



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Facultad de Agrobiología
"Presidente Juárez"
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**Respuesta al estrés biótico sobre la expresión de genes del
metabolismo de sacarosa en plantas de tomate inoculadas con
hongos micorrizógenos arbusculares**

T E S I S

Que como requisito parcial para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

ISAAC ALEJANDRO SALMERÓN SANTIAGO

Directora de tesis

DRA ANA TZTZQUI CHÁVEZ BÁRCENAS

Co-director

Dr. Víctor Olalde Portugal

Uruapan, Mich., Marzo de 2015



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

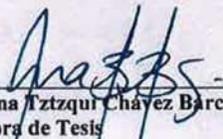
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Respuesta al estrés biótico sobre la expresión de genes del metabolismo de sacarosa en plantas de tomate inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares" presentado por el ING. ISAAC ALEJANDRO SALMERÓN SANTIAGO, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Morelia, Michoacán, a 17 de febrero de 2015

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Ana Tzitzqui Chávez Barcenas
Directora de Tesis



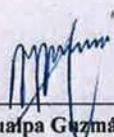
Dr. Víctor Olalde Portugal
Co director



Dra. María José Pozo Jiménez



Dr. Miguel Martínez Trujillo



M.C. Atahualpa Guzmán de Casa

Este trabajo se realizó en las Laboratorio de Interacciones Planta-Ambiente de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” y en el Laboratorio de Micorrizas y Estrés Biótico de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ)

Bajo la dirección de:

Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas (Facultad de Agrobiología UMSNH)

La co-dirección de:

Dr. Víctor Olalde Portugal (CINVESTAV Unidad-Irapuato)

En colaboración con:

Dr. María José Pozo Jiménez (EEZ)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

A la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez"

Al programa de Becas Nacionales y Becas Mixtas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A la Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas.

A la Dra. María José Pozo Jiménez.

A los Doctores Víctor Olalde Portugal, Miguel Martínez Trujillo y al MC Atahualpa Guzmán de Casa.

A mi familia y amigos de México y España.

ÍNDICE

	Pág
REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1. Relación entre tejidos fotosintéticos y tejidos heterotróficos en el flujo del carbono	1
1.2. Biosíntesis de sacarosa en plantas.	5
1.2.1 Regulación de la expresión y de la actividad enzimática de Sacarosa-fosfato sintasa, elemento clave de la biosíntesis de sacarosa	10
1.3 Movilización de la sacarosa en plantas	15
1.4 Degradación de sacarosa por efecto de sacarosa sintasa e invertasas en tejidos de metabolismo heterotrófico	16
1.5 Influencia de factores externos sobre la expresión y de las actividades enzimáticas de los elementos clave en la biosíntesis y la degradación de sacarosa.	19
1.6 Efecto de la simbiosis micorrícica sobre los genes clave del metabolismo de sacarosa	20
1.7 La herbívora, desencadenante de respuestas de defensa en plantas y su relación con el metabolismo de sacarosa	24
LITERATURA CONSULTADA	27
OBJETIVOS	38
Objetivo general	38
Objetivos específicos	38

CAPITULO I

Influencia de la presencia de la simbiosis micorrícica arbuscular sobre la expresión de genes del metabolismo de sacarosa y el contenido de azúcares solubles en *Solanum lycopersicum*

RESUMEN	39
INTRODUCCIÓN	40

	MATERIALES Y MÉTODOS	44
1.	<i>Material biológico</i>	44
2.	<i>Biomasa</i>	45
3.	<i>Cuantificación de la colonización micorrícica</i>	45
4.	<i>Extracción de RNA y análisis de expresión de genes</i>	45
5.	<i>Análisis del contenido de carbohidratos solubles</i>	47
6.	<i>Análisis estadísticos</i>	49
	RESULTADOS	50
1.	<i>Colonización micorrícica y biomasa</i>	50
2.	<i>La simbiosis micorrícica está involucrada en la modificación de la expresión de genes sps específicos</i>	51
3.	<i>La simbiosis micorrícica altera la expresión de los genes involucrados en el catabolismo de sacarosa</i>	52
4.	<i>La concentración de sacarosa en tejido foliar y la relación raíz:tejido foliar de azúcares reductores libres, se modifican en plantas con simbiosis micorrícica</i>	53
	DISCUSIÓN	56
	CONCLUSIONES	63
	LITERATURA CONSULTADA	65

CAPITULO II

Efecto del estrés causado por herbivoría sobre la expresión de genes de síntesis y degradación de sacarosa y el contenido de carbohidratos solubles en tejidos fotosintéticos y heterotróficos

	RESUMEN	72
	INTRODUCCIÓN	74
	MATERIALES Y MÉTODOS	76
1.	<i>Material biológico</i>	76
2.	<i>Análisis de expresión de genes</i>	76
3.	<i>Cuantificación de carbohidratos solubles y determinación de masa seca</i>	78
4.	<i>Análisis estadísticos</i>	78
	RESULTADOS	79
1.	<i>La pérdida de tejido en la parte aérea en plantas sometidas a herbivoría no modifica la acumulación de biomasa en parte aérea ni en raíz</i>	79
2.	<i>Modificaciones de la expresión de genes del metabolismo de sacarosa por la presencia de larvas de Spodoptera exigua</i>	80
3.	<i>La presencia de Spodoptera exigua en hojas causa una reducción de la concentración de distintas fracciones de azúcares solubles en tejidos foliares y modifica la proporción raíz-tejido foliar</i>	81

DISCUSIÓN	84
CONCLUSIONES	88
LITERATURA CITADA	89

CAPITULO III

Analizar el efecto del estrés causado por herbivoría sobre la expresión de genes de síntesis y degradación de sacarosa y el contenido de carbohidratos solubles en tejidos fotosintéticos y heterotróficos en plantas con la simbiosis micorrícica establecida

RESUMEN	94
INTRODUCCIÓN	96
MATERIALES Y MÉTODOS	97
1. <i>Material biológico</i>	97
2. <i>Estimación de la colonización micorrícica y determinación de masa seca</i>	98
3. <i>Análisis de expresión de genes</i>	98
4. <i>Cuantificación de azúcares solubles</i>	99
5. <i>Análisis estadísticos</i>	99
RESULTADOS	100
1. <i>El estrés causado por la herbivoría, causa el aumento de algunos parámetros de la colonización micorrícica</i>	100
2. <i>Acumulación de biomasa</i>	101
3. <i>La micorriza arbuscular y el estrés causado por la presencia de Spodoptora exigua modifican la expresión de genes de síntesis de sacarosa de manera tejido específica</i>	102
4. <i>Modificación de los niveles de expresión de genes de SUS y de la invertasa LIN6</i>	103
5. <i>Cuantificación de azúcares solubles y acumulación de biomasa</i>	104
DISCUSIÓN	107
CONCLUSIONES	113
LITERATURA CONSULTADA	114

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Cebadores utilizados para el análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Esquema general de las reacciones de fijación de carbono y destino de los productos generados.	2
Figura 2 Síntesis de sacaros a partir de los productos de la fijación de carbono (Baroja Fernández et al., 2001).	6
Figura 3. Colonización micorrícica en plantas de tomate inoculadas con <i>F. mosseae</i>.	50
Figura 4. Efecto de la colonización micorrícica en la biomasa de plantas de tomate.	51
Figura 5. Efecto de la colonización micorrícica en la expresión relativa de genes de biosíntesis de sacarosa en plantas de tomate.	52
Figura 6. Análisis de expresión de los genes del catabolismo de sacarosa.	53
Figura 7. Efecto de la colonización micorrícica en la concentración de azúcares solubles en plantas de tomate.	54
Figura 8. Efecto de la herbivoría en el peso fresco y biomasa de plantas de tomate.	79
Figura 9: Efecto de la herbivoría en la expresión relativa de genes del metabolismo de sacarosa.	81
Figura 10. Efecto de la herbivoría sobre la concentración de azúcares solubles en plantas de tomate.	82
Figura 11. Colonización micorrícica de plantas inoculadas con <i>F. mosseae</i> y efecto de la herbivoría.	100
Figura 12. Efecto de la herbivoría y la simbiosis micorrícica sobre el peso fresco y biomasa de plantas de tomate.	101

Figura 13. Efecto de la herbivoría y la colonización micorrícica en la expresión relativa de genes de biosíntesis de sacarosa en plantas de tomate.	103
Figura 14. Efecto de la herbivoría y la colonización micorrícica en la expresión relativa de genes del catabolismo de sacarosa en plantas de tomate.	104
Figura 15. Efecto de la colonización micorrícica y la herbivoría en la concentración de azúcares solubles en plantas de tomate.	106

RESUMEN

La sacarosa juega un papel principal en el metabolismo primario de las plantas; es uno de los principales carbohidratos producto de la fotosíntesis, y además, la forma en la que la mayoría de las especies vegetales transportan el carbono desde los tejidos fotosintéticos, hasta el resto de sus tejidos. La presencia de la simbiosis micorrícica con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) biotrofos obligados que forman simbiosis mutualistas con gran parte de los taxa vegetales, modifica los patrones de distribución y las cantidades de ácido jasmónico (AJ), un regulador vegetal clave en la respuesta de defensa ante el ataque de insectos herbívoros, lo cual puede tener impacto sobre la respuesta la modificación de la respuesta de las plantas ante este tipo de estrés. Por el impacto de la simbiosis micorrícica sobre elementos clave implicados en la respuesta de defensa ante herbívoros, en el presente trabajo se analizó la influencia de la presencia de la simbiosis micorrícica establecida con *Funneliformis mosseae* (BEG12) y de larvas de *Spodoptera exigua*, sobre la expresión de genes del metabolismo de sacarosa, y la distribución de azúcares solubles en tejidos foliares y radiculares de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). La herbivoría modificó los patrones de colonización de la simbiosis micorrícica causando un aumento en la frecuencia de la micorrización y abundancia de arbusculos en el sistema radicular. El análisis de la expresión de genes implicados en el metabolismo de sacarosa, reveló que existen modificaciones que concuerdan con los patrones de expresión reportados en otros modelos vegetales. En cuanto a la distribución de azúcares, se observó que la herbivoría causa un descenso de la concentración de distintas fracciones de carbohidratos solubles con excepción de la sacarosa, la cual aumento en presencia de HMAs independientemente de si las plantas fueron sometidas a herbivoría.

Palabras clave: Simbiosis micorrícica, metabolismo de sacarosa, herbivoría.

ABSTRACT

Sucrose plays a key role in plant primary metabolism since is considered a main product of photosynthesis, additionally is used by most plant species for carbon transportation from photosynthetic tissues, to tissues with heterotrophic metabolism. The establishment of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in plant roots, obligated biotrophs that forms mutualistic associations with plants, modify the pattern of distribution and quantities of jasmonic acid (JA), a plant growth regulator implicated in the defense response against the attack of herbivore insects, which can have an important effect on the modification of plant response under this type of stress. For the impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis over the elements related to plant defense response against herbivore insects, in the present research project, we analyze the influence of the presence of the mycorrhizal symbiosis established with *Funneliformis mosseae* (BEG12) and *Spodoptora exigua* larvae on the sucrose metabolism gene expression, and the distribution of soluble sugars in tomato (*Solanum lycopersicum*) leaf and root tissues. The analysis of gene expression implicated in sucrose metabolism revealed modifications of the expression that encompass with the expression patterns of this genes reported in other plant models. With respect to soluble sugar distribution in leaf and root tissues, it was observed that herbivore causes a reduction of distinct soluble carbohydrate fractions in leaf tissues. Only sucrose showed an increase by the influence of AMF, which was independent of the induction of the stresses caused by herbivore and suggest an increase of source strength.

Key words: Mycorrhizal symbiosis, sucrose metabolism, herbivore.

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Relación entre tejidos fotosintéticos y tejidos heterotróficos en el flujo del carbono

De manera general, el proceso de la fotosíntesis se concibe como la formación de carbohidratos a partir del CO₂ atmosférico y agua con la generación de oxígeno, usando la energía de los fotones, como motor de este proceso. El resultado de este mecanismo de incorporación de carbono es la obtención de moléculas que tienen la capacidad de almacenar energía y se considera como un elemento de importancia crucial en los ecosistemas actuales y que ha tenido gran impacto sobre el desarrollo de la vida sobre la Tierra. El proceso de fotosíntesis, por tal razón, ha sido objeto de estudio, entre otras cosas, con la finalidad de conocer el mecanismo por medio del cual se realiza la biosíntesis de moléculas que sirven como fuente de carbono para el sustento del metabolismo de las plantas, los mecanismos que regulan dicho proceso y la relación existente entre los órganos y/o tejidos capaces de realizar este proceso con los tejidos que carecen de esta capacidad (MacRae y Lunn, 2012.).

Las plantas, como organismos fotosintéticos, han evolucionado de tal manera que han logrado desarrollar órganos especializados en el proceso de recepción de la energía luminosa proveniente del sol, y de efectuar las reacciones de fijación de carbono, las hojas, las cuales son los sitios principales de la actividad fotosintética y de la biosíntesis de carbohidratos. La estructura y las reacciones bioquímicas en las hojas que preceden la formación de carbohidratos varía de acuerdo a al desarrollo de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas específicas dentro de los distintos linajes de plantas. Sin embargo, estas modificaciones en el metabolismo del carbono convergen en un punto que implica la reducción del carbono en el ciclo de Calvin, proceso que se realiza en los cloroplastos, el cual es la principal vía por la cual se realiza la fijación del carbono en los organismos vegetales superiores. Durante este proceso, se generan moléculas conocidas como triosas-fosfato, las cuales, son canalizadas principalmente hacia la

biosíntesis de carbohidratos de reserva o de transporte (Figura 1). En este contexto, se considera a las hojas como elementos de las plantas con metabolismo heterotrófico, y en general, por su capacidad de producción de carbohidratos son denominados tejidos fuente, dado que en dichos órganos, el tejido del mesófilo representa el sitio de mayor actividad fotosintética.

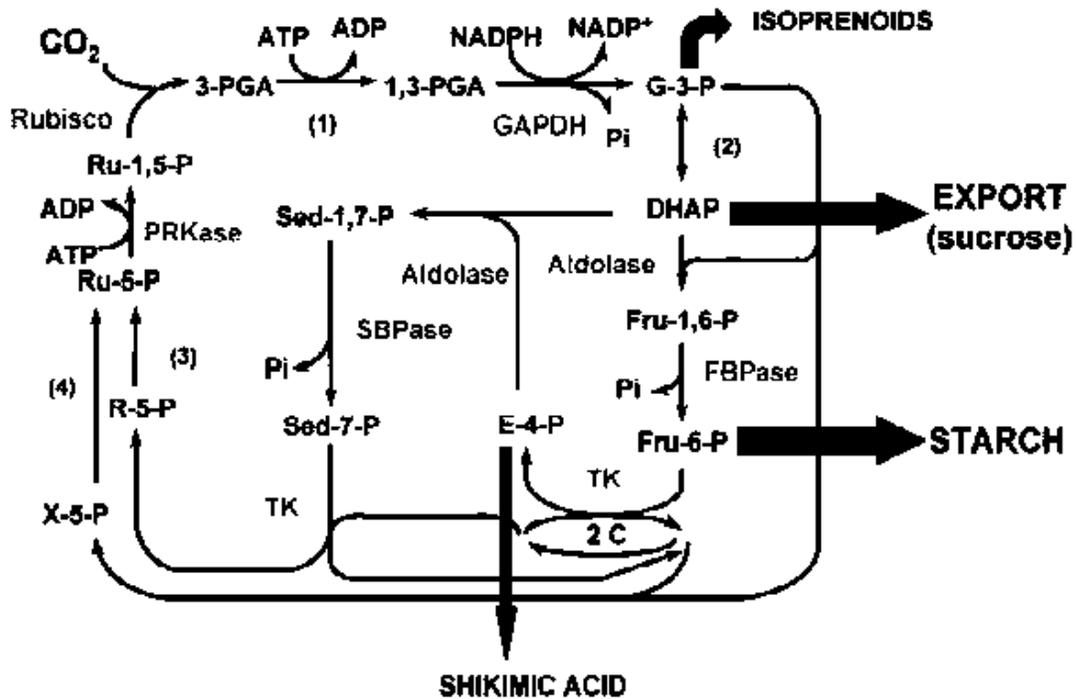


Figura 1. Esquema general de las reacciones de fijación de carbono y destino de los productos generados. Tomado de Raines, (2003).

Por otro lado, las plantas también tienen órganos y tejidos que requieren del suministro de una fuente de carbono para sustentar su metabolismo, como estructuras vegetativas en desarrollo y otros elementos especializados en funciones tales como la absorción de agua y nutrientes por la raíz; o la reproducción en dónde se encuentran estructuras tales como flores, frutos y semillas, los cuales no desarrollan eficientemente o carecen de la capacidad fotosintética. Estos tejidos de metabolismo heterotrófico son conocidos como tejidos demanda.

La distribución de los carbohidratos en plantas, además de estar influenciada por distintos factores externos que actúan directa o indirectamente sobre el proceso fotosintético, es afectada por factores intrínsecos como el estado de desarrollo, la

formación de nuevas estructuras de demanda, así como la interacción entre los tejidos fuente y los tejidos demanda. Aunque virtualmente, se considera que todos los órganos y tejidos de las plantas tuvieron un metabolismo heterotrófico durante alguna de sus etapas de desarrollo, a medida que alcanzaban la madurez, algunos de ellos sufren procesos de especialización que los definen como tejidos fuente o tejidos demanda (Ho, 1988).

La distribución del carbono en las plantas, es entonces un proceso dinámico en el cual existen distintos factores que lo regulan, y además en dónde están implicados el metabolismo de los tejidos fuente *per se*, así como el flujo existente hacia los tejidos demanda, en dónde, los productos de la fotosíntesis son destinados a distintas rutas metabólicas de acuerdo a su función.

Durante el estudio de las interacciones entre tejidos fuente y tejidos demanda, se han generado conceptos como “fuerza de tejido fuente” y “fuerza de tejido demanda”, que han ayudado a explicar en parte la interacción existente entre estos dos elementos y en particular, para intentar establecer el mecanismo mediante el cual se realiza la distribución del carbono, o biomasa, en las plantas.

La fuerza del tejido fuente, es definida por Marcelis (1996), como “la tasa en la que los fotoasimilados son producidos” en un tejido fuente, el cual es entonces definido como “un exportador neto de fotoasimilados”. En este caso, es entonces que se denota la importancia de la canalización de los productos generados en las reacciones de fotosíntesis hacia la síntesis de sacarosa, la cual es el carbohidrato que las plantas utilizan para el transporte de los productos obtenidos en las reacciones de la fotosíntesis hacia otros tejidos, y en dónde los tejidos fuentes son elementos activos de síntesis de este disacárido, y es por esto que existen autores que sugieren los modelos en los cuales se explique la adquisición, la distribución y la pérdida del carbono en plantas debe de tener a la sacarosa como iniciadora del mecanismo de distribución de biomasa entre los distintos tejidos de las plantas, entre otras cosas por su importancia en el transporte de carbono, su uso en tejidos de metabolismo heterotrófico y por estar involucrada en distintas rutas de señalización (Farrar,2000). Por su parte, Farrar y Jones (2000) explican la existencia de distintas teorías que explican el flujo de carbono existente desde la

parte aérea hasta los tejidos de la raíz, en dónde se atribuye a una de ellas el control sobre éste flujo a los tejidos fuente, determinando así el crecimiento y la ganancia de biomasa por la raíz, debido a que el carbono adquirido por los tejidos radicales es constante y su la proporción en que es canalizado hacia esta zona está relacionada con la pérdida por el metabolismo respiratorio.

Es por estas características y por qué los sitios principales de síntesis de sacarosa son los tejidos fuente, se ha prestado gran atención a los mecanismos regulatorios implicados durante el proceso de biosíntesis de sacarosa, y más aún, se ha analizado el papel que juegan enzimas clave en esta ruta, y particularmente, la actividad de la sacarosa-fosfato sintasa (SPS) ha sido considerada un determinante importante de la “fuerza del tejido fuente” dado que canaliza los productos de las reacciones de fijación de carbono hacia la biosíntesis de sacarosa en condiciones *in vivo*.

A pesar de que los sitios en dónde se realiza la fotosíntesis son los centros de generación de carbohidratos para el transporte, numerosos autores indican que el flujo está controlado, principalmente por la actividad presente en los tejidos demanda y no en los tejidos fuente. En este caso, Marcelis (1996) indica que la capacidad de acumulación de carbohidratos por parte de los tejidos demanda es un determinante importante de la distribución de carbono en las plantas. De igual manera, otros autores han sugerido que la distribución de biomasa en las plantas está en gran parte determinada por la habilidad de los tejidos demanda de adquirir carbohidratos, más que otros aspectos como las conexiones vasculares entre ellos y/o la presencia de distintos tejidos demanda distribuidos en distintas zonas de crecimiento de las plantas (Gifford y Evans, 1981). De igual manera ha tomado interés el tipo de tejido sumidero que esté involucrado en la distribución del carbono. Ho (1988), clasifica a los tejidos sumidero en tejidos que usan los productos de fotosíntesis para su crecimiento y desarrollo, indicando también la existencia de tejidos especializados en el almacenamiento de carbohidratos, dicha clasificación está ligada al metabolismo de cada uno de los tejidos, en dónde en los primeros, los carbohidratos de transporte son utilizados para suplementar las demandas del metabolismo respiratorios, mientras que en los tejidos de que

acumulan reservas, los carbohidratos son utilizados para la formación de compuestos de reserva. En estos casos, la diferencia en el metabolismo, podría estar implicado en la capacidad de cada uno de estos tejidos para atraer los productos de la fotosíntesis. Es por esto que en el caso de los tejidos demanda, su actividad y el concepto de “fuerza de tejido demanda” ha estado ligado a las enzimas sacarosa sintasa (SUS) e invertasas (INV) responsables de la hidrólisis de sacarosa para la canalización de los productos de sus respectivas reacciones a distintas rutas en los tejidos heterotróficos (Herbers y Sonnewald, 1998).

1.2 Biosíntesis de sacarosa en plantas.

La sacarosa juega un papel de importancia en el metabolismo primario de las plantas, al ser uno de los principales carbohidratos producto de la fotosíntesis, y además de que por sus características fisicoquímicas es la principal forma de carbono usada para transporte a larga distancia desde los sitios primarios de síntesis, las hojas, hasta los tejidos de metabolismo heterotrófico en las plantas (Farrar, 2000).

Los sitios más activos de síntesis de sacarosa son los tejidos foliares, particularmente el tejido del mesófilo. La síntesis ocurre en el citoplasma celular, a partir de las triosas-fosfato generadas en el Ciclo de Calvin, inicia con el transporte asistido de las triosas-fosfato (triosas-P) a través de una proteína simportadora conocida como translocador triosa-fosfato/fosfato (TPT), que forma parte de uno de los sistemas de transporte localizado en la membrana interna del cloroplasto, cuya función es el transporte de triosas fosfato al citoplasma, mientras que el P generado durante la biosíntesis de sacarosa y/o de otros metabolitos a partir de triosas-P es transportado de regreso al interior del cloroplasto (Flügge et al., 1989). Un sucesivo paso que involucra la formación de Fuctosa-1,6-Bifosfato (Fru-1,6-BP) a partir de las triosas-P en el citoplasma es catalizado por acción de la Fructosa 1,6-bifostato aldolasa (FBP), enzima codificada por una familia de genes que en *Arabidopsis thaliana* presenta dos subfamilias con genes que presentan distintos patrones de expresión y distinta localización subcelular, con isoformas

localizadas en el citoplasma celular (Lu *et al.*, 2012). Posteriormente la Fru-1,6-BP, es usada como sustrato de la Fructosa Bisosfatasa (FBPasa) para generar Fructosa-6-fosfato (Fru-6-P), reacción que se considerada como uno de los pasos clave durante la biosíntesis de sacarosa; la actividad de FBPasa es dependiente del suministro de las triosas-P, y a medida que este se reduce, se limita la producción de Fru-6-P, causando inhibición de otros pasos clave de la biosíntesis de sacarosa por falta de sustrato (Daie, 1993). La Fru-6-P, resultado de la actividad de la FBPasa, es sucesivamente usada como sustrato de una fosfoglucoisomerasa para generar Glucosa-6-fosfato (Glc-6-P); luego Glc-6-P cambia su estado de fosforilación por acción de una la fosfoglucomutasa (PGM) para generar Glucosa-1-fosfato (Glc-1-P) y finalmente la Glc-1-P se usa como sustrato de la UGPasa para generar UDP-Glucosa. Una vez generados los productos UDP-Glc y Fru-6-P, éstos son usados para efectuar la penúltima reacción de la ruta de biosíntesis de sacarosa, catalizada por la sacarosa-fosfato sintasa (SPS), cuyo producto de reacción es Sacarosa-6-fosfato (Suc-6-P), la cual es defosforilada por la sacarosa-fosfato fosfatasa (SPP) que genera como producto final sacarosa (Figura 2).

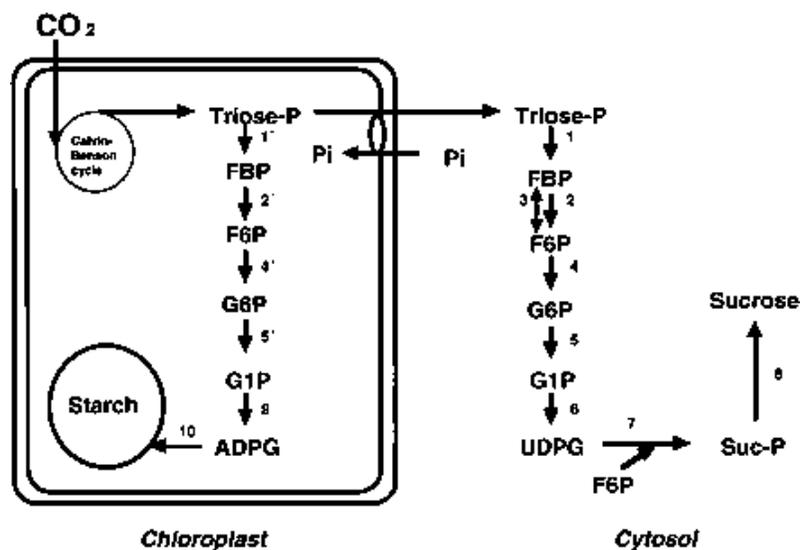


Figura 2 Síntesis de sacaros a partir de los productos de la fijación de carbono (Baroja Fernández et al., 2001). En el esquema, las enzimas marcadas con números en la ruta de biosíntesis de sacarosa corresponden a: 1, FBP aldolasa; 2, FBPasa; 4, Fosfoglucoisomerasa; 5 Fosfoglucomutasa; 5 UGPasa; 7, Sacarosa-fosfato sintasa; 8 Sacarosa fosfato fosfatasa. La ruta análoga de síntesis de almidón está representada dentro del cloroplasto.

Como se mencionó anteriormente, una de las reacciones clave durante la biosíntesis de sacarosa, es la reacción catalizada por la FBPasa, la cual genera los productos que serán usados por reacciones sucesivas para la formación de sacarosa a partir de las triosas fosfato. Sin embargo, la reacción catalizada por la SPS, es la que ejerce un mayor control sobre la canalización de los productos de las reacciones de fijación de carbono hacia la formación de sacarosa. La reacción efectuada por SPS, entre otras cosas, tiene la característica de ser irreversible, dado que su producto, la Suc-6-P es defosforilado inmediatamente en condiciones *in vivo* por la SPP por la formación de un complejo enzimático entre SPS y SPP. Este fenómeno fue propuesto por la evidencia física y el aumento de la actividad catalítica de SPS en presencia de SPP, la cual a su vez, en presencia de SPS aumenta su capacidad de hidrolizar los productos de la SPS, pero también, evidencia del análisis de la cinética de las reacciones de la biosíntesis de sacarosa, indican que las reacciones previas de a la condensación de UDP-Glc y Fru-6-P, están en equilibrio aparente en condiciones *in vivo*, sin embargo, las reacciones finales catalizadas por SPS y SPP, desplazan el equilibrio hacia la dirección del flujo de sacarosa, por la irreversibilidad que presenta la reacción SPP *in vivo*, pero con mayor contribución por parte de SPS hacia la biosíntesis de sacarosa (Lunn y Ap Rees, 1990; Chen *et al.*, 2005).

Las distintas isoformas de SPS están distribuidas en una familia multigénica, constituida de cuatro subfamilias, que indica que los genes *sps*, se encuentran en múltiples copias en el genoma de los vegetales. Se cree que la capacidad fotosintética de los organismos vegetales, así como de los mecanismos que están implicados en la síntesis de azúcares como la sacarosa, proviene de la capacidad heredada de organismos como cianobacterias, e incluso, cabe la posibilidad que estas características estén ligadas a organismos aún más ancestrales (McRae y Lunn, 2012). Durante el proceso evolutivo de las plantas, los genes *sps* han sufrido duplicaciones, además de que existe la contribución de los niveles de ploidia, lo cual ha resultado en la presencia de múltiples genes *sps*, que ha traído como consecuencia que cada uno de ellos, sufra eventos de especialización evolutiva, que causen cambios en los patrones de expresión que pueden estar

ligados o no a cambios en las características de las proteínas (MacRae y Lunn, 2012; Chen *et al.*, 2012).

Antes se pensaba que las angiospermas únicamente contenían un gen que codificaba una única forma de SPS, con grupos de genes propios de monocotiledóneas y de dicotiledóneas. Sin embargo, a medida de que se comenzaron a caracterizar los genes *sps* de distintas especies, se encontró que algunos procedentes de monocotiledóneas tenían similitudes con los encontrados en dicotiledóneas, y además, en algunas especies se empezaba a encontrar más de un gen *sps*. Estos descubrimientos generaron la pauta para el estudio filogenético que demostró la presencia de tres familias de SPS en plantas superiores, designadas como A, B, y C respectivamente, cada una con una división correspondiente a secuencias procedentes de monocotiledóneas o dicotiledóneas (Langenkämper *et al.*, 2002). Posteriores análisis, han demostrado la existencia de una familia designada como D, que hasta ahora está restringida a plantas monocotiledóneas (Castleden *et al.*, 2004); además de la descripción de una subdivisión de la familia A de dicotiledóneas en dos grupos, que había sido sugerida en los estudios iniciales por la presencia de dos secuencias aminoacídicas divergentes dentro del grupo A procedentes de *A. thaliana* (MacRae y Lunn, 2012; Langenkämper *et al.*, 2002).

Cada familia de SPS presenta a nivel de expresión génica, un patrón similar en los tejidos analizados de plantas. Se sabe que los genes de la familia A, por ejemplo, se expresan en la mayoría de los tejidos, observándose su expresión en tejidos fotosintéticos, como en órganos de metabolismo heterotrófico como raíces y tejidos reproductivos. La expresión de genes de la familia B en plantas de arroz ha sido reportado en tejidos reproductivos, en tejidos fotosintéticos lo que se relacionado con la sacarogénesis en células del mesófilo, y en el escutelo, en dónde su función se asocia con la síntesis de sacarosa a partir de los productos de la degradación del almidón del endospermo para suplementar las demandas de carbono durante la germinación (Chávez-Bárcenas *et al.*, 2000), mientras que en plantas dicotiledóneas han sido reportado que los genes de la familia B están presentes en tejidos reproductivos con una contribución poco significativa en otros

tejidos (Chen *et al.*, 2005). Sin embargo, en ambos linajes de plantas, se ha generado evidencia de que los genes de esta familia se encuentren expresados en raíces. Por su parte, los genes de la familia C, se han encontrado de manera abundante en tejidos fotosintéticos de tabaco, *A. thaliana* y en la hoja bandera de monocotiledóneas como trigo y cebada, y se considera, junto con las formas A de SPS como uno de los formas más abundantes en dicotiledóneas (Chen *et al.*, 2005; Lunn y MacRae, 2003). En trigo, se han encontrado que los genes de las familias A, C y D, se encuentran expresados en hojas bandera; mientras que en *A. thaliana* y tabaco, los genes de las familias A y C son los predominantes en los tejidos fotosintéticos (Castleden *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005), lo que sugiere que existen múltiples formas de SPS que están implicadas en la síntesis de sacarosa en tejidos fotosintéticos

La diversidad que presentan los genes *sps* en los patrones de expresión, está ligada a la función que tiene en los tejidos en donde se expresa. Por ejemplo, los genes de las familias A y C, se consideran como los principales elementos responsables de la sacarogénesis en tejidos fotosintéticos. Particularmente, usando plantas de tabaco como modelo, se han propuesto mecanismos de movilización del almidón que se forma de forma transitoria en tejidos fotosintéticos en donde esencialmente participa la el gen del familia C, esto fue evidenciado por la acumulación de metabolitos producto de la degradación de almidón en tejidos fuente y por el patrón de expresión detectado del gen *NtSPSC* durante las horas de oscuridad (Chen *et al.*, 2005). En un experimento similar realizado en *A. thaliana*, éste fenómeno fue asociado a la actividad de los genes *AtSPSA1* y *AtSPSC* (Volkert *et al.*, 2014). Lo que sugiere que la función de las isoformas de SPS podría estar especializada a nivel algún nivel taxonómico.

Por otro lado, se sabe que existen genes *sps* que se expresan en tejidos heterotróficos, y en éstos se ha detectado actividad SPS, lo que se relaciona con la movilización y ciclación de carbohidratos y mantenimiento homeostático de los productos de la degradación de sacarosa asociado a la síntesis de otros polímeros de carbohidratos, resíntesis a partir de los productos generados por acción de enzimas encargadas de la degradación de sacarosa y acumulación de sacarosa

en frutos, entre otras funciones (Park *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007; Hubbard *et al.*, 1991).

1.2.1 Regulación de la expresión y de la actividad enzimática de Sacarosa-fosfato sintasa, elemento clave de la biosíntesis de sacarosa.

Existe en la actualidad evidencia de que los genes *sps* a nivel de expresión génica, están regulados por numerosos factores. Chávez-Bárceñas *et al.* (2000) analizan la expresión del gen *sps1* de arroz por fusión de su promotor al gen reportero GUS, el cual presentó un patrón de expresión que coincide con la transición demanda fuente en hojas, por lo que se sugirió que los factores que están determinando este fenómeno, también ejercen control sobre la expresión de *sps1*. Adicionalmente a este fenómeno, se realizaron observaciones detalladas de los patrones de expresión revelados por el gen reportero GUS, así como por la distribución del RNA en tejidos foliares mediante RT-PCR *in situ*, lo que reveló que la luz es un importante factor que activa la expresión. Esta idea es soportada por la presencia de elementos *cis*-regulatorios posiblemente funcionales de respuesta a luz. En este trabajo, también se reporta la expresión del gen *sps1* de arroz en el escutelo de las semillas durante la germinación, lo que indica que existen otros mecanismos asociados a la germinación de semillas. Para explicar esto, el promotor de *sps1* también contiene elementos *cis*-regulatorios de respuesta a giberelinas conservados en otros genes asociados a la germinación como los de α -amilasas. Finalmente se observó mediante RT-PCR *in situ*, que los productos de la traducción del gen *sps1* de arroz están confinados a las células del mesófilo y en el escutelo, mientras que por la expresión del gen reportero fusionado al promotor de *sps*, se encontró que este también se expresa en granos de polen. En polen, la expresión de *sps1* está relacionada con el estado de desarrollo, ligada a la formación del tubo polínico, pero también a la síntesis de sacarosa en estados tempranos, lo cual está estrechamente relacionado con la viabilidad y longevidad de este (Hirose *et al.*, 2014).

Una distribución similar se encontró de la enzima SPS por ensayos de inmunodetección en hojas de maíz, en donde se encontró la presencia de la enzima en los tejidos del mesófilo y en las células de la vaina, además de que se describe que la expresión de los genes *sps* en hojas están regulados por el estado de desarrollo del tejido, y por efecto de la luz, lo último evidenciado por la detección reducida de RNA producto de la transcripción de genes *sps* después de que las plantas fueron sometidas a oscuridad por >12 horas (Cheng *et al.*, 1996).

De manera particular, para el gen *sps1* de arroz, se ha encontrado de la región 5'UTR contribuye a la expresión de este gen a pesar de que esta región es larga (360 nucleótidos) y con un estructura secundaria compleja, observándose una reducción de la expresión del gen reportero GUS bajo en control de la expresión de promotor del gen *sps1* al cual se le había eliminado el externo 5'UTR (Martínez-Trujillo *et al.*, 2003).

En análisis de plantas transgénicas con el gen de la luciferasa fusionado al promotor de los genes *sps1* y *sps11* de arroz, que permite el estudio de la expresión de estos genes *in situ* y en tiempo real por la cuantificación de la bioluminiscencia en plantas intactas, reveló que estos están bajo control del ritmo circadiano, aumentando la bioluminiscencia cuantificada en horas de luz, la cual se reducida durante las horas de oscuridad en periodos de luz/oscuridad de 12 horas, fenómeno que se mantuvo cuando las plantas fueron sometidas a periodos constantes de luz. De igual manera, se demostró que la acumulación de sacarosa en tejidos foliares, no afectó la expresión de estos genes, indicando que las concentraciones de sacarosa no ejercen un mayor efecto sobre la expresión de estos dos genes (Yonekura *et al.*, 2013).

Un patrón de expresión regulado por el desarrollo de frutos ha sido encontrado para el gen *CmSPS1* de melón (*Cucumis melon*), del cual se han detectado aumentos de la acumulación de transcritos en frutos maduros en el mesocarpio, pero no en frutos jóvenes en desarrollo (Yu *et al.*, 2007).

Ensayos más recientes han realizado análisis detallados de los distintos patrones de expresión de los genes *sps*. Por ejemplo, en tabaco, se ha demostrado que existe una expresión diferencial de los genes *sps*, encontrándose que el gen de la

familia A (NtSPSA) esta expresado en la mayoría de los tejidos de las plantas, sin embargo para durante la realización de este estudio, aún no se sabía cuántos genes de la familia A existían en el genoma del tabaco, ya que en otras especies como tomate y *A. thaliana*, se ha reportado la existencia de más de un gene de ésta familia. Por otra parte el gen de la familia B, está prácticamente restringido a los tejidos reproductivos, con implicaciones en el desarrollo del polen por ejemplo, de manera similar al gen de la familia B de *sps* de monocotiledóneas como el arroz (*sps1*), y finalmente el gen de la familia C, se encuentra expresado con mayor intensidad en tejidos fotosintéticos. Un patrón de expresión similar realizado en *A. thaliana* reveló que la distribución de los genes era similar a la encontrada en tabaco, sin embargo, la descripción de los genes de la familia A, permitió que se analizar la expresión del gen reportero GUS bajo la influencia del promotor de cada uno de los dos genes de la familia A encontrados en esta planta, encontrado que el gen A1, (AtSPSA1) es junto con el gen de la familia C (AtSPSC) las formas más abundantes (Chen *et al.*, 2005; Volkert *et al.*, 2014).

En tabaco se encontró que el gen de la familia C, a nivel de transcritos tiene un nivel de transcritos que alcanza un máximo de expresión durante la noche, sugiriendo otros factores que estén regulando la expresión de genes *sps*, distinto a la transición demanda-fuente y por influencia de la luz, como se ha reportado para otros genes en tejidos fotosintéticos. La expresión del gen NtSPSC durante la noche está relacionada con la movilización del almidón transitorio que se forma durante las horas de luz. Esta idea de la función de NtSPSC, esta soportada por el efecto del silenciamiento de este gen que causa la acumulación de metabolitos productos de la degradación de almidón. Pero durante las horas de luz, el silenciamiento de este gen, no causó cambios evidentes sobre la síntesis y movilización de sacarosa, debido al efecto de la expresión y actividad de otras formas de SPS, especialmente por la perteneciente a la familia A. Un efecto similar se ha encontrado en plantas de *A. thaliana*, pero los resultados a diferencia de lo observado en tabaco para este modelo biológico indican que podría no existir una diferenciación tan estricta en la función de proveer sacarosa durante la noche,

sino que ambas están actuando de manera conjunta (Chen *et al.*, 2005; Volkert *et al.*, 2014).

Con estos ejemplos se denota la diversidad de elementos bajo los cuales las plantas regulan la expresión de los distintos genes *sps*, en dónde destacan los estado de desarrollo, y particularmente la transición demanda-fuente, y en otros sistemas heterotróficos, el estado de maduración como en frutos, y la generación de sacarosa para suplementar la demanda de carbono de embriones en desarrollo durante la germinación, así como durante el desarrollo y germinación de granos de polen. Algunos mecanismos han sido explicados eficientemente, por ejemplo por la presencia de elementos *cis*-regulatorios en los promotores que influyen la expresión bajo ciertas condiciones, aún existen otros factores que afectan la expresión de genes *sps* que son desconocidos.

Cuando se iniciaron los estudios de la regulación de la actividad enzimática de SPS, esta al ser una enzima escasa en tejidos vegetales y con poca estabilidad supuso un reto, especialmente en los análisis de realizados en tejidos demanda (Reimholz *et al.*, 1994). Sin embargo, se desarrollaron técnicas que han permitido el análisis que han elucidado los mecanismos de regulación que actúan sobre la SPS.

En extractos parcialmente purificados de SPS, demostró que glucosa-6-fosfato (Glc-6-P), sirve como un activador de la enzima, mientras que la presencia de fósforo inorgánico (Pi), la inhibe y genera un efecto antagónico a la activación inducida por la presencia de Glc-6-P, provocando una reducción de la actividad de SPS de hasta el 65 % cuando era probado en ausencia del Glc-6-P. El efecto de la inhibición del Pi, fue dependiente del pH del medio, encontrándose que en condiciones ácidas (pH 5.5) el efecto del Pi sobre la inactivación de la SPS esta ausente, evidenciándose a medida que las condiciones del medio se tornaban alcalinas. El efecto del Pi en la regulación de la SPS durante los cambios de luz a oscuridad puede ser explicado por el aumento del Pi en condiciones de oscuridad (Doethler y Huber, 1983).

Aparte de esta regulación de naturaleza alostérica, se conoce la existencia de modificaciones por uniones covalentes con Pi, esta conclusión surge por la

observación de la inactividad “espontanea” de extractos de SPS, que había sido incubado a 25 °C, fenómeno que fue contrarrestado por la presencia de inhibidores de fosfatasa (Huber *et al.*, 1991). La incubación de extractos de SPS de espinaca (*S. oleracea*) obtenidos durante las horas de luz, cuando la SPS está en su forma activa, con [γ - 32 P]ATP en presencia de una proteína cinasa, ayudo a identificar el sitio de fosforilación en el aminoácido Ser₁₅₈; la fosforilación en este sitio fue suficiente para la inactivación de la enzima, y se considera como el sitio principal de fosforilación de la SPS (McMichel *et al.*, 1993), que ha sido identificado en enzimas SPS de otras especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas (Huber y Huber, 1996).

En tubérculos de papa y en semillas en germinación de *Ricinus communis*, ambos tejidos sumidero, se encontró que la actividad SPS se regula de manera similar por efectores alostéricos, aumentando su actividad en presencia de metabolitos como Glc-6-P, e inhibición por Pi, así como influencia de la presencia de otros metabolitos que inhibieron la actividad catalítica como el ácido okadoico y microcistina, o aumentaron la actividad como manosa, observándose también antagonismo entre Glc-6-P y Pi, como se había reportado en tejidos fuente (Reimholz *et al.*, 1994).

La expresión de los cuatro genes de SPS de *A. thaliana* (*SPSA1*, *SPSA2*, *SPSB*, y *SPSC*) en *Saccharomyces cerevisiae*, permitieron la obtención de extractos puros de cada una de las isoformas de SPS. Las enzimas, obtenidas de cada uno de los genes *sps*, mostró actividad catalítica, sin embargo, cuando la actividad de cada una de las isoformas fue analizada en presencia de los reguladores alostéricos Glc-6-P y Pi, solo la SPSB mostró modificaciones en su actividad, presentando un patrón que coincidía con lo reportado en numerosas especies de plantas, pero las otras tres isoformas, no mostraron cambios relevantes en su actividad por influencia de ambos reguladores alostéricos, indicando por un lado que la proteína puede sufrir modificaciones postraduccionales cuya ausencia es resultado de la expresión heteróloga de la proteína en *S. cerevisiae*, pero el hecho de que una de ellas responda de acuerdo a los mecanismos regulatorios caracterizados en SPS, puede indicar que existan otros mecanismos regulatorios a nivel postraduccional

que estén controlando la actividad de la SPS. El patrón de expresión fue analizado por fusión del gen reportero GUS a los promotores de cada uno de los genes *sps*, esto demostró que existe para cada uno un patrón de expresión particular pero que en algunos tejidos existe co-expresión de genes *sps* (Volkert *et al.*, 2014).

Tomando en cuenta estos resultados, se ha caracterizado la regulación de la expresión de genes por influencia de factores intrínsecos ligados al desarrollo y al cambio metabólico que esto conlleva, pero también por influencia de externos. También, la evidencia más reciente indica que aparte de los mecanismos de regulación de la expresión de genes *sps* así como de la actividad catalítica de los productos de la transcripción de cada uno de los genes, pueden existir otros que aún no han sido elucidados.

1.3 Movilización de la sacarosa en planta

Los principales sitios de síntesis de sacarosa en las plantas son las hojas, y como se ha mencionado anteriormente, esta ocurre en el citoplasma celular (Bird *et al.*, 1974). En plantas de maíz, se encontró que la mayor actividad SPS está en células de mesófilo y en células de la vaina (Ohsugi y Huber, 1987). En arroz, la distribución de la expresión del gen *sps1* de la familia B, en tejido fuente, fue detectada en las células del mesófilo (Chávez-Bárcenas *et al.*, 2000). Una vez que la sacarosa es sintetizada, transita por el simplasto a través de rutas pasivas, sin embargo, también existe movimiento de sacarosa a través de células que no están conectadas por medio de plasmodesmos, y esto implica que el transporte debe usar como vía de tránsito el apoplasto (Sauer *et al.*, 2007).

El transporte asistido se realiza por una parte, gracias a la actividad de proteínas de membrana transportadoras de sacarosa (SUT) que son codificadas por una pequeña familia de genes. Estas proteínas tienen distinta localización subcelular, encontrándose en la membrana celular, en el tonoplasto y en las membranas de plastidios, y su función se relaciona con la movilización de sacarosa cuando esta es liberada al apoplasto, y en la carga y descarga del floema (Kühn y Grof, 2010, Liesche *et al.*, 2011).

El transporte de la sacarosa por el apoplasto, esta también es asistido por transportadores de monosacáridos, que interactúan con la actividad de invertasas (INV) apoplásticas, que generan hexosas a partir de la sacarosa que se libera a este espacio (Slewinski, 2011). Además, dentro de la célula, también se han descrito mecanismos de degradación y resíntesis en donde están implicadas las enzimas sacarosa sintasa (SUS) e INV vacuolares o citoplásmicas, en un mecanismo acoplado a la resíntesis de sacarosa en conjunto con la actividad SPS en el interior de las células. Estos procesos de movilización de sacarosa se conocen como ciclos fútiles en y en tomate por ejemplo, se han propuesto como mecanismos mediadores de la movilización de carbono hacia el fruto (Nguyen-Quoc y Foyer, 2001).

Una vez que la sacarosa alcanza las células del mesófilo, adyacentes a las células acompañantes, es mayoritariamente descargada al apoplasto, por la carencia de formación de plasmodesmos entre las células del mesófilo y las células acompañantes. Este proceso es mediado por una pequeña familia de genes que codifica un nuevo grupo de proteínas denominadas SWEET, a través de un mecanismo recientemente caracterizado (Braun, 2012). Después, la sacarosa es ingresada por transportadores localizados en las membranas de las células acompañantes o de los elementos cribosos, y una vez dentro del floema, mediante flujo de masas es liberada en los tejidos demanda o sumidero.

Una vez que alcanza los tejidos demanda, desde el floema es liberada al espacio extracelular, a partir de donde puede ser ingresada al interior celular a través de transportadores de sacarosa, o en forma de hexosas, gracias a la hidrólisis catalizada por INV apoplásticas (Sauer, 2007), también siguiendo rutas de distribución que implican su tránsito por rutas simplásticas y apoplásticas.

1.4 Degradación de sacarosa por efecto de sacarosa sintasa e invertasas en tejidos de metabolismo heterotrófico

La SUS, cataliza la formación de UDP-Glc y fructosa a partir de sacarosa, mediante una reacción fácilmente reversible (Geigenberger y Stitt, 1993; Lunn,

2002). En plantas como algodón, así como en otras plantas modelo de las cuales se conoce su genoma, se han encontrado hasta siete genes *SUS* (Chen *et al.*, 2012). A la fecha, se ha reconocido que la multiplicidad de genes *SUS* en el genoma de las plantas, tiene repercusiones en su función por procesos de divergencia evolutiva, que se reflejan en el número de intrones y exones de cada una de los genes, y en los distintos patrones de expresión que presenta cada uno de ellos (Chen *et al.*, 2012). Estas modificaciones han sugerido que las distintas isoformas de *SUS*, son capaces de realizar distintas funciones que están implicadas en la conservación de energía, ya que la reacción que cataliza, no representa un costo energético como otras rutas de degradación de sacarosa, pero también en la síntesis de otros polímeros de carbohidratos (Goren *et al.*, 2011). En maíz, se ha caracterizado que una de isoenzimas de *SUS* está implicada en la síntesis de celulosa, mientras que otra distinta está relacionada con la generación de los productos para la síntesis de almidón (Chourey *et al.*, 1998), un fenómeno similar ha sido reportado en plantas de chícharo (Barratt *et al.*, 2001). Los productos generados por las enzimas *SUS*, también han sido relacionados con la síntesis de callosa (Amor *et al.*, 1995). Se ha considerado que en tejidos existe una relación entre la actividad de *SUS* y *SPS* durante los ciclos fútiles, específicamente en los procesos de degradación y re-síntesis que ocurren en el citoplasma celular (Nguyen-Quoc y Foyer, 2001), y se ha observado que la reducción de la actividad de *SUS* en plantas transgénicas, ocasiona también la reducción de la actividad *SPS*, por lo que se sugiere está implicado en los procesos de importe de sacarosa en tejidos de metabolismo heterotrófico (D'Aoust *et al.*, 1999) y en algunos de estos tejidos como frutos de tomate, su actividad se ha relacionado con la fuerza del tejido demanda . La regulación de la movilización de solutos hacia dentro y fuera de la mitocondria, una función distinta a la sacarolítica, ha sido supuesta a algunas formas de *SUS* por la presencia de péptidos de destinación a la mitocondria (Subbiah *et al.*, 2006).

En *Arabidopsis*, cada uno de los genes de *SUS*, a pesar de que presenta patrones de expresión particulares, con diferencia espacio temporal, algunos de ellos,

muestran redundancia en su expresión en algunos tejidos (Bieniawska *et al.*, 2007).

Otro grupo de enzimas encargadas de la degradación de sacarosa, son las invertasas. Estas, al igual que otras enzimas implicadas en la síntesis de sacarosa, son codificadas por una pequeña familia multigénica; catalizan la reacción de hidrólisis de sacarosa, formando a partir de ella, fructosa y glucosa. Tradicionalmente, se han clasificado como invertasas apoplásticas, extracelulares o de pared celular (CW-Inv); ácidas o vacuolares, y neutras o alcalinas. Esta clasificación está basada en la localización subcelular, y la diferencia en las propiedades catalíticas, al pH óptimo en el que llevan a cabo su reacción, el punto isoeléctrico y a las características particulares de su secuencia aminoacídica (Strum, 1999). En plantas modelo como tomate, se han caracterizado por ejemplo, 4 genes de CW-Inv (Godt y Roitsch, 1997), en papa se ha descrito la presencia de 5 y la predicción de un sexto gen que posiblemente pertenezca a la familia de invertasas (Draffehn *et al.*, 2010), mientras que en *Arabidopsis*, seis genes de la familia de las CW-Inv han sido encontrados (Sherson *et al.*, 2003).

Las invertasas han sido clasificadas dentro del grupo de genes que regulan la distribución del carbono en tejidos vegetales. La invertasa Lin6, por los patrones de expresión que manifiesta, así como por su localización subcelular, se considera como un elemento involucrado en el suministro de carbohidratos en los tejidos demanda (Godt y Roitsch, 1997). Así mismo, en frutos de *Cucumis melo*, la actividad de las invertasas ácidas, más que de otros grupos de invertasas han asociadas a la acumulación de azúcares, mostrando una disminución de su actividad de acuerdo a la progresión del desarrollo del fruto (Hubbard *et al.*, 1989). Como se había mencionado anteriormente, las invertasas están implicadas en los ciclos fútiles y en la ciclación de carbohidratos, mediante mecanismos complejos que involucran la actividad de transportadores de sacarosa y monosacáridos, de SPS y SUS (Nguyen-Quoc y Foyer, 2001).

La multiplicidad de genes de invertasas, así como el patrón de expresión de cada uno de ellos, sugiere que cada uno de ellos podría estar implicado en distintas funciones fisiológicas en las plantas (Sherson *et al.*, 2003).

1.5 Influencia de factores externos sobre la expresión y de las actividades enzimáticas de los elementos clave en la biosíntesis y la degradación de sacarosa.

Está documentado que algunos genes de *sps* son capaces de responder a estímulos medioambientales tales como frío (Guy *et al.*, 1992; Bascuñán-Godoy *et al.*, 2006); en condiciones de falta de agua, en trigo se ha observado un aumento en la actividad de SPS que se correlaciona con la disminución de la actividad de enzimas de degradación de sacarosa en tejidos no fotosintéticos, al igual que en *Festuca arundinacea*, se ha observado acumulación de sacarosa en hojas en condiciones de estrés osmótico, lo cual indica que la contribución de este carbohidrato en la reducción del potencial osmótico en hojas como un efecto protector en contra ante este tipo de estrés (Fu *et al.*, 2010). Además de que algunos genes contienen elementos de respuesta a luz en sus promotores, y la cantidad de radiación también controla los estados de actividad a nivel enzimático (Chávez-Bárceñas *et al.*, 2000; Pattanayak, 1998; Yonekura *et al.*, 2013).

Por su parte, la regulación de la expresión de genes *SUS* por estrés causado por sequía, baja temperatura y por estimulación de etileno en plantas de *Hevea brasiliensis* ha sido documentada (Xiao *et al.*, 2014); en ciclos de rehidratación y deshidratación en *Caterostigma* (Kleines *et al.*, 1999) y en varios órganos en estado de deshidratación, se ha observado la activación de la expresión de uno de los genes de SucSy en *A. thaliana* (Baud *et al.*, 2004). Así mismo, como se ha caracterizado en plantas de arroz sujeto a condiciones de anaerobiosis (Ricard *et al.*, 1991), la actividad de sacarosa sintasa se favorece en dichas condiciones que se propician en ciertos tejidos heterotróficos de algunas especies vegetales como las raíces.

El efecto del frío se ha asociado con la actividad de las invertasas y la acumulación de fructosa y glucosa en tubérculos de papa (Pressey, 1969; Bagnaresi *et al.*, 2008). Así mismo, existen invertasas que presentan la particularidad de presentar alteraciones en sus niveles de expresión génica ante múltiples estímulos externos, como la invertasa apoplástica LIN6 de tomate, la

cual se considera como un elemento convergente de numerosas rutas que se desencadenan por elementos externos de naturaleza biótica como la presencia de *Botrytis cinerea*, (Hyun *et al.*, 2011) por la infección causada por el virus del rizado amarillo del tomate (Sade *et al.*, 2013); la presencia de hongos micorrizógenos arbusculares (Schaarschmidt *et al.*, 2006; García-Rodríguez *et al.*, 2007); y por influencia de reguladores de crecimiento vegetal como brasinosteroides, ácido jasmónico y ácido salicílico (Proels y Roistsch, 2009), entre otros.

1.6 Efecto de la simbiosis micorrícica sobre los genes clave del metabolismo de sacarosa

En la actualidad, ha sido documentado en diversos estudios que la simbiosis micorrícica de tipo arbuscular es capaz de causar efectos sobre tejidos fotosintéticos. Se sabe que la presencia de la simbiosis, es capaz de cambiar el metabolismo primario de las plantas, detectándose en estas aumentos en la medida de las tasas fotosintéticas, lo cual está relacionado con análisis que se han realizado en donde se ha estimado que las plantas son capaces de destinar de un 4 a un 20 % de total de fotoasimilados para el mantenimiento de la simbiosis, dichos cambios también pueden estar relacionados con otros procesos afines como la síntesis de polímeros de reserva y biosíntesis de otros carbohidratos como sacarosa.

En este punto, los procesos generales que rigen los cambios del metabolismo de los carbohidratos sobre las plantas en presencia de la simbiosis micorrícica han sido debatidos desde distintas perspectivas. Dichos cambios por una parte han sido considerados como un efecto de la mejora nutricional a la que están sujetas las plantas. A este respecto, el trabajo de Wright *et al.* (1998), quienes analizan los cambios sobre las tasas fotosintéticas en plantas de *Trifolium repens* inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares y plantas no inoculadas, pero en ambos casos las plantas fueron tratadas para que mantuvieran una condición nutricional similar, especialmente en fósforo y nitrógeno. En este experimento, se registró un aumento en la tasa fotosintética en plantas inoculadas con HMA, sin embargo, el

aumento no estuvo relacionado con el aumento de la biomasa de estas plantas, por lo que los autores proponen que el aumento de la tasa fotosintética y por consiguiente de la producción de fotoasimilados, es necesaria para el mantenimiento de la simbiosis, sugiriendo así que la presencia del simbionte fúngico en la raíz aumenta la fuerza de demanda de este tejido.

En otro estudio en el que se usó como planta modelo *Cucumis sativus*, en un experimento en el cual se modificó el régimen de fertilización para obtener niveles de fósforo similar en plantas inoculadas con *Gl. mosseae* y plantas no inoculadas, no se observaron cambios en la tasa fotosintética, por lo que se determinó que la presencia del hongo en la raíz no está ejerciendo un cambio significativo en la partición de carbono, pero que la mejora nutrimental que está bajo influencia de éste en asociación con las plantas, causa un efecto sobre la tasa fotosintética (Black *et al.*, 2000).

A pesar de que estos análisis que aún mantienen una postura vigente en cuanto a la asimilación de carbono y la distribución de este en plantas por influencia de la simbiosis micorrícica de tipo arbuscular, en la actualidad, debido a la diversidad funcional que presentan estos hongos, así como la influencia que el medio externo causa sobre distintos aspectos de la simbiosis, y por lo poco que se conoce de los flujos de carbono entre los simbiontes, ha llevado a considerar que en realidad pueden estar actuando distintos fenómenos en lo que respecta a la producción fotoasimilados y su destino hacia el mantenimiento de la simbiosis, entre los cuales se encuentran el estado de desarrollo de la planta, así como de la simbiosis *per se*, al igual que el tipo de organismos que se encuentren en asociación y su interacción con factores bióticos y abióticos (Valentine *et al.*, 2013).

Como se ha venido mencionado, uno de los carbohidratos generados como producto de las reacciones de fijación de carbono es la sacarosa, la cual es la forma orgánica por la cual la mayoría de las plantas transportan el carbono orgánico desde los tejidos fotosintéticos hasta los tejidos de metabolismo heterotrófico. Su biosíntesis es altamente regulada por distintos mecanismos a nivel de expresión de los genes involucrados en la ruta de síntesis y de igual manera, existe alta regulación de la actividad a nivel enzimático.

En el contexto de las interacciones bióticas y de manera específica, durante la interacción con hongos formadores de micorriza de tipo arbuscular, las plantas, al modificar los procesos de fijación de carbono, podrían estar también modulando los procesos de biosíntesis de sacarosa, de manera distinta que en ausencia de la simbiosis, lo que ocasionaría una modificación en la distribución del carbono en los distintos órganos de las plantas.

En plantas con la simbiosis micorrícica establecida, las invertasas han tenido relevancia en su estudio, en parte por su localización celular. La expresión del gen de la invertasa apopástica LIN6 en tomate, se ha estudiado. Se sabe que existe una estimulación de la expresión del gen en plantas con la simbiosis micorrícica establecida (García-Rodríguez *et al.*, 2007; Schaarschmidt *et al.*, 2006), y análisis de distribución de transcritos *in situ* por hibridación en raíces de tomate, demostraron que existe acumulación de transcritos restringidos a las células del corticales que albergan arbusculos y en el cilindro central en dónde se localizan los tejidos vasculares, este patrón de distribución se observó también por la detección histoquímica de la expresión del gen reportero *iudA* fusionado al promotor de *Lin6* en raíces de tabaco colonizadas por HMA (Schaarschmidt *et al.*, 2006). La acumulación de transcritos de invertasas vacuolares también ha sido reportado en células que contienen arbusculos en raíces colonizadas por HMAs por hibridación *in situ* (Blee y Anderson, 2002). Por su parte, Schubert *et al.* (2003) reportó el incremento de la actividad de invertasas alcalinas en plantas de soya cuyas raíces habían sido colonizadas por HMAs, que se sugiere podrían estar implicadas en el suministro de azúcares al hongo.

Finalmente, se han generado pocos estudios sobre la influencia que podría tener la simbiosis micorrícica sobre los elementos clave responsables de la biosíntesis de sacarosa a nivel de transcritos o enzimático. En plantas de tomate, por ejemplo, García-Rodríguez (2006) observan que existe una estimulación de la expresión del gen de la *spsA1* en tejido fotosintético de plantas de tomate inoculadas con *Funneliformis mosseae* (*Gl. mosseae*) o con *Rhizophagus irregularis* (*Gl. intraradices*) en comparación con la expresión observan en plantas no inoculadas. Paralelamente, observan cambios en la expresión del gene de la subunidad

pequeña de RuBisCO, que codifican la enzima responsable de la fijación del CO₂, con lo que proponen la existencia de un mecanismo de aumento de la fijación de carbono y canalización de los productos generados a la biosíntesis de sacarosa en parte aérea ocasionado por el aumento en el requerimiento de fotoasimilados inducido por la presencia de la simbiosis.

En otro estudio, Black *et al.* (2000), analizan la actividad de la enzima SPS en hojas con distintos estados de desarrollo en plantas con un régimen de fertilización modificado que permitió inducir una producción de biomasa en plantas no inoculadas con HMA similar al registrado en plantas inoculadas con el hongo *Funneliformis mosseae* (*Gl. mosseae*), que fueron fertilizadas con una concentración más baja de fósforo. En este trabajo no se observaron cambios significativos en la actividad de SPS en los tejidos foliares analizados, pero una reducción de la actividad en AGPasa, enzima involucrada en la biosíntesis de almidón, fue detectada en las condiciones anteriormente mencionadas cuando fueron comparadas con plantas que no tenían presente la simbiosis que fueron fertilizadas con concentraciones bajas de P iguales a las usadas en las plantas que fueron inoculadas con el hongo. Con estos análisis, a pesar de no haber registrado cambios en la actividad de las enzimas responsables de la biosíntesis de sacarosa, los autores concluyen que en presencia de la simbiosis, al igual que en altas concentraciones de fósforo, existe un cambio en el metabolismo en donde existe una preferencia hacia la canalización de los fotoasimilados hacia la síntesis de carbohidratos solubles que posteriormente serán enviados a tejidos heterotróficos.

Hasta lo que se sabe, los trabajos de investigación antes citados, relacionados con la expresión de genes y actividad enzimática de SPS en plantas bajo influencia de la simbiosis micorrícica han sido los únicos publicados. Así mismo, el efecto sobre la expresión de distintos genes *sps*, ha sido poco explorada.

En los sitios de demanda de carbono, se ha detectado la expresión de isoformas de sacarosa-fosfato sintasa. Por ejemplo, en polen se detectó la expresión del gen de la isoforma SPS1 de arroz por la fusión de un gen reportero al promotor de este. La expresión de una de las isoformas de sacarosa-fosfato sintasa en esta

estructura heterotrófica, que de acuerdo a los autores, esta relacionada con generación de un flujo de partición de carbono para la síntesis de otros compuestos de importancia para el desarrollo de esta estructura (Chávez-Bárcenas *et al.*, 2000) puede abrir la posibilidad que durante la simbiosis micorrícica de tipo arbuscular, en tejidos como las raíces, se pueda modificar la expresión de alguno de los genes de *sps*, con la finalidad de modificar los gradientes de concentración de este carbohidrato, y así como en otras estructuras heterotróficas, modificar en mayor o menor grado la partición del carbono en las plantas.

1.7 La herbívora, desencadenante de respuestas de defensa en plantas y su relación con el metabolismo de sacarosa

Las plantas han desarrollado múltiples respuestas de defensa ante el estrés causado por la presencia de insectos fitófagos. De manera general, los mecanismos implicados en la respuesta de defensa se clasifican en directos, que implican la modificación del perfil químico que causan efectos detrimentales en el desarrollo y/o supervivencia de los insectos herbívoros y la protección por el desarrollo de estructuras especializadas como tricomas, espinas, o pubescencia, entre otras; por otro lado existen mecanismo indirectos que se relacionan con la producción de sustancias químicas volátiles que atraen a enemigos naturales de insectos fitófagos (War *et al.*, 2012). El jasmonato (JA), es un regulador de crecimiento que tiene efectos sobre distintos aspectos fisiológicos en las plantas, pero también es una molécula señal que está estrechamente ligada con la respuesta de defensa en contra de herbívoros y patógenos necrotróficos (Schaller y Stintzi, 2008).

Tradicionalmente, las respuestas de defensa de las plantas estaban asociadas a la plasticidad que presenta el metabolismo primario, sin embargo, las técnicas actuales ha revelado que la el ataque por herbívoros, también modifica la expresión de genes relacionados con del metabolismo carbono (Schwachtje y Baldwin, 2008).

Numerosos estudios indican que en plantas sometidas a herbivoría, ocurre una modificación de la distribución de fotoasimilados, que favorece la acumulación de carbohidratos en tejidos subterráneos cuando la herbivoría es inducida en tejidos foliares, y en tallos cuando ocurre en tejidos radiculares (Schwachtje *et al.*, 2006). Por el contrario otros estudios han encontrado la reducción de carbohidratos en los tejidos de plantas sometidas a herbívora, que se correlaciona con el aumento de la síntesis de compuestos de defensa (Machado *et al.*, 2013).

Schwachtje y Baldwin (2008) proponen que los cambios en el metabolismo primario por la presencia de insectos fitófagos puede ser resultado de la función redundante de mecanismos involucrados en: 1) el mantenimiento de las respuestas de defensa que requieren el uso de las reservas disponibles, 2) el mantenimiento del cambio metabólico que las plantas sufren para tolerar el ataque, 3) la función de los metabolitos primarios como moléculas señaladoras, y 3) la posibilidad de que los metabolitos primarios puedan ser moléculas de defensa.

La modificación de la distribución del carbono se ha asociado a la síntesis de JA (Henkes *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2013), sin embargo se ha sugerido que otros mecanismos implicados, son independientes de este señalizador (Schwachtje *et al.*, 2006).

Particularmente, en lo que corresponde al metabolismo de sacarosa, existe evidencia del aumento de la actividad SPS en hojas y SUS en raíces (Guo *et al.*, 2012) de invertasas ácidas en raíces (Schwachtje *et al.*, 2006), sin embargo, otros trabajo que ha aplicado el análisis de la modificación de la expresión de genes mediante microarreglos, no han encontrado cambios sustanciales de la expresión de genes de síntesis de sacarosa (Babsts *et al.*, 2009). Sin embargo, la complejidad de las interacciones con herbívoros ha sido evidenciada durante el análisis de la modificación del transcriptoma en dos especies de solanáceas sometidas al ataque de la misma especie de larva de lepidóptero fitófaga, que reveló que las especies de plantas estudiadas responden de manera distinta sin un patrón común ante la herbivoría (Schmidt *et al.*, 2005), lo que pone de

manifiesto la complejidad de las interacciones entre insectos herbívoros y las plantas.

LITERATURA CONSULTADA

- Amor Y, Haigler CA, Jhonson S, Wainscott M y Delmer DP (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. PNAS 92: 9353-9357.
- Babst BA, Sjödin A, Jansson S y Orians CM (2009). Local and systemic transcriptome responses to herbivory and jasmonic acid in *Populus*. Tree Genetics & Genomes 5: 459-474.
- Bagnaresi P, Moschella A, Beretta O, Vitulli F, Ranalli P y Perata P (2008) Heterologous microarray experiments allow the identification of the early events associated with potato tuber cold sweetening BMC Genomics 9(176):1-23.
- Baroja-Fernandez E, Muñoz FJ, Akazawa T y Pozueta-Romero J (2001) Reappraisal of the current prevailing model of starch biosynthesis in photosynthetic tissues: a proposal involving the cytosolic production of ADP-Glucose by sucrose synthase and occurrence of cyclic turnover of starch in chloroplast. Plant cell physiology 42:1311-1320.
- Barratt DHP, Barber L, Kruger NJ, Smith AM, Wang TL y Martin C (2001) Multiple distinct isoforms of sucrose synthase in pea. Plant physiology 127:655-664.
- Bascuñan-Godoy L, Urube E, Zúñiga-Feest A, Corcuera LJ y Bravo LA (2006) Low temperature regulates sucrose-phosphate synthase activity in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. by decreasing its sensitivity to Pi and increased activation by glucose-6-phosphate. Polar Biology 29: 1011-1017.

- Baud S, Vaultier M-N y Rochat C (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 55 (396): 397-409.
- Bird IF, Cornelius MJ, Keys AJ y Whittingham CP (1974) Intracellular site of sucrose synthesis in leaves. *Phytochemistry*. 13:59-64.
- Bieniawska Z, Barratt DHP, Garlick AP, Thole V, Kruger NJ, Martin C, Zrenner R, Smith AM (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. *The Plant Journal* 49: 810–828.
- Black KG, Mitchell DT, Osborne B (2000) Effect of mycorrhizal-enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber. *Plant, Cell and Environment* 23:797–809.
- Blee K y Anderson AJ (2002) Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant molecular biology* 50:197–211.
- Braun DM (2012) SWEET! the pathway is complete. *Science* 335:173-174.
- Castleden C, Aoki N, Gillespie VJ, MacRae EA, Quick WP, Buchner P, Foyer CH, Furbank RT y Lunn JE (2004) Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiology* 135:1753–1764.
- Chávez-Barcenas AT, Valdéz-Alarcon JJ, Martínez-Trujillo M, Chen L, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ y Herrera-Estrella L (2000). Tissue specific and developmental pattern of expression of the rice *sps1*. *Plant Physiology* 124: 641-654.

- Chen S, Hajirezaei M y Börnke F (2005) expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiology* 139:1163–1174
- Chen A, He S, Li F, Li Z, Ding M, Liu Q y Rong J (2012). Analyses of the sucrosa synthase gene family in cotton: structure, phylogeny and expression patterns. *Plant biology* 12(85):1-17.
- Cheng W-H, Im KH y Chourey PS (1996). Sucrose phosphate synthase expression at the cell and tissue level is coordinated with sucrose sink-to-source transition in maize leaf. *Plant Physiology* 111: 1021-1029.
- Chourey PS, Taliercio EW, Carlson SJ y Ruan YL (1998). Genetic evidence that the two isozymes 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
- Daie J (1993). Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: A key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. *Photosynthesis research* 38: 5-14.
- D'Aoust MA, Yelle S y 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.
- Doehlert DC, Huber SC (1983). Regulation of spinach leaf sucrose- phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate, and pH. *Plant Physiology* 73: 989–994
- Draffehn AM, Meller S, Li L, Gebhardt C (2010). Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases. *BMC Plant biology* 10(271):1-15.

- Farrar JF (2000). Aquisition, partitioning and loss of carbon. Physiological Plant Ecology: 39th symposium of the British Ecological Society. Press M, Scholes J, Barker M Eds. Cambridge University Press.
- Fu J, Huang B y Fry J (2010) Osmotic potential, sucrose level, and activity of sucrose metabolic enzyemes in tall festuca in response to deficit irrigation. Journal of American Society of Horticultural Science 135 (6): 506-510.
- Flüge UI, Fischer K, Gross A, Sebald W, Lottspeich y Eckerskorn C (1989). The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplast: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplast. The EMBO Journal 8 (1): 39-46.
- García-Rodríguez S (2006) Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la regulación de genes implicados en el metabolismo carbonado en plantas de tomate (*Solanum esculentum*). Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- García-Rodríguez S, Azcón-Aguilar C y Ferrol Nuria (2007). Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. Physiologia Plantarum 129: 737-746.
- Geigenberger P y Stitt M (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. Planta 189:329-339.
- Gifford RM y Evans LT (1981). Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. Annual Review of Plant Physiology 32: 485-509.

- Godt DE, Roitsch T (1997). Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertases isoenzymes of tomato suggest an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiology* 115: 273-282.
- Goren S, Huber SC y Granot D (2011). Comparison of a novel tomato sucrose synthase, SISUS4, with previously described SISUS isoforms reveals distinct sequence features and differential expression patterns in association with stem maturation. *Planta* 233:1011–23.
- Guo H, Sun Y, Ren Q, Zhu-Salzman K, Kang L, Wang C, Li C y Ge F (2012). Elevated CO₂ reduces the resistance and tolerance of tomato plants to *Helicoverpa armigera* by suppressing the JA signalling pathway. *PLOS One* 7 (7): e41426.
- Guy CL, Huber JL y Huber SC (1992) Sucrose-phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology* 100: 502-508.
- Henkes GJ, Thorpe MR, Minchin PEH, Schurr U y Röse U (2008). Jasmonic acid treatment to part of the root system is consistent with simulated leaf herbivory, diverting recently assimilated carbon towards untreated roots within an hour. *Plant, Cell and Environment* 31: 1229-1236.
- Herbers K y Sonnewald U (1998). Molecular determinants of sink strength. *Current Opinion in Plant Biology* 1 (3): 207-216.
- Hirosea T, Hashidab Y, Aokib N, Okamurab M, Yonekurac M, Ohtoc C, Teraoa T y Ohsugib R (2014). Analysis of gene-disruption mutants of a sucrose phosphate synthase gene in rice, OsSPS1, shows the importance of sucrose synthesis in pollen germination. *Plant Science* 225: 102-106.

- Ho LC (1988). Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 39: 355-378.
- Hubbard NL, Pharr DM y Huber SC (1991). Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Physiologia Plantarum* 82: 191-196.
- Huber JL, Hite DRC, Outlaw WH y Huber SC (1991). Inactivation of highly activated spinach leaf sucrose-phosphate synthase by dephosphorilation. *Plant Physiology* 95: 291-297.
- Huber SC, Huber JL (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 47: 431–444.
- Hyun TK, Eom SH, Rim Y Kim J-S (2011). Alteration of the expression and activation of tomato invertases during *Botrytis cinerea* infection. *Plant Omics Journal* 4 (7): 413-417.
- Kleines M, Elster R-C, Rodrigo M-J, Blervacq A-S, Salamini F y Bartles D (1999) Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst.). *Planta* 209: 13-24.
- Kühn C y Grof C (2010). Sucrose transporters of higher plants. *Current opinion in plant biology*. 13:288-298.
- Langenkämper G, Fung RWM, Newcomb RD, Atkinson RG, Gardner RC y MacRae EA (2002). Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *Journal of Molecular Evolution* 54: 322-332.

- Liesche J, Krügel U, He H, Chincinska I, Hackel A y Kühn C (2011) Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. *Journal of plant physiology*. 168:1426-1433.
- Lu W, Tang X, Huo Y, Xu R, Qi S, Huang J, Zheng C y Wu C-ai (2012). Identification and characterization of fructose 1,6-biphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stress. *Gene* 503: 65-74
- Lunn JE (2002). Evolution of Sucrose Synthesis. *Plant physiology* 128:1490-1500.
- Lunn EL y ApRees T (1990). Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose phosphate synthase in seeds of *Pisum sativum*. *Biochemistry Journal* 267: 739-743.
- Lunn EL y MacRae E (2003). New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 208-214.
- Machado RAR, Ferrieri AP, Robert CA, Glauser G, Kallenbach M, Baldwin IT y Erb M (2013). Leaf-herbivore attack reduces carbon reserves and regrowth from the roots via jasmonate and auxin signaling. *New Phytologist* 200: 1243-1246.
- MacRae E, y Lunn JE (2012). Photosynthetic sucrose biosynthesis: An evolutionary perspective. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol 34. *Photosynthesis: Plastid biology, energy conversion and carbon assimilation*. Eaton-Rye JJ, Tripathy BC y Sharkey T Eds. Springer.
- Marcelis LFM (1996). Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *Journal of Experimental Botany* 47: 1281-1291.

- Martínez-Trujillo M, Chávez-Bárceñas AT, Limones-Briones V, Simpson J y Herrera-Estrella L (2003). Functional analysis of the promoter of the rice sucrose phosphate synthase gene (sps1). *Plant Science* 166: 131-140.
- McMichael RW.Jr, Klein RR, Salvucci ME, y Huber SC (1993). Identification of the major regulation phosphorylation site in sucrose phosphate synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 248-252.
- Nguyen-Quoc B y Foyer CH (2001). A role for "futile cycles" involving invertase and sucrosa synthase in sucrosa metabolism of tomato fruit. *Journal of experimental botany.* 52(358):881-889.
- Park J-Y, Canam T, Kang K-Y, Ellis DD y Mansfiel SD (2008). Over-expression of an arabidopsis family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development. *Transgenic Research* 17: 181-192.
- Pattanayak D (1998). Light regulation of diurnal variation of sucrose-phosphate synthase in potato. *Biologia Plantarum* 41 (3): 369-376.
- Pressey R (1969) Role of invertase in the acumulation of sugar in cold-store potatoes. *American potatoe journal* 46:291-297.
- Proels RK y Roitsch T (2009). Extracellular invertase LIN6 of tomtato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany* 60 (6): 1555-1567.
- Raines CA (2003). The Calvin Cycle revisited. *Photosynthesis Research* 75 (1): 1-10.

- Reimholz R, Geigenberger P y Sitt M (1994). Sucrose-phosphate synthase is regulated via metabolites and protein phosphorylation in potato tubers, in a manner analogous to the enzyme in leaves. *Planta* 192: 480-488.
- Ricard B, Rivoal J, Spiteri A, y Pradet A (1991) Anaerobic Stress Induces the Transcription and Translation of Sucrose Synthase in Rice. *Plant physiology* 95:669-674.
- Sade D, Brotman Y, Eybishtz A, Cuadros-Inostroza A, Fernie AR, Willmitzner L y Czosnek H (2013). Involvement of hexose transporter gene LeHT1 and of sugars in resistance of tomato yellow leaf curl virus. *Molecular Plant* 6 (5): 1707-1710.
- Sauer N (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS letters* 581:2309–17.
- Schaarschmidt S, Roitsch T y Hause B (2006) Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of experimental botany* 57:4015–23.
- Schaller A y Stintzi A (2008) Jasmonate biosynthesis and signaling for induced plant defense against herbivory. En: *Induced plant resistance to herbivory*. Schaller A (Ed.) Springer Science , pp. 349.
- Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U y Baldwin IT (2006). SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *PNAS* 103 (34): 12935-12940.
- Schmidt DD, Voelckel C, Hartl M, Schmidt S, y Baldwin IT (2005) Specificity in Ecological Interactions. *Attack from the Same Lepidopteran Herbivore Results*

in Species-Specific Transcriptional Responses in Two Solanaceous Host Plants. *Plant Physiology* 138:1763–1773

Schubert A, Allara P y Morte A (2003). Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 161: 495-501.

Sherson SM, Alford HL, Forbes SM, Wallace G y Smith SM (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 54(382):525-531.

Slewinski TL (2011). Diverse Functional Roles of Monosaccharide Transporters and their Homologs in Vascular Plants: A Physiological Perspective. *Molecular Plant* 4(4):641–662.

Strum A (1999). Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121: 1-7.

Subbaiah CC, Palaniappan A, Duncan K, Rhoads DM, Huber SC y Sachs MM (2006). Mitochondrial localization and putative signalling function of maize sucrose synthase. *Journal of Biological Chemistry* 281:15625-35

Valentine AJ, Mortimer PE, Kleinert A, Kang Y y Bedito VA (2013) Carbon metabolism and costs of arbuscular mycorrhizal associations to host roots. En: *Symbiotic Endophytes*. Aroca R (Ed.). Springer, pp. 233-252.

Volkert K, Debast S, Voll LM, Voll H, Schießl I, Hofmann J, Schneider S y Börnke F (2014). Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate syntase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 68 (18): 5217-5229.

War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S y Sharma HC (2012) Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores. *Plant Signaling & Behavior*. 7(10): 1306-1320.

Wright DP, Read DJ y Scholes JD (1998) Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* 21:209–216.

Xiao X, Tang C, Fang Y, Yang M, Zhou B, Qi J y Zhang Y (2014) Structure and expression profile of the sucrose synthase gene family in the rubber tree: indicative of roles in stress response and sucrose utilization in the lactifers. *The FEBS Journal* 281: 291-305.

Yonekura M, Aoki N, Hirose T, Onai K, Ishiura M, Okamura M, Ohsigi R y Ohto C (2013) The promoter activities of sucrose phosphate synthase genes in rice, OsSPS1 and OsSPS11, are controlled by light and circadian clock, but not by sucrose. *Frontiers in Plant Science* 4: 31

OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Analizar la influencia de la presencia de la simbiosis micorrícica y el estrés biótico por herbívora sobre la expresión de genes del metabolismo de sacarosa usando tomate como planta modelo.

- **Objetivos específicos**

- 1) Comparar el efecto de la presencia de la simbiosis micorrícica sobre la expresión de genes de síntesis y degradación de sacarosa y sobre el contenido de carbohidratos solubles en tejidos fotosintéticos y heterotróficos.
- 2) Analizar el efecto del estrés causado por herbivoría sobre la expresión de genes de síntesis y degradación de sacarosa y el contenido de carbohidratos solubles en tejidos fotosintéticos y heterotróficos.
- 3) Analizar el efecto del estrés causado por herbivoría sobre la expresión de genes de síntesis y degradación de sacarosa y el contenido de carbohidratos solubles en tejidos fotosintéticos y heterotróficos en plantas con la simbiosis micorrícica establecida.

CAPITULO I

Influencia de la presencia de la simbiosis micorrícica arbuscular sobre la expresión de genes del metabolismo de sacarosa y el contenido de azúcares solubles en *Solanum lycopersicum*

RESUMEN

La presencia de la simbiosis establecida entre hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) y raíces de plantas implica el flujo de carbono desde la planta hacia el hongo, el transporte de los fotoasimilados a través de las plantas se da en forma de sacarosa en la mayoría de las especies. Es por ello que, con la finalidad de generar las primeras perspectivas del impacto de la simbiosis micorrícica sobre el metabolismo de sacarosa, se realizaron análisis de expresión por RT-PCR cuantitativa de genes implicados en la síntesis y el catabolismo de este disacárido en tejido foliar y radicular de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en las que se había establecido la simbiosis micorrícica con el HMA *Funneliformis mosseae* (BEG 12). Para el estudio de genes relacionados con la biosíntesis de sacarosa se eligieron dos genes que codifican isoformas de la enzima sacarosa-fosfato sintasa (*spsA2* y *spsC*); además de dos genes de sacarosa sintasa (*SUS1* y *SUS3*) y el de la invertasa LIN6 (*Lin6*), que corresponden a enzimas implicadas en el catabolismo de sacarosa. Los patrones de expresión en plantas colonizadas con HMA fueron comparados con los de plantas que no fueron inoculadas y los resultados mostraron un aumento de la expresión relativa del gen *spsC*, así como de los genes *SUS3* y *Lin6* en tejido foliar, que se atribuyó a la presencia de la simbiosis micorrícica. Bajo estas condiciones también se detectaron aumentos del contenido de sacarosa en tejido foliar, que podría estar ligado al aumento de la expresión detectado del gen de la *spsC*, mientras la presencia de la simbiosis micorrícica redujo la proporción de azúcares reductores en tejido radicular respecto a los detectados en tejido foliar, lo cual sugiere una relación con la presencia del hongo en las raíces.

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) son microorganismos de suelo capaces de establecer relaciones estrechas con las raíces de la mayoría de las plantas terrestres. Esta bien documentado que la presencia de dicha interacción es capaz de proporcionar distintos beneficios a las plantas, como una mejora en la absorción de agua y nutrientes del suelo, en especial de fósforo (Augé, 2001; Bucher, 2007), además de que a la presencia de estos microorganismos en las raíces de las plantas se le han atribuido otros beneficios como el aumento del umbral de resistencia-tolerancia ante factores bióticos y abióticos adversos (Barea *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2012).

Durante la simbiosis, el hongo demanda una porción de los fotoasimilados para el mantenimiento de sus funciones metabólicas. Numerosos estudios han analizado este efecto, y se considera que las plantas son capaces de destinar de un 4 a un 20 % del total de los productos de las reacciones de fijación de carbono al mantenimiento de la simbiosis micorrícica (Bago, 2000; Smith y Read, 2008), sin embargo el proceso mediante el cual los hongos durante la simbiosis adquieren el carbono de las plantas ha sido uno de los procesos menos entendidos en esta relación mutualista. No ha sido sino hasta recientemente, que algunos elementos del proceso de adquisición de carbono por parte del hongo han empezado a ser dilucidados. Recientemente se ha descrito el gen *MT2*, el cual pertenece a un grupo de genes encontrados en *Glomus* sp (DAOM 197198) con capacidad de transportar monosacáridos. Incluso, se ha demostrado que la expresión de *MT2*, está ligada con la expresión de otros genes responsables de otros procesos vitales para la simbiosis como el gen transportador de fosfatos *PT4* (Helber *et al.*, 2011). En el hongo *Geosiphon pyriformis*, un miembro ancestral perteneciente al clado de los HMAs, pero que a diferencia de los demás grupos de glomeromycetos, establece una relación mutualista con cianobacterias del género *Nostoc*, se reportó la existencia de un transportador de monosacáridos denominado *GpMST1*, el cual tiene alta afinidad por glucosa (Schüßler *et al.*, 2006).

A pesar de que se han identificado los elementos que están implicados en la adquisición de carbohidratos por el hongo en la simbiosis micorrícica, los genes y proteínas encargados del transporte de carbohidratos de la planta hacia el hongo aun son desconocidos, y además los mecanismos mediante los cuales las plantas son capaces de mantener el metabolismo heterotrófico de simbionte fúngico no han sido completamente descritos.

Diferentes estudios han intentado esclarecer el efecto de la presencia de simbiosis micorrícica de tipo arbuscular sobre el metabolismo primario, generando distintas hipótesis. Black *et al.*, 2000, con base en análisis realizados en *Cucumis sativus* publicó que el aumento de la tasa fotosintética causada por la presencia de HMAs en raíces es consecuencia del incremento de fósforo (P) en los tejidos, más que por la demanda adicional de carbohidratos que supone su presencia en raíces. Por el contrario, Wrigth *et al.* (1998) observó un aumento en la tasa fotosintética de plantas de *Trifolium repens* colonizadas por HMAs, respecto a plantas no colonizadas, sin embargo, la acumulación de biomasa en ambos casos fue similar, por lo que concluyen que bajo influencia de la simbiosis micorrícica, las plantas son capaces de aumentar la tasa fotosintética con la finalidad de generar los carbohidratos extra que serán destinados al mantenimiento de la simbiosis. En ambos estudios se consideró la modificación de la fertilización fosfórica con la finalidad de generar plantas colonizadas y no colonizadas por HMA con una condición fisiológica similar, que fue determinada de acuerdo al contenido de biomasa. A pesar de que estos resultados, algunos autores sugieren que puede existir una combinación de los fenómenos anteriormente descritos, y que su interacción puede estar sujeta a distintos factores, como el estado de desarrollo de la planta y/o del hongo, así como de las especies que estén involucradas en la simbiosis y las distintas condiciones externas que estén influyendo sobre ellas (Valentine *et al.*, 2013).

La principal forma en la que los fotoasimilados son transportados desde los tejidos fotosintéticos, o tejidos fuente, hasta los tejidos de metabolismo heterotrófico, o tejidos demanda, es la sacarosa. En tejidos fuente, la sacarosa se sintetiza a partir de fructosa-6-fosfato y UDP-glucosa por acción de la sacarosa-

fosfato sintasa (SPS) que genera como producto final sacarosa-6-fosfato, la cual es sustrato de la sacarosa-fosfato fosfatasa (SPP), para generar sacarosa. En condiciones *in vivo*, el análisis de distintos parámetros de la actividad de la enzima SPS ha demostrado que ésta ejerce un control significativo en la canalización de los productos de las reacciones de fijación de carbono hacia la síntesis de sacarosa (Lunn y ap Rees, 1990). Sin embargo, bajo este contexto, poco se ha indagado sobre el papel que pueda tener la simbiosis micorrícica sobre la actividad catalítica de SPS o sobre la expresión de los genes que la codifican.

Algunos elementos implicados en la distribución del carbono en plantas han sido analizados en presencia de la simbiosis micorrícica. Se ha demostrado que la presencia de HMA en raíces tienen influencia sobre la expresión de genes transportadores de sacarosa en distintos modelos biológicos como tomate, (Ge *et al.*, 2008; Boldt *et al.*, 2011; Bitterlich *et al.*, 2014), *Medicago truncatula* (Doidy *et al.*, 2012) y patata (Gabriel-Neumann *et al.*, 2011). Entre otras cosas se ha descrito que la simbiosis micorrícica es capaz de aumentar o reprimir la expresión de algunos de estos genes y que existe una regulación diferencial de ellos, dependiendo de la especie fúngica en interacción.

En tejidos de metabolismo heterotrófico, la actividad catalítica de enzimas que hidrolizan sacarosa como la sacarosa sintasa (SUS) e invertasas (INV), es en gran medida la que estimula el movimiento de fotoasimilados en forma de sacarosa desde los tejidos fotosintéticos hacia tejidos de metabolismo heterotrófico (como son raíces, brotes en crecimiento, y estructuras reproductivas). Es por esto que existen estudios enfocados al análisis de la expresión génica y/o de la actividad enzimática, así como estudios del efecto de las modificaciones de la expresión de genes implicados en el metabolismo de sacarosa en tejidos heterotróficos en presencia de la simbiosis micorrícica (Hohnjec *et al.*, 2003; García-Rodríguez, 2006; Schaarschmidt *et al.*, 2006; García-Rodríguez 2007; García-Rodríguez *et al.*, 2007; Baier *et al.*, 2010), pero en algunos casos, se han desestimado los cambios sobre estos elementos y otros implicados en la biosíntesis de sacarosa en tejidos fotosintéticos que podrían también estar influenciando la distribución de carbono. No obstante, estos trabajos han resaltado

la importancia de los elementos mencionados, en el mantenimiento de la simbiosis por la modificación de los patrones de colonización en mutantes silenciadas del gen *SucS1* en *Medicago truncatula* (Baier *et al.*, 2010); la acumulación de los transcritos de genes de SUS e INV en células radiculares colonizadas por HMAs (Blee y Anderson, 2002), también se ha generado evidencia sobre la posible regulación de la actividad enzimática de INV por medio de la sobreexpresión heteróloga de invertasas en *Nicotiana tabacum* y *Medicago truncatula* (Schaarschmidt *et al.*, 2007). Adicionalmente, estudios realizados en *Glycine max*, sugieren un papel importante de la activación de ciertas clases de invertasas a nivel catalítico bajo en plantas inoculadas con HMAs en comparación con plantas no inoculadas (Schubert *et al.*, 2004).

Los genes de enzimas SPS, SUS e INV se encuentran en varias copias dentro del genoma de las plantas, y existe actividad de estas enzimas tanto en tejidos fuente como en tejidos demanda. Es por esto que en el presente trabajo se planteó el estudio a nivel transcripcional de genes involucrados en la biosíntesis y en el catabolismo de sacarosa por RT-PCR en tiempo real, así como el análisis de distintas fracciones de azúcares solubles en tejidos foliares y radiculares en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) cuyas raíces fueron inoculadas con *Funneliformis mosseae*, los resultados obtenidos de estos análisis fueron comparados con los encontrados en plantas mantenidas bajo las mismas condiciones pero en ausencia de simbiosis micorrícica, con la finalidad de registrar cambios en los patrones de expresión en éstos tejidos y así mismo, analizar las posibles modificaciones sobre la distribución de carbohidratos solubles por influencia de la presencia de la simbiosis micorrícica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Se utilizaron plántulas de tomate de la variedad Castelmart que fueron sembradas en semillero y trasplantadas ocho días después de la germinación a macetas de 400 mL con una mezcla de arena-suelo-vermiculita en una proporción de 3:1:1 tinalizado durante tres días consecutivos. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero bajo un régimen de fertilización que consistió en la aplicación de la solución Long Ashton (Hewitt, 1966) con el contenido de fósforo reducido hasta un 25 % de la solución estándar una vez por semana, con intervalos regulares de riego con agua corriente, desde el trasplante de las plántulas a macetas hasta la cosecha.

El experimento incluyó dos tratamientos en donde el primero incluía plantas inoculadas con el hongo *Funneliformis mosseae* (BEG12), para lo cual, durante el trasplante, se mezcló suelo-inóculo a una razón del 10 % del volumen total contenido en la maceta de trasplante. El segundo tratamiento estaba constituido de plantas que no habían sido inoculadas con el HMA, a las cuales durante el trasplante, se les aplicó 5 mL a cada planta de un extracto carente de propágulos de HMA obtenido a partir del suelo-inoculo. Cada tratamiento tenía 6 replicas biológicas, que consistían de una planta cada una.

Siete semanas después de la inoculación, se cosecharon hojas maduras y fotosintéticamente activas, así como raíces de plantas de los tratamientos anteriormente descritos para realizar los análisis moleculares y de contenidos de azúcares solubles. Los tejidos colectados fueron congelados en N₂ líquido y posteriormente almacenados a – 80 °C hasta su procesamiento. Además se determinó la biomasa de parte aérea y de raíz a partir de plantas de la misma edad y se tomaron muestras representativas de raíz para realizar la estimación de la colonización micorrícica.

2. Biomasa

La cantidad de biomasa fue estimada a partir de la masa seca obtenida de plantas que fueron mantenidas y cosechadas como se describió anteriormente. La masa seca de las plantas fue obtenida de tejidos vegetales frescos, que fueron sometidos a una temperatura de 80 °C durante 48 horas, los cuales fueron posteriormente pesados para registrar su masa en gramos.

3. Cuantificación de la colonización micorrícica

Como se mencionó anteriormente, parte del tejido radicular fue colectado de plantas de tomate, después de 7 semanas de haber sido trasplantadas a macetas para la estimación de la colonización micorrícica, la cual se realizó a partir de fragmentos de raíz de plantas inoculadas y no inoculadas con el HMA, de acuerdo al protocolo reportado por Vrerheilig *et al.* (1998). Los parámetros de la estimación de la colonización micorrícica se obtuvieron usando el método reportado por Trouvelot *et al.* (1968).

4. Extracción de RNA y análisis de expresión de genes

La expresión génica en tejido foliar y radicular se analizó tanto para enzimas de biosíntesis, como para enzimas de catabolismo de sacarosa. Para ello se extrajo RNA de los tejidos colectados, se generó cDNA por retrotranscripción y se analizó la expresión relativa de los genes por PCR en tiempo real, todo ello como se describe a continuación:

Se obtuvieron extractos crudos de RNA a partir de tejido foliar y radicular pulverizado en mortero con N₂ líquido, cada repetición biológica consistió en una mezcla del tejido foliar o radicular colectado de una sola planta. Para obtener los extractos de RNA, se usó el kit comercial Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research) provisto de DNasa, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, 2 µL de los extractos de RNA fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1 % con la finalidad de visualizar su integridad, de igual manera, su pureza y cantidad fueron evaluadas por espectrofotometría (NanoDrop, 1000).

Para la síntesis de cDNA, se usó el kit de retrotranscripción cDNA Synthesis Kit (TAKARA), a partir de 1 µg de RNA de cada extracto. Una vez obtenido el cDNA, su calidad y eficiencia fueron comprobadas por la amplificación del gen del factor de elongación-1α (*SIEF-1α*) por PCR semicuantitativa usando 1 µL de cDNA en un volumen total de reacción de 24 µL. Finalmente, los productos de la retrotranscripción fueron sometidos a análisis de PCR en tiempo real (SYBR® Premix Ex Taq™ TAKARA) para obtener valores de expresión relativa de genes del metabolismo de sacarosa en plantas, bajo las condiciones anteriormente descritas.

La expresión relativa de cada uno de los genes fue analizada en tejido foliar y radicular, en cada caso con tres replicas biológicas con su correspondiente replica técnica. Para el análisis de genes involucrados en la biosíntesis de sacarosa se seleccionaron los genes *spsC* y *spsA2* (Cuadro 1), para los cuales fue necesario generar parejas de cebadores específicas, usando el programa Primer3 (Koressaar y Remm, 2007; Untergrasser *et al.*, 2012) con base en las secuencias reportadas en la Sol Genomics Network (Bombarely *et al.*, 2011) para cada uno de estos genes. Para el caso del análisis de la expresión de genes involucrados en el catabolismo de sacarosa se eligieron los genes de sacarosa sintasa *SUS1* y *SUS3* y de la invertasa *Lin6* (Cuadro 1). Los genes fueron seleccionados de acuerdo a los patrones de expresión descritos para tomate y otros modelos biológicos. Para todos los genes, los valores de expresión fueron referenciados a la expresión del gen del *SIEF-1α* usando el método $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los valores detectados de la expresión relativa de cada uno de los genes es presentada como aumento o disminución de la expresión respecto a la detectada en las plantas que no habían sido inoculadas con el HMA.

Cuadro 1. Cebadores utilizados para el análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa.
Las parejas de cebadores en negritas fueron diseñados en el presente trabajo. Para el resto se hace referencia a la cita bibliográfica de dónde se obtuvo la secuencia..

Nombre	Especificidad en <i>S. lycopersicum</i>	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Referencia	
sps-C Fw		5'-AAGCCAGCTCCTGAAGAACC-3'	58 °C		
sps-C Rev	<i>spsC</i>	5'-TGATTGAATTAGCTTTCCGTGAG-3'			
sps-A2 Fw		5'-TGTTATTGCGGCAGATTGTG-3'	58 °C		
sps-A2 Rev	<i>spsA2</i>	5'-TCACTAATGGTCAAGGCTGTTG-3'			
FTOMSSF		5'-GGATTGAAAGCCACGGAAAGG-3'	58 °C		García-Rodríguez, 2006
RTOMSSF	<i>SUS1</i>	5'-ACCAGGCCTCAACGAATAGCA-3'			
SUS3 Fw		5'-GGTTTCTGTCTGATTGTTATCC-3'	58 °C		Goren <i>et al.</i> , 2011
SUS3 Rev	<i>SUS3</i>	5'-ACAGAAGGGAATAATGGCAAA-3'			
Lin6F		5'-AGCACATTTATTCGCCTTCAACAA-3'	58 °C		García-Rodríguez, 2006
Lin6R	<i>Lin6</i>	5'-TTTGTGACGTGGCATAATAAGAT-3'			
EF-1 Fw		5'-GATTGGTGGTATTGGAAGTGC-3'	58 °C		Rotenberg <i>et al.</i> , 2006
EF-1 Rev	<i>EF-1α</i>	5'-AGCTTCGTGGTGCATCTC-3'			

5. Análisis del contenido de carbohidratos solubles

La cuantificación del contenido de carbohidratos solubles se hizo a partir de tejidos foliares y de raíz pulverizados con N₂ líquido. Para la extracción de carbohidratos solubles se colocaron aproximadamente 50 mg de tejido pulverizado en un tubo de centrifugación de 2 mL y se mezcló hasta homogenizar con 500 μ L de una solución de etanol al 80 % (v:v). A continuación se incubó la mezcla a 80 °C durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 13 000 rpm, a 4 °C. Se recuperó la fase líquida y se transfirió a un tubo de recuperación nuevo; la pastilla se resuspendió con 250 μ L de la solución de etanol y se repitió el proceso de incubación y centrifugación bajo las condiciones descritas anteriormente, éste último proceso se repitió dos veces adicionales y el sobrenadante en cada fase de centrifugación se mezcló en el tubo de recuperación. Para la cuantificación de distintas fracciones de azúcares a partir de los extractos de carbohidratos solubles obtenidos se generaron diluciones 1:10 de los extractos y se procesaron como se describe a continuación:

Los azúcares solubles totales fueron cuantificados por la técnica de fenol-ácido sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956), para lo cual se mezclaron 20 – 50 μ L de la dilución del extracto, que se completó con el volumen necesario de agua destilada

para alcanzar 200 μL , esto se mezcló con 80 μL de fenol al 5 % (p:v) y 500 μL de ácido sulfúrico concentrado, para completar un volumen de reacción final de 780 μL . La fructosa total fue estimada de acuerdo a la reacción con resorcinol (Roe, 1934) para la cual se realizó una mezcla de reacción usando 100 μL del extracto diluido 1:10 con 100 μL de resorcinol (0.1 % diluido en etanol) y 700 μL de HCl al 31 % (v:v) que posteriormente fue incubada a 80°C durante 10 minutos. La fracción correspondiente a sacarosa fue cuantificada usando la misma reacción descrita para fructosa total, pero en ésta se incluyó un paso inicial de degradación de hexosas con calor en un medio alcalino, que consistió en agregar a 200 μL de la dilución del extracto una alícuota de una solución madre de NaOH diluido a 1N, para alcanzar una concentración 0.3 N, esta mezcla fue calentada a 100 °C durante 15 minutos, se dejó enfriar y posteriormente se le agregaron 300 μL de resorcinol (0.1 % diluido en etanol) y 900 μL de HCl al 30 % (v:v), a continuación se incubó a 80 ° C por 10 minutos con la finalidad de hidrolizar la sacarosa a fructosa y glucosa, y a partir de estas, detectar con la fracción correspondiente a fructosa, con resorcinol. Finalmente, los azúcares reductores libres, fueron detectados usando la reacción de Somogy-Nelson (Nelson, 1944), adaptada a placas microtituladoras, en la cual se usaron 60 μL del extracto diluido al que se adicionaron 60 μL de una solución que contenía $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.4 %), se incubó a 100 °C por 10 minutos y después se mezcló con 60 μL de una solución que contenía $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 %).

En todos los casos, se analizaron tres replicas biológicas que correspondían cada una a tejidos radiculares y foliares de plantas distintas con su respectiva replica técnica. Para estimar la concentración de azúcares solubles totales por mg de tejido fresco se tomaron lecturas a absorbancia de 490 nm, en tanto que para azúcares reductores libres las lecturas se realizaron a 660 nm; en cada uno de los casos, se elaboró la curva de calibración correspondiente usando concentraciones de glucosa de 1 a 10 μg para azúcares totales y de 0.3 a 5.4 para azúcares reductores. Para la cuantificación de fructosa total y sacarosa, se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 550 nm, sin embargo para fructosa total se utilizó fructosa como patrón para la elaboración de

la curva estándar en un rango de concentración de 0.5 a 7 μg , mientras que para la cuantificación de sacarosa, la curva se realizó a partir de la fracción de fructosa proveniente de sacarosa de concentraciones entre 4 y 18 μg usando la reacción previamente descrita para la detección de la fracción de sacarosa en extractos vegetales de azúcares solubles etanólicos, posteriormente, la masa de sacarosa en las muestras fue detectada de acuerdo a los moles de fructosa provenientes de sacarosa.

6. Análisis estadísticos

Las plantas de los tratamientos anteriormente descritos se acomodaron de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar. Los análisis estadísticos fueron realizados a partir de tres replicas biológicas, con excepción de la biomasa, que contó con cinco replicas biológicas. Los datos obtenidos de en cada caso fueron procesados por análisis de varianza (ANOVA) simple y las medias que presentaron diferencia estadística significativa se compararon usando la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fisher con $p < 0.1$ para los análisis de expresión y la cuantificación de carbohidratos solubles, y $p < 0.05$ para el análisis de biomasa.

RESULTADOS

1. Colonización micorrícica y biomasa

Las raíces de plantas inoculadas con *F. mosseae*, mostraron una media de 4.4 del parámetro de la intensidad de la colonización, que estima el total del córtex radicular colonizado por el hongo, de acuerdo a la metodología propuesta por Trouvelot *et al.* (1968). Otros parámetros como la abundancia de arbuscúlos en el sistema radical, presentaron medias aritméticas de 3.5 %, sin embargo, a pesar de que el sistema radicular presentaba niveles bajos de colonización, la abundancia de estructuras intraradicales en los fragmentos observados fue alta, particularmente la de los arbuscúlos, lo que sugiere que a pesar de que el hongo estaba en una proporción relativamente baja en el sistema radicular, en las zonas colonizadas existía una alta actividad que puede ser interpretada por la abundancia de arbuscúlos en las zonas colonizadas (Figura 3).

La estimulación en plantas micorrizadas de la expresión del gen *LePT4* fue evaluada, revelando la funcionalidad de la simbiosis. En el caso de las plantas no inoculadas con *F. mosseae*, no se observaron estructuras micorrícicas ni se detectó expresión del gen *LePT4*.

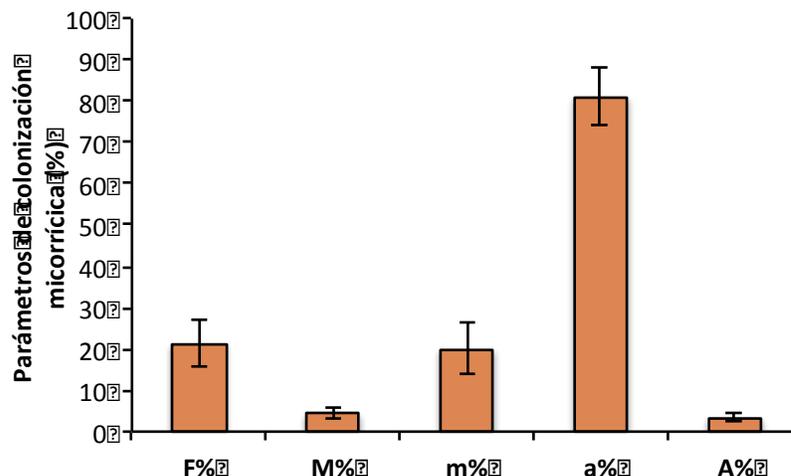


Figura 3. Colonización micorrícica en plantas de tomate inoculadas con *F. mosseae*. La interacción micorrícica fue determinada en las raíces de las plantas, siete semanas después de haber sido inoculadas. Los parámetros evaluados fueron frecuencia (F%), intensidad de la colonización (M%) y abundancia de arbuscúlos (A%) en el sistema radicular; así como intensidad de la colonización (m%) y abundancia de arbuscúlos (a%) en los fragmentos de raíz observados de acuerdo a Trouvelot *et al.* (1986). Las barras de error representan el error de estándar de la media.

Por otro lado, El análisis de la materia seca, reveló que las plantas con raíces colonizadas por *F. mosseae* acumularon una cantidad significativamente mayor de biomasa en los tejidos radiculares, pero no en la parte aérea (Figura 4A), lo cual puede ser efecto de la modificación de la distribución de algunas formas de carbohidratos, como se observó al analizar la concentración de fracciones de carbohidratos solubles entre tejidos foliares y radiculares (Figura 4B). A pesar de esto, no se observó un cambio significativo en la proporción correspondiente de biomasa acumulada en raíz respecto a la de parte aérea entre las plantas de los dos tratamientos.

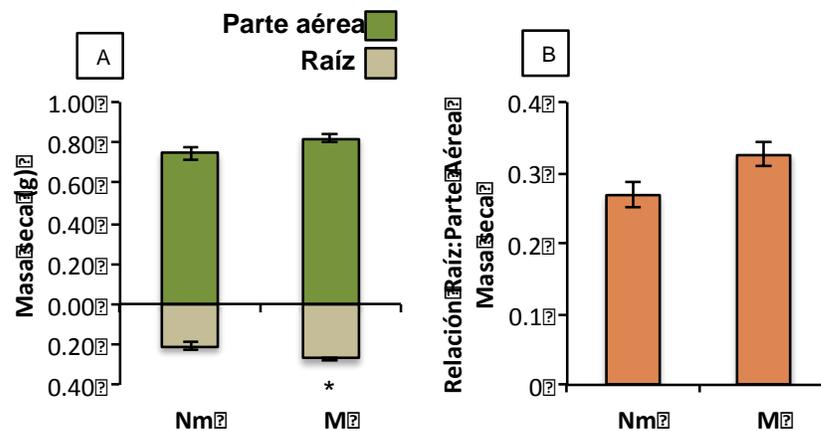


Figura 4. Efecto de la colonización micorrícica en la biomasa de plantas de tomate. (A) La materia seca de plantas de tomate de ocho semanas después de la germinación y 7 semanas después de haber sido inoculadas con *F. mosseae* (M) y plantas control no inoculadas (Nm). **(B)** Relación raíz:parte aérea de la biomasa. Las barras de error en las gráficas representan el error estándar de la media, los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos de a la Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher ($p < 0.05$).

2. La simbiosis micorrícica está involucrada en la modificación de la expresión de genes *sps* específicos

Con base en las secuencias de los genes *spsA2* y *spsC*, publicadas en la base de datos de la Sol Genomics Network (Bombarely *et al.*, 2011) se logró la obtención de parejas de oligonucleótidos para PCR cuantitativa, específicos para cada gen (Cuadro 1). Con las parejas de oligonucleótidos diseñadas se analizó la expresión relativa de éstos genes en plantas cuyas raíces habían sido colonizadas por *F. mosseae* y comparar cada una con la expresión detectada en plantas control no inoculadas con el hongo micorrizógeno.

Los resultados mostraron que la expresión relativa del gen *spsC* en plantas con la simbiosis micorrícica establecida fue mayor que en las plantas control en muestras de tejido foliar. Por el contrario, la expresión del gen *spsA2* en tejido foliar no sufrió modificaciones, manteniéndose igual que la detectada en las plantas control. Por su parte, la expresión relativa de los genes *spsA1* y *spsC* detectada en tejido radicular no sufrió cambios significativos que indiquen que la presencia de la simbiosis micorrícica esté funcionando como un estímulo para el aumento o disminución de la expresión comparada con la de las plantas no inoculadas con *F. mosseae* (Figura 5).

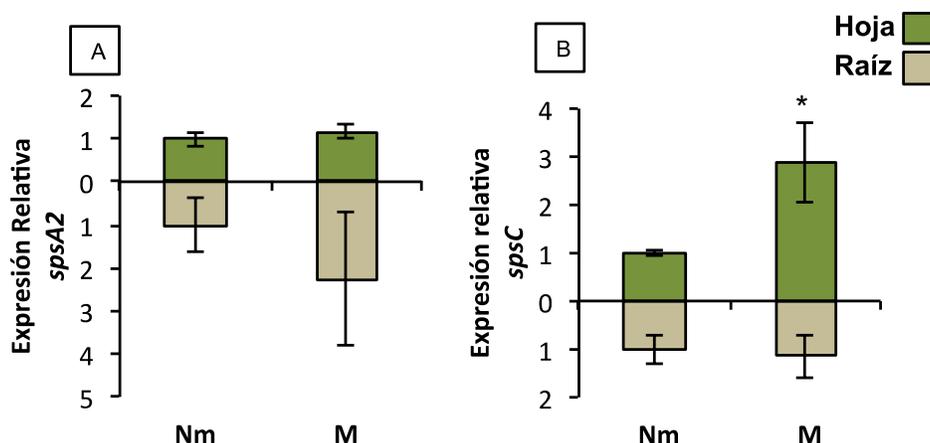


Figura 5. Efecto de la colonización micorrícica en la expresión relativa de genes de biosíntesis de sacarosa en plantas de tomate. Niveles de expresión relativa de los genes *spsA2* (A) y *spsC* (B) en tejido foliar y radicular de plantas colonizadas con *F. mosseae* cuantificados 7 semanas después de la inoculación (M) y plantas control sin inocular (Nm). Los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos de acuerdo la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DSM) de Fisher ($p < 0.1$) y las barras de error representan el error está.

3. La simbiosis micorrícica altera la expresión de los genes involucrados en el catabolismo de sacarosa

La expresión de dos genes de sacarosa sintasa de tomate se evaluó por RT-PCR cuantitativa en plantas inoculadas con *F. mosseae*. Los niveles de expresión relativa del gen de la sacarosa sintasa 1 (*SUS1*) no fueron significativamente distintos entre plantas cuyas raíces estaban colonizadas por *F. mosseae* y las plantas control. En cambio, se detectó sobreexpresión del gen de la sacarosa sintasa 3 (*SUS3*) y de la invertasa LIN6 (*Lin6*) en los tejidos foliares de plantas colonizadas, pero también se observó una reducción de la expresión de *SUS3* en

tejido radicular bajo las dos condiciones analizadas; mientras que los niveles de expresión en tejido radicular de *Lin6* no fueron estadísticamente significativos entre las plantas de los dos tratamientos evaluados (Figura 6).

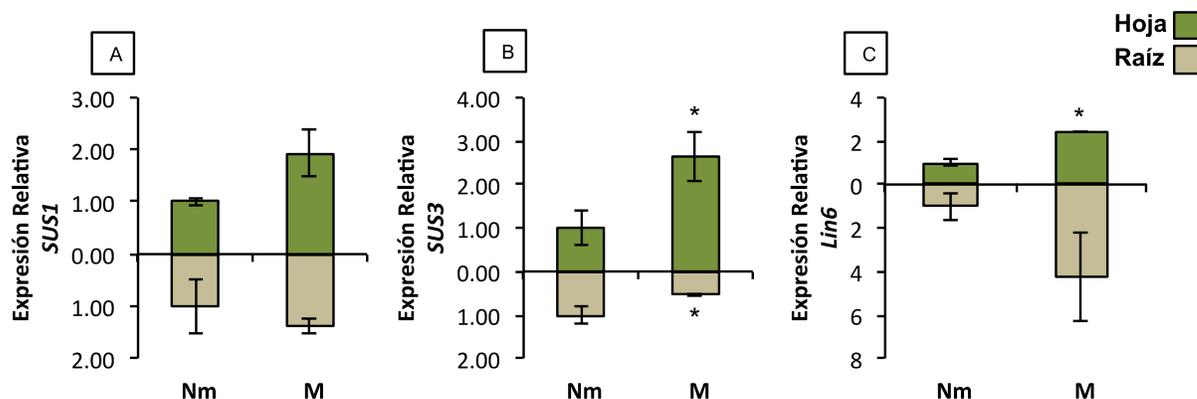


Figura 6. Análisis de expresión de los genes del catabolismo de sacarosa. Niveles de expresión relativa de los genes de sacarosa sintasa SUS1 (A) y SUS3 (B) y de la invertasa Lin6 (C) en plantas de tomate inoculadas *F. mosseae* (M) cuantificados 7 semanas después de la inoculación, y plantas control no inoculadas (Nm). En las gráficas, las barras de error representan el error estándar de la media, los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos al aplicar la Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher ($p < 0.1$).

4. La concentración de sacarosa en tejido foliar y la relación raíz:tejido foliar de azúcares reductores libres, se modifican en plantas con simbiosis micorrícica

La distribución de distintas fracciones de carbohidratos solubles fue analizada en las plantas sometidas a las condiciones descritas anteriormente. De acuerdo a los resultados obtenidos, no se evidenciaron modificaciones significativas de las fracciones correspondientes a las fracciones correspondientes a azúcares solubles totales, y fructosa total (Figura 7A y 7B).

La concentración de sacarosa en muestras de tejido foliar de plantas en simbiosis establecida con *F. mosseae* fue significativamente mayor que la encontrada en las plantas control, sin embargo, no se detectaron cambios significativos en la concentración de sacarosa en raíces entre las plantas de los dos tratamientos. Por su parte, el aumento de la concentración de sacarosa en tejido foliar no modificó la relación del contenido en raíz respecto al cuantificado en tejido foliar (Figura 7C y 7G).

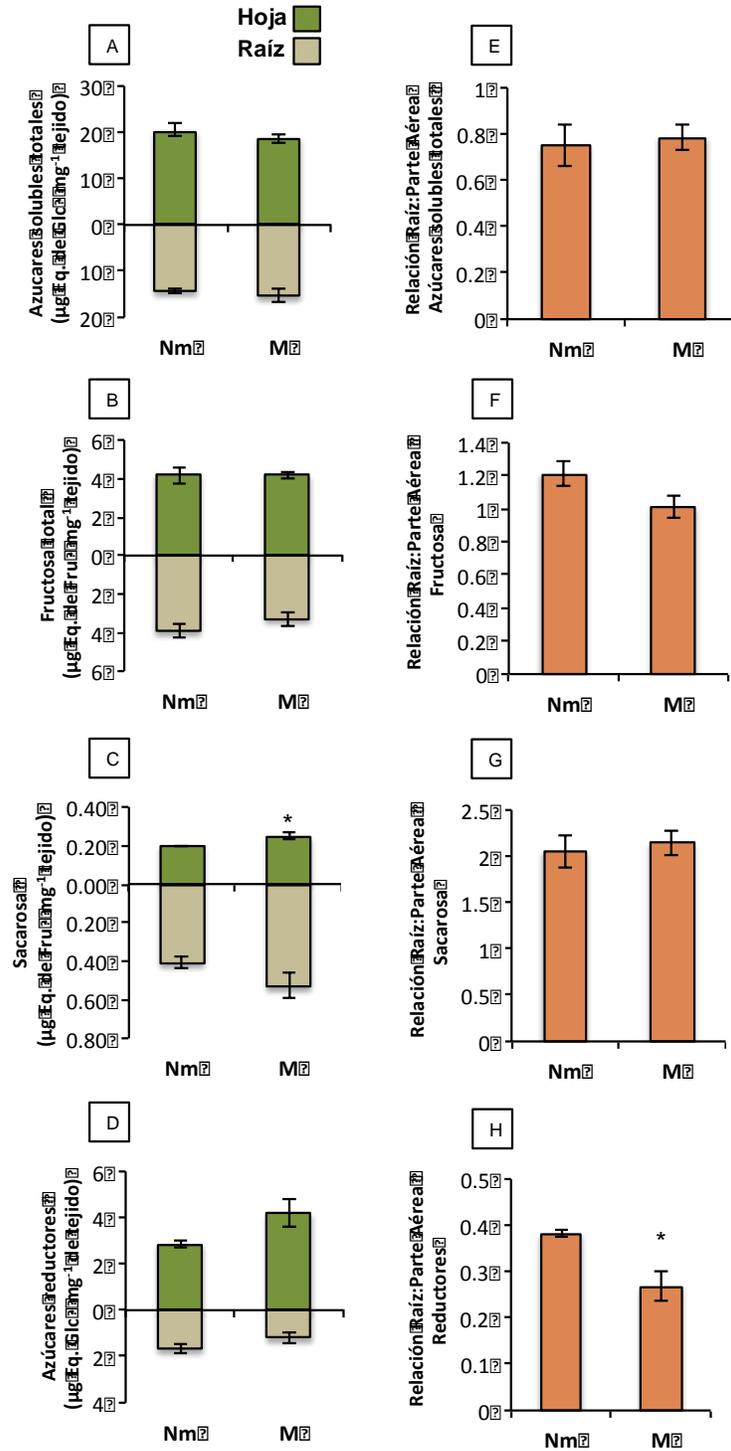


Figura 7. Efecto de la colonización micorrícica en la concentración de azúcares solubles en plantas de tomate. Concentración de azúcares solubles totales (A), fructosa (B), sacarosa (C) y azúcares reductores (D), así como la relación raíz:parte aérea para cada fracción de azúcares cuantificada (E, F, G y H, respectivamente), en plantas de tomate inoculadas y colonizadas con *F. mosseae* (M) cuantificados 7 semanas después de la inoculación, y plantas control no inoculadas (Nm). En las gráficas, las barras representan el error estándar de la media, los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos de acuerdo a la Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher ($p < 0.1$).

En cuanto a los azúcares reductores, no se encontraron modificaciones significativas en su concentración en los tejidos analizados de los dos tratamientos (Figura 7D), sin embargo, la tendencia al aumento de la cantidad de azúcares reductores libres en la parte aérea, y la tendencia a la reducción de esta misma fracción en raíces de plantas en dónde está establecida la simbiosis micorrícica, causó una reducción significativa de la proporción de los azúcares reductores libres cuantificados en tejido radicular respecto a los cuantificados en tejido foliar, comparada con la proporción calculada en plantas que no presentaban la interacción micorrícica (Figura 7H), mientras que dichas proporciones de las demás fracciones de azúcares solubles, y de los azúcares solubles totales no mostraron modificaciones significativas entre las muestras evaluadas de ambos tratamientos (Figura 7E-G).

Estos resultados sugieren que en plantas con la simbiosis micorrícica establecida existen modificaciones de la distribución de algunas formas de azúcares solubles entre tejidos foliares y radiculares, en comparación a la plantas que no están sujetas a esta interacción.

DISCUSIÓN

La sacarosa es uno de los principales metabolitos generados a partir de las reacciones de fijación de carbono, además, es la principal molécula usada por las plantas para realizar el transporte de el carbono asimilado durante el proceso fotosintético desde los sitios de síntesis hacia el resto de los tejidos y órganos vegetales. Por sus implicaciones en dicho proceso, además de ser un elemento central del mantenimiento del metabolismo en los tejidos de metabolismo heterotrófico y por su función como elemento implicado en rutas de señalización, ha sido incluido como un elemento imprescindible en la generación de modelos que para explicar la distribución del carbono entre los tejidos de las plantas (Farrar, 2000).

Dada la importancia de la sacarosa en el metabolismo primario de las plantas, el presente trabajo se enfocó hacia el estudio de la posible modificación de la expresión de los genes que codifican las enzimas clave implicadas en la síntesis y catabolismo de sacarosa en *S. lycopersicum*, y a establecer un posible vínculo entre dichas modificaciones en la expresión de genes con el contenido de distintas fracciones de azúcares solubles en tejidos foliares y tejidos radiculares ante la presencia de la simbiosis micorrícica de tipo arbuscular establecida con el hongo *F. mosseae*.

Se analizó la expresión de los genes *spsA2* y *spsC*, pertenecientes a las familias de genes *sps* más abundantes en dicotiledóneas y cuya expresión específica de tejido se ha reportado como constitutiva y específica de hojas fuente, respectivamente (Lunn y McRae, 2003; Chen *et al.*, 2005). Se observó que la presencia de la simbiosis micorrícica causa un aumento de la expresión del gen *spsC* en hojas, mientras que el gen *spsA2* no muestra cambios en comparación con plantas no inoculadas en tejido foliar. El tomate, como otras especies vegetales, presenta dos genes *sps* de la familia A, esto fue confirmado por la comparación de secuencias depositadas en la base de datos de la Sol Genomics Network correspondientes a genes *sps* (Bombarely *et al.*, 2011) y hasta donde se tiene conocimiento, existe solo un trabajo publicado en el cual se analizó la expresión del gen *spsA1* de tomate bajo presencia de la simbiosis micorrícica

(Rodríguez-García, 2006). En este trabajo se observa una modificación de la expresión en plantas cuyas raíces habían sido inoculadas con *Glomus intraradices* (actualmente *Rhizophagus intraradices*) *Glomus mosseae* (ahora *Funneliformis mosseae*), y en ambos casos, existió sobreexpresión del gen *spsA1* en comparación con la expresión detectada en las plantas control en tejido foliar, debido a este resultado, y a la observación del aumento de la expresión de el gen de la subunidad pequeña de RuBisCO, los autores concluyeron que existe una coordinación de la expresión de genes implicados en la fijación de carbono y la biosíntesis de sacarosa en plantas con la simbiosis micorrícica establecida, con la finalidad de generar los carbohidratos necesarios para suplementar los requerimientos metabólicos de la planta, pero también para brindar una fuente de carbono para sustentar la actividad del HMA en las raíces (García-Rodríguez, 2006).

A pesar de que la familia A es una de las más abundantes en los tejidos de plantas monocotiledóneas, actualmente se sabe, por análisis de expresión de los genes *sps* de *Arabidopsis thaliana* (*SPSA1*, *SPSA2*, *SPSB*, y *SPSC*) por RT-PCR cuantitativa y por detección de la expresión del gen reportero de la β -Glucuronidasa (*GUS*) en fusiones transcripcionales, que el gen A1 es predominante a nivel de expresión génica, comparado con los demás genes *sps*, mientras que la detección de la expresión del gen *GUS* bajo el control del promotor del gen *AtSPSA2* indicó que se encuentra expresado casi exclusivamente en raíces. Con esto, también se demostró que el gen de la familia *AtSPSC* y el gen *AtSPSA1*, son las formas predominantes, particularmente en tejidos foliares (Volkert *et al.*, 2014). Un fenómeno similar fue observado en los patrones de expresión de los genes *sps* en *Nicotiana tabacum*, pero en el análisis de este modelo, no se contempló, la posibilidad de la existencia de dos genes *sps* de la familia A, pero tampoco se descartó (Chen *et al.*, 2005). La generación de mutantes knock-out del gen de la familia C de tabaco, (*NtSPSC*), sugirió que éste está implicado en la movilización del almidón formado en tejido foliar de manera transitoria durante las horas de oscuridad (Chen *et al.*, 2005). En cambio, en *A. thaliana*, se encontró que la movilización del almidón almacenado en hojas

durante la noche esta asociado a la actividad de las isoformas SPSA1 y SPSC, debido a que los dobles mutantes con que carecían de la expresión de estos genes (knock-out) mostraron una acumulación de almidón durante horas de oscuridad y luz, además de acumulación de maltosa, producto generado para formar compuestos destinados a ser movilizados a partir de almidón (Volkert *et al.*, 2014).

Estas descripciones de los posibles roles en los cuales está implicado el gen *spsC*, así como de los patrones de expresión encontrados en *spsA2* en otros modelos vegetales, puede explicar los niveles de expresión detectados en el presente trabajo, en dónde por un lado, la ausencia de modificación de los niveles de expresión relativa del gen *spsA2* en tejido foliar por influencia de la simbiosis micorrízica puede estar en relación con que este gen no es una de las formas predominantes en tejido foliar como lo observado en *A. thaliana*. Por otro lado, la detección del aumento de la expresión del gen *spsC* puede ser resultado de que esta también representa una de las formas abundantes en tejidos foliares de tomate (Lunn y McRae, 2003; Chen *et al.*, 2005), y no se descarta que en tomate pueda tener una función sobre la distribución del carbono, sintetizando sacarosa a partir de los productos de catabolismo del almidón transitorio sintetizado en tejidos fuente como fue descrito anteriormente en otros modelos vegetales, pero para esto, es necesario plantear nuevos ensayos que permitan analizar esta posibilidad.

Otra posibilidad es que los aumentos de expresión detectados en los genes *spsC* y *SUS3*, puedan tener relación con la síntesis de almidón. Se sabe que la síntesis de ADP-Glucosa (ADP-Glc), destinada a la síntesis de almidón ocurre mayoritariamente en el citoplasma (Borja-Fernández *et al.*, 2004). Los modelos que explican cómo ocurre la síntesis de ADP-Glc, indican que tanto la SPS y la SUS están implicadas en este proceso (Borja-Fernández *et al.*, 2004).

Así pues, los los aumentos en la expresión de genes de biosíntesis y catabolismo de sacarosa detectados en este trabajo en plantas cuyas raíces habían sido colonizadas con *F. mosseae*, no solo pueden estar relacionados con la síntesis de sacarosa, sino también con la síntesis y movilización de otras formas de

carbohidratos como almidón, sin embargo estas hipótesis merecen ser materia de estudio en investigaciones futuras.

La modificación de la expresión del gen *spsC* en tejido foliar, por influencia de la simbiosis micorrícica, pero la falta de evidencia de que también esté ejerciendo un efecto sobre la expresión del gen *spsA2*, del cual tampoco se detectaron cambios en la expresión en tejido radicular, indica que la presencia de la simbiosis micorrícica puede estar ejerciendo un control más evidente sobre la síntesis de sacarosa en tejidos fotosintéticos. De igual manera, nuestros resultados también sugieren que la presencia de la simbiosis micorrícica en raíces puede estar ejerciendo un aumento de la capacidad de los tejidos fuente para producir fotoasimilados, interpretada como un aumento de la “fuerza de tejido fuente” en respuesta al aumento de la demanda de carbono que ejerce la presencia del hongo en las raíces, lo cual puede explicar el aumento de la expresión de *spsC* y el aumento de la concentración de sacarosa en tejidos foliares (Figuras 5B y 7C). Estos resultados, junto con la disminución de la proporción de la concentración de azúcares reductores libres, puede sugerir que la sacarosa sintetizada en los tejidos foliares es transportada y metabolizada rápidamente para cumplir la demanda energética que supone la presencia de la simbiosis en los tejidos radiculares, pero también para canalizar carbohidratos para el mantenimiento del metabolismo heterotrófico del hongo, el cual adquiere preferentemente el carbono en forma de hexosas (Figuras 5B, 7D y 7H). García-Rodríguez *et al.* (2007) observaron un aumento en el contenido de sacarosa que concuerda con la expresión de genes implicados en el catabolismo de sacarosa en raíces de plantas de tomate colonizadas con HMAs, seis semanas después de haber sido inoculadas, en comparación con plantas control, y una reducción de las concentraciones de glucosa y fructosa, lo cual se asoció a la adquisición de carbohidratos en forma de hexosas por el HMA.

En los tejidos vegetales, la SPS es una enzima escasa (Reimholz *et al.*, 1994), lo que puede indicar que los cambios detectados en su expresión pueden tener repercusiones en su abundancia y/o en su actividad catalítica, sin embargo se debe considerar los controles postranscripcional y postraduccionales ejercidos

sobre los productos de la transcripción y de la traducción de los genes *sps* en condiciones *in vivo*.

En lo que respecta a la expresión de los genes que codifican enzimas que se encargan del catabolismo de sacarosa en raíces, existen reportes en donde se ha observado aumento de los niveles de expresión de los genes *SUS1* y *Lin6* (Schaarschmidt *et al.*, 2006; García-Rodríguez *et al.*, 2007; Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008) en presencia de la simbiosis micorrícica. De igual manera se ha resaltado la importancia de la actividad de *SUS* para el mantenimiento de la simbiosis micorrícica por el efecto detrimental sobre la colonización y formación de estructuras intraradicales de HMA que implica el silenciamiento del gen de la sacarosa sintasa 1 (*MtSucS1*) de *Medicago truncatula* (Baier *et al.*, 2010).

La distribución de los transcritos a nivel celular de genes implicados en el metabolismo de sacarosa ha sido evaluada por análisis de hibridación *in situ*, encontrándose que éstos se acumulan en células que albergan arbusculos y células adyacentes (Blee y Anderson, 2000). Nuestros resultados, no evidenciaron un aumento estadístico significativo de la expresión relativa del gen *SUS1* y *Lin6* en presencia de la simbiosis micorrícica en raíz, sin embargo, de manera particular para en el análisis de expresión del gen *Lin6* algunas muestras de cDNA obtenidos de plantas inoculadas con *F. mosseae*, mostraron niveles hasta 4 veces superiores a los detectados en las plantas no inoculadas, lo cual, como menciona Franken (2010), puede ser resultado de la presencia de múltiples estados de desarrollo de la simbiosis en el sistema radicular, que se sabe, interfiere particularmente en el análisis de perfiles de expresión en genes en raíces inoculadas con HMAs, lo cual podría estar ligado con el nivel de colonización cuantificado de *F. mosseae*, que a pesar de que se comprobó que era funcional por análisis de otros genes como *LePT4*, no fue muy abundante en el sistema radicular (Figura 3),.

De manera similar a lo observado por García-Rodríguez (2006), nuestros resultados indican un aumento de la expresión de *Lin6* en la parte aérea, pero también de *SUS3*. De manera particular, se sabe que *Lin6* es blanco de múltiples factores que modulan su expresión, por lo que se propone como un punto de

convergencia de distintas rutas de señalización en las que se involucran eventos como el ritmo circadiano, el crecimiento y algunos factores de estrés como las heridas (Proels y Roitsch, 2009), por lo que se sabe, la presencia de la simbiosis micorrícica tiene efectos sobre algunos de estos factores, especialmente, por influencia que tiene sobre el contenido y distribución de hormonas del crecimiento y de defensa, por lo que el aumento de la expresión de *Lin6* en parte aérea, podría estar relacionado en parte con el aumento de la sensibilidad de las plantas colonizadas por hongos micorrizógenos ante factores de estrés, pero también, en la ciclación y movimiento de carbono.

Por otra parte, los cambios en la expresión de genes del metabolismo de sacarosa, puede estar asociado también a la síntesis y ciclación de otros carbohidratos o polímeros de carbohidratos y/o en los ciclos fútiles de transporte de sacarosa, que implica el catabolismo y re-síntesis de sacarosa en distintos compartimentos celulares y en el apoplasto hasta alcanzar los tejidos del floema (Nguyen-Quoc y Foyer, 2001; Sauer, 2007).

Los cambios detectados en las cantidades de las fracciones de azúcares anteriormente descritos, así como la modificación de los patrones de expresión en los tejidos analizados en presencia de la simbiosis micorrícica, pudo haber ejercido un efecto sobre la acumulación de biomasa observada en la raíces colonizadas con *F. mosseae*, en comparación con lo observado en raíces no colonizadas, pero esto no ejerció una influencia suficiente para modificar de manera significativa la relación raíz:parte aérea (Figura 4). Debido a que en algunos estudios en dónde se ha analizado el efecto de la simbiosis micorrícica sobre el metabolismo primario, se modifican las concentraciones de las soluciones minerales aplicadas durante la fertilización de plantas inoculadas con HMA y no inoculadas, con la finalidad de establecer una comparación entre plantas fisiológicamente iguales, lo cual se determina de acuerdo a la acumulación de biomasa en sus tejidos, eliminando el factor nutrimental, nuestros resultados no desestiman un efecto causado por la mejora nutricional que confiere la presencia de HMAs en las raíces de las plantas, especialmente en el fenómeno relacionado con la adquisición de P. Sin embargo, estudios recientes realizados bajo

condiciones de manejo similares que usan como modelo plantas de tomate, utilizan concentraciones de P reducidas en comparación a las soluciones nutritivas estándar durante el mantenimiento de plantas inoculadas y no inoculadas con HMAs (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008; López-Raéz, *et al.*, 2010); además, la revisión y análisis de numerosos trabajos en dónde se analizó el costo de fotoasimilados que implica la presencia de interacciones en la raíz con HMAs, han indicado que la adquisición de nutrientes estimulada por HMAs en raíces, no explica completamente los incrementos que se registran de la actividad fotosintética (Kaschuk *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

En esencia, los resultados presentados en este manuscrito indican que, bajo las condiciones evaluadas, la simbiosis micorrícica de tipo arbuscular es capaz de modular la expresión de genes de biosíntesis y catabolismo de sacarosa en tejidos foliares y radiculares de plantas, además, se sugiere que estas modificaciones de la expresión están ligadas a la función catalítica de sus productos de transcripción, que influye no solo en el proceso de síntesis y catabolismo de sacarosa, sino en la movilización y síntesis de otros carbohidratos. De igual manera, se pone en consideración que los cambios observados en la expresión de los genes evaluados pueden estar ligados a la modificación en la distribución de algunas fracciones de carbohidratos solubles, considerando que los genes estudiados son responsables en gran medida de la distribución del carbono en plantas por medio de la síntesis y catabolismo de sacarosa. Sin embargo, no se desestima que la simbiosis micorrícica esté ejerciendo control a nivel de expresión génica sobre otros genes pertenecientes a los grupos aquí evaluados.

Futuros análisis deben de considerar el estudio de la regulación de la expresión de estos genes en presencia de la simbiosis micorrícica, bajo factores implicados en su regulación, como la influencia del ritmo circadiano, la generación de mutantes con los promotores de estos genes fusionados a un gen reportero en modelos biológicos que permitan incluir el efecto de la colonización micorrícica, así como realizar análisis de la actividad enzimática, considerando los elementos de importancia que ejercen control sobre la actividad de las enzimas que son codificadas por genes implicados en el metabolismo de sacarosa. Se debe considerar también el análisis de la respuesta ante distintas especies de HMA, con la finalidad de analizar si existe un patrón de modificación de la expresión común o distinto en presencia de distintas especies de HMA. Además, analizar otras formas de carbono como almidones, e incluir el uso de herramientas novedosas como la metabolómica para realizar análisis más precisos sobre la concentración y distribución de las formas principales de carbohidratos bajo influencia de la simbiosis micorrícica de tipo arbuscular.

Es importante reconocer que la modificación de los patrones de expresión observados asociados a la presencia de la simbiosis micorrícica varían, entre otras cosas, debido a las modificaciones de metabolismo del carbono durante las horas de luz y oscuridad, fenómeno que será importante evaluar y que se propone como perspectivas de investigación del presente trabajo; además, tampoco se desestima que exista la modificación de la expresión de otros genes pertenecientes a otras familias multigénicas de *sps* de tomate en los tejidos evaluados y que también puede proponerse como tema de investigaciones futuras.

LITERATURA CONSULTADA

- Augé R (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3–42.
- Bago B, Pfeffer PE y Shachar-Hill Y (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant physiology* 124:949–957.
- Baier MC, Keck M, Gödde V, Niehaus K, Küster H y Hohnjec N (2010) Knockdown of the symbiotic sucrose synthase MtSucS1 affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant physiology* 152:1000–14.
- Barea J-M, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany* 56:1761–78.
- Borja-Fernandez E, Muñoz FJ, Zanduetta-Criado A, Morán-Zorzano MT, Viale AM, Alonso-Casajús N y Pozueta-Romero J (2004). Most of ADP-glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *PNAS* 101 (31): 13080-13085.
- Bitterlich M, Krügel U, Bold-Burisch K, Franken P, Kühn C (2014). The sucrose transporter SUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *The Plant Journal* 78 (5): 877-889.
- Black KG, Mitchell DT, Osborne B (2000) Effect of mycorrhizal-enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber. *Plant, Cell and Environment* 23:797–809.

- Blee K y Anderson AJ (2002) Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant molecular biology* 50:197–211.
- Bombarely A, Menda N, Teclé IY, Buels RM, Strickler S, Fischer-York T, Pujar A, Leto J, Gosselin J y Mueller LA (2011). The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. *Nucleic Acids Res.* Volume 39 (Database issue):D1149-55.
- Boldt K, Pörs Y, Haupt B, Bitterlich M, Kühn C, Grimm B y Franken P (2011). Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *Journal of Plant Physiology* 168: 1256-1263.
- Bucher M (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173:11–26.
- Chen S, Hajirezaei M y Börnke F (2005) expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiology* 139:1163–1174.
- Doidy J, van Tuinen D, Lamotte O, Corneillat M, Alcaraz G y Wipf D (2012). The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant* 5 (6): 1346-1358.
- Du Bois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P y Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350-356.

- Farrar JF (2000). Aquisition, partitioning and loss of carbon. *Physiological Plant Ecology: 39th symposium of the British Ecological Society*. Press M, Scholes J, Barker M Eds. Cambridge University Press.
- Franken P (2010). Molecular-physiological aspects of the AM symbiosus post penetration. *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and funcion*. Hinanit K y Yoram K Eds. 2º Ed. Springer
- Gabriel-Neumann E, Neumann G, Leggewie G y George E (2011). Constitutive overexpression of the sugar transporter SoSUT1 in potato plants increases arbuscular mycorrhiza fungal root colonization under high, but not under low, soil phpsphorus availability. *Journal of Plant Physiology* 168 (9): 911-91
- García-Rodríguez S (2006) Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la regulación de genes implicados en el metabolismo carbonado en plantas de tomate (*Solanum esculentum*). Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- García-Rodríguez S, Azcón-Aguilar C y Ferrol Nuria (2007). Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiologia Plantarum* 129: 737-746.
- Ge L, Sun S, Chen A, Kapulnik Y y Xu G (2008). Tomato sugar transporter genes associated with mycorrhiza and phosphate. *Plant Growth and Regulation* 55: 115-123.
- Goren S, Huber SC y Granot D (2011). Comparison of a novel tomato sucrose synthase, SISUS4, with previously described SISUS isoforms reveals distinct sequence features and differential expression patterns in association with stem maturation. *Planta* 233:1011–23.
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B y Requina N (2011). A versatile monosacharide transporter that operates in the arbuscular

mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *The Plant Cell* 23 (10): 3812-3823.

Hewitt EJ (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, UK, pp 187-237.

Hohnjec N, Perlick A, Püler A y Küster H (2003). *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. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* 16:903–915.

Jung CS, Martínez-Medina A, López-Ráez JA y Pozo MJ (2012). Mycorrhiza-induced resistance and priming of plants defenses. *Journal of Chemical Ecology* 38: 651-664.

Kaschuk G, Kuyper T, Leffelaar PA, Hungria M y Giller KE (2009). Are the rates of photosynthesis stimulated by carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology & Biochemistry* 41: 1233-1244.

Koressaar T y Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23(10):1289-91.

Livak KJ y Schmittgen TD (2001). Analysis of the relative expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25: 402-408.

Lunn EL y ApRees T (1990). Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose phosphate synthase in seeds of *Pisum sativum*. *Biochemistry Journal* 267: 739-743.

- Lunn EL y MacRae E (2003). New complexities in the synthesis of sucrose. *Curent Opinion in Plant Biology* 6: 208-214.
- Nelson N (1944): A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 375-380.
- Proels RK y Roitsch T (2009). Extracellular invertase LIN6 of tomtato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany* 60 (6): 1555-1567.
- Reimholz R, Geigenberger P y Sitt M (1994). Sucrose-phosphate synthase is regulated via metabolites and protein phosphorylation in potato tubers, in a manner analogous to the enzyme in leaves. *Planta* 192: 480-488.
- Roe JH (1934). A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *Journal of Biological Chemitry* 107: 15-22
- Rotenberg D, Thompson TS, German TL, Willis DK. (2006) Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *Journal of Virological Methods* 138: 49–59.
- Sauer N (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS letters* 581:2309–17.
- Schaarschmidt S, González M-C, Roitsch T, Strack D, Sonnewald U y Hause B (2007) Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant physiology* 143:1827–40.
- Schaarschmidt S, Roitsch T y Hause B (2006) Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of experimental botany* 57:4015–23.

- Schubert A, Allara P y Morte A (2004). Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 161: 495-501.
- Schüßler A, Martin H, Cohen D, Fitz M y Wipf D (2006). Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* 444 (7121): 933-936.
- Smith SE y Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3^o Edición. Academic Press, Nueva York.
- Tejeda-Sartorius M, Martínez de la Vega O y Délano-Frier P (2008). Jasmonic acid influences mycorrhizal solonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiologia Plantarum* 133: 339-353.
- Trouvelot A, Kough JL y Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (Eds.). INRA Press, Paris, pp. 217-221.
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M y Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115.
- Valentine AJ, Mortimer PE, Kleinert A, Kang Y y Benedito VA (2013) Carbon metabolism and costs of arbuscular mycorrhizal associations to host roots. En: *Simbiotic Endophytes*. Aroca R (Ed.). Springer, pp. 233-252.

Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U y Piché Y (1998). Ink and vinager, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (12): 5004-5007.

Volkert K, Debast S, Voll LM, Voll H, Schießl I, Hofmann J, Schneider S y Börnke F (2014). Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate syntase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 68 (18): 5217-5229.

Wright DP, Read DJ y Scholes JD (1998) Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* 21:209–216.

CAPITULO II

Efecto del estrés causado por herbivoría sobre la expresión de genes de síntesis y degradación de sacarosa y el contenido de carbohidratos solubles en tejidos fotosintéticos y heterotróficos

RESUMEN

En la mayoría de las plantas, los fotoasimilados son transportados en forma de sacarosa desde los tejidos fotosintéticos hasta los tejidos de metabolismo heterotrófico, y este disacárido se considera como uno de los principales productos de la fotosíntesis. Actualmente, algunos estudios indican que ocurre una reconfiguración del metabolismo primario que ayuda a mitigar el estrés causado por la presencia de insectos fitófagos. Es por esto, que en el presente trabajo se analizó el efecto sobre la expresión de genes implicados en metabolismo de sacarosa mediante RT-PCR cuantitativa, así como la distribución de distintas fracciones de carbohidratos solubles en tejidos foliares y radicales de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) sometidas al ataque de larvas de *Spodoptera exigua*. De acuerdo a los patrones de expresión reportados para los genes del metabolismo de sacarosa, para estudiar aquellos relacionados con la síntesis se eligieron los genes *spsA2* y *spsC* que codifican dos isoformas distintas de sacarosa-fosfato sintasa (SPS), además de dos genes de sacarosa sintasa (*SUS1* y *SUS3*) y el de la invertasa LIN6 (*Lin6*), que corresponden a enzimas implicadas en el catabolismo de sacarosa. Los resultados obtenidos fueron comparados con plantas que no habían sido sujetas al estrés por herbivoría y se observó que la presencia de las larvas de *S. exigua* aumenta la expresión de los genes *spsC* y *SUS1* en tejidos foliares, sin embargo en tejidos radicales causa una tendencia a la reducción de la expresión fuertemente marcada en *spsA2* y *SUS3*, que de acuerdo a los patrones de expresión reportados en tomate y otros modelos vegetales, son las formas predominantes en raíces a nivel transcripcional. Así mismo, la herbivoría causó la reducción de la concentración de todas las

fracciones de azúcares solubles detectadas en tejidos foliares. En raíces, solo se detectó una reducción de la concentración de azúcares reductores, efecto que se puede asociar a la reducción de la expresión de los genes del metabolismo de sacarosa en estos tejidos.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado estrategias que les permiten desarrollarse en presencia de insectos herbívoros, a través del desencadenamiento de mecanismos de resistencia y tolerancia que actúan en conjunto para mitigar los efectos negativos causados por la presencia de insectos fitófagos. El jasmonato (JA), es un regulador de crecimiento que tiene efectos sobre distintos aspectos fisiológicos en las plantas, pero también es una molécula señal que está estrechamente ligada con la respuesta de defensa en contra de herbívoros y patógenos necrotróficos (Schaller y Stintzi, 2008).

En respuesta a este tipo de ataque, las plantas han desarrollado diversas estrategias inducibles por la presencia de insectos herbívoros que se han clasificado en resistencia y tolerancia, que están en relación con la canalización de los recursos al mantenimiento de estos mecanismos, pero también a la modificación de los patrones de distribución de recursos con la finalidad de sustentar otras funciones básicas como la reproducción y el crecimiento (Schwachtje y Baldwin, 2008).

Se ha observado que en plantas que sufren el ataque de herbívoros en tejidos foliares tienen la capacidad de movilizar parte de sus fotoasimilados hacia órganos subterráneos, más aun, se ha probado que la presencia de JA tiene la capacidad de regular dicho efecto (Ferrieri *et al.*, 2012). Un mecanismo similar ha sido observado en el ataque de herbívoros en el tejido radicular en maíz, que causó acumulación de reservas en tallo (Rober ., 2014). Lo que indica que las plantas como estrategia de tolerancia tienen la capacidad de movilizar los productos de las reacciones de fijación de carbono hacia tejidos no afectados (Henkes *et al.*, 2008), fenómeno que al que se hace referencia también como secuestro de carbono.

Gracias al análisis sobre el efecto de la simulación de la herbivoría en plantas de *Nicotiana attenuata*, se describió que mediante un mecanismo independiente de JA, se realiza la reducción de expresión de la proteína GAL8, que forma la subunidad β de una proteína SnRK1 cinasa, tiene la capacidad de

influenciar la movilización de carbono desde tejidos fotosintéticos hacia raíces, con la finalidad de sustentar el posterior recrecimiento una vez haya cesado el ataque, sin embargo, los mecanismos implicados en este proceso aun son desconocidos (Schwachtje *et al.* 2006),.

En cambio, como respuesta a la herbivoría causada por larvas de *Manduca sexta*, se detectó una reducción del contenido de azúcares no estructurales y almidón que tuvo correlación positiva con la síntesis de compuestos de defensa, particularmente de nicotina, en plantas de *N. attenuata*, en cuyo caso, el secuestro de carbono en la raíz, provee los elementos necesarios para la síntesis de compuestos de defensa mediante mecanismos dependientes de AJ (Machado *et al.*, 2013).

Con la finalidad de estudiar la movilización de carbohidratos bajo influencia de la presencia del estrés causado por herbivoría, en el presente trabajo se estableció como objetivo el análisis de la expresión de genes que codifican enzimas que representan los pasos clave durante la síntesis y degradación de sacarosa, que tiene influencia sobre la movilización de este disacárido, en tejidos foliares y radiculares de planta de tomate (*Solanum lycopersicum*), después de un periodo considerablemente prolongado de haber estado expuestas a la defoliación parcial por el ataque de larvas de *Spodoptora exigua*. De igual manera, se analizó la distribución entre tejidos foliares y radiculares de distintas fracciones de azúcares solubles, con la finalidad de establecer una primera aproximación del efecto causado por insectos fitófagos de aparato bucal masticador sobre el metabolismo de sacarosa en plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Con la finalidad de evaluar el efecto del estrés por herbivoría, plantas de tomate de la variedad Castelmart, fueron mantenidas en condiciones de invernadero en macetas de 400 mL que contenían una mezcla de Arena-Suelo-Vermiculita en una proporción 3:1:1 tinalizado durante tres días consecutivos. Las plantas fueron sometidas a un régimen de fertilización que consistió en la aplicación de la solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1966) con una reducción de la concentración de P respecto a la solución estándar al 25 %, y con agua corriente a intervalos regulares, cuando fuera necesario. Después de cinco semanas de haberse mantenido en estas condiciones, la mitad de las plantas fueron separadas y en cada una de ellas se colocaron cinco larvas de *Spodopora exigua*. La inducción de herbivoría por larvas del lepidóptero, se mantuvo durante dos semanas, con la finalidad de causar en las plantas una respuesta a un estrés prolongado para simular un ataque por larvas masticadoras como ocurre en condiciones naturales, mientras que en el resto de las plantas no se indujo la herbivoría y fueron usadas como control, resultando así un experimento con dos tratamientos. Con el propósito de propiciar que las larvas se alimentaran de una manera constante, se seleccionaron individuos de estadios larvarios tempranos y una vez que se completaron dos semanas después de que se colocaron las larvas en las plantas, se retiraron y se cosecharon tejidos foliares y radiculares, de los cuales se determinó el peso fresco y posteriormente una porción de estos fue congelada con nitrógeno líquido y mantenida a – 80 °C hasta su procesamiento.

2. Análisis de expresión de genes

Con la finalidad de analizar el efecto de la presencia del estrés por herbivoría causado por *Spodoptora exigua* sobre la expresión de genes implicados en el metabolismo de sacarosa, se obtuvieron extractos de RNA a partir de tejido foliar y radicular macerado en mortero con N₂ líquido, colectado bajo las condiciones anteriormente descritas usando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research)

de acuerdo a la instrucciones del fabricante. Con la finalidad de comprobar su integridad, 2 μ L de los extractos de RNA fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1 %, mientras que la pureza y concentración fueron determinadas por espectrofotometría (NanoDrop 1000).

La retrotranscripción de se realizó a partir de 1 μ g de RNA, usando el volumen necesario de cada uno de los extractos de acuerdo a su concentración usando el kit de retrotranscripción cDNA Synthesis Kit TAKARA; una vez que se obtuvo el cDNA, su eficiencia fue evaluada por la amplificación del factor elongación-1 α (*SIEF-1 α*) de tomate (*SIEF-1 α*) mediante PCR semicuantitativa, usando 1 μ L de cDNA en un volumen total de reacción de 24 μ L. Una vez evaluados, los productos de la retrotranscripción se usaron para efectuar análisis de PCR en tiempo real (SYBR® Premix Ex Taq™ TAKARA) a partir de muestras de plantas trabadas bajo las condiciones anteriormente descritas.

La expresión relativa de genes se realizó en tejidos foliares y radicales de los genes *spsA2* y *spsC*, implicados en la biosíntesis de sacarosa; los genes *SUS1* y *SUS3*, que codifican dos isoformas distintas de sacarosa sintasa (SUS), y el gen *Lin6*, que codifica una invertasa apoplástica (*Lin6*), éstos dos últimos grupos de genes, involucrados en la degradación de sacarosa. La expresión relativa de todos los genes fue relativizada a la expresión detectada del gen *SIEF-1 α* usando el método $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los resultados se expresaron en incremento o disminución de acuerdo a la expresión relativa detectada de cada uno de los genes en las plantas control.

Para el análisis de la expresión relativa de los genes *spsA2* y *spsC*, se diseñaron primers usando el software Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar y Remm, 2007), cuya especificidad fue evaluada por PCR punto final y tiempo real. Las parejas de primers usadas para los genes *SUS1*, *SUS3* y *SIEF-1 alpha* fueron idénticas a las reportadas por García Rodríguez *et al.* (2007), Goren *et al.* (2011), y Rotenberg *et al.* (2006) respectivamente (Cuadro 1).

3. Cuantificación de carbohidratos solubles y determinación de masa seca

La cuantificación de distintas fracciones de carbohidratos solubles y la masa seca de plantas de cada uno de los tratamientos fue determinada de acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo 1.

4. Análisis estadísticos

Las plantas de los tratamientos anteriormente descritos se acomodaron de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar. Los análisis estadísticos fueron realizados a partir de tres replicas biológicas, con excepción de la biomasa, que contó con cinco replicas biológicas. Los datos obtenidos de en cada caso fueron procesados por análisis de varianza (ANOVA) simple y las medias que presentaron diferencia estadística significativa se compararon usando la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fisher con $p < 0.1$ para los análisis de expresión y la cuantificación de carbohidratos solubles, y $p < 0.05$ para el análisis de biomasa.

RESULTADOS

1. La pérdida de tejido en la parte aérea en plantas sometidas a herbivoría no modifica la acumulación de biomasa en parte aérea ni en raíz

El efecto de la presencia de las larvas de *S. exigua* en los tejidos foliares tuvo repercusión en la disminución de la masa de la materia fresca, la cual disminuyó respecto a las plantas control, sin embargo, esta disminución no representó un cambio suficiente para la disminución de la biomasa (Figura 8) de las plantas sometidas a este mismo tratamiento, al igual que la biomasa de la raíz, la cual permaneció sin cambios significativos entre los tratamientos (Figura 8A y 8B), lo cual se vio reflejado en la relación raíz-parte aérea, que no sufrió modificaciones en las plantas que habían sido sometidas a herbivoría con relación a las plantas control (Figura 8C)

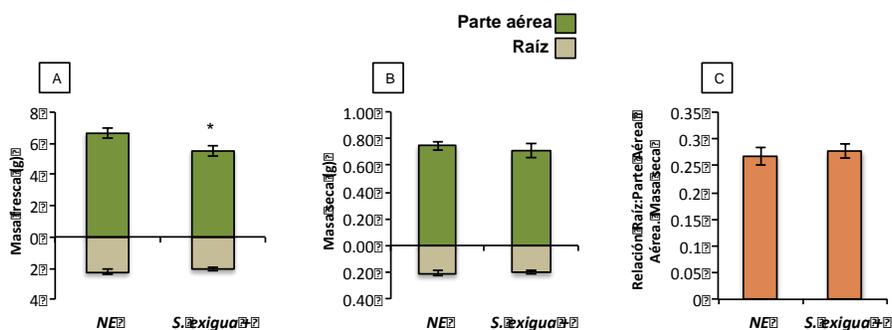


Figura 8. Efecto de la herbivoría en el peso fresco y biomasa de plantas de tomate. (A) Masa fresca y (B) masa seca expresada en gramos de las plantas de tomate 8 semanas después de la germinación, sometidas a herbivoría por larvas de *S. exigua* durante las últimas dos semanas (*S. exigua* +) y plantas control (NE) y (C) relación raíz:parte aérea de la masa seca. Las barras de error en las gráficas representan el error estándar de la media, los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos de a la Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher ($p < 0.05$).

Tomando estos resultados, y considerando que la biomasa que acumulan las plantas es resultado en gran parte de la asimilación del carbono atmosférico mediante el proceso de fotosíntesis (Peng *et al.*, 1991), la acumulación de biomasa en los tratamientos evaluados podría indicar que la tasa fotosintética fue suficiente para acumular biomasa de una manera equivalente en entre las plantas control y las que habían sufrido el ataque de *S. exigua*, a pesar de la pérdida de tejido foliar por los hábitos de alimentación de las larvas.

2. Modificaciones de la expresión de genes del metabolismo de sacarosa por la presencia de larvas de *Spodoptora exigua*

En plantas bajo estrés por herbivoría causado por larvas fitófagas de *S. exigua* en hojas, se detectó un aumento de la expresión del gen *spsC* en tejidos foliares respecto al nivel detectado en las plantas control, mientras que no se detectaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de este gen en raíces (Figura 9B). En cambio, la expresión del gen *spsA2* no sufrió cambios significativos en su expresión en plantas sometidas a herbivoría, sin embargo, no se detectó amplificación de este gen a partir de las muestras de cDNA obtenidas de raíces de plantas que habían sufrido el ataque de *S. exigua*, lo que indica una inhibición de la expresión de este gen bajo esta condición (Figura 9A).

Cuando los niveles de expresión relativa de los genes *SUS1* y *SUS3* fueron evaluados en plantas sometidas a estrés por herbivoría y comparados con los detectados en las plantas control, se observó que *SUS1* aumentaba su nivel de expresión en tejido foliar, mientras que *SUS3* reducía su expresión en raíces (Figura 9C y 9D).

En plantas que habían sufrido la presencia de larvas de *S. exigua* en sus tejidos, el gen *Lin6* redujo su nivel de expresión en tejido foliar, y de igual manera se observó una tendencia a la reducción de la expresión de este gen en plantas que habían sufrido esta condición, sin embargo, esta no fue significativamente distinta a la detectada en las plantas control (Figura 9E).

Estos resultados indican que la presencia de larvas de insectos con aparato bucal masticador en los tejidos foliares tienen la capacidad de modificar la expresión de genes del metabolismo de sacarosa, en tejidos foliares y radicales, en donde en estos últimos, se tiene por lo general a la reducción de la expresión, que particularmente evidente en la reducción de los niveles de expresión relativa detectados de los genes *spsA2* y *SUS3*.

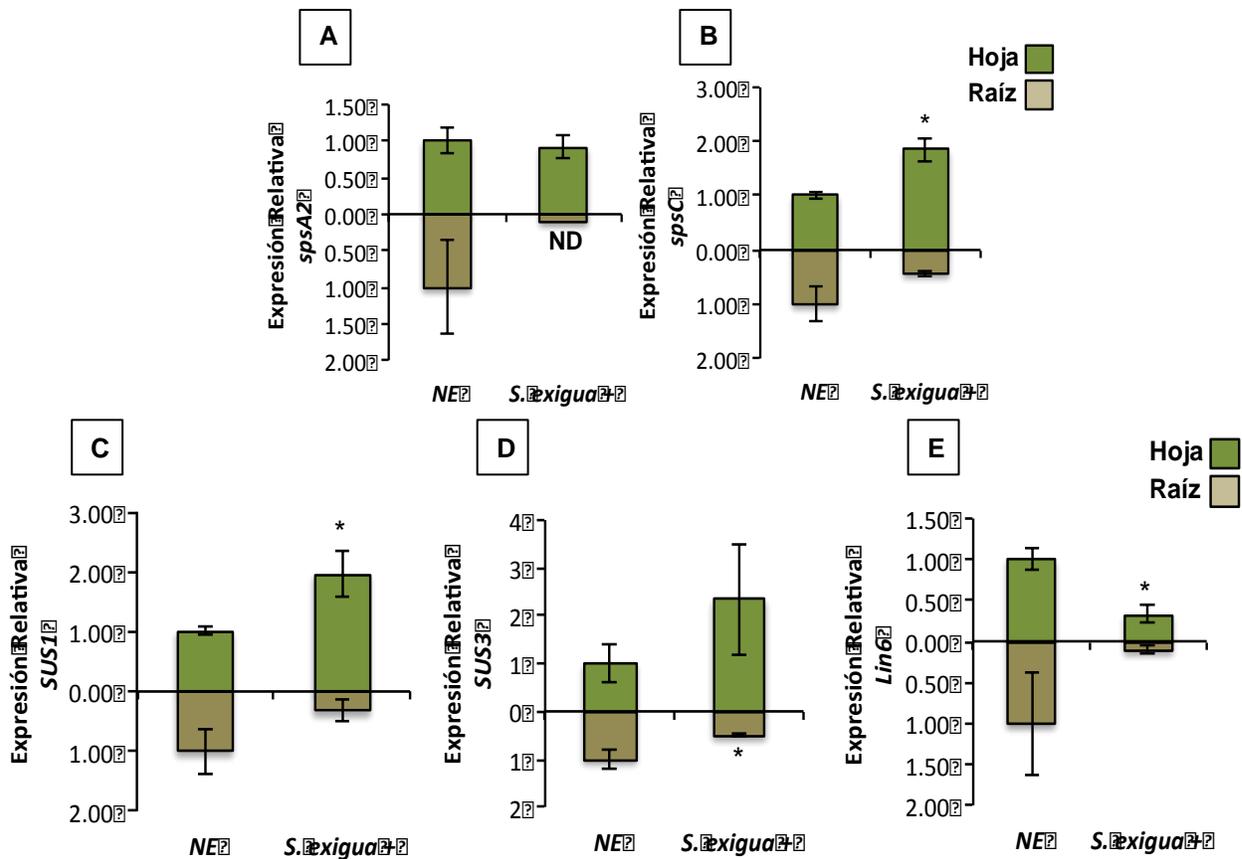


Figura 9: Efecto de la herbivoría en la expresión relativa de genes del metabolismo de sacarosa. Niveles de expresión relativa de los genes *spsA2* (A), *spsC* (C) implicados en la biosíntesis, y de los genes *SUS1* (C), *SUS3* (D) y *Lin6* (E), implicados en el catabolismo de sacarosa de plantas sometidas a herbivoría por durante 15 días (*S. exigua* +) y plantas control (NE). Los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos de acuerdo la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DSM) de Fisher ($p < 0.1$) y las barras de error representan el error está.

3. La presencia de *Spodoptera exigua* en hojas causa una reducción de la concentración de distintas fracciones de azúcares solubles en tejidos foliares y modifica la proporción raíz-tejido foliar

Se evaluaron las fracciones correspondientes a azúcares solubles totales, fructosa total, sacarosa y azúcares reductores en tejidos foliares y radiculares de las plantas mantenidas de acuerdo a los tratamientos anteriormente descritos.

Se observó que la defoliación parcial causada por *S. exigua* en tejido foliar, causó una reducción significativa de la concentración de azúcares solubles totales en tejido foliar (Figura 10A)

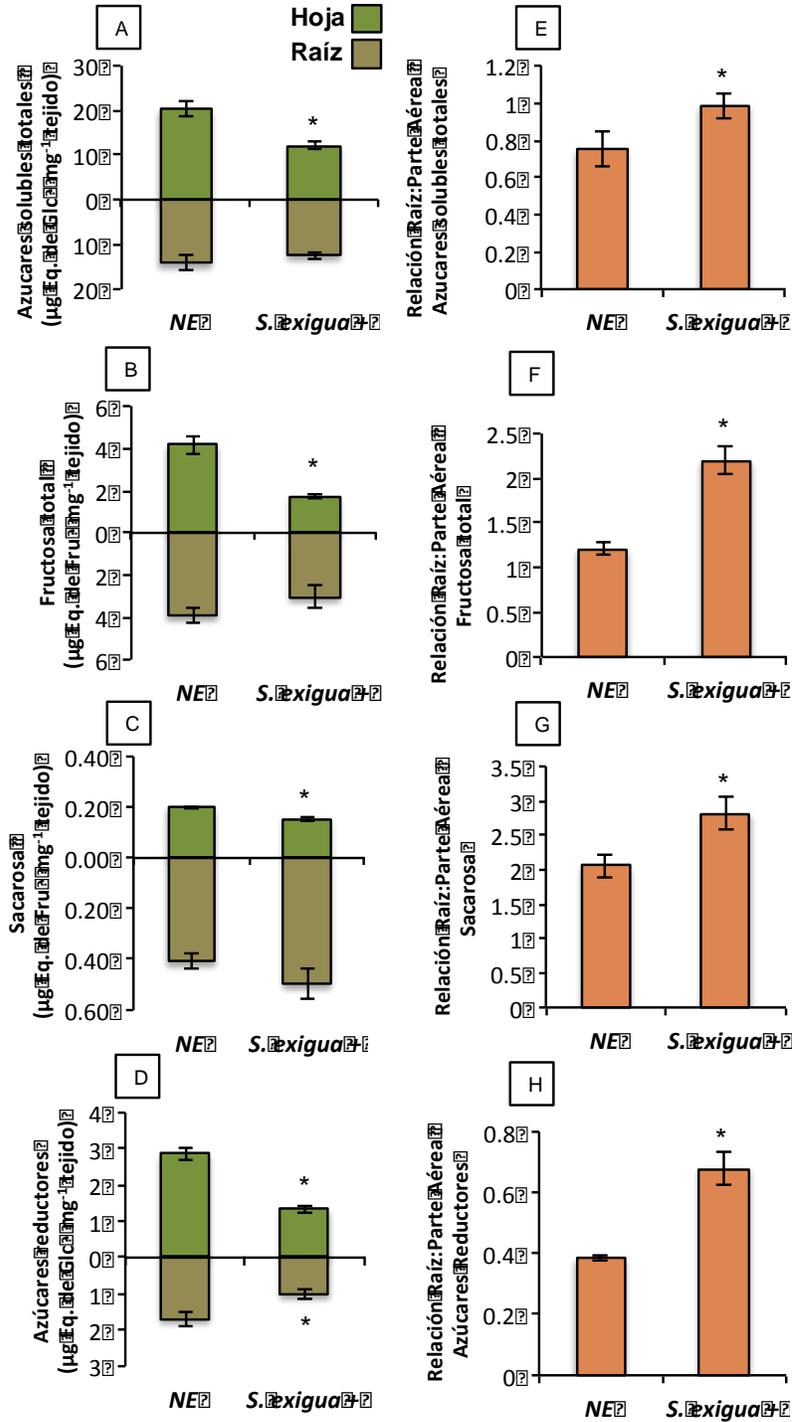


Figura 10. Efecto de la herbivoría sobre la concentración de azúcares solubles en plantas de tomate. Concentración de azúcares solubles totales (A), fructosa (B), sacarosa (C) y azúcares reductores (D), así como la relación raíz:parte aérea para cada fracción de azúcares cuantificada (E, F, G y H, respectivamente), en plantas de tomate sometidas a herbivoría por la presencia de larvas de *S. exigua* durante dos semanas (*S. exigua* +) y plantas control (NE). En las gráficas, las barras de error representan el error estándar de la media, los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos de acuerdo a la Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher ($p < 0.1$).

La reducción general de los azúcares solubles totales tuvo una repercusión en la reducción de otras fracciones de azúcares solubles como fructosa total, sacarosa y azúcares reductores. Sin embargo en el tejido radicular, no se observaron cambios significativos entre las dos condiciones evaluadas, con excepción de la concentración de de azúcares reductores, que fue significativamente menor en las plantas que habían sido sometidas a herbivoría (Figura 10D).

Se calculó la proporción de carbohidratos cuantificados en el tejido radicular y en el tejido foliar (proporción raíz:parte aérea) de las distintas fracciones de azúcares solubles evaluadas. Dichas proporciones aumentaron en plantas que habían sido sometidas a herbivoría, en comparación con los valores obtenidos de este mismo parámetro en plantas control incluso para azúcares reductores, en donde se observó reducción de estos en tejido foliar y en tejido radicular (Figuras 10E-H).

Tomando en consideración estos resultados, se indica que bajo el estrés por herbivoría causado por la presencia de larvas de *S. exigua* en el tejido foliar, se reducen los niveles de azúcares solubles en tejido foliar y se modifican las proporciones raíz-tejido foliar, indicando que respecto a otros tejidos, las raíces acumulan una mayor proporción de azúcares no estructurales por influencia de estrés por herbivoría

DISCUSIÓN

La sacarosa, es el carbohidrato que la mayoría de las plantas usan para la movilización de fotoasimilados generados durante los procesos de fijación de carbono desde los tejidos fotosintéticos, hacia el resto de los órganos y tejidos para el mantenimiento del metabolismo. Como factores que controlan la síntesis y degradación de sacarosa, su concentración y que además actúan sobre su movilización entre los diferentes tejidos, se analizó en tejidos foliares y radiculares de plantas de tomate la expresión de los genes *spsA2* y *spsC*, que codifican dos isoformas de sacarosa-fosfato sintasa (SPS), enzima que en condiciones *in-vivo* ejerce un control significativo sobre la canalización de los productos de las reacciones de fijación de carbono hacia la síntesis de sacarosa (Chen *et al.*, 2005); además de los genes *SUS1* y *SUS3* de sacarosa sintasa, y el gen *Lin6* de una invertasa, que codifican enzimas que degradan sacarosa, bajo la influencia de la presencia de larvas de *S. exigua*. En la actualidad se ha documentado que la presencia de insectos herbívoros, causa una movilización de las reservas sintetizadas por las plantas durante la fotosíntesis a tejidos que no están sufriendo el ataque como raíces (Ferrieri *et al.*, 2012) y tallos (Rober *et al.*, 2014).

Bajo las condiciones evaluadas en este experimento, se detectó una tendencia a la disminución de la expresión de los genes de síntesis y degradación de sacarosa en plantas que sufrieron defoliación parcial por presencia de larvas de *S. exigua* en comparación con las plantas control (Figura 9), dicha reducción de la expresión, fue evidente en los genes *spsA1* y *SUS3*, en dónde para el primero se redujo hasta niveles no detectables por el método utilizado, mientras que el segundo se redujo estadísticamente en comparación con la expresión de las plantas control. En plantas de *Amaranthus cruentus* 5 días después de que habían sido parcialmente defoliadas por larvas del lepidóptero *Spoladea recurvalis* durante 4 días mostraron una disminución de la actividad de SUS en raíces, pero un aumento de ésta en tejidos fotosintéticamente activos en comparación con plantas control (Castrillón-Arbeláez *et al.*, 2012).

Los patrones de expresión de los genes asociados al metabolismo de sacarosa son similares en las plantas y se han descrito en algunas plantas modelo. Se sabe por ejemplo que el gen *SUS3* es la forma predominante a nivel de transcritos en raíces de tomate (Goren *et al.*, 2011); mientras que la detección de la expresión del gen GUS fusionado al promotor del gen *SPSA2* en *Arabidopsis thaliana*, demostró que este se encuentra casi restringido al tejido radicular (Volkert *et al.*, 2014). Los niveles expresión detectada en este estudio, indican que la herbivoría en tejido foliar, podría estar implicada en la reducción del metabolismo de sacarosa en raíces, lo cual podría tener impacto por ejemplo sobre la síntesis de polímeros como almidón (Asano *et al.*, 2002), celulosa y callosa (Amor *et al.*, 1995) y en la distribución y ciclación de carbohidratos (Nguyen-Quoc y Foyer, 2001) debido por la importancia de los productos de la traducción de los transcritos de estos genes sobre estos procesos.

En el tejido foliar de plantas que sufrieron defoliación parcial por las larvas de *S. exigua*, se observó una tendencia a la reducción de la concentración de azúcares no estructurales en comparación a la detectada en las plantas control. Este resultado coincide con lo reportado por Machado *et al.* (2013), quienes describen que en plantas de *Nicotiana attenuata* a las que se le indujo la herbivoría causada por larvas de *Manduca sexta*, se redujo el contenido de azúcares en tejido foliar; de igual manera reportan una reducción de carbohidratos solubles en raíces, pero bajo las condiciones evaluadas en este trabajo, solo se detectó una reducción de la fracción correspondiente a azúcares reductores de las plantas sometidas al ataque de *S. exigua*, lo cual puede estar asociado a la reducción de la expresión de *SUS3* y a la tendencia a la reducción de *SUS1* y *Lin6*, cuyas enzimas catalizan la producción de hexosas a partir de sacarosa.

Particularmente en tomate LIN6 ha sido asociada a la movilización de reservas ante en respuesta a la presencia de brasinosteroides (Prols *et al.*, 2000); en la presencia de *Botrytis cinerea*, que aumenta la expresión del gen que la codifica (*Lin6*) y además la actividad de invertasas extracelulares (Hyun *et al.*, 2011) al igual que en plantas infectadas con el virus del rizado amarillo del tomate, en dónde se ha observado aumento de la expresión de *Lin6* (Sade *et al.*, 2013); y

ante la presencia de hongos micorrizógenos arbusculares en raíces se han reportado efectos locales y sistémicos que repercuten en el aumento de la expresión de *Lin6* en hojas y en raíces (Schaarschmidt *et al.*, 2006; Rodríguez-García *et al.*, 2007); así mismo, bajo influencia de los señalizadores de respuestas de defensa, *Lin6* aumenta su expresión en presencia de AJ, pero disminuye ante la presencia de ácido salicílico (Proel y Roistsch, 2009), por lo que se ha propuesto como un punto de convergencia de distintos estímulos medioambientales (Proel y Roistsch, 2009). LIN6 es una invertasa apoplástica, que comparte algunas propiedades enzimáticas con las invertasas vacuolares, pero que por su localización subcelular difiere en función (Strum, 1999). En este estudio, se evidenció que *Lin6* no solo responde en la reducción de su expresión en los tejidos foliares de plantas sometidas a herbivoría, sino que también existe una tendencia a la reducción en tejidos radiculares, sugiriendo que la presencia de insectos herbívoros puede actuar sobre el metabolismo de sacarosa por la redistribución y aumento de la sensibilidad de los tejidos a la presencia de sustancias que desencadenan la respuesta de defensa en plantas de manera local y sistémica.

En tejidos foliares, se detectó un aumento de la expresión de los genes *spsC* y *SUS1* en plantas que sufrieron herbivoría. Se ha observado en plantas de *Populus*, que la presencia de larvas de *Lymantria dispar* y la aplicación de AJ de manera exógena no modificó la expresión de genes de biosíntesis de sacarosa en tejido foliar, pero se cambió la expresión de genes del metabolismo primario, con mayor abundancia en las plantas que habían sufrido herbivoría que en plantas que habían sido tratadas con AJ (Babst *et al.*, 2009). Por otro lado, en plantas de *Populus*, la sobreexpresión de SPS, por la inserción de un gen *sps* de maíz, ocasionó la modificación de la concentración de metabolitos secundarios que entre otras cosas, se relacionaron con la reducción de los hábitos de alimentación de *Phratora vitellinae*, un crisomélido especializado que consume tejidos de plantas del género *Populus*, indicando que el cambio en la composición química de los tejidos vegetales producto de la modificación de la expresión de SPS puede reducir el ataque por herbívoros (Hjältén *et al.*, 2006). Estos resultados podrían

indicar que los niveles de expresión detectados en las plantas de tomate sometidas a herbivoría por *S. exigua* en el presente estudio pueden estar relacionados con la respuesta de defensa de las plantas. La SPS es una proteína poco abundante en los tejidos vegetales (Reimholz *et al.*, 1993), por lo que los cambios detectados en la modificación de los niveles de expresión relativa de *spsC* en tejidos foliares podría tener repercusión en la actividad de la enzima que codifica en los tejidos afectados por larvas de *S. exigua* como una respuesta de defensa que implicaría en cambio en la distribución de compuestos del metabolismo secundario en hojas. Esta idea esta en parte apoyada por el hecho de que en plantas de *Nicotiana attenuata* que sufrieron la simulación de la herbivoría causada por larvas de *M. sexta*, se ha observado una reducción de GAL8, proteína de la subunidad β de una proteína SnRK1 cinasa (Schwachtje *et al.*, 2006), las cuales han sido consideradas por la evidencia en ensayos *in vitro* como potenciales reguladoras de la síntesis de sacarosa por fosforilación de la SPS (Sudgen *et al.*, 1999).

Se ha reportado que la presencia de larvas de *M. sexta* en plantas de *N. attenuata* reduce la asimilación de carbono (Halitschke *et al.*, 2011), incluso cuando la síntesis de compuestos de defensa (nicotina) ha alcanzado su máximo (Nabity *et al.*, 2012). Las plantas de los dos tratamientos evaluados, no difirieron en la cantidad de biomasa acumulada en la parte aérea ni en las raíces, y por el efecto directo causado por la fotosíntesis sobre la acumulación de biomasa (Peng *et al.*, 1991), se puede pensar que la actividad fotosintética ocurrida en las plantas que sufrieron herbivoría, fue suficiente para generar una cantidad de biomasa igual que las plantas control, a pesar de la pérdida de tejido foliar que causó la presencia de *S. exigua*. A pesar de que la cantidad de biomasa de las plantas de los dos tratamientos no sufrió cambios significativos, la reducción de las cantidades de azúcares solubles en la parte aérea, causó que el valor de la proporción del contenido de estos en raíces respecto a tejidos foliares aumentara en plantas que habían sufrido el ataque de *S. exigua*, indicando que las plantas bajo herbivoría modifican la distribución de azúcares solubles, que puede estar en relación con la síntesis de compuestos de defensa.

CONCLUSIONES

Tomando en consideración los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que plantas de tomate sufren modificaciones en los patrones de expresión de genes de SPS y de SUS en tejido foliar, que puede estar asociado a la modificación del perfil químico los tejidos foliares por posibles repercusiones sobre el metabolismo secundario. Adicionalmente, se observó una disminución de las formas principales de genes del metabolismo de sacarosa en raíz, lo cual puede tener repercusiones sobre la síntesis de polímeros y ciclación de otros carbohidratos en tejidos heterotróficos, pero cabe la posibilidad de que se esté favoreciendo la canalización de los carbohidratos hacia otras rutas como la síntesis de compuestos de defensa en raíces. Así mismo, se pudo observar que el gen de la invertasa LIN6 disminuye su expresión en presencia de larvas de *S. exigua* en tejido foliar, por lo que la interacción en estos tejidos de las sustancias involucradas en la respuesta de defensa, particularmente de naturaleza hormonal como posibles candidatos de la modificación de la distribución del azúcares solubles debe de estudiarse más profundamente.

LITERATURA CITADA

- Amor Y, Haigler CA, Jhonson S, Wainscott M y Delmer DP (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *PNAS* 92: 9353-9357.
- Asano T, Kunieda N, Omura Y, Ibe H, Kawasaki T, Takano M, Sato M, Furuhashi H, Mujin T, Takaiwa F, Wu Chuan-yin, Tada Y, Satozawa T, Sakamoto M y 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. *The Plant Cell* 14: 619-628.
- Babst BA, Sjödin A, Jansson S y Orians CM (2009). Local and systemic transcriptome responses to herbivory and jasmonic acid in *Populus*. *Tree Genetics & Genomes* 5: 459-474.
- Castrillón-Arbeláez PA, Martínez-Gallardo N, Avilés Arnuat H, Tiessen A y Délano-Frier J (2012). Metabolic and enzymatic changes associated with carbon mobilization, utilization and replenishment triggered in grain amaranth (*Amaranthus cruentus*) in response to partial defoliation by mechanical injury or insect herbivory. *BMC Plant biology* 12: 163.
- Ferrieri PA, Agtuca B, Apple HM, Ferrieri RA y Schultz JC (2012). Temporal changes in allocation and partitioning of new carbon as ¹¹C elicited by simulated herbivory suggest that roots shape aboveground responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 161: 692-704.
- Koressaar T y Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23(10):1289-91.

- Livak KJ y Schmittgen TD (2001). Analysis of the relative expression data usgin real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- García-Rodríguez S, Azcón-Aguilar C y Ferrol Nuria (2007). Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiologia Plantarum* 129: 737-746.
- Goetz M, Godt DE y Roitsch T (2000), Tissue-specific induction of the mRNA for an extracellular invertase isoenzyme of tomato by brassinosteroids suggest a role for steroid hormones in assimilate partitionig. *The Plant Journal* 22: 515-522.
- Goren S, Huber SC y Granot D (2011). Comparison of a novel tomato sucrose synthase, SISUS4, with previously described SISUS isoforms reveals distinct sequence features and differential expression patterns in association with stem maturation. *Planta* 233:1011–23.
- Halitschke R, Hamilton JG y Kessler A (2011). Herbivore-specific elicitation of photosynthesis by mirid bug salivary secretions in the wild tobacco *Nicotiana attenuata*. *New Phytologist* 191: 528-535.
- Henkes GJ, Thorpe MR, Minchin PEH, Schurr U y Röse U (2008). Jasmonic acid treatment to part of the root system in consistent with simulated leaf herbivory, diverting recently assimilated carbon towards untreated roots within an hour. *Plant, Cell and Environment* 31: 1229-1236.
- Hjältén J, Lindau A, Wennström A, Blomberg P, Witzell J, Hurry V y Ericson L (2007). Unintentional changes of defence traits in GM trees can influence plant-herbivore interactions. *Basic and Applied Ecology* 8: 434-443.

- Hewitt EJ (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, UK, pp 187-237.
- Hyun TK, Eom SH, Rim Y y Kim J-S (2011). Alteration of the expression and activation of tomato invertases during *Botrytis cinerea* infection. *Plant Omics Journal* 4 (7): 413-417.
- Machado RAR, Ferrieri AP, Robert CA, Glauser G, Kallenbach M, Baldwin IT y Erb M (2013). Leaf-herbivore attack reduces carbon reserves and regrowth from the roots via jasmonate and auxin signaling. *New Phytologist* 200: 1243-1246.
- Nabity PD, Zavala JA y DeLucia EH (2009). Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. *Annals of Botany* 103: 655-663.
- Nguyen-Quoc y Foyer C (2001). A role for 'futile cycles' involving invertases and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 52 (358): 881-889.
- Peng S, Krieg DR y Girma FS (1991). Leaf photosynthetic rate is correlated with biomass and grain production in grain sorghum lines. *Photosynthesis Research* 28: 1-7.
- Proels RK y Roitsch T (2009). Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany* 60 (6): 1555-1567.

- Reimholz R, Geigenberger P y Sitt M (1994). Sucrose-phosphate synthase is regulated via metabolites and protein phosphorylation in potato tubers, in a manner analogous to the enzyme in leaves. *Planta* 192: 480-488.
- Robert CAM, Ferrieri RA, Schimer S, Babst BA, Schueller MJ, Machado RAR, Arce CCM, Hibbard BE, Gershenzon J, Turlings T, Erb M (2014). Induced carbon reallocation and compensatory growth as root herbivore tolerance mechanisms. *Plant, Cell and Environment* 37: 2613-2622.
- Rotenberg D, Thompson TS, German TL, Willis DK. (2006) Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *Journal of Virological Methods* 138: 49–59.
- Sade D, Brotman Y, Eybishtz A, Cuadros-Inostroza A, Fernie AR, Willmitzner L y Czosnek H (2013). Involvement of hexose transporter gene LeHT1 and of sugars in resistance of tomato yellow leaf curl virus. *Molecular Plant* 6 (5): 1707-1710.
- Schaarschmidt S, Roitsch T y Hause B (2006) Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of experimental botany* 57:4015–23.
- Schaller A y Stintzi A (2008). Jasmonate biosynthesis and signaling for induced plant defence against herbivory. En: *Induced plant resistance to herbivory*. Schaller A (Ed.). Springer Science, pp 349.
- Schwachtje J y Baldwin IT (2008). Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiology* 146: 845-851.

- Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Donngen JT, Schittko U y Baldwin IT (2006). SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *PNAS* 103 (34): 12935-12940.
- Strum A (1999). Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121: 1-7.
- Sugden C, Donaghy PG, Halford NG y Hardie G (1999). Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaril-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiology* 120: 257-274.
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M y Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115.
- Volkert K, Debast S, Voll LM, Voll H, Schießl I, Hofmann J, Schneider S y Börnke F (2014). Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate syntase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 68 (18): 5217-5229.

CAPITULO III

Analizar el efecto del estrés causado por herbivoría sobre la expresión de genes de síntesis y degradación de sacarosa y el contenido de carbohidratos solubles en tejidos fotosintéticos y heterotróficos en plantas con la simbiosis micorrícica establecida.

RESUMEN

La sacarosa juega un papel principal en el metabolismo primario de las plantas; es uno de los principales carbohidratos producto de la fotosíntesis, y además, la forma en la que la mayoría de las especies vegetales transportan el carbono desde los tejidos fotosintéticos, hasta el resto de sus tejidos. La presencia de la simbiosis micorrícica con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) biotrofos obligados que forman simbiosis mutualistas con gran parte de los taxa vegetales, modifica los patrones de distribución y las cantidades de ácido jasmónico (AJ), un regulador vegetal clave en la respuesta de defensa ante el ataque de insectos herbívoros. Así mismo, evidencia científica apunta que existe una modificación del metabolismo primario como una respuesta al la presencia de insectos herbívoros. Por el impacto de la simbiosis micorrícica sobre elementos clave implicados en la respuesta de defensa ante herbívoros, en el presente trabajo se analizó la influencia de la presencia de la simbiosis micorrícica establecida con *Funneliformis mosseae* (BEG12) y de larvas de *Spodoptora exigua*, sobre la expresión de genes del metabolismo de sacarosa por RT-PCR cuantitativa, y la distribución de azúcares solubles en tejidos foliares y radiculares de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). El impacto de la herbivoría sobre la simbiosis micorrícica se manifestó en un aumento en la frecuencia de la micorrización y abundancia de arbusculos en el sistema radicular. Para el análisis de la expresión de genes relacionados a la síntesis de sacarosa se escogieron los genes *spsA2* y *spsC*, y los genes SUS1 y SUS3 de sacarosa sintasa y de la invertasa LIN6, éstos últimos implicados en el catabolismo. Los genes *spsA2* y *spsC* mostraron modificaciones

tejido específicas que concuerdan con los patrones de expresión reportados en otros modelos vegetales. En cuanto a los genes *SUS1* y *SUS3*, la presencia de ambas interacciones causó el aumento de la expresión de estos en tejidos foliares y radiculares, ya sea en comparación a las a las plantas control, y/o a las plantas que habían sido sometidas a la interacción con *F. mosseae* o con *S. exigua* por separado. El gen de la invertasa LIN6 redujo su expresión en tejidos foliares cuando las plantas fueron sujetas a herbivoría, aparentemente independiente de la presencia de la simbiosis micorrícica; pero en raíces, la presencia de la simbiosis micorrícica amortiguó el descenso de la expresión observada en plantas que habían sido sometidas solo a herbivoría. En cuanto a la distribución de azúcares, se observó que la herbivoría causa un descenso de la concentración de la mayoría de las fracciones de carbohidratos solubles cuantificadas tanto en presencia como en ausencia de la simbiosis micorrícica, con excepción de la sacarosa, cuya concentración aumentó en plantas sometidas a la interacción con HMAs y herbivoría, respecto a la cuantificada en plantas control y plantas que fueron únicamente sometidas a herbivoría.

INTRODUCCIÓN

Se ha reportado que el establecimiento de relaciones mutualistas con HMAs, conduce a la activación de mecanismos de defensa como la síntesis de AJ, y de su precursor, el Jasmonano-isoleucina (JA-Ile). Se ha especulado que este efecto esta asociado al control de la colonización micorrícica por parte de la planta, y además con el aumento del umbral de resistencia/tolerancia que presentan las plantas ante agentes adversos de origen biótico (Hause et al., 2002; Herrera-Medina et al., 2008). Particularmente, las plantas son capaces de modificar distintos aspectos del metabolismo primario ante la presencia de insectos herbívoros. Por un lado se han descrito mecanismos moleculares que están asociados a la movilización de carbohidratos desde los sitios de síntesis, las hojas, hasta las raíces, con la finalidad de sustentar las demandas energéticas que supone en recrecimiento una vez que el ataque por insectos defoliadoras haya cesado (Schwachtje et al., 2006). Sin embargo mecanismos más recientes ha propuesto que la herbivoría conduce a una reducción de la concentración de carbohidratos en los tejidos, y que dicha reducción esta en relación con el aumento de las cantidades de compuestos de defensa (Machado et al., 2013).

Por su parte, el establecimiento de la simbiosis micorrícica, tiene repercusión sobre el metabolismo del carbono de las plantas, ya que los HMAs, son biotrofos obligados de metabolismo heterotrófico y se estima que las plantas destinan de un 4 a un 20 % del total de los fotoasimilados que producen al mantenimiento del hongo (Smith y Read, 2008). Debido a que este disacárido es uno de los principales productos de la fotosíntesis, y por sus características fisicoquímicas es la forma más usual mediante la cual las plantas transportan el carbono fijado en tejidos fotosintéticos, hacia tejidos de metabolismo heterotrófico, en el presente trabajo se planteó el estudio de las posibles modificaciones en la expresión de genes implicados en la síntesis y degradación de sacarosa, así como de distintas fracciones de carbohidratos solubles, en plantas de tomate bajo influencia de la interacción con larvas de *Spodoptera exigua*, la presencia de la simbiosis micorrícica, y la combinación de ambas, en tejido foliar y radicular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Para analizar el efecto de la presencia de insectos herbívoros en plantas con la simbiosis micorrícica establecida, plántulas de tomate de la variedad Castelmart fueron trasplantadas después de 8 días de haber germinado a macetas de 400 mL que contenían una mezcla de Arena-Suelo-Vermiculita en una proporción 3:1:1 tinalizado durante una hora tres días consecutivos. Al momento del trasplante, la mitad de las plantas fueron inoculadas con el HMA *Funneliformis mosseae* (BEG 12), el cual fue aplicado en forma de suelo-inóculo proveniente macetas de propagación el cual constituyó el 10 % del volumen total del sustrato de las macetas en dónde se realizó el trasplante, mientras que el resto de las plantas no fueron inoculadas. Después de cinco semanas de que se realizó el trasplante, las plantas de cada una de las condiciones anteriormente descritas fueron divididas en dos grupos, eligiéndose uno de cada condición para inducir el ataque por insectos herbivoros, el cual consistió en colocar cinco larvas de *Spodoptera exigua* en los tejidos foliares por planta. Con la finalidad de obtener plantas que no habían sido sometidas a herbivoría en tejido foliar sin la simbiosis micorrícica establecida, y plantas con la simbiosis micorrícica establecida, con y sin la presencia de larvas de *S. exigua* en las hojas. De esta manera, el experimento constó de cuatro tratamientos.

Con el propósito de propiciar que las larvas se alimentaran de una manera constante, se seleccionaron individuos de estadios larvarios tempranos y una vez que se completaron dos semanas después de que se colocaron en los tejidos foliares, se retiraron y se cosecharon tejidos foliares y radiculares, los cuales se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a – 80 °C hasta ser procesados para realizar análisis de expresión de genes y cuantificación de azúcares solubles. Se determinó el peso fresco y la biomasa de parte aérea y raíz, además se tomaron muestras representativas de raíz para realizar la estimación de la colonización micorrícica.

Las plantas que habían sido tratadas de acuerdo a lo anteriormente descrito, desde el trasplante de las plántulas hasta la cosecha, fueron mantenidas en invernadero bajo un régimen de fertilización que consistió en la aplicación de la solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1966) al 25 %, y con agua corriente a intervalos regulares, cuando fuera necesario.

2. Estimación de la colonización micorrícica y determinación de masa seca

La cuantificación de la colonización micorrícica en los tratamientos que fueron inoculados con el hongo *F. mosseae*, así como la biomasa de las plantas de los tratamientos fue realizada de acuerdo a la metodología a la que se hace referencia en el capítulo I.

3. Análisis de expresión de genes

Se obtuvieron extractos de RNA, a partir de tejido foliar y radicular macerado con N₂ líquido de cada uno de los cuatro tratamientos usando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research) de acuerdo a la instrucciones del fabricante; 2 µL de los extractos de RNA fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1 % con la finalidad de visualizar su integridad, de igual manera, su pureza y cantidad fueron evaluadas por espectrofotometría (NanoDrop, 1000).

La retrotranscripción de se realizó a partir de 1 µg de RNA de cada uno de los extractos (cDNA Synthesis Kit TAKARA) y una vez que se obtuvo el cDNA, su calidad y eficiencia fue evaluada por la amplificación del factor elongación-1 alfa de tomate (*SIEF-1α*) mediante PCR semicuantitativa. Una vez evaluados, los productos de la retrotranscripción se usaron para realizar los análisis de PCR en tiempo real (SYBR® Premix Ex Taq™ TAKARA).

La expresión relativa de genes se realizó en tejidos foliares y radiculares de los genes *spsA2* y *spsC*, implicados en la biosíntesis de sacarosa, y los genes *SUS1* y *SUS3* correspondientes a dos formas distintas de sacarosa sintasa y el gen *Lin6* de una invertasa, éstos últimos implicados en la degradación de sacarosa. La expresión relativa de todos los genes evaluados en tejido foliar y radicular fue reactivizada a la expresión del gen *SIEF-1 alpha*. Los resultados

obtenidos fueron referidos en aumento o disminución de la expresión relativa detectada de cada uno de los genes en las plantas no inoculadas con *F. mosseae* y que no habían sido sometidas a herbivoría, que constituyeron las plantas control.

Para el análisis de la expresión relativa de los genes *spsA2* y *spsC*, se diseñaron primers usando el software Primer3 (Untergrasser *et al.*, 2012; Koressaar y Remm, 2007), cuya especificidad fue evaluada por PCR punto final y tiempo real. Las parejas de primers usadas para los genes *SUS1*, *SUS3* y *SIEF-1 α* fueron idénticas a las reportadas por García Rodríguez *et al.* (2007), Goren *et al.* (2011), y Rotenberg *et al.* (2006) respectivamente (Cuadro 1).

4. Cuantificación de azúcares solubles

La cuantificación azúcares solubles totales, fructosa total, sacarosa y azúcares reductores al igual que la determinación de la masa seca fue realizada de acuerdo a lo que se describe en el capítulo I.

5. Análisis estadísticos

Las plantas de los tratamientos anteriormente descritos se acomodaron de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar. Los análisis estadísticos fueron realizados a partir de tres replicas biológicas, con excepción de la biomasa, que contó con cinco replicas biológicas. Los datos obtenidos de en cada caso fueron procesados por análisis de varianza (ANOVA) simple y las medias que presentaron diferencia estadística significativa se compararon usando la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fisher con $p < 0.1$ para los análisis de expresión y la cuantificación de carbohidratos solubles, y $p < 0.05$ para el análisis de biomasa.

RESULTADOS

1. El estrés causado por la herbivoría, causa el aumento de algunos parámetros de la colonización micorrícica

La herbivoría, en plantas con la simbiosis micorrícica establecida, causó una promoción del aumento de la frecuencia de la micorrización (F %) y de la abundancia de arbusculos (A %) en el sistema radical, en comparación a los niveles detectados de estos parámetros en plantas que habían sido solamente sometidas a la interacción con *F. mosseae* (Figura 11). En ambos casos, la abundancia de estructuras intraradicales en los fragmentos observados fue alta, particularmente la abundancia de arbusculos (a %), lo que sugiere que las zonas de la raíz colonizada tanto en las plantas que habían sido solo inoculadas con *F. mosseae*, y las plantas que fueron sujetas a las dos interacciones consideradas en este estudio, existía una alta actividad que puede ser interpretada por la abundancia de arbusculos en las zonas colonizadas (Figura 11).

Estos resultados pueden sugerir que existe una modificación de la distribución del carbono en plantas sometidas a herbivoría que favorece el desarrollo de la simbiosis micorrícica.

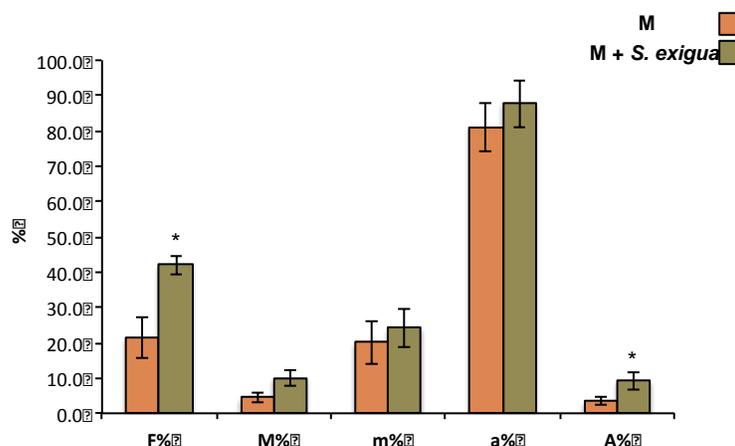


Figura 11. Colonización micorrícica de plantas inoculadas con *F. mosseae* y efecto de la herbivoría. *M* y *M + S. exigua*, representan los tratamientos inoculados con *F. mosseae*, en donde *M + S. exigua*, sufrió el ataque por larvas de *S. exigua* durante dos semanas antes de la cosecha. Los parámetros de la colonización micorrícica fueron calculados de acuerdo a Trouvelot *et al.* (1963) en raíces después de 7 semanas de la inoculación con *F. mosseae*. En las gráficas, las barras de error representan el error estándar de la media, los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos de acuerdo a la Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher ($p < 0.1$).

2. Acumulación de biomasa

En lo que corresponde a la acumulación de biomasa (masa seca), no se observaron cambios significativos de esta en la parte aérea de las plantas de los cuatro tratamientos evaluados, a pesar de que las plantas que sufrieron herbivoría, mostraron pérdida de peso fresco, el cual fue poco evidente en las plantas que sufrieron la presencia de ambas interacciones (Figura 12A y 12B). Por el contrario, una acumulación de biomasa en la raíz de las plantas bajo influencia de la simbiosis micorrícica fue detectada. Sin embargo, a pesar de que se detectó un aumento de la frecuencia de la micorrización en el tejido radicular de plantas micorrizadas que habían sufrido herbivoría, la biomasa en estas codicines no sufrió cambios significativos a la encontrada en plantas control (figura Z B). La proporción de biomasa entre raíz y parte aérea fue significativamente más elevada en las plantas de los tratamientos que incluyeron la presencia de la simbiosis micorrícica, solo en comparación con las plantas control. Estos resultados indican que la micorriza de tipo arbuscular tiene un efecto sobre la acumulación de biomasa en raíces, mientras que la presencia de insectos herbívoros no modifica los patrones de acumulación de biomasa en plantas en tejidos ni la distribución de esta en plantas.

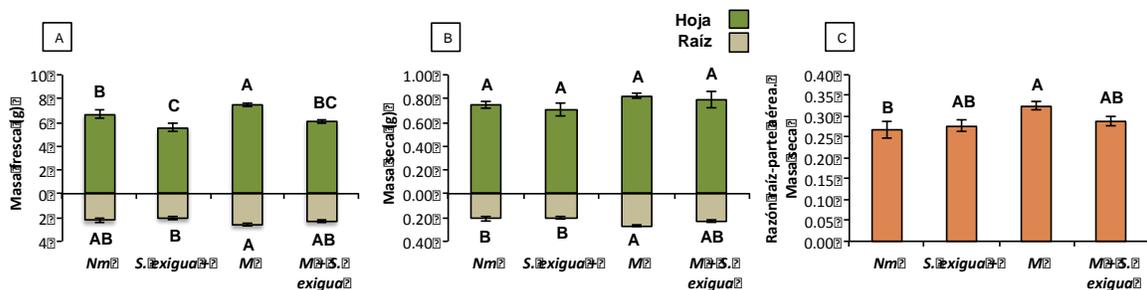


Figura 12. Efecto de la herbivoría y la simbiosis micorrícica sobre el peso fresco y biomasa de plantas de tomate. (A) Masa fresca y (B) masa seca expresada en gramos de las plantas de tomate y (C) corresponde a la relación raíz:parte aérea de la masa seca de plantas de 8 semanas después de la germinación. *M* y *M + S. exigua*, representan los tratamientos inoculados con *F. mosseae*. Los tratamientos *S. exigua* + y *M + S. exigua*, son los tratamientos en los que se indujo la herbivoría durante dos semanas, 5 semanas después de la inoculación de *F. mosseae* para el caso de *M + S. exigua*. *Nm* son las plantas control. Las barras de error en las gráficas representan el error estándar de la media, los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos de a la Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher ($p < 0.05$).

3. La micorriza arbuscular y el estrés causado por la presencia de *Spodoptera exigua* modifican la expresión de genes de síntesis de sacarosa de manera tejido específica

La expresión relativa del gen *spsA2*, no presentó modificaciones detectables en tejido foliar por influencia de la interacción con el HMA, el herbívoro o la combinación de ambas interacciones en comparación con la expresión relativa detectada en las plantas control. Por otro lado, a pesar de que se observó que la colonización por *F. mosseae* en las raíces no causó un efecto en la modificación de la expresión relativa de *spsA2* en estos tejidos, la presencia de larvas de *S. exigua*, modificó la expresión en plantas tanto ausencia como en presencia de la simbiosis micorrícica respecto al nivel detectado en las plantas control, observándose en el primer caso una reducción de la expresión hasta niveles no detectables de *spsA2* en raíces, pero en el segundo caso, la presencia de ambas interacciones ocasionó una sobreexpresión de este gen (Figura 13A).

En los capítulos anteriores, se ha puesto de manifiesto que la interacción con el HMA y con larvas de *S. exigua* en plantas de tomate tiene un efecto significativo en la modificación de la expresión del gen *spsC* en el tejido foliar, con un particular aumento de esta en las plantas cuyas raíces habían sido inoculadas con *F. mosseae* al compararse con las plantas control. Mientras que la expresión en raíces de *spsC*, se mantuvo invariable estadísticamente entre los cuatro tratamientos (Figura 13B).

De acuerdo a los patrones de expresión reportados para estos genes en otros modelos vegetales, Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que existe la ruta de biosíntesis de sacarosa responde ante los estímulos causados por la presencia de HMAs y herbívoros, de manera tejido específica.

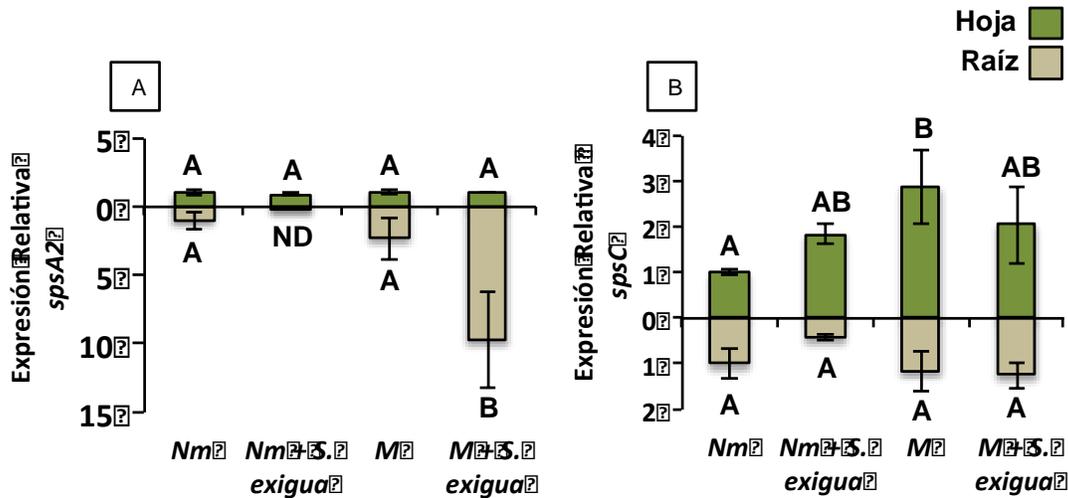


Figura 13. Efecto de la herbivoría y la colonización micorrícica en la expresión relativa de genes de biosíntesis de sacarosa en plantas de tomate. Niveles de expresión relativa de los genes *spsA2* (A) y *spsC* (B) en tejido foliar y radicular. *M* y *M + S. exigua*, representan los tratamientos inoculados con *F. mosseae*. Los tratamientos *S. exigua* + y *M + S. exigua*, son los tratamientos en los que se indujo la herbivoría durante dos semanas, 5 semanas después de la inoculación de *F. mosseae* para el caso de *M + S. exigua*. *Nm* son las plantas control. Los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos de acuerdo la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DSM) de Fisher ($p < 0.1$) y las barras de error representan el error está.

4. Modificación de los niveles de expresión de genes de SUS y de la invertasa LIN6

En plantas en las cuales se estableció la interacción con *F. mosseae* en raíces, y con larvas de *S. exigua* en la parte aérea, se observó un aumento de la expresión de SUS1 en tejidos foliares en comparación con las plantas control; el nivel de expresión relativa en las plantas sometidas a ambas interacciones de SUS1 fue significativamente mayor en raíz que el nivel detectado en plantas fueron sujetas solo a herbivoría, con niveles similares a los de plantas control y las que solo fueron colonizadas por el HMA (Figura 14A).

Bajo las mismas condiciones, el gen SUS3 aumento su expresión relativa cuando se comparó con el resto de los tratamientos, sin embargo, se observó que tanto la herbivoría y como la simbiosis micorrícica por separado, causaron una disminución de la cuantificación de transcritos en tejidos radicales en comparación con las plantas control. (Figura 14B).

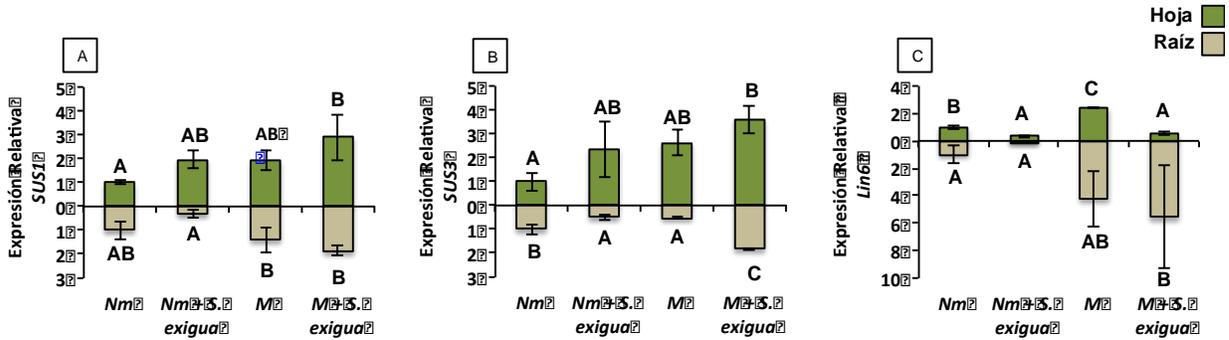


Figura 14. Efecto de la herbivoría y la colonización micorrícica en la expresión relativa de genes del catabolismo de sacarosa en plantas de tomate. Niveles de expresión relativa de los genes *SUS1* (A) y *SUS3* (B) de sacarosa sintasa y (C) de la invertasa LIN6 en tejido foliar y radicular. *M* y *M + S. exigua*, representan los tratamientos inoculados con *F. mosseae*. Los tratamientos *S. exigua* + y *M + S. exigua*, son los tratamientos en los que se indujo la herbivoría durante dos semanas, 5 semanas después de la inoculación de *F. mosseae* para el caso de *M + S. exigua*. *Nm* son las plantas control. Los asteriscos indican diferencia estadística significativa de acuerdo a la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DSM) de Fisher ($p < 0.1$) y las barras de error representan el error está.

El gen *Lin6* de la invertasa apoplástica, mostró reducción de la expresión en tejido foliar en plantas que habían sido sometidas a herbivoría, independientemente si se trataba de plantas que tenían la colonización micorrícica establecida o no (Figura 14C). Sin embargo, un aumento significativo de la expresión fue detectado en el tejido foliar de plantas cuyas raíces estaban colonizadas por *F. mosseae*, en comparación al resto de los tratamientos, y en raíces de plantas que habían sido sometidas a ambas interacciones, la expresión de *Lin6* fue significativamente mayor a la detectada en las plantas control y en las plantas que habían sido expuestas a herbivoría (Figura 14C).

5. Cuantificación de azúcares solubles y acumulación de biomasa

En cuanto a la cuantificación de azúcares solubles en tejidos foliares y radicales, se detectó un descenso de las fracciones correspondientes a fructosa total, azúcares reductores, y en la concentración de azúcares solubles totales en plantas que habían sido sometidas a herbivoría, independientemente si sus raíces presentaban colonización por *F. mosseae* o no. En raíces, no se detectaron cambios significativos en las fracciones correspondientes a fructosa y a azúcares reductores, pero la concentración de azúcares solubles totales cuantificada en plantas micorrizadas que habían sufrido herbivoría, fue significativamente mayor a la encontrada en plantas que solo sufrieron herbivoría (Figuras 15A 15B 15D).

Estas modificaciones de la distribución de azúcares solubles, repercutió en la proporción de éstos en los tejidos evaluados, encontrándose que las plantas que sufrieron herbivoría contienen una mayor proporción de estas fracciones de azúcares no estructurales en raíces en comparación con las plantas control y las plantas que cuyas raíces habían sido colonizadas por *F. mosseae* (Figuras 15E-F y 15H). Particularmente por efecto de la presencia de la simbiosis micorrícica, la proporción raíz-tejido foliar se redujo en comparación con la encontrada en plantas control, lo que se asoció al metabolismo heterotrófico del hongo, sin embargo, en presencia de la herbivoría en plantas con la simbiosis micorrícica establecida, esta proporción aumentó significativamente respecto a la calculada en los demás tratamientos (Figura 15D y 15H).

En lo que respecta a la fracción correspondiente a sacarosa, en plantas cuyas raíces habían sido colonizadas por *F. mosseae*, se detectó un aumento de la cantidad de sacarosa en tejidos foliares, en presencia y en ausencia de las larvas fitófagas, que en ambos casos fue significativamente mayor a la detectada en el resto de los tratamientos; observándose también que entre plantas control y plantas que habían sufrido el ataque de *S. exigua*, la concentración de sacarosa en tejido foliar no se modifica significativamente (Figura 15C).

El aumento de sacarosa en tejido foliar bajo estas condiciones puede sugerir que la simbiosis micorrícica ejerce control sobre la síntesis de sacarosa con la finalidad de aumentar la fuerza del tejido fuente. En raíces, se observó que las plantas del tratamiento que incluyó la interacción con el HMA y con larvas de *S. exigua*, presentaban una concentración más elevada de sacarosa que las plantas control (Figura 15C). De manera particular, solo se observó un aumento la modificación de la proporción raíz-tejido foliar de sacarosa en las plantas que fueron sometidas a herbivoría que fue significativamente mayor a la calculada para el resto de los tratamientos evaluados (Figura 15G).

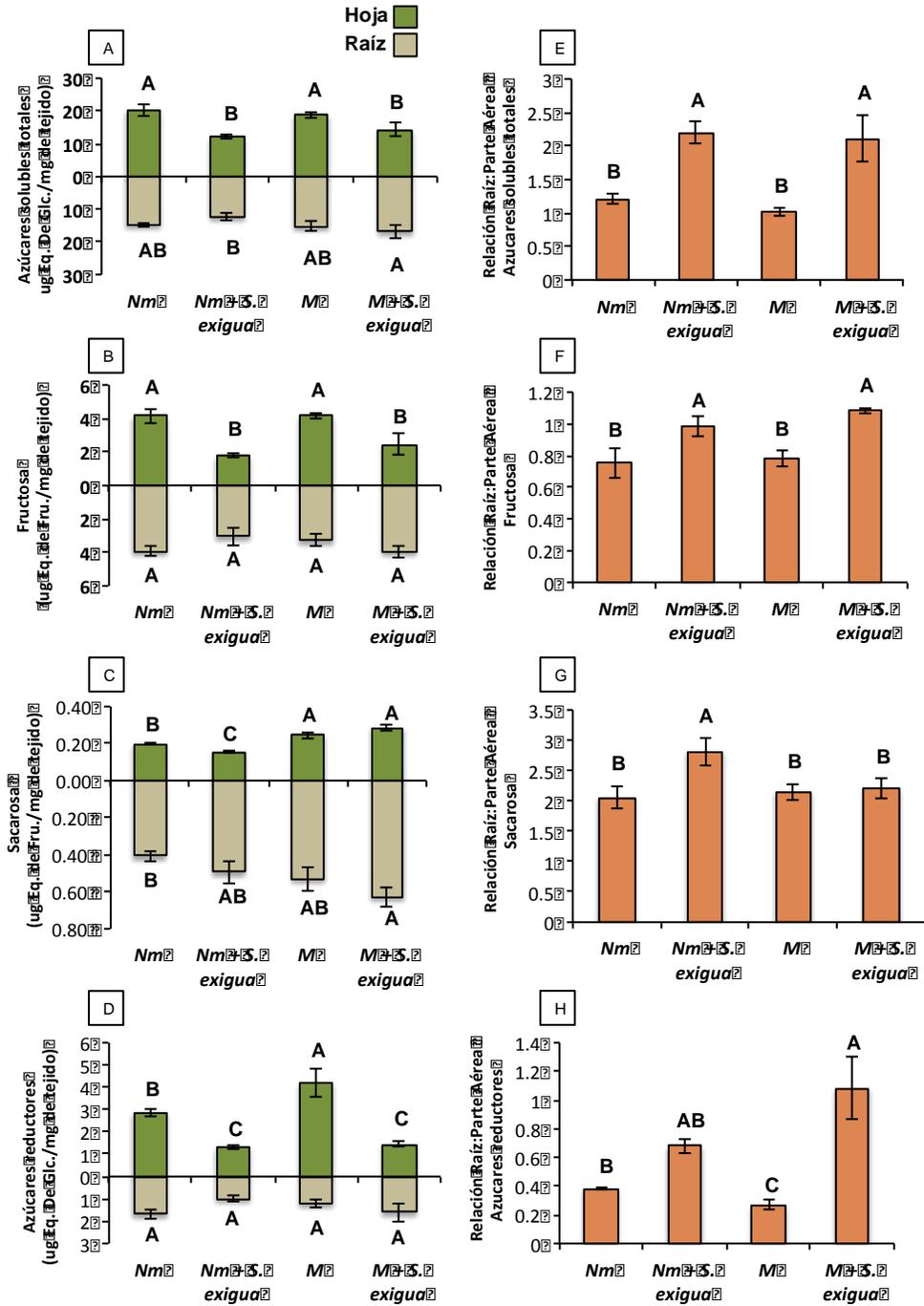


Figura 15. Efecto de la colonización micorrícica y la herbivoría en la concentración de azúcares solubles en plantas de tomate. Concentración de azúcares solubles totales (A), fructosa (B), sacarosa (C) y azúcares reductores (D), así como la relación raíz:parte aérea para cada fracción de azúcares cuantificada (E, F, G y H, respectivamente). *M* y *M + S. exigua*, representan los tratamientos inoculados con *F. mosseae*. Los tratamientos *S. exigua* + y *M + S. exigua*, son los tratamientos en los que se indujo la herbivoría durante dos semanas, 5 semanas después de la inoculación de *F. mosseae* para el caso de *M + S. exigua*. *Nm* son las plantas control. En las gráficas, las barras representan el error estándar de la media, los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre tratamientos de acuerdo a la Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher ($p < 0.1$).

DISCUSIÓN

Se analizaron los genes *spsA2* y *spsC*, ambos codifican isoformas distintas de sacarosa-fosfato sintasa (SPS), enzima clave de la ruta de síntesis de sacarosa, que se considera como el paso que ejerce el control sobre la canalización de los productos de las reacciones de fijación de carbono hacia la síntesis de sacarosa. Como se ha revelado en otros modelos vegetales, los genes C y A2 de *sps* son predominantes en tejidos fotosintéticos y en raíces respectivamente (Vokert *et al.*, 2014).

Bajo las condiciones evaluadas, la cantidad de transcritos del gen *spsC* en tejido radicular no sufrió cambios significativos bajo ninguna de las condiciones evaluadas (Figura 13B). De manera similar, pero en tejido foliar, la expresión relativa del gen *spsA2*, no sufrió modificaciones en ninguno de los tratamientos evaluados en comparación con el nivel detectado en las plantas control. Sin embargo bajo la influencia de la simbiosis micorrícica establecida con *F. mosseae*, la presencia de larvas de *S. exigua* en tejido foliar, y/o durante la combinación de la interacción con ambos organismos, se detectaron cambios de la expresión del gen *spsC* en tejido foliar, y del gen *spsA2* en tejido radicular. Esto sugiere que bajo en presencia del estrés causado por la presencia de insectos herbívoros en tejido foliar, y ante la por la influencia de la simbiosis micorrícica de tipo arbuscular, existen mecanismos que regulan de manera particular la expresión de los genes *sps*, con posibles efectos tejido-específicos, lo cual está asociado a la divergencia funcional que se ha descrito para estos genes en otras condiciones (Fittinghoff *et al.*, 2006; MacRae y Lunn, 2012).

Un efecto similar fue observado en los genes *SUS*, que codifican a sacarosa sintasa (SUS) una enzima que hidroliza sacarosa. Se ha observado que los genes *SUS* son de importante para el mantenimiento de la simbiosis. En estudios posteriores se ha asociado el aumento de la expresión de genes *SUS* al mantenimiento de las demandas metabólicas que implica la formación de estructuras intraradicales de los HMAs (García-Rodríguez *et al.*, 2007; Baier *et al.*, 2010). Por su parte en la asociación con herbívoros defoliadores, se ha sugerido

que uno de los mecanismos de tolerancia de las plantas es la movilización de recursos hacia los tejidos subterráneos que posteriormente son metabolizados para mantener el crecimiento una vez que el ataque haya cesado, relacionándose el aumento de la fuerza de tejido demanda por aumento de la actividad de invertasas ácidas más que de isoformas de SUS (Schwachtje et al., 2006). Sin embargo otros estudios han detectado cambios en la actividad enzimática de sacarosa sintasa con fluctuaciones temporales en tejidos foliares, tallo y raíces posteriores al ataque por insectos (Castrillón-Arbeláez et al., 2012). En las condiciones evaluadas, se puede observar que en presencia de insectos herbívoros, estimula la síntesis de genes de síntesis y degradación de sacarosa en el tejido foliar, lo cual podría tener relación con la modificación de los perfiles de metabolitos secundarios que estén asociados a la resistencia en contra de insectos, como se observó en plantas transgénicas de *Populus* que sobre expresaban un gen *sps* de maíz (Hjältén et al., 2007). Estas modificaciones pueden estar relacionadas también con la modificación de otros aspectos del metabolismo primario como la síntesis de polímeros como almidón (Borja-Fernández et al., 2004), celulosa y callosa (Amor et al., 1995) y en la distribución y ciclación de carbohidratos (Nguyen-Quoc y Foyer, 2001). En hojas, se detectó la tendencia a la sobreexpresión del gen *spsC*, que fue significativamente superior a los niveles detectados en las plantas control, cuando las raíces de las plantas de tomate fueron colonizadas por *F. mosseae* en presencia y en ausencia de las larvas de *S. exigua*. Como se mencionó anteriormente, el gen *spsC* codifica una de las isoformas de SPS predominantes en tejidos fotosintéticos. Su función se ha asociado a la síntesis de sacarosa y al movimiento del almidón almacenado de forma transitoria en tabaco y *Arabidopsis thaliana* (Volkert et al., 2014). La modificación de la expresión del gen *spsC*, se relacionó con el aumento de la cantidad de sacarosa en plantas con la simbiosis micorrízica establecida, efecto que se sugiere como resultado del aumento de la fuerza del tejido fuente, con la finalidad de generar sacarosa suficiente para ser transportada hacia las raíces, que será utilizada para mantener la demanda extra de fotoasimilados en los tejidos radiculares para el mantenimiento de la simbiosis.

El gen *Lin6*, que codifica una invertasa cuya acción catalítica es la hidrólisis de sacarosa generado a partir de esta fructosa y glucosa. *Lin6* es uno de los cuatro genes de invertasas que está implicado en la movilización de carbohidratos hacia tejidos demanda a través de rutas apoplásticas (Godt y Roitsch, 1997). Se detectó una reducción de la expresión de *Lin6* en tejido foliar en los dos tratamientos sometidos a herbivoría (Figuras 14C y 15D). En plantas, la respuesta de defensa desencadena entre otras cosas, la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), las cuales están asociadas con respuestas primarias de defensa (Kandoth et al., 2007) y que se sabe tienen la capacidad de estimular la expresión de *Lin6* ante estímulos como por heridas, la presencia de compuestos producidos por el hongo *Fusarium oxysporum lycopersici*, así como ante condiciones de estrés salino (Hyun et al., 2009). Actualmente se considera que *Lin6* es capaz de modificar su expresión ante numerosos estímulos endógenos y externos, por lo que se considera como un punto convergente de numerosas rutas de señalización (Proels y Roitsch, 2009), indicando que bajo las condiciones evaluadas, otros mecanismos de regulación pueden estar ejerciendo control sobre la expresión de *Lin6*, distintos a aquellos controlados por MAPKs, y que podrían tener relación con moléculas señalizadores como AJ, y ácido absísico, que se sabe aumentan su expresión (Hyun et al., 2009; Kandoth et al., 2007; Proels y Roitsch, 2009). Estas diferencias en la regulación pueden tener relación con los insectos que estén implicados en la interacción y con sus hábitos de alimentación.

En plantas de tomate con la simbiosis micorrícica establecida existen reportes en donde se ha observado aumento de los niveles de expresión de los genes *Lin6* (García-Rodríguez et al., 2007; Schaarschmidt et al., 2006; Tejeda-Sartorius et al., 2008). Dicho efecto se ha relacionado con la mayor actividad metabólica de los tejidos radiculares que albergan las estructuras intraradicales del hongo con la finalidad de aumentar el suministro de carbohidratos por aumento de la actividad catalítica de invertasas, que se realiza de forma sutil, para evitar desencadenar otros mecanismos de defensa activados por hexosas como se sugiere durante algunas condiciones de estrés que actúan aumentando el nivel de

la transcripción de *Lin6* (Schaarschmidt et al., 2006). En este estudio, el aumento de las cantidades de azúcares reductores, en tejidos foliares que fueron detectadas en plantas con la simbiosis micorrícica establecida, puede estar relacionada con el aumento de la actividad de *Lin6* en tejidos foliares, lo cual puede indicar que bajo esta condición existe un aumento del flujo de sacarosa desde los tejidos fotosintéticos, que se relaciona también, con el aumento en el contenido de sacarosa y con el aumento del gen *spsC* en tejidos foliares.

El aumento significativo de la expresión de *Lin6* en las raíces de plantas que sufrieron herbivoría en presencia de la simbiosis micorrícica, con respecto a las plantas control puede ser un efecto del incremento de la frecuencia de colonización y de la abundancia de arbusculos en el sistema radicular bajo esta condición. La promoción de la colonización de los HMAs en plantas que han sufrido herbivoría ha sido documentada (Kula et al., 2005) mientras que en otros casos se ha observado un efecto negativo (Bennett et al., 2013; Gange et al., 2002). Sin embargo se ha sugerido que la variabilidad de los niveles de colonización están relacionados con las especies que se encuentren formando la asociación, ya que se conoce que las plantas toleran de manera distinta la presencia de herbívoros en los tejidos de la parte aérea, de acuerdo a la especie fúngica con la que se ha establecido la simbiosis micorrícica y de igual manera, la especialización del insecto y el modo de alimentación juegan un papel importante sobre el efecto de la herbivoría en plantas colonizada por HMAs (Bennett y Bever 2007; Koricheva et al., 2009).

En raíces de plantas que sufrieron herbivoría, pero que no fueron inoculadas con HMAs, se observó una reducción significativa de los genes *spsA2* y *SUS3* en tejidos radiculares, lo cual puede tener posibles repercusiones en la actividad de los tejidos radiculares en la síntesis y degradación de sacarosa, ya que estos dos genes han sido caracterizados como los predominantes en estos tejidos en *A. thaliana* y tomate respectivamente (Volkert et al., 2014; Goren et al. 2011), lo cual podría ser la causa del aumento de la proporción de este disacárido en los tejidos radiculares de las plantas sometidas a herbivoría respecto a la cantidad cuantificada en tejidos foliares (Figura 15C). Mientras que en presencia

de la simbiosis micorrícica, este efecto se contrarresta, ya que se detectan aumentos de la expresión de genes de biosíntesis y degradación de sacarosa en estos tejidos y la proporción de sacarosa entre tejido radicular y foliar es igual estadísticamente a la encontrada en las plantas control, lo que sugiere que la simbiosis micorrícica estimula el metabolismo de sacarosa en tejido radicular, mientras que la herbivoría lo reprime.

En plantas bajo estrés por herbivoría se ha reportado la disminución de la concentración de carbohidratos no estructurales e insolubles en tejidos foliares y radiculares, lo cual se asoció a la síntesis de compuestos de defensa (Machado et al., 2013). Este resultado coincide parcialmente con lo observado en estrés trabajo, e indica que la reducción de la concentración de las fracciones de carbohidratos solubles en tejido foliar en presencia de larvas de *S. exigua*, independientemente de la presencia de la simbiosis micorrícica, se canalizan los carbohidratos hacia la síntesis compuestos de defensa de manera local, y suprimen parcialmente las transporte de sacarosa, evidenciada por la reducción de la expresión de Lin6.

En cuanto a la biomasa a cumulada en los tejidos de la parte aérea, no se observaron cambios estadísticamente significativos entre los cuatro tratamientos evaluados, a pesar de que en las plantas que sufrieron el ataque de *S. exigua* se observó una disminución del peso fresco, por la pérdida de tejido foliar por los hábitos alimenticios de las larvas. De igual manera, cambios sutiles en la pérdida de peso fresco de las plantas cuyas raíces fueron colonizadas por *F. mosseae* y que se sometieron a herbivoría fueron detectados, sin embargo estos no resultaron ser estadísticamente distintos cuando se compararon con los obtenidos de las plantas control. En raíz, por su parte, la presencia de la simbiosis micorrícica, pero en ausencia de herbivoría, resultó en el aumento del peso fresco, y ocasionó también aumento de biomasa en raíz, así como la modificación de la proporción raíz-parte aérea de las plantas que fueron sujetas a esta condición. En las plantas que sufrieron ambas interacciones, a pesar de que se cuantificaron niveles mayores de frecuencia de la micorrización en el sistema radicular, no se detectaron cambios en la biomasa de las raíces respecto al control. El efecto en la

acumulación de biomas tuvo poca relación con las cantidades de azúcares solubles detectados, ya que de estos, solo diferencias sutiles fueron detectadas en la fracción correspondiente a sacarosa y en los azúcares solubles totales cuantificados en tejido radicular, ni con las proporciones raíz-tejido foliar de cada una de las fracciones, por lo que las fracciones de azúcares insolubles merecen ser estudiadas con la finalidad de generar un panorama más amplio sobre las repercusiones de la modificación del metabolismo de sacarosa bajo estas condiciones. Se sigue que otras rutas implicadas en la fijación de carbono están bajo regulación ya que no se observaron detrimentos en la acumulación de biomasa bajo ninguna de los tratamientos evaluados comparados con el control.

CONCLUSIONES

Se observó que la respuesta en la modificación de la expresión de los genes *sus* y *SUS* esta asociada a la divergencia funcional, indicando que en tejidos foliares y radiculares, existen distintas isoformas que controlan el metabolismo de sacarosa. Así mismo, la reducción de la expresión de los genes *sps* y *SUS* predominantes en raíces, fue un efecto del estrés causado por la presencia de larvas defoliadoras, lo cual favoreció el aumento de la proporción de sacarosa contenida en los tejidos radiculares. Bajo el estrés por herbivoría, la presencia de la simbiosis micorrícica ayudó a contrarrestar este efecto, sin embargo análisis posteriores deben de ser realizados para asociar este efecto al incremento de la demanda de carbohidratos por la simbiosis micorrícica y su relación con la defensa ante el ataque de herbívoros, ya sea en la movilización de fotoasimilados, o en la síntesis de compuestos de defensa.

La presencia de la simbiosis micorrícica, aumentó la cantidad de sacarosa en tejidos foliares, indicando que se estimula la síntesis de carbohidratos destinados al transporte por el aumento de los requerimiento de carbono de las raíces por el establecimiento de la relación mutualista con el hongo.

En hojas, la estimulación de los genes de *sps* y *SUS*, implican la existencia de una demanda energética adicional que requiere la degradación de sacarosa en tejidos autotróficos para compensar el aumento en la síntesis de carbohidratos en plantas con la simbiosis micorrícica establecida, pero por otro lado, en plantas que sufrieron herbivoría, para la canalización de carbohidratos hacia la síntesis de compuestos de defensa, que particularmente bajo esta condición, se sugiere una reducción parcial del flujo de sacarosa por vías apoplásticas. En los tratamientos evaluados, no se desestima que también este existiendo repercusión en las rutas de síntesis y degradación de otras formas de carbohidratos insolubles como almidón.

LITERATURA CONSULTADA

- Amor Y, Haigler CA, Jhonson S, Wainscott M y Delmer DP (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. PNAS 92: 9353-9357.
- Castrillón-Arbeláez PA, Martínez-Gallardo N, Avilés Arnuat H, Tiessen A y Délano-Frier J (2012). Metabolic and enzymatic changes associated with carbon mobilization, utilization and replenishment triggered in grain amaranth (*Amaranthus cruentus*) in response to partial defoliation by mechanical injury or insect herbivory. BMC Plant biology 12: 163.
- Baier MC, Keck M, Gödde V, Niehaus K, Küster H y Hohnjec N (2010) Knockdown of the symbiotic sucrose synthase MtSucS1 affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. Plant physiology 152:1000–14.
- Bennett AE y Beber JD. (2007). Mycorrhizal species differentially alter plant growth and response to herbivory. Ecology 88 (1): 210-218.
- Bennett AE, Macrae AM, Moore BD, Caul S y Johnson SN (2013). Early Root Herbivory Impairs Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization and Shifts Defence Allocation in Establishing *Plantago lanceolata*. PLOS One 8 (6): e66053.
- Fittinghoff K, Laubinger S, Nixdorf M, Fackendahl P, Baumgardt R-L, Batschauer A y Hoecker U. (2006). Functional and expression analysis of *Arabidopsis* SPA genes during seedling photomorphogenesis and adult growth. The Plant Journal 47: 577-590.

- Gange AC, Bower E y Brown VK (2002). Differential effects of insect herbivory in arbuscular mycorrhizal colonization. *Oecologia* 131: 103-112.
- Kandoth PK, Ranf S, Pancholi SS, Jayanty S, Walla MD, Miller W, Howe GA, Lincoln DE y Stratmann JW. (2007). Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2 y LeMPK3 function in the systemin-mediated defence response against herbivorous insects. *PNAS* 104 (29): 12205-12210.
- Koressaar T y Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23(10): 1289-91.
- Koricheva J, Gange AC y Jones T (2009). Effects of mycorrhizal fungi on insect herbivores; a meta-analysis. *Ecology* 90 (8): 2088-2097.
- Kula AAR, HartnettDC y Wilson GWT (2005). Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant–herbivore interactions. *Ecol. Lett.* 8:61–69.
- García-Rodríguez S, Azcón-Aguilar C y Ferrol Nuria (2007). Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiologia Plantarum* 129: 737-746.
- Godt DE, Roitsch T (1997). Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertases isoenzymes of tomato suggest an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiology* 115: 273-282.
- Goren S, Huber SC y Granot D (2011). Comparison of a novel tomato sucrose synthase, SISUS4, with previously described SISUS isoforms reveals distinct sequence features and differential expression patterns in association with stem maturation. *Planta* 233:1011–23.

- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R y Strack D. (2002). Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* 130: 1213-1220.
- Hjältén J, Lindau A, Wennström A, Blomberg P, Witzell J, Hurry V y Ericson L (2007). Unintentional changes of defence traits in GM trees can influence plant-herbivore interactions. *Basic and Applied Ecology* 8: 434-443.
- Herrera-Medina MJ, Tamayo MI, Vierheilig Hocampo JA y García-Garrido JM (2008). The jasmonic acid signalling pathway restricts the development of the arbuscular mycorrhizal association in tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* 27: 221-230.
- Hewitt EJ (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, UK, pp 187-237.
- Hyun TK, Hoffmann A, Sinha AK, Roitsch T (2009) Tomato mitogen activated protein kinases regulate the expression of extracellular invertase Lin6 in response to stress related stimuli. *Funct Plant Biol* 36: 1088-1097
- MacRae E, y Lunn JE (2012). Photosynthetic sucrose biosynthesis: An evolutionary perspective. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol 34. Photosynthesis: Plastid biology, energy conversion and carbon assimilation. Eaton-Rye JJ, Tripathy BC y Sharkey T Eds. Springer.
- Machado RAR, Ferrieri AP, Robert CA, Glauser G, Kallenbach M, Baldwin IT y Erb M (2013). Leaf-herbivore attack reduces carbon reserves and regrowth from the roots via jasmonate and auxin signaling. *New Phytologist* 200: 1243-1246.

Nguyen-Quoc y Foyer C (2001). A role for 'futile cycles' involving invertases and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 52 (358): 881-889.

Proels RK y Roitsch T (2009). Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany* 60 (6): 1555-1567.

Rotenberg D, Thompson TS, German TL, Willis DK. (2006) Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *Journal of Virological Methods* 138: 49–59.

Schaarschmidt S, Roitsch T y Hause B (2006) Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of experimental botany* 57:4015–23.

Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U y Baldwin IT (2006). SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *PNAS* 103 (34): 12935-12940.

Smith S E, Read D J (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. Elsevier. Nueva York, USA.

Tejeda-Sartorius M, Martínez de la Vega O y Délano-Frier P (2008). Jasmonic acid influences mycorrhizal solonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiologia Plantarum* 133: 339-353.

Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M y Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115.

Volkert K, Debast S, Voll LM, Voll H, Schießl I, Hofmann J, Schneider S y Börnke F (2014). Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate syntase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 68 (18): 5217-5229.