske M (2004)** Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 7: 414-421
- Patel V, Saunders G, Bucke C (1997)** N-deglycosylation of fructosyl- transferase and invertase from *Fusarium oxysporum* decreases stability but has little effect on kinetics and synthetic specificity. *Biotechnol Lett* 19: 75–77
- Paszkowski U, Boller T (2002)** The growth defect of *Irt1*, a maize mutant lacking lateral roots, can be complemented by symbiotic fungi or high phosphate nutrition. *Planta* 214: 584–90
- Paul MJ, Foyer CH (2001)** Sink regulation of photosynthesis. *J Expl Bot* 52(360): 1383-1400
- Pavis N, Boucaud J, Prud'homme MP (2001)** Fructans and fructan-metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. *New Phytol* 150: 97–109
- Pawlowska TE (2005)** Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* 251: 185-192
- Pawlowska TE, Taylor JW (2002)** Organization of genetic variation within glomalean individuals. *Proceedings of the 7th International Mycological Congress*
- Pearson JN, Jakobsen I (1993)** Symbiotic exchange of carbon and phosphorus between *Cucumber* and three arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 124: 481-488
- Pearson V, Read DJ (1975)** The physiology of the mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. *Trans Br Mycol Soc* 64: 1-7

Pfeffer PE, Douds DDJr, Becard G, Shachar-Hill Y (1999) Carbon Uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 120:587-598.

Phillips JM, Haymans DS (1970) Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158-160

Pons T, Hernandez L, Batista FR, Chinea G (2000) Prediction of a common beta-propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Sci* 9:2285-2291

Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barea JM (1998) Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. *J Exp Bot* 49:1729-1739

Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barea JM (1999) β -1,3 glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Sci* 141:14-157

Pozo MJ, Slezack-Deschaumes S, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Azcón-Aguilar C (2002) Plant defense responses induced by arbuscular mycorrhizal fungi. In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) *Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts*. Birkhäuser, Basel, pp 103-112

Proels RK, Hause B, Berger S, Roitsch T (2003) Tissue specific expression in sexual organs and novel modes of hormonal regulation of tomato invertase tandem genes. *Plant Mol Biol* 52:191–201

Proels RK, Roitsch T (2006) Cloning of a CACTA transposon-like insertion in intron I of tomato invertase Lin5 gene and identification of transposase-like sequences of Solanaceae species. *J Plant Physiol* 163(5):562-569

Prosser JI (2002) Molecular and functional diversity in soil microorganism. *Plant and Soil* 244:9-17

Quick WP (1996) Sucrose metabolism in sources and sinks. In: Zamski E, Schaffer AA Eds. *Photoassimilate Distribution in Plants*, Marcel Dekker, New York, pp 115-156

Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol*

Biol 50:665-693

Rasmussen N, Lloyd DC, Ratcliffe G, Hansen PE, Jakobsen I (2000) ^{31}P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226:245-253

Rausch C, Bucher M (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216:23-37

Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Lalio M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M (2001) A phosphate transporter expressed in arbuscular-containing cells in potato. *Nature* 414:462-466

Rausch T, Greiner S (2004) Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim Biophys Acta* 1696:253-261

Rauser WE, Ackerley CA (1987) Localization of cadmium in granules within differentiating and mature roots. *Can J Bot* 65:643-646

Ravnskov S, Wu Y, Graham JH (2003) Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect expression of genes coding for sucrose synthases in maize roots. *New Phytol* 157:539-545.

Reddy A, Maley F (1996) Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *J of Biolo Chem* 271:13953-13958

Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289:1920-1921

Regierer B, Fernie RA, Springer F, Perez-Melis A, Leisse A, Koehl K, Willmitzer L, Geigenberger P, Kossmann J (2002) Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants. *Nature Biotechnology* 20:1256–1260

Rehill BJ, Schultz JC (2003) Enhanced invertase activities in the galls of *Hormaphis hamamelidis*. *J Chem Ecol* 29:2703-2720

Rehm J, Willmitzer L, Heyer A (1998) Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol* 180:1305–1310

Requena N, Breuninger M, Franken P, Ocon A (2003) Symbiotic status, phosphate and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol* 132:1540-1549

Requena N, Mann P, Franken P (2000) A homologue of the cell cycle check

point TOR2 from *Saccharomyces cerevisiae* exists in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Protoplasma* 212:89-98

Requena N, Mann P, Hampp R, Franken P (2002) Early developmentally regulated genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: Identification of GmGIN1, a novel gene with homology to the C-terminus of metazoan hedgehog proteins. *Plant Soil* 244:129-139

Requena N, Pérez-Solis E, Azcón-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM (2001) Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl Envir Microbiol* 67(2):495-498

Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* 91:11841-11843

Rentsch D, Boorer K, Frommer WB (1998) Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *Journal of Membrane Biology* 162:177-190

Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in the ohloem loading and assimilate partitioning. *The EMBO Journal* 13:1-7

Ritsema T, Smeekens S (2003) Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol* 6:223–230

Ritsema T, Smeekens S (2003b) Engineering fructan metabolism in plants. *J Plant Physiol* 160:811-820

Ritsema T, Verhaar A, Vijn I, Smeekens S (2004) Fructosyltransferase mutans specify a function for the β -fructosidase motif of the sucrose-binding box in specifying the fructan type synthesized. *Plant Molec Biol* 54:853-863

Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, Caussanel JP, Belimov AA, Gianinazzi S, Strasser RJ, Gianinazzi-Pearson V (2002) Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *J Exp Bot* 53:1177-1185

Rodriguez RL, Tait RC (1983) Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing.

Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J Exp Bot* 54 (382):513-524

Roitsch T, Bitter M, Godt DE (1995) Induction of apoplasmic invertase of

Chenopodium rubrum by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol* 108:285-294

Roitsch T, Gonzalez MC (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci* 9(12):606-13.

Roitsch T, Tanner W (1996) Cell wall invertase: Bridging the gap. *Bot Acta* 109(2):90-93

Rojo E, Zouhar J, Carter C, Kovaleva V, Raikhel NV (2003) A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (12):7389-7394

Rolland F, Moore B, Shean J (2002) Sugar sensing and signalling in plants. *Plant Cell* 14:S185-S205

Rook F, Bevan MW (2003) Genetic approaches to understanding sugar-response pathway. *J Expl Bot* 54:495-501

Rosendahl D, Taylor JW (1997) Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP™. *Mol Ecol* 6:821-829

Ross HA, McRae D, Davies HV (1996) Sucrolytic enzyme activities in cotyledons of the faba bean - Developmental changes and purification of alkaline invertase. *Plant Physiol* 111(1):329-338

Roth A, Lüscher M, Sprenger N, Boller T, Wiemken A (1997) Fructan and fructan-metabolizing enzymes in the growth zone of barley leaves. *New Phytol* 136:73-79

Rufyikiri G, Thiry Y, Declerck S (2003) Contribution of hyphae and roots to uranium uptake and translocation by arbuscular mycorrhizal carrot roots under root-organ culture conditions. *New Phytol* 158:391-399

Ruiz-Lozano JM (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. *New perspectives for molecular studies. Mycorrhiza* 13:309-317

Ryan MH, McCully ME, Huang CX (2003) Localization and quantification of phosphorus and other elements in fully hydrated, soil-grown arbuscular mycorrhizas: a cryo-analytical scanning electron microscopy study. *New Phytol* 160:429-441

Saier M H, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WHM, Huang S-C, Jack DL, Jahn PS, Lew K, Liu J, Pao SS, Paulsen IT, Tsang TT, Virk PS (1999) The major facilitator superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*

1:257-279

Saito M (1995) Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall. *New Phytol* 129:425-431

Salerno GL, Curatti L (2003) Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why?. *TRENDS in Plant Science* Vol. 8 No. 2

Salnikov VV, Grimson MJ, Seagull RW, Haigler CH (2003) Localization of sucrose synthase and callose in freeze-substituted secondary-wall-stage cotton fibers. *Protoplasma* 221(3-4):175-184

Salzer P, Hager A (1991) Sucrose utilisation of the ectomycorrhizal fungi *Amanita muscaria* and *Hebeloma crustuliniforme* depends on the cell wall-bound invertase activity of their host *Picea abies*. *Botanica Acta* 104:439-445

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

Sanders IR, Clapp JP, Wiemken A (1996) The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems- a key to understand the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 133:123-134

Sanders FE, Tinker PB (1973) Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pest Sci* 4:385-395

Sauer N, Caspari T, Klebl F, Tanner W (1990) Functional expression of *Chorella* hexose transporter in *Schizosaccharomices pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7949-7952

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

Schaeffer C, Wallenda T, Guttenberger M, Hampp R (1995) Acid invertase in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) seedlings. *The New Phytol* 129:417-424

Schleucher J, Vanderveer PJ, Sharkey TD (1998) Export of carbon from chloroplast at night. *Plant Physiol* 118:1439-1445

Schellenbaum L, Müller J, Boller T, Wiemken A, Schüepp H (1998) Effects of drought on non-mycorrhizal and mycorrhizal maize: changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. *New Phytol* 138:59-66

- Schellenbaum L, Sprenger N, Schüepp H, Wiemken A, Boller T (1999)** Effects of drought, transgenic expression of a fructan synthesizing enzyme and of mycorrhizal symbiosis on growth and soluble carbohydrate pools in tobacco. *New Phytol* 142:67-77
- Schiestl RH, Gietz RD (1989)** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16: 339-346
- Schubert A, Allara P, Morte A (2003)** Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 161:495-501
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001)** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105:1413-1421
- Sévenier R, Hall RD, van der Meer IM, Hakkert HJC, van Tunen AJ, Koops AJ (1998)** High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nat Biotechnol* 16:843-846
- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG (1995)** Partitioning of intermediate carbon metabolism in VAM colonized leek. *Plant Physiol* 108:7-15
- Sherman F, Fink GR, Hicks JB (1986)** *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY
- Sherson SM, Afford 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.
- Shiomi N (1981)** Purification and characterisation of 6G-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Carbohydrate Research* 96:281-292.
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993)** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363:67-69
- Simpson C G, Hedley P E, Watters J A, Clark G P, McQuade C, Machray G C, Brown J W (2000)** Requirements for mini-exon inclusion in potato invertase mRNAs provides evidence for exon-scanning interactions in plants. *RNA* 6:422-433
- Sinha AK, Hofmann MG, Romer U, Kockenberger W, Elling L, Roitsch T (2002)** Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiol* 128:1480-1489

- Smeeckens S (1998)** Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1:230-234
- Smith S, Read D (1997)** Mycorrhizal symbiosis Academic Press, London
- Smith SE (1966)** Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol* 65:488-499
- Smith SE, Gianninazzi-Pearson V (1988)** Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:221-244
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2003)** Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol* 133:16–20
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2004)** Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol* 162:511-524
- Solaiman MD, Saito M (1997)** Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytol* 136:533-538
- Sonnewald U, Hajirezaei MR, Kossmann J, Heyer A, Trethewey RN, Willmitzer L (1997)** Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnol* 15:794-797
- Sprenger N, Bortlik K, Brandt A, Boller T, Wiemken A (1995)** Purification, cloning, and functional expression of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11652-11656
- Stitt M, Huber SC, Kerr PS (1987)** Control of photosynthetic sucrose formation. In: Hatch MD, Boardman NK Eds. *The Biochemistry of Plants*, New York pp 327-409
- St-John BJ, Smith SE, Nicholas DJD, Smith FA (1985)** Enzymes of ammonium assimilation in *Pezizella ericae* Read. *New Phytol* 100:579-584
- Stougaard J, Sandal N, Gron A, Kuhle A, Marcker K (1987)** 5' analysis of the soybean leghaemoglobin lbc3 gene: Regulatory elements required for promoter activity and organ specificity. *EMBO J.* 6:3565-3569
- Strand A, Foyer CH, Gustafsoon P, Gardestrom P, Hurry V (2003)** Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell Environ* 26:523-535

- Strullu DG (1978)** Cytologie des endomycorrhizes. *Physiologie Végétale* 16: 657-669
- Stukenbrock EH, Rosendahl S (2005)** Distribution of dominant arbuscular mycorrhizal fungi among five plant species in undisturbed vegetation of a coast grassland. *Mycorrhiza* 15(7):497-503
- Sturm A (1996)** Molecular characterization and functional analysis of sucrose-cleaving enzymes in carrot (*Daucus carota* L.). *J Exp Bot* 47:1187-1192
- Sturm A (1999)** Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol* 121:1-7
- Sturm A, Chrispeels MJ (1990)** cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *The Plant Cell* 2:1107-1119
- Sturm A, Tang G-Q (1999)** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 4:401-407.
- Subbaiah CC, Sachs MM (2001)** Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedling. *Plant Physiol* 125(2):585-594
- Subramanian KS, Charest C (1998)** Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Physiol Plant* 102:285-296
- Sun JL, Loboda T, Sung S-JS, Black CCJ (1992)** Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol* 98:1163-1169
- Swaminathan V (1979)** Nature of the inorganic fraction of soil phosphate fed on by vesicular-arbuscular mycorrhizae of potatoes. *Proc Ind Acad Sci* 88B:423-433
- Sward RJ (1981)** The structure of the spores of *Gigaspora margarita*. II. Changes accompanying germination. *New Phytol* 88:661-666
- Tallgren AH, Airaksinen U, von Weissenberg R, Ojamo H, Kuusisto J, Leisola M (1999)** Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets. *Appl Environ Microbiol* 65:862-864
- Tang GQ, Luscher M, Sturm A (1999)** Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* 11(2):177-189
- Tamasloukht M, Sejalon-Delmas N, Kluever A, Jauneau A, Roux C, Becard G, Franken P (2003)** Root factors induce mitochondrial-related gene expression

and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiol* 131:1468-1478

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680

Tinker PB, Durall DM, Jones MD (1994) Carbon use in mycorrhizas: Theory and sample calculations. *New Phytol* 128:115-122.

Tobar R, Azcón R, Barea JM (1994) Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytol* 126:119-122

Tommerup IC, Abbott LK (1981) Prolonged survival and viability of VA-mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biol. Biochem.* 13:431-433

Torozer D, Huber SC (1997) Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiol* 114:947-955

Torozer D, McMichael R, Krause KP, Kurreck J, Sonnewald U, Stitt M, Huber SC (1999) Site-directed mutagenesis of serine 158 demonstrates its role in spinach leaf sucrose-phosphate synthase modulation. *Plant J* 17:407-413

Trappe JM (1986) Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in angiosperms from an evolutionary standpoint. In Safir GR, ed *Ecophysiology of AV Mycorrhizal plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 5-25

Truernit E (2001) Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Current Biology* 11:R169-R171

Truernit E, Schmid J, Epple P, Illing J, 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

Tubbe A, Buckhout TJ (1992) In vitro analysis of the H⁺-hexose symporter on the plasma membrane of sugar beets (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol* 99:945-951

Turnau K, Kottke I, Oberwinkler F (1993) *Paxillus involutus*-*Pinus sylvestris* mycorrhizae from heavily polluted forest. Element localization using electron energy loss spectroscopy and imaging. *Bot Acta* 106:213-219

- Tymowska-Lalanne Z, Kreis M (1998)** The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Adv Bot Res* 28:71–117
- Ueno K, Onodera S, Kawakami A, Yoshida M, Shiomi N (2005)** Molecular characterization and expression of a cDNA encoding fructan 6(G)-fructosyltransferase from asparagus (*Asparagus officinalis*). *Plant Physiol* 165(3):813-824
- Uetake Y, Kojima T, Ezawa T, Saito M (2002)** Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol* 154:761-768
- Vandenkoornhuysse P, Leyval C, Bonnin I (2001)** High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity* 87:243-253
- Van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, Boogaerts D, Le Roy K, Arckens L, Van Laere A (2006)** Cloning and functional analysis of a high DP fructan : fructan 1-fructosyl transferase from *Echinops ritro* (Asteraceae): comparison of the native and recombinant enzymes. *J Exp Bot* 57(4):775-78
- Van den Ende W, De Coninck B, Van Laere A (2004)** Plant Fructan exohydrolases: a role in signaling and defense?. *TRENDS in Plant Science* Vol. 9 No. 11
- Van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, Van Riet L, Van Laere A, Yoshida M, Kawakami A (2003)** Fructan 1-exohydrolases: β (2,1) trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat (*Triticum aestivum* L.)? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two 1-FEH isoforms. *Plant Physiol* 131:621–631
- Van den Ende W, De Coninck B, Clerens S, Vergauwen R, Van Laere A (2003b)** Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants. Characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel “cell-wall invertase-like” specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant J* 36:697–710
- Van den Ende W, Michiels A, De Roover J, Verhaert P, Van Laere A (2000)** Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *Plant J* 24:447–456
- Van den Ende W, Michiels A, Le Roy K, Van Laere A (2002)** Cloning of a vacuolar invertase from belgian endive leaves (*Cichorium intybus*). *Physiol Plant* 115:504-512

- Van den Ende W, Michiels A, Van Wonterghem D, Clerens SP, De Roover J, Van Laere AJ (2001)** Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIa and 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiol* 126:1186–1195
- Van den Ende W, Mintiens A, Speleers H, Onuoha AA, VanLaere A (1996)** The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytol* 132(4):555-563
- Van den Ende W, Van Laere A (1996)** De-novo synthesis of fructans from sucrose in vitro by a combination of two purified enzymes (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan: fructan 1-fructosyltransferase) from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 200:335–342
- Van den Ende W, Yoshida M, Clerens S, Vergauwen R, Kawakami A (2005)** Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol* 166:917-932
- van der Meer IM, Koops AJ, Hakkert JC, van Tunen AJ (1998)** Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *Plant J* 15:489–500.
- van Dongen JT, Schurr U, Pfister M, Geigenberger P (2003)** Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiol* 131(4):1529-1543
- Van Laere A, Van den Ende W (2002)** Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant Cell Environ* 25:803–815
- Van Tichelen KK, Colpaert JV, Vangronsveld J (2001)** Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytol* 150(1):203-213
- Vereyken IJ, van Kuik JA, Evers TH, Rijken PJ, de Kruijff B (2003)** Structural requirements of the fructan–lipid interaction. *Biophys J* 84:3147–3154
- Vargas W, Cumino A, Salerno GL (2003)** Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol?. *Planta* 216(6):951-960
- Vergauwen R, Van den Ende W, Van Laere A. (2000)** The role of fructans in flowering of *Campanula rapunculoides*. *J Exp Bot* 51:1261–1266
- Vergauwen R, Van Laere A, Van den Ende W (2003)** Properties of fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from *Cichorium intybus* L. and *Echinops ritro* L., two Asteracean plants storing greatly different types of inulin. *Plant Physiol* 133:391–401

- Vierheilig H, Iseli B, Alt M, Raikhel N, Wiemken A, Boller T (1996)** Resistance of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: a possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. *Plant Soil* 183:131–36
- Vijn I, Smeekens S (1999)** Fructan: More Than a Reverse Carbohydrate?. *Plant Physiol* 120:351-359
- Vijn I, van Dijken A, Lüscher M, Bos A, Smeets E, Weisbeek P, Wiemken A, Smeekens S (1998)** Cloning of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose. *Plant Physiol* 117:1507-1513
- Vijn I, van Dijken A, Sprenger N, van Dun K, Weisbeek P, Wiemken A, Smeekens S (1997)** Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase. *Plant J* 11:387–398.
- Voegelé RT, Struck C, Hahn M, Mendgen K (2001)** The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(14):8133-8
- Voegelé RT, Wirsal S, Moll U, Lechner M, Mendgen K (2006)** Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol Plant-Microbe Interact* 19(6):625-634
- Volpin H, Phillips DA, Okon Y, Kapulnik Y (1995)** Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiol* 108:1449–54
- von Schaewen A, Stitt M, Schmidt R, Sonnewald U, Willmitzer L (1990)** Expression of yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly growth influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO Journal* 9:3033-3044
- Wachter R, Langhans M, Aloni R, Gotz S, Weilmunster A, Koops A, Temguia L, Mistrik I, Pavlovkin J, Rascher U et al. (2003)** Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 133:1024-1037
- Wang F, Sanz A, Brenner ML, Smith AG (1993)** Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit strength. *Plant Physiol* 101:321-327

- Wang F, Smith AG, Brenner ML (1993)** Isolation and Sequencing of Tomato Fruit Sucrose Synthase cDNA. *Plant Physiol* 103:1463-1464
- Wang F, Smith AG, Brenner ML (1994)** Temporal and spatial expression pattern of sucrose synthase during tomato fruit-development. *Plant Physiol* 104(2):535-540
- Ward J, Kühn C, Tegeder M, Frommer WB (1998)** Sucrose transport in higher plants. *International Review of Cytology* 178:41-71
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Buchner P, Wobus U (1995)** Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell* 7(11):1835-1846
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus W (1997)** A role for sugar transporters during seed development: Molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9:895 1997
- Weidmann S, Sánchez L, Descombin J, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2004)** Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:1385-1393
- Weiersbye IM, Straker CJ, Przybylowicz WJ (1999)** Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots of the grass *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings. *Nuc Inst Meth Phys Res* 158:335-343
- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM (2000)** A new subfamily of sucrose transporter, SUT4, with low affinity/high capacity is localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* 12:1345-1355
- Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthelin J (1995)** Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy-metal uptake by maize (*Zea-mays l*) in pot culture with contaminated soil. *Mycorrhiza* 5(4):245-251
- Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuk R, Weber H, Wobus U (2003)** The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J* 33:395-411
- Weyens G, Ritsema T, Van Dun K, Meyer D, Lommel M, Lathouwers J, Rosquin I, Denys P, Tossens A, Nijs M, Turk S, Gerrits N, Bink S, Walraven B, Lefebvre M, Smeekens S (2004)** Production of tailor-made fructans in sugar beet by onion fructosyltransferases. *Plant Biotechnol J* 2:321-327

- Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Friedel K, Hollenberg CP, Bolles E (1999)** Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Sacharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 464:123-128
- Wiemken A et al. (1986)** Fructan metabolism, enzymology and compartmentation. Curr. Top. Plant Biochem. Physiol 5:17–37
- Wiemken A, Sprenger N, Boller T (1995)** Fructans – an extension of sucrose by sucrose. In Pontis, HG et al., eds, Current Topics in Plant Physiology ASPP, Rockville, MD, USA pp 179–189
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N (2000)** Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. Trends in Plant Sciences 5:283-290
- Winter H, Huber SC (2000)** Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: Localization and Regulation of Activity of Key Enzymes. Crit Rev Biochem Mol Biol 35(4):253-289
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW (1994)** Subcellular volumes and metabolite concentrations by barley leaves. Planta 193:532-555
- Winzer H, Lohaus G, Heldt HW (1996)** Influence of phloem transport, N-fertilization and ion accumulation on sucrose storage in the taproots of fodder beet and sugar beet. J Exp Bot 47:115-123
- Wobus U, Weber H (1999)** Sugars as signal molecules in plant seed development. Biol Chem 390:937-944
- Wright DP, Baldwin B, Shephard M, Scholes J (1995)** Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. Physiol Mol Plant Pathol 47:237-253
- Wright DP, Read DJ, Scholes JD (1998)** Mycorrhizal sink streng influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. Plant Cell & Enviromental 21:881-891
- Wright DP, Scholes JD, Read DJ, Rolfe SA (2000)** Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. Plant, Cell & Environment 23:39–49.
- Xie ZP, Staehelin C, Broughton WJ, Wiemken A, Boller T, Muller J (2003)** Accumulation of soluble carbohydrates, trehalase and sucrose synthase in effective (Fix(+)) and ineffective (Fix(-)) nodules of soybean cultivars that differentially nodulate with *Bradyrhizobium japonicum*. Funct Plant Biol 30(9):965-971

- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q (2001)** Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrose-phosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling. *J Exp Bot* 52:2169-2179
- Yau Y, Simon P (2003)** A 2.5-kb insert eliminates acid soluble invertase isozyme II transcript in carrot (*Daucus carota* L.) roots, causing high sucrose accumulation. *Plant Mol Biol* 53:151–162
- Yiallourous I, Kappelhoff R, Schilling O, Wegmann F, Helms MW, Auge A, Brachtendorf G, Berkhoff EG, Beermann B, Hinz HJ, König S, Peter-Katalinic J, Stocker W (2002)** Activation mechanism of pro-astacin: role of the propeptide, tryptic and autoproteolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing. *J Mol Biol* 324:237-246
- Yu D, Chen C, Chen Z (2001)** Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* 13:1527-1540
- Yu J, Chang P, Bhatnagar D, Cleveland TE (2000)** Cloning of a sugar utilization gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1493(1-2):211-4
- Yu T, Egger KN, Peterson RL (2001)** Ectendomycorrhizal associations characteristics and functions. *Mycorrhiza* 11:167-177
- Yu J, Hu SN, Wang J, Li SG, Wong KSG, Liu B, Deng Y, Dai L, et al. (2001)** A draft sequence of the rice (*Oryza sativa ssp indica*) genome. *Chin Sci Bull* 46:1937-1942
- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE (1998)** Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. *Plant Physiol* 116:1573-1583.
- Zhrenner 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*). *Plant J* 7:97-107

