

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**EL ESTRÉS HIDRICO ALTERA EL REPARTO
DE CARBONO EN TEJIDOS FUENTE Y
DEMANDA DE
PLANTAS DE JITOMATE
(*Lycopersicon esculentum*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

PRESENTA

TANIA ANGELICA RAMIREZ PALMA

TUTOR: DRA. SOBEIDA SANCHEZ NIETO



MÉXICO

DF.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE Dr. Omar H. Pantoja Ayala
VOCAL Dr. Salvador Uribe Carvajal
SECRETARIO Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
SUPLENTE Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
SUPLENTE Dr. Felipe Cruz García

Sitio donde se desarrollo el tema:
Laboratorio 114, Departamento de Bioquímica
Facultad de Química, UNAM

Asesor del Tema: _____
Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Sustentante: _____
Q.F.B. Tania Angélica Ramírez Palma

Comité tutorial:

Dr. Felipe Cruz García
Dr. Omar H. Pantoja Ayala



AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial:

A la Dr. Sobeida Sanchez Nieto mi más sincero agradecimiento por su paciencia, enseñanzas y apoyo durante mi formación académica y sobre todo por brindarme su amistad, por ser una gran mujer.

Al Dr. Felipe Cruz García por su apoyo, por todas sus observaciones, sugerencias y comentarios acerca de este trabajo.

Al Dr. Omar H. Pantoja Ayala por sus sugerencias y todas sus observaciones para mejorar este trabajo.

A todos los que de alguna manera intervinieron en la realización de este trabajo:

A la UNAM por ser mi casa y la fuente de mi formación universitaria.

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

Agradezco el apoyo económico recibido por parte del programa de becas para estudios de posgrado CONACYT (No. 185523) que sostuvo mi formación durante mis estudios de Maestría

El presente proyecto fue financiado por la Facultad de Química de la UNAM, PAIP 6290-12.

A la Dra. Rocío Cruz-Ortega por sus atinados comentarios durante la realización y escritura de la tesis. Además, porque el proyecto inicio como una rama a un trabajo desarrollado en su laboratorio, sobre los efectos del estrés abiótico en plantas.

A la Q.F.B. María Consuelo Enríquez Arredondo, se agradece el apoyo técnico, así como el apoyo moral y sobre todo su amistad durante toda la maestría.

Al MVZ Atonatiu Edmundo Gómez Martínez se le agradece su participación en la obtención de los anticuerpos contra el transportador de hexosas y de sacarosa de la membrana plasmática.

A la Q.A. Iralda Hernández López, por todo el trabajo experimental que realizó durante este proyecto, por su valiosa amistad y sobre todo por haberme apoyado en los momentos más difíciles de mi vida..., gracias Ira.

A mis compañeros de laboratorio Eric, Aida, Sonia, Victor, Naty, Silvia por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo y por hacer más divertida y agradable mi estancia en el laboratorio.

A mi familia que tanto quiero y que siempre tengo presente, especialmente a mis primos: Cheni, Vianey, Damaris, Pepe, Cruz, Reyna, Hura, Imer, Angel por ser mis hermanos, mis amigos y por quererme tanto, a mis sobrinos Quique, Thayli y Kevin por recordarme lo que es ser niño.

A Elvin por todo su apoyo, por su cariño, por impulsarme siempre a seguir adelante y por existir... Gracias.

A mis grandes amigas: Viri, Norma G, Norma E., Ethel, Bere por ser una parte muy importante de mi vida y por el gran cariño. A Ana Karina por las risas y los buenos momentos, a Clau por todo su cariño, apoyo incondicional, por estar a mi lado en los momentos más difíciles y por su ayuda muchas gracias. A Kenia por haber regresado y ser muy feliz, a Nini por recordarme siempre.

A mi familia por decisión, por que se que puedo contar con ellos siempre: Ariel, por el abrazo y el cariño, a Valtercito, por su peculiar sentido del humor y por apreciarme de verdad, a Jorge Ojeda (Rojo) por estar tan loquito y rojo, a Pirrol por escucharme siempre y por esos hermosos hijos que lo llevan a seguir adelante, a Alejandro (Pelos) por que se que siempre estará a mi lado, a Miguel (Ra) y a Orlando (Choco) por la fiesta, a Alberto (Mimos) por que es un buen manito, a Carlos (Chino) por ser mi hermano, a Richi por los buenos ratos y por el cariño, a Fernando (Palencia) por seguir luchando, a Sandra (Cosa) por su amor a la banda, a Mestas por sus ganas de ayudar siempre, y a todos los que me faltaron, los quiero de verdad, y espero verlos al final.



Esta tesis la dedico con muchísimo cariño a mi padre: Mario por quererme tanto, por las risas, por apoyarme siempre y por ser un gran ejemplo a seguir. A mi madre Adolfa, por escucharme siempre, por su apoyo y su cariño. A mis hermanitas hermosas Chayo, Azu y Jimena por la vida compartida y por ser mis hermanas; las adoro. A mi abuela Petra por los recuerdos pero sobre todo por haberme enseñado un mundo increíble y fantástico que vive en mi mente. A mi abuela Sadot, por enseñarme el sazón de la vida y por su sabiduría, abuela te recuerdo todos los días y a mi tío Juan por su valentía.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. RELACIÓN FUENTE-DEMANDA	3
1.2. METABOLISMO EN LOS TEJIDOS FUENTE	3
1.3. METABOLISMO EN LOS TEJIDOS DEMANDA	7
1.4. REGULACIÓN METABÓLICA POR AZÚCARES	10
1.5. TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS A DISTANCIA.....	12
1.5.1. CARGA DEL FLOEMA.....	13
1.5.2. DESCARGA DEL FLOEMA	14
1.6. TRANSPORTADORES DE CARBOHIDRATOS	15
1.6.1. TRANSPORTADOR DE HEXOSAS.....	16
1.6.2. TRANSPORTADOR DE SACAROSA.....	19
1.7. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE CARBOHIDRATOS	23
1.7.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.....	23
1.7.2. INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	24
1.7.3. REGULACIÓN POR ASOCIACIÓN CON MICORRIZAS	25
1.8. ESTRÉS EN PLANTAS.....	25
1.8.1. ESTRÉS HÍDRICO	26
1.8.2. PROTECCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CELULARES.....	27
1.9. METABOLISMO DE CARBONO DURANTE EL ESTRÉS.....	29
2. JUSTIFICACIÓN	31
2.1. HIPÓTESIS	32
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	32
2.3. OBJETIVOS PARTICULARES	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1. CRECIMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE DÉFICIT HÍDRICO	33
3.2. DETERMINACIÓN DE ACUMULACIÓN DE BIOMASA, LA TALLA DE PLANTA Y NÚMERO DE FOLÍOLOS.....	34
3.3. DETERMINACIÓN DE CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA, % DE HUMEDAD RELATIVA, TRANSPIRACIÓN.....	34
3.4. EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS	34
3.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCOSA, FRUCTOSA Y SACAROSA MEDIANTE UN MÉTODO ENZIMÁTICO.....	35
3.6. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MICROSOMAL.....	37
3.7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	38
3.8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DEL TRANSPORTADOR DE SACAROSA Y HEXOSAS MEDIANTE INMUNORÉPLICA TIPO WESTERN.....	38
4. RESULTADOS.....	42
4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA ESTABLECER EL ESTRÉS HÍDRICO EN LAS PLANTAS DE JITOMATE	42
4.2. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN EL FENOTIPO SOBRE LAS PLANTAS DE JITOMATE.....	45
4.2.1. NÚMERO DE FOLÍOLOS DE PLANTAS CONTROL Y CON DÉFICIT HÍDRICO	48
4.2.2. LONGITUD DE LOS TALLOS DE LAS PLANTAS CONTROL Y CON DÉFICIT HÍDRICO	49
4.2.3. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN EL PESO FRESCO Y PESO SECO DE LA PLANTA	50
4.3. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA, LA TRANSPIRACIÓN Y LA HUMEDAD RELATIVA DE LOS FOLÍOLOS	54
4.4. DETERMINACIÓN DE CONTENIDOS DE GLUCOSA, FRUCTOSA Y SACAROSA EN FOLÍOLOS	56
4.5. DETERMINACIÓN DE CONTENIDOS DE GLUCOSA, FRUCTOSA Y SACAROSA EN RAÍCES.....	58
4.6. DETERMINACIÓN DE CONTENIDOS DE ALMIDÓN EN FOLÍOLOS Y RAÍCES	60

4.7. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE SACAROSA Y HEXOSAS EN HOJAS MADURAS	62
4.8. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE SACAROSA Y HEXOSAS EN RAÍCES	66
5. DISCUSIÓN.....	70
5.1. EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL ESTRÉS HÍDRICO	70
5.2. ALTERACIONES EN EL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN LAS PLANTAS SUJETAS A ESTRÉS HÍDRICO.....	72
5.3. EL TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS DURANTE EL ESTRÉS HÍDRICO Y SU RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS.....	76
6. CONCLUSIONES	84
7. REFERENCIAS	85

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de síntesis de sacarosa y almidón en las hojas fuente	4
Figura 2. Posibles vías de movilización de almidón en un plastidio	7
Figura 3. Metabolismo de carbohidratos en las células demanda.....	8
Figura 4. Sistema de transporte de sacarosa en el floema	14
Figura 5. Caricaturas de la topología de los transportadores de carbohidratos de plantas	16
Figura 6. Estructura de una hoja compuesta	33
Figura 7. Curva estándar de glucosa	36
Figura 8. Caricatura del transportador de sacarosa de maíz y la localización de la secuencia que se uso para inmunizar a los conejos	39
Figura 9. Alineamiento parcial de la zona consenso de los transportadores de hexosas de plantas y péptido que se diseño para detectar al transportador de sacarosa de la membrana plasmática en maíz	41
Figura 10. Primer esquema para el establecimiento del estrés hídrico en plantas de jitomate	42
Figura 11. Efecto del estrés hídrico en el peso fresco de folíolos, tallos y raíces durante el riego a $\frac{1}{4}$ de la cc y después de la reducción a $\frac{1}{8}$ de la cc.....	43
Figura 12. Esquema final para el establecimiento de estrés hídrico en plantas de jitomate.....	45
Figura 13. Plantas de jitomate antes de iniciar el estrés hídrico.	45
Figura 14. Aspecto de las raíces a diferentes días del tratamiento.....	46
Figura 15. Aspecto de las plantas de jitomate durante todo el periodo de tratamiento.....	47
Figura 16. Número de folíolos jóvenes en plantas de jitomate control y sometidas a estrés hídrico.	48
Figura 17. Número de folíolos maduros en plantas de jitomate control y plantas sometidas a estrés hídrico.....	49
Figura 18. Longitud del tallo de plantas control y plantas sometidas a estrés hídrico.....	49
Figura 19. Peso fresco de la parte área de plantas de jitomate control y plantas sometidas a estrés hídrico por un periodo de 17 días.....	51
Figura 20. Peso fresco de raíces de plantas de jitomate control y plantas sometidas a estrés hídrico.....	52
Figura 21. Peso seco de diferentes tejidos de plantas de jitomate sometidas a estrés hídrico	53
Figura 22. Efecto del estrés hídrico en los niveles de conductancia estomática en las plantas de jitomate	54
Figura 23. Efecto del estrés hídrico en los niveles de transpiración en plantas de jitomate	55
Figura 24. Efecto del estrés hídrico en los niveles de humedad relativa en plantas de jitomate	55
Figura 25. Efecto del estrés hídrico en los niveles de los carbohidratos solubles en folíolos de plantas de jitomate, control y sometidas a estrés	57

Figura 26. Efecto del estrés hídrico en los niveles de carbohidratos solubles en raíces de plantas de jitomate	59
Figura 27. Niveles de almidón en folíolos y raíces de plantas de jitomate sometidas a estrés hídrico	60
Figura 28. Efecto del estrés hídrico en la expresión del transportador de sacarosa en las fracciones microsomales de hojas durante 13 días de tratamiento de estrés hídrico	63
Figura 29. Efecto del estrés hídrico en la expresión del transportador de hexosas en las fracciones microsomales de hojas durante diferentes tiempos de estrés hídrico	65
Figura 30. Efecto del estrés hídrico en la expresión del transportador de sacarosa en las fracciones de raíces durante diferentes tiempos de estrés hídrico	67
Figura 31. Efecto del estrés hídrico en la expresión del transportador de hexosas en las fracciones de raíces durante diferentes tiempos de estrés hídrico	69
Figura 32. Efecto del estrés hídrico sobre el reparto de carbohidratos en las hojas de jitomate	77
Figura 33. Efecto del estrés hídrico sobre el reparto de carbohidratos en las raíces de jitomate....	81

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Lista de algunos de los transportadores de hexosas y su localización en la planta. Adaptado de Bütner M. <i>et al.</i> , 2000 y Gear <i>et al.</i> , 2000	18
Tabla II. Lista de algunos de los transportadores de sacarosa y su localización en la planta que representan los tres diferentes grupos en los que son clasificados.	21
Tabla III. Regulación por carbohidratos de algunos transportadores de carbohidratos.	24
Tabla IV. Efecto del estrés hídrico en la humedad relativa, la conductancia estomática y la transpiración.	44

Abreviaturas

ABA	ácido abscísico
ADP	Difosfato de adenosina
AGPasa	5-difosfoglucosa pirofosforilasa
ATP	Trifosfato de adenosina
CC	Capacidad de Campo
DPGA	Difosfogliceraldehído
FBPasa	Fructosa-1,6 bifosfatasa
F6P	Fructosa-6, fosfato
G1P	Glucosa -1, fosfato
G6P	Glucosa-6, fosfato
MSF	Superfamilia de facilitadores mayores
NADP ⁺	Nicotinamida adenin dinucleotido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenin fosfato dinucleotido hidratado
Pi	Fósforo inorgánico
PGA	3-fosfoglicerato
RuBP	ribulosa 1, 5 bifosfato
Rubisco	Ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa/oxígenoasa
SBPasa	Sepdoheptulosa bifosfatasa
SNF1	Del inglés sucrose non fermenting
SuSy	Sacarosa sintetasa
SPS	Sacarosa fosfato sintasa
UDPglucosa	Uracil difosfoglucosa

Resumen

En las plantas, el establecimiento del flujo de carbono entre los tejidos fuente (hojas maduras y tallos) que son capaces de sintetizar sacarosa y los tejidos demanda (hojas jóvenes, meristemos, flores, raíces y frutos) es sensible a cambios en el ambiente y de importancia para el metabolismo. Adicionalmente, el carbono en forma de sacarosa o glucosa se reconoce como molécula señal que permite regular la expresión de proteínas importantes en su metabolismo, dentro de las que se encuentran enzimas que participan en la síntesis y degradación de almidón y sacarosa. Sin embargo, las alteraciones en el contenido de carbono durante la vida de la planta generalmente se han estudiado sólo en la parte metabólica del proceso, desdeñando el papel que los transportadores de carbohidratos podrían estar jugando para establecer o mantener el flujo de carbono entre los tejidos fuente y demanda. Por lo anterior, en este trabajo, se estableció un modelo experimental de tratamiento con estrés hídrico en plantas de jitomate, mediante el cual se llevó a las plantas a una situación crítica.

En las plantas tratadas disminuyó la conductancia estomática, se redujo el crecimiento de la parte aérea y cambió el patrón de contenido de carbohidratos en tejidos fuente (hojas madura) y tejidos demanda (raíces); por lo que se examinó si los transportadores de sacarosa y hexosas cambiaban.

Se encontró que en las plantas tratadas, las hojas acumulaban fructosa (2.2-13.1 veces) y sacarosa (2-4 veces) y reducían su contenido de almidón (2.1 veces) y el contenido de glucosa solo se modificó a los días 3, 5, 11 y 13 días del estrés en 1.5 a 3.5 veces. Ambos transportadores de carbohidratos en las hojas de las plantas sometidas a estrés mostraron un perfil diferente, sin embargo sólo a los 3 y 5 días aumentaron más de 2 veces y al día 7 hay un decremento en la expresión de ambos transportadores.

Por otro lado, en las raíces se encontró un aumento en el contenido de glucosa y fructosa desde el día 3 y hasta el 13 que duró el tratamiento, este aumento fue de 2.2-3 veces y 3-6 veces respectivamente, además de un incremento en el contenido de almidón entre 2 y 13 veces y la sacarosa se incremento a los días 3, 5, 7 y 11. Los transportadores de carbohidratos de las raíces cambiaron más que los de las hojas y durante todo el tratamiento. Los transportadores de sacarosa y hexosas aumentaron más de dos veces a los 3, 5, y 13 días y disminuyeron al día 7 y 9.

Debido a que tanto sacarosa como glucosa cambiaron durante el tratamiento de estrés hídrico es difícil proponer si ambos carbohidratos en conjunto o separados, tuvieron alguna influencia en los cambios observados en los niveles de ambos transportadores de carbohidratos. Sin embargo, coincide que al aumentar la glucosa y sacarosa en conjunto hay un incremento en ambos transportadores de carbohidratos, mientras que cuando se encuentra solo aumento de la sacarosa, disminuyen los niveles de ambos transportadores.

No obstante, encontramos que el reparto de carbohidratos en sus dos componentes en el contenido de carbohidratos y el de sus transportadores, se modificó por efecto del estrés hídrico.

1. Introducción

1.1. Relación fuente-demanda

Las plantas utilizan preferentemente la sacarosa como fuente carbonada para ser transportada a larga distancia. La síntesis y degradación de ésta, así como su transporte han sido sujetas a estudio desde principios del siglo pasado. Una hipótesis planteada en 1927, establece que la sacarosa, siendo el mayor osmólito de los constituyentes del floema, puede proveer la energía necesaria para transportar a los demás componentes de la savia. Entonces, se establece un gradiente o flujo de carbono que ocurre desde los tejidos denominados fuente, constituidos por las hojas fotosintéticamente competentes, hasta los tejidos llamados demanda, que esencialmente importan nutrientes, entre los que se encuentran aquellos de crecimiento rápido como los meristemos, las hojas inmaduras y los tejidos de almacenamiento vegetativo como los frutos, semillas y raíces (Bray 2001; Minchin y Lacoite, 2004).

La fotosíntesis, directa o indirectamente, proporcionará los componentes necesarios para la producción de biomasa así como el desarrollo y crecimiento de los tejidos demanda. Por esto debe existir un acoplamiento coordinado entre el metabolismo en los tejidos fuente y demanda, así como su reparto, ya que la información sobre la disponibilidad de asimilados en cada órgano debe ser percibida y usada para modular la expresión de genes (Pego *et al.*, 2000). Los mecanismos metabólicos y moleculares que facilitan esta coordinación determinan en gran medida la productividad de las plantas, sin embargo aún se desconoce el proceso.

1.2. Metabolismo en los tejidos fuente

El ciclo de Calvin es la vía primaria de la fijación de carbono y este ciclo contiene 13 pasos de reacción catalizados por 11 enzimas en el cloroplasto de las plantas

C3. Se considera que ocurre en tres fases: el primero de éstos es la carboxilación de la ribulosa 1, 5 bifosfato (RuBP) catalizado por la enzima ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa /oxigenasa (Rubisco), resultando en la formación de 3-fosfoglicerato (PGA). El segundo paso es la fase reductiva, la cual produce triosas fosfato y consume ATP y NADPH. La última fase del ciclo es la fase regenerativa en el cual las triosas fosfato son usadas para producir RuBP (Voet y Voet, 1995). En el ciclo las triosas fosfato son los intermediarios clave, y no sólo de este ciclo ya que se encontrarán disponibles para la biosíntesis de almidón y sacarosa (Figura 1).

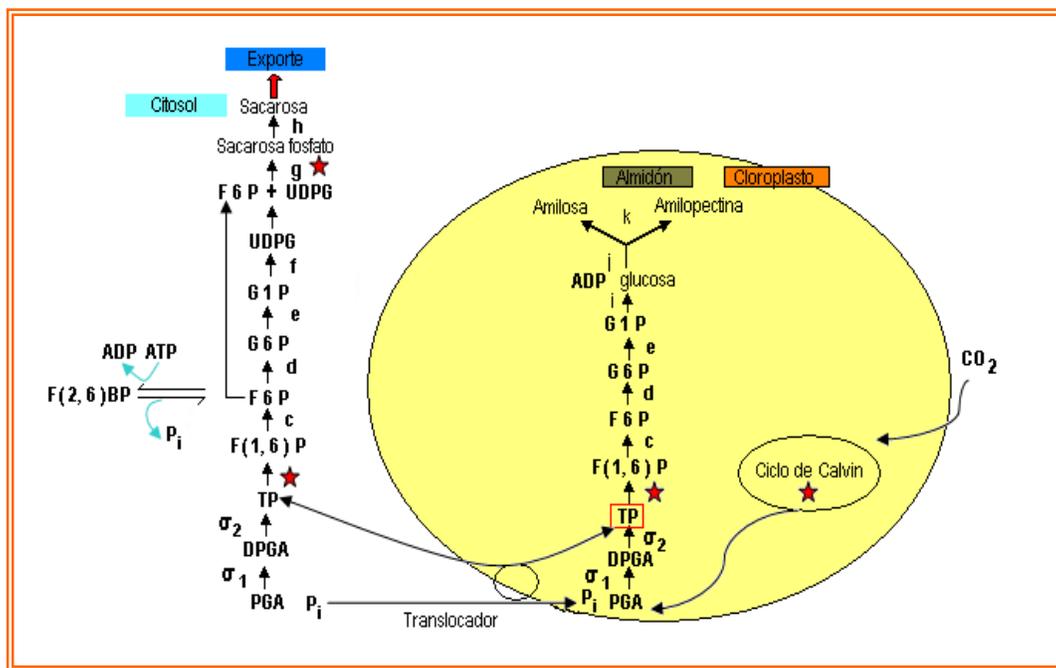


Figura 1. Vías de síntesis de sacarosa y almidón en las hojas fuente. (Tomado de Foyer y Paul, 2001). ★ Enzimas que regulan las diferentes vías metabólicas en Ciclo de Calvin la sedoheptulosa 1, 7 bifosfatasa, en la biosíntesis de almidón la FBPasa y en la síntesis de sacarosa la FBPasa citosólica y la sacarosa fosfato sintetasa. Un control adicional lo lleva a cabo la disponibilidad de fosfato que es intercambiado por PGA en la membrana del cloroplasto por el translocador fosfato/triosas fosfato. Enzimas a1, fosfoglicerato cinasa; a2, NAD(P)-gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa; b, aldolasa; c, fructosa-1,6 bisfosfatasa; d, hexosa fosfato isomerasa; e, fosfoglucomutasa; f, UDP-glucosa pirofosforilasa; g, sacarosa fosfato sintetasa; h, sacarosa fosfatasa; i, ADP-glucosa pirofosforilasa; j, sintetasa de almidón ; k, enzima ramificante del almidón; Metabolitos DPGA 1,3-bifosfoglicerato, F6P fructosa 6-fosfato; G1P, glucosa -1-fosfato; G6P, glucosa-6-fosfato; PGA, 3-fosfoglicerato UDP, UDPglucosa.

El balance entre la exportación de las triosas fosfato y la regeneración, es importante para que el Ciclo de Calvin no se vea disminuido en intermediarios. En la regulación del ciclo de Calvin participan tres enzimas cloroplásticas, la Rubisco (EC 4.1.1.39), la sedoheptulosa 1,7 bifosfatasa (SBPasa, EC 3.1.3.37) y la fructosa-1,6 bifosfatasa (FBPasa, EC 3.1.3.11). La primera está fuertemente regulada por las variaciones en el pH y las concentraciones de Mg^{2+} y NADPH que a su vez están directamente relacionadas con la actividad de la fase luminosa de la fotosíntesis (Voet y Voet, 1995). Por otra parte, las dos últimas enzimas también son activadas por incremento en el pH y Mg^{2+} y por NADPH, la acción de estos factores se ve complementada por un segundo sistema regulador que responde al potencial rédox del estroma vía el sistema ferredoxina/tiorredoxina, el cual modula la actividad de las enzimas en respuesta a condiciones de luz/oscuridad (Tamoi *et al.*, 2005). La sobreexpresión de FBPasa y SBPasa en enzimas para el caso del tabaco, aumenta el flujo del ciclo de Calvin hacia RuBP incrementando la tasa fotosintética, lo cual, afecta positivamente el crecimiento de las plantas transgénicas (Tamoi *et al.*, 2005).

La FBPasa es una enzima que participa en la síntesis de almidón en el cloroplasto, pero en el citosol participa en la vía de síntesis de sacarosa (Figura 1). Las plantas transgénicas que sobreexpresan esta enzima en el citosol tienen altos niveles de sacarosa en las hojas, tallos y raíces durante el periodo de luz; mientras que los niveles de almidón disminuyen, aunque estas diferencias en los metabolitos no tienen impacto en el crecimiento, el peso seco y la actividad fotosintética de la planta (Tamoi *et al.*, 2005). Otra enzima importante que regula la síntesis de sacarosa es la sacarosa fosfato sintetasa (SPS; EC 2.3.1.14), la cual cataliza la síntesis de sacarosa-6P y UDP, usando como sustratos fructosa-6-fosfato y UDP glucosa (Figura 1). La actividad de la SPS de hojas de diferentes líneas de maíz correlaciona con su velocidad de crecimiento; mientras que para las plantas de tomate que sobreexpresan la SPS de maíz son capaces de reducir la cantidad de almidón e incrementar la concentración de sacarosa en las hojas de una manera directamente proporcional a la actividad de la SPS. Estos resultados

apoyan que la SPS es una enzima clave para regular el balance de almidón y sacarosa en las hojas (Worrell *et al.*, 1991). La enzima es regulada a través de dos mecanismos, uno transcripcional y otro post-traducciona via fosforilación de la SPS ocasionando un aumento en la actividad enzimática, la cual puede también ser modulada por la concentración de metabolitos y la luz (Worrell *et al.*, 1991).

Otro modo de regulación durante la síntesis de sacarosa es la liberación de P_i , que tiene que ser intercambiado por las triosas fosfato en el cloroplasto. De esta manera quedan coordinados el proceso fotosintético y la biosíntesis de sacarosa, misma que se altera cuando el fosfato disponible en la planta es reducido (Foyer y Paul, 2001).

La capacidad de las plantas para sintetizar almidón en las hojas maduras varía de especie a especie. Los cereales por ejemplo, almacenan poco almidón en las hojas, mientras que otras especies como *Galanthus nivalis* (campanilla de invierno) conservan mucho de lo asimilado en forma de almidón. En general, las hojas tienden a sintetizar y exportar sacarosa en las primeras horas del día, pero cuando la capacidad fotosintética excede la síntesis y la exportación de sacarosa, el exceso se retiene en el cloroplasto como almidón durante el día. Para que en el posterior periodo de oscuridad el almidón se degrade y se use para la síntesis de sacarosa y su exportación (Foyer y Paul, 2001; Zeeman *et al.*, 2004).

El tiempo de inicio, la duración y velocidad de degradación de almidón varía dependiendo de la especie. Se desconoce toda la vía de degradación del almidón y por tanto su regulación. Sin embargo, los estudios en *Arabidopsis* demuestran que para la degradación de los gránulos de almidón se necesita de la glucan hidrodicinas y la α -amilasa, para producir α -1,4-glucanos que son sustratos de la isoamilasa y la dextrinasa. Uno de los productos mayoritarios sería la maltosa, la que se exportaría del cloroplasto a través del transportador de maltosa y ya en el citoplasma la glucosiltransferasa llevaría a la producción de glucosa, susceptible

de fosforilarse por la hexocinasa, y entonces continuar el metabolismo (Smith *et al.*, 2003; Zeeman *et al.*, 2004) como se muestra en la Figura 2.

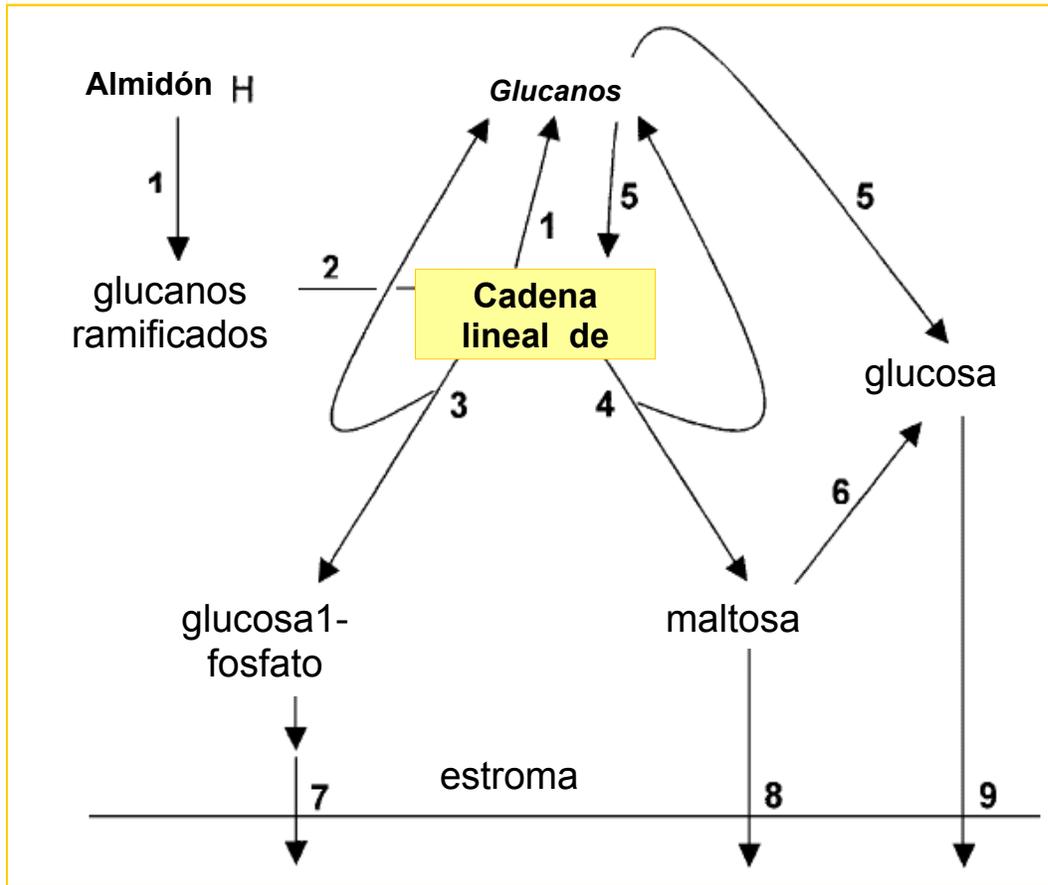


Figura 2. Posibles vías de movilización de almidón en un plastidio. (Tomado de Smith *et al.*, 2003). Reacciones catalizadas por enzimas que se encuentran en el plastidio. Hay que hacer notar que no todas las reacciones posibles han sido indicadas: β -amilasa, fosforilasa del almidón y la enzima desproporcionante pueden actuar sobre las cadenas de glucano. (1, amilasa; 2, la enzima desramificante (isoamilasa y la dextrinasa límite; fosforilasa del almidón; 4, -amilasa; 5, enzima desproporcionante; 6, -glucosidasa; 7, triosa, translocador de triosas fosfato; 8 translocador de maltosa, 9 translocador de glucosa).

1.3. Metabolismo en los tejidos demanda

El importe de sacarosa por los tejidos demanda: hojas jóvenes, flores, frutos, tubérculos, les provee de esqueletos carbonados, fuente de energía. Además, se ha reconocido que la sacarosa y sus dos hexosas componentes actúan como señal que modifica el estado metabólico de la célula, modulando la expresión de ciertos genes. En general, los carbohidratos favorecen la expresión de enzimas en

conexión con la biosíntesis, el uso y el almacenamiento de reservas, así como la represión o expresión de enzimas involucradas en la fotosíntesis y en la movilización de reservas (Koch, 1996).

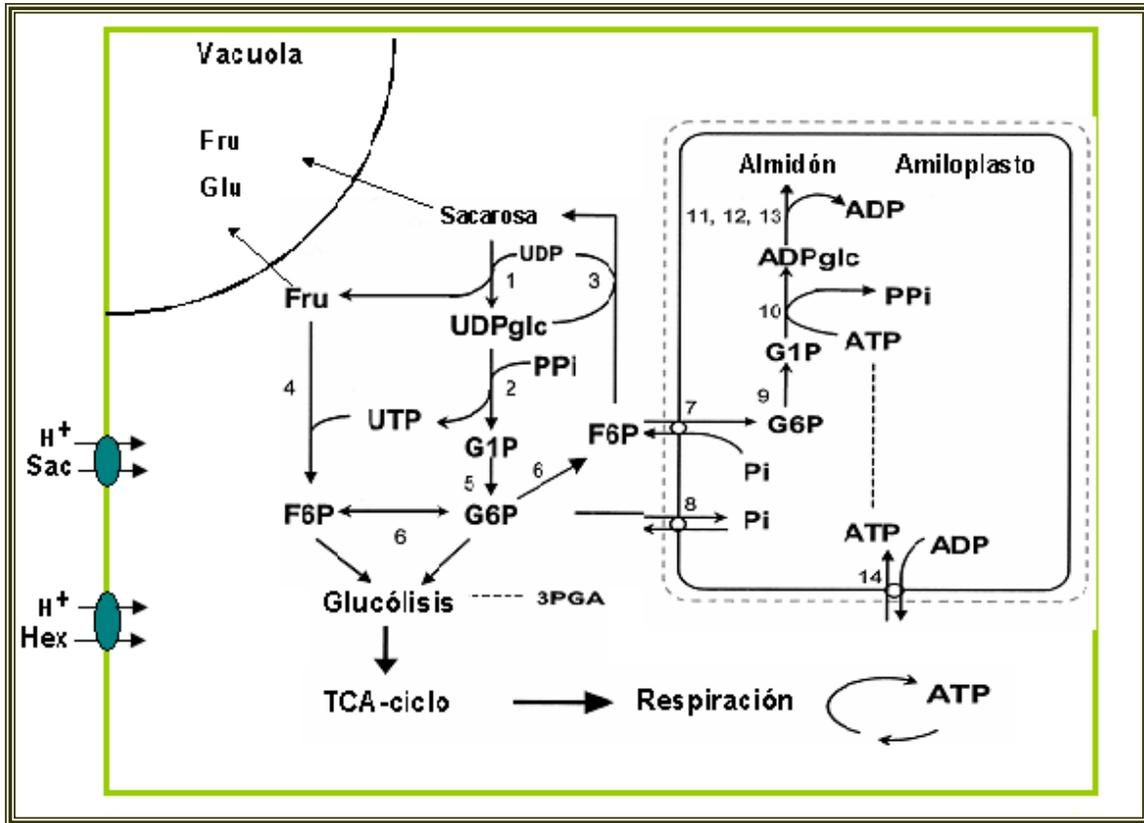


Figura 3. Metabolismo de carbohidratos en las células demanda. (1) Sacarosa sintasa, (2) UDP-glucosa pirofosforilasa, (3) sacarosa-fosfato sintasa, (4) fructocinasa, (5) fosfoglucomutasa citosólica, (6) fosfoglucoisomerasa, (7) translocador de hexosas-fosfato, (8) translocador de triosas-fosfato (9) fosfoglucomutasa de plastidio, (10) ADP-glucosa pirofosforilasa, (11) almidón sintasa soluble, (12) sintetasa de almidón unida al granulo, (13) enzima ramificante, (14) translocador de adenilatos.

La sacarosa puede ser transportada al apoplasto de las células demandantes, y puede o no ser usada por la invertasa de la pared celular, y las hexosas son entonces transportadas al interior celular. Si la sacarosa es introducida como disacárido a los tejidos demandantes, se hidroliza por la acción coordinada de dos enzimas citosólicas: la invertasa (EC 3.2.1.26) y la sacarosa sintetasa (SuSy; EC 2.4.1.13). La primera se encarga de producir las dos hexosas, glucosa y fructosa, mientras que SuSy producirá fructosa y UDP-Glucosa, actividad reversible (Figura 3). Ambas enzimas tienen diferentes funciones en los tejidos demanda, las

invertasas citosólicas generalmente tienen una actividad mínima en la mayoría de los sistemas, y por lo tanto, no influyen de manera importante en el importe de sacarosa al tejido demanda, denominada baja fuerza de demanda. Contrario a la invertasa de la vacuola y de la pared celular, que pueden en general producir una abundante cantidad de hexosas con una influencia alta en la capacidad de demanda del tejido. Por su parte, la SuSy presenta dos funciones: una la de conservar adenilatos y la otra el de dirigir el carbono hacia procesos biosintéticos, es decir el uso de UDPG para la generación de almidón, en la síntesis de calosa y en una gran diversidad de polisacáridos de la pared celular (Koch, 2004). En las mutantes “knock-out” para el gen de la sacarosa sintetasa se inhibe la formación de la pared celular (Koch, 2004).

Dependiendo del tejido demanda, los carbohidratos se acumularán en forma de almidón o de hexosas. En el caso de los frutos de tomate en el estadio temprano pasan por un periodo transitorio de acumulación de almidón llegando a concentraciones del 20% de su peso seco, pero posterior a este tiempo comienza a disminuir para producir sacarosa y hexosas y dar la consistencia final al fruto (Schaffer y Petreikov, 1997). Mientras que en el tubérculo de la papa la acumulación de almidón es continúa.

Una vez que se producen las hexosas fosfato, la glucosa 6 fosfato se transporta al amiloplasto y se convierte en almidón vía la adenosina 5'-difosfoglucosa pirofosforilasa (AGPasa) y varias isoformas de sintetasa de almidón y enzimas ramificantes. La AGPasa cataliza el primer paso de la biosíntesis de almidón convirtiendo la glucosa 1 fosfato y ATP en ADPglucosa y pirofosfato, además, la enzima se ha propuesto como clave en la regulación y control de la síntesis de almidón. Por ejemplo, la AGPasa de papa es activada por PGA e inhibida por fosfato, sin embargo, en plantas transgénicas de papa que sobreexpresan a una AGPasa de *E. coli* pierden esta forma de regulación por PGA, (Ballicora *et al.*, 1995). El silenciamiento de la AGPasa se debe a la expresión en antisentido de su gen, lo que conduce a un decremento en la velocidad de acumulación de almidón

en las papas (Geingenberg *et al.*, 1997), demostrando que la regulación alostérica de la enzima controla la acumulación del almidón. Además, los niveles del transcrito de AGPasa y de SuSy disminuyen rápidamente cuando se interrumpe el abastecimiento de nutrientes, teniendo ambos un efecto negativo en la acumulación del almidón. Aunque el mecanismo de señalización para mediar incremento en almidón aún se desconoce, se sugiere que la disponibilidad de sacarosa es parte de la señal que induce la expresión de AGPasa y SuSy durante la acumulación de almidón.

1.4. Regulación metabólica por azúcares

En relación con los cambios metabólicos en los tejidos por efecto de la disponibilidad de carbohidratos, se ha reportado una larga lista de genes regulados positivamente por azúcares. Entre estos se encuentran (a) genes que codifican proteínas relacionadas con el almacenamiento como patatina en papa (Hattori *et al.*, 1990); (b) genes que codifican proteínas relacionadas con la biosíntesis del almidón como ADPG fosforilasa (Müller-Röbert *et al.*, 1992); (c) genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de la sacarosa como invertasa y sacarosa sintasa (Koch *et al.*, 1992; Roitsch *et al.*, 1995). En contraste, también hay una gran variedad de genes regulados negativamente por el aumento en los azúcares, y su expresión se induce cuando hay una disminución en los niveles de los mismos, algunos ejemplos son los genes de α -amilasa en suspensiones celulares y embriones de arroz (Yu *et al.*, 1996); la endopeptidasa, la sacarosa sintasa en maíz (Koch *et al.*, 1992; James *et al.*, 1993; Chevalier *et al.*, 1995), la malato sintasa así como también la isocitrato liasa en cotiledones de calabaza y células en suspensión (Graham *et al.*, 1994).

Estudios en papa muestran que la sacarosa y la glucosa activan a la AGPasa, a través de dos vías diferentes que involucran a una proteína cinasa parecida a la SNF1 de levadura (SNF del inglés “sucrose non-fermenting”) y a la hexocinasa (Tiessen *et al.*, 2003). La inhibición del gen homólogo de la cinasa SNF1 en tubérculos de papa, mediante su expresión en antisentido, disminuye la activación

de la AGPasa después de la adición de sacarosa, pero no después de añadir glucosa. Por otra parte, la activación de la AGPasa dependiente de glucosa, requiere el paso de fosforilación de la glucosa por la hexocinasa (Geigenberg *et al.*, 2005). Tanto la hexocinasa y la cinasa SNF1 son parte de una red de regulación que controla la expresión y la fosforilación de enzimas citosólicas en respuesta a carbohidratos.

En el caso particular de la hidrólisis del almidón, mediciones en los índices de NADPH/NADP⁺ después de adicionar glucosa o sacarosa a discos de papa, muestra un incremento de dos veces en la activación de la AGPasa y también del tejido en general, solamente en respuesta a glucosa pero no a sacarosa. El incremento en respuesta a glucosa puede ser indicativo de una estimulación del ciclo oxidativo de las pentosas o algunos otros procesos que involucran la reducción del NADP⁺. En este último aspecto, se ha encontrado que la glucosa-6P deshidrogenasa del plastidio del tubérculo de papa es muy susceptible a la inactivación por tioredoxina y a la inhibición por producto final por NADPH, aunque aún se desconoce como la señal viaja desde el citoplasma hasta la tioredoxina en el plastidio (Geigenberg *et al.*, 2005).

Por su parte la sacarosa no lleva a cambios en el índice NADPH/NADP⁺ en los tubérculos. Sin embargo, la presencia de glucosa sí incrementa la activación reductiva de la AGPasa, el mecanismo se desconoce pero es probable que la modulación de la transferencia redox a la AGPasa por metabolitos esté llevándose a cabo. La sacarosa estimula entonces la biosíntesis de almidón pero también la degradación de sacarosa, a través de la inducción de la expresión de la SUSy (Figura 4); sin embargo, aún hay controversia respecto a si la inducción es dependiente de sacarosa o bien a la disminución en la tensión de oxígeno en la célula. Esto último se debe a que si la invertasa está activa, se producen dos hexosas, se fosforilan con dos moléculas de ATP y se consume oxígeno para producir estas dos moléculas. Entonces al bajar la tensión de oxígeno la célula apaga la expresión de la invertasa y enciende la de SuSy que al producir fructosa

y UDPG, sólo se requiere una molécula de ATP y se empieza a restablecer la tensión de oxígeno en la célula (Geigenberg, 2003).

Dentro de la cascada de señalización por carbohidratos, los transportadores de carbohidratos tienen un papel importante, ya que son proteínas que al usar como sustratos a sacarosa o a las hexosas podrían indicar su tipo y concentración a otras moléculas proteicas vecinas y así iniciar la señalización (Pego *et al.*, 2000). Se sugiere que los transportadores de carbohidratos u otros componentes proteicos que se encuentran en la membrana, pueden ser importantes en la regulación del metabolismo en los tejidos demanda. Por ejemplo, los tubérculos de la papa que expresan a la invertasa en el apoplasto presentan una mayor división celular y tienen un metabolismo diferente a aquellas que expresan a la invertasa en el citosol, aún cuando las hexosas liberadas por su actividad hidrolítica están disponibles para entrar al metabolismo. Además, se conoce que la degradación y la síntesis de almidón se estimula cuando se añaden análogos de sacarosa como palatinosa a los discos de papa, aún cuando el transporte de palatinosa es casi nulo (Geigenberg, 2003).

1.5. Transporte de carbohidratos a distancia

Todas las plantas superiores poseen una red vascular muy desarrollada que entrelaza a los diferentes órganos que las conforman. Esta red es esencial para transferir moléculas orgánicas e inorgánicas, además de ser el medio en el cual se mueven las señales que regulan la función de los tejidos de la planta. El xilema es el canal de transferencia de agua desde las raíces hacia los tallos, también absorbe minerales del suelo y transporta hacia su sitio blanco algunos compuestos orgánicos que son sintetizados en las raíces. Mientras que el floema es la vía de transferencia de carbohidratos, desde el sitio de síntesis que son los tejidos fuente (hojas maduras), hacia los tejidos demandantes (hojas inmaduras, raíces, flores, frutos) en donde son utilizados para el crecimiento, respiración y almacenamiento. Generalmente, hay una comunicación entre ambos flujos, el del xilema y el del floema (Van Bel, 2003).

En el paso de los carbohidratos por el floema, la teoría de Münch propone que el movimiento de la solución concentrada de sacarosa 0.5-1.0 M, fluye a través del floema al generarse un gradiente de presión osmótica (Minchin y Lacoite, 2004). Actualmente, se tienen significativos avances sobre la ruta de descarga del floema, se conoce que el floema no es solo un conducto pasivo de sustancias a través de los plasmodesmata¹, ya que se han identificado y localizado transportadores proteicos en la membrana plasmática, tanto de las células acompañantes como en las células de los elementos cribosos de la savia, ambas componentes del floema (Figura 4).

1.5.1. Carga del floema.

El mecanismo de carga de carbohidratos del floema puede ser simplástico o apoplástico, sin embargo, puede haber combinaciones de ambos tipos de mecanismos. El paso simplástico involucra el flujo de los carbohidratos desde el parénquima de la hoja hacia el complejo elemento amorfo-célula acompañante, a través de plasmodesmata, sin que el soluto pase por el apoplasto (Figura 4). Por el contrario, en el paso apoplástico el flujo de carbohidratos, usualmente sacarosa, comienza en el mesofilo de las hojas y continúa hacia el espacio apoplástico en la zona vecina al tejido vascular involucrándose a los transportadores de carbohidratos localizados en el complejo elemento criboso-célula acompañante (Lalonde *et al.*, 1999; Minchin y Lacoite, 2004).

¹ Plasmodesmata: Estructuras cilíndricas de membrana plasmática que interconectan a las células de la planta (Turgeon, 2006).

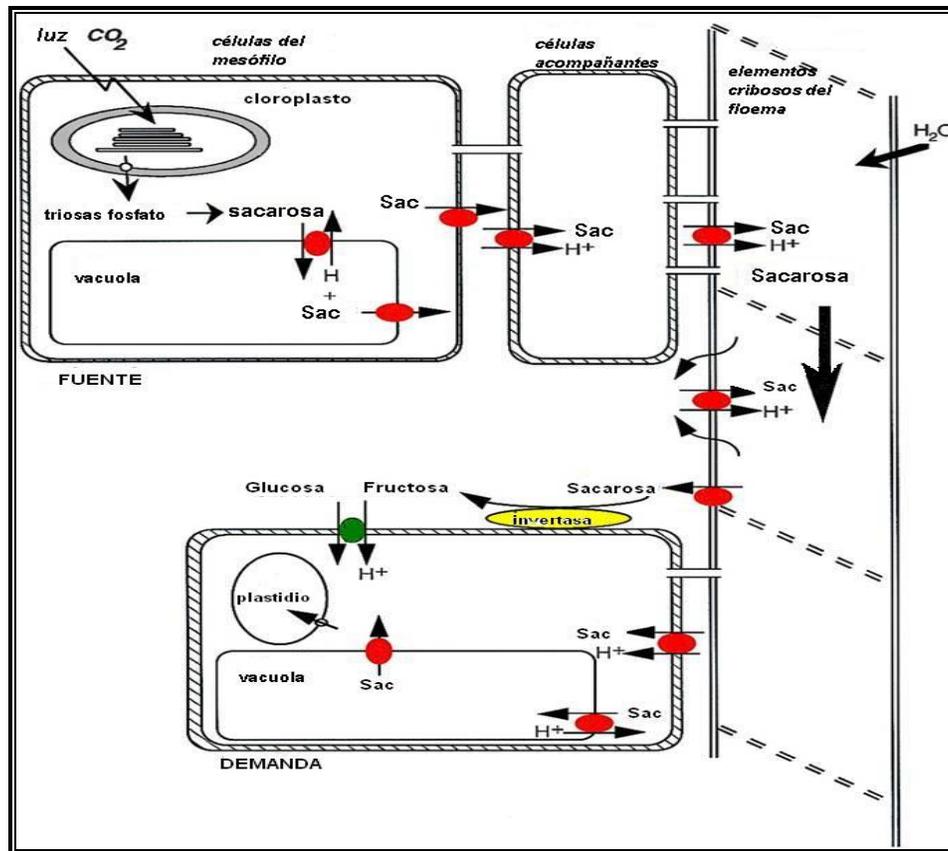


Figura 4. Sistema de transporte de sacarosa en el floema. Las células fuente y las células demanda pueden contener transportadores de sacarosa. La salida de sacarosa de las células fuente puede ser apoplástica o simplástica para verterse al floema (células acompañantes y elementos cribosos del floema) y una vez allí la sacarosa se transporta hacia los tejidos demandantes. Sin embargo, la sacarosa también puede ser hidrolizada a sus hexosas mediante la invertasa de pared celular, y en este caso los carbohidratos son transportados por un transportador de hexosas (Lalonde, 1999).

1.5.2. Descarga del floema

En la mayoría de los tejidos la descarga del floema hacia las células demanda es del tipo simplástico, en donde los plasmodesmata unen a las células en la región de demanda. En esta región la presión osmótica se mantiene baja, debido a que el metabolismo se conduce hacia la conversión de carbohidratos osmóticamente menos activos como los fructanos y el almidón (Minchin y Laointe, 2004). Sin embargo, hay evidencia que apunta hacia un transporte de tipo apoplástico, por ejemplo en las semillas en desarrollo, donde el tejido en formación está aislado simplásticamente del tejido materno, la transferencia apoplástica de nutrientes es esencial. En este sentido, se han encontrado en membranas plasmáticas de las

células demanda tanto transportadores de sacarosa como de monosacáridos (Figura 4; Weber *et al.*, 1997).

1.6. Transportadores de carbohidratos

La Superfamilia de Facilitadores Mayores (Del inglés “Major Facilitator Superfamily”, MFS), presenta como característica común doce segmentos transmembranales con una estructura de α -hélice (Figura 5). Se propone que estos transportadores provienen de la duplicación y fusión de un gen primitivo, el cual codificaba para una proteína con seis segmentos transmembranales. Esto explica la existencia del asa citoplásmica que conecta a los primeros seis segmentos transmembranales con los segmentos restantes, la secuencia y longitud de esta asa citoplásmica difiere a lo largo de toda la familia. No obstante, al comparar las dos mitades de proteína que conecta, es posible encontrar regiones conservadas entre ellas, sobre todo dentro de las regiones sugeridas como transmembranales (Lalonde, 1999).

En 1998 la MFS se subdividió en 17 grupos con base a la secuencia de las proteínas entonces disponibles en las base de datos (Pao *et al.*, 1998). Los transportadores de sacarosa y glucosa de plantas están incluidos dentro del primer grupo formado por el uniportador de carbohidratos de animales, los simportadores carbohidrato/H⁺ de bacterias y el simportador de glucosa de levadura (Pao *et al.*, 1998).

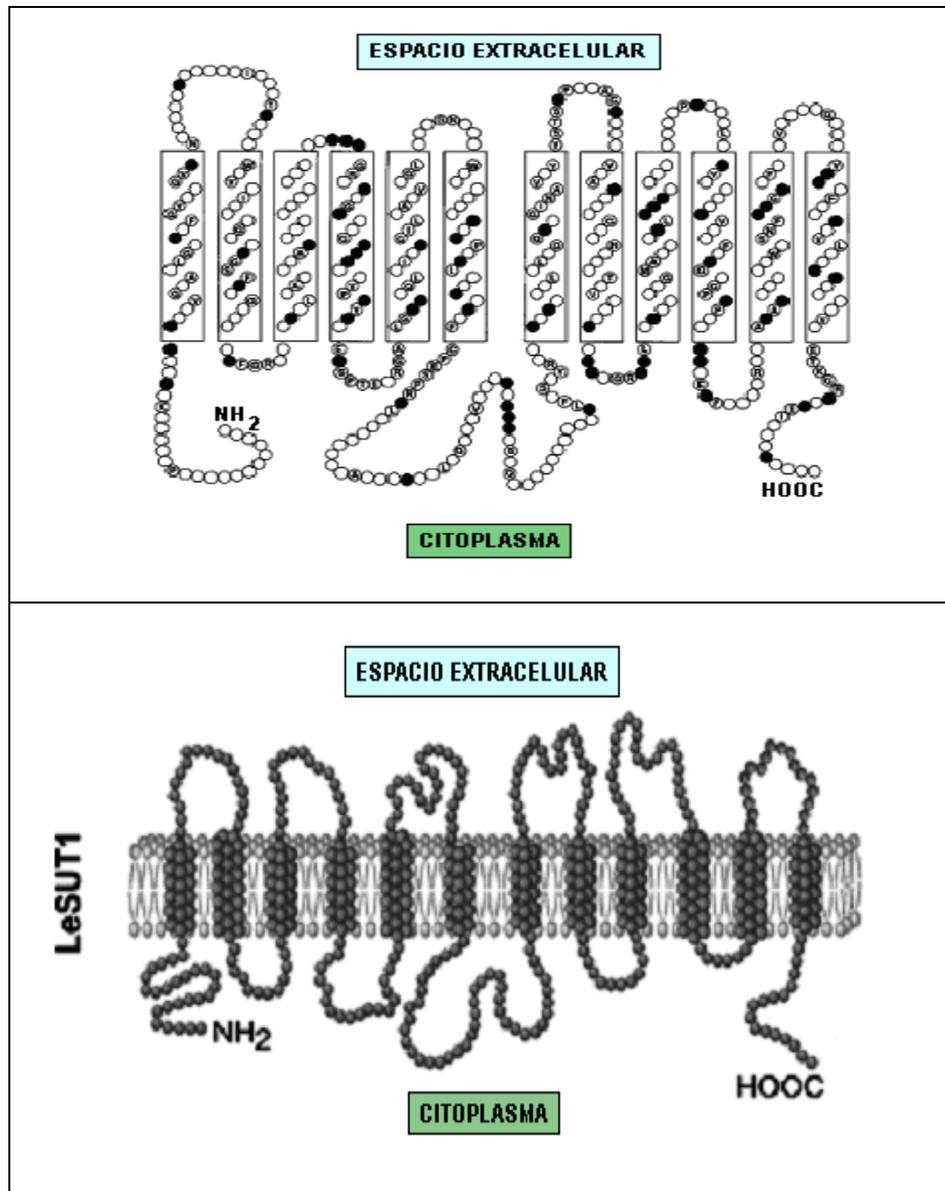


Figura 5. Caricaturas de la topología de los transportadores de carbohidratos de plantas. A. Transportador de hexosas B. Transportador de sacarosa. Ambos muestran similitudes en el número de cruces transmembrana (12), la localización citoplásmica de la región amino, carboxilo y el asa mayor que conecta a los 6 cruces transmembranales.

1.6.1. Transportador de hexosas

La clonación del transportador de hexosas en *Chlorella kessleri* sirvió como base para clonar el gen para el transportador en *Arabidopsis thaliana* (Sauer y Tanner, 1989). Actualmente, se conocen las secuencias para una gran cantidad de transportadores de hexosas en diferentes plantas, algunas dicotiledóneas como

por ejemplo *Arabidopsis thaliana* presentan al menos 26 genes diferentes, mientras que se han encontrado 8 en *Ricinus communis* y 7 en *Chenopodium rubrum*. También, se han identificado los transportadores en algunas monocodiledóneas como *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* y en *Zea mays* (Delrot, 2001). En este último, se encontró el transportador que se localiza en la vacuola (Weber *et al.*, 2000).

El transporte de monosacáridos se ha identificado en una gran variedad de especies de plantas. Los substratos que son eficientemente transportados por éstos son la β -D glucosa, 3-O-metil- β -D glucosa, 2-deoxi- β -D glucosa, α -D-manosa y β -D fructosa, aunque no con la misma especificidad. Por ejemplo, la comparación de la actividad independiente de proteínas recombinantes CkHUP1, CkHUP2 y CkHUP3 en *Schizosaccharomyces pombe* revelaron que las velocidades relativas de transporte para diferentes substratos, como D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, D-manosa, D-fructosa, etc., difieren drásticamente. CkHUP1 y CkHUP3 transportan preferentemente D-glucosa, mientras que CkHUP2 transporta D-galactosa mucho mejor que D-glucosa (Büttner *et al.*, 2000; Gear *et al.*, 2000) (Tabla I).

Tabla I. Lista de algunos de los transportadores de hexosas y su localización en la planta. Adaptado de Bütner *et al.*, (2000) y Gear *et al.*, (2000)

Nombre	Especie	No. de acceso	Km (μ M)	Localización
CkHUP1	<i>Chlorella kessleri</i>		Glu 15-46 Fru 392 Man 136 Xil 725 Gal 3000	—
CkHUP2	<i>Chlorella kessleri</i>		Gal 25	—
CkHUP3	<i>Chlorella kessleri</i>		Gal 900	—
AtSTP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	X55350	Glu 20	Ra, Sg
AtSTP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ001362	Gal 50	Fl, Pg
AtSTP3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ002399	Glu 2000	Hf, aumenta en estrés por patógenos
AtSTP4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	X66857	Glu 15	Ra, P, aumenta en estrés por patógenos
LeHT1	Jitomate	AJ32223	ND ^b	Fr, Ra
LeHT2	Jitomate	AJ132224	Glc 45	Hf, F
LeHT3	Jitomate	AJ132225	ND	Fr, Ra (punta)

^a.Hf, Ra, raíces; Sg, semilla en germinación; Fl, floema; Pg, polen en germinación; Hf, hoja fuente, P, polen; Fr, fruto, F, flor.

^b.ND no determinado.

Muchas plantas superiores convierten el CO₂ fijado en sacarosa, que es la principal forma de carbohidrato para el transporte a larga distancia en el floema. Ciertos tejidos demanda, tales como son las hojas jóvenes o puntas de las raíces tienen un acceso directo al floema vía numerosos plasmodesmatas. Otros tejidos; sin embargo, como los granos de polen, tubo polínico, células del tapete de la antera, el embrión en desarrollo, y las células guarda están simplásticamente

aisladas y pueden importar foto-asimilados sólo con la ayuda de proteínas de transporte en su membrana plasmática (Bütner y Sauer, 2000).

El patrón de expresión de varios de los transportadores de hexosas sugiere que su función primaria es la de introducir hexosas a los tejidos fuente, por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se analizó la localización de algunos de los miembros de los transportadores de hexosas como el AtSTP2 (de las siglas en inglés de “*Arabidopsis thaliana* sugar transporter protein”). Este gen se expresa exclusivamente en granos de polen durante un corto periodo de desarrollo del polen y su expresión se correlaciona con la degradación de la pared de calosa que rodea al polen tratado y que sugiere la toma de los carbohidratos para el crecimiento de las células. Mientras que AtSTP4 se expresa específicamente en las puntas de la raíz y en polen y AtSTP1 parece ser responsable del importe de carbohidratos en las células guarda, además de encontrarse altamente expresada en semillas en desarrollo, sugiriendo que puede ser responsable de la toma de glucosa. En otras especies como en *Ricinus communis*, HEX3 se expresa predominantemente en las raíces y en las hojas inmaduras, mientras que HEX1 se encuentra de preferencia en raíces, hipocotilos y hojas fuente (Bütner y Sauer, 2000).

1.6.2. Transportador de sacarosa

El primer transportador de sacarosa, denominado SUT1, fue clonado por expresión funcional en levadura (Riesmier *et al.*, 1992). Desde entonces otros transportadores de sacarosa han sido clonados y secuenciados en diferentes especies de plantas incluyendo, dentro de las dicotiledóneas a tabaco, jitomate, papa, *Arabidopsis*, betabel, haba, frijol, chícharo, limón, entre otras; así como en tres especies de monocotiledóneas, trigo, arroz y maíz. De estas familias multigénicas sólo algunos de sus miembros han sido caracterizados funcionalmente (Deltrot *et al.*, 2001; Lemoine, 2000).

Giaquinta (1977) propuso que la acumulación de sacarosa en el tejido vascular de la hoja se debía a un transportador que de manera coordinada transportaba los protones y la sacarosa desde el apoplasto al interior celular. Las propiedades de los transportadores de sacarosa se demostraron indirectamente al usar compuestos que colapsan el gradiente de protones de la membrana plasmática (dinitrofenol y carbonil cianida 3-clorofenilhidrazona), o inhibidores de la generación de ATP como antimicina y arsenato. La adición de los compuestos resultó en la inhibición de la toma de sacarosa, tanto en vesículas de membrana plasmática aisladas de hojas de betabel como en células de levadura que expresaban al transportador, mostrando así la actividad de simportador sacarosa/H⁺ (Bush, 1990; Bush, 1993).

Asimismo, la expresión funcional de los transportadores en ovocitos de *Xenopus* y en levaduras ha permitido establecer la especificidad del transportador por sacarosa así como la estequiometría por los protones. En esta última propiedad se ha establecido que la estequiometría es de 1 protón:1 molécula de sacarosa. La Km para los protones es de alrededor de 0.7 μM en vesículas de membrana plasmática de hojas de remolacha, y se encontraron resultados similares para otras especies. Si consideramos que el pH del apoplasto varía entre 5 a 6 unidades de pH, es decir 10 a 1 μM, los protones no serían limitantes en condiciones fisiológicas para el transporte de sacarosa (Bush, 1993; Slone *et al.*, 1991).

Tabla II. Lista de algunos de los transportadores de sacarosa y su localización en la planta que representan los tres diferentes grupos en los que son clasificados.

Nombre	Especie	No. de acceso	Km	Localización ^a	Referencia
AtSUC1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	481132	1mM	Hf, Hd, Ra, FI	Sauer N. <i>et al.</i> , 1994
AtSUC2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	407092	1.44 mM	Hf, Hd, FI, CA	Chandran <i>et al.</i> 2003.
ZmSUT1	<i>Zea mays</i>	BAA83501	1.5 mM	Ra, Es, Hf, Ta, Pis	Aoki <i>et al.</i> , 1999, Greaves-Fernández, 2001
AtSUT2/ AtSUC3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g02860	11.1 mM	FI	Sauer N. <i>et al.</i> 1994
AtSUT4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF175322	8mM	Hf, Hd, Ra, FI	Barker <i>et al.</i> , 2000
LeSUT1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	X82275	ND ^b	Hf, Hd, Ra, FI	Barker <i>et al.</i> , 2000
LeSUT2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF166498	ND	Hd, T, Fr, Flor, Anteras	Barker <i>et al.</i> , 2000; Hackel <i>et al.</i> , 2006
LeSUT4	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF176950	11.6 mM	FI	Barrer <i>et al.</i> , 2000

^aHf, hoja fuente; Hd, hoja demanda; Ra, raíces; FI, floema; Fr, fruto; CA, célula acompañante; Es, escutelo; Ta, tallo; Pis, pistilo.

^bND no determinado

A partir de los valores de sus constantes cinéticas, se han agrupado a los transportadores de sacarosa en tres grandes grupos (Tabla II). Los simportadores que forman la familia SUT1 (H⁺/sacarosa) responsables de la descarga al floema presentan una alta afinidad por la sacarosa (Km≈ 1mM), algunas se expresan en células epidermales de cotiledones y sirven para la toma de sacarosa durante el desarrollo de las semillas (Weber *et al.*, 1997; Tegeder *et al.*, 1999). La subfamilia SUT2, incluye PMSUC3, LeSUT2 de jitomate y AtSUC3 (similar a SUT2) de *Arabidopsis* con una función posible como “sensor” de carbohidratos (Barker *et al.*,

2000; Eckardt, 2003; Meyer *et al.*, 2000), con K_m s que se encuentran en el intervalo de 2.6 a 10 mM y velocidades de transporte reducidas. La subfamilia SUT4 incluye a AtSUT4 y LeSUT4 que son transportadores de baja afinidad, $K_m \approx 10$ mM (Weise *et al.*, 2000), como el expresado en nódulos de raíces de *Lotus japonicus* (Flemetakis *et al.*, 2003).

Debido a que el transporte mediado por el transportador de sacarosa es esencial para el llenado del floema, una reducción en la actividad de transporte afecta la distribución de carbono y la fotosíntesis. Riesmeier *et al.* (1993) generaron una planta de papa transgénica que expresa el transcrito del transportador en antisentido, causando una reducción en el flujo de carbohidratos desde los tejidos fuente, inhibición del crecimiento de la raíz y de la fotosíntesis y un incremento de la concentración de carbohidratos en las hojas. Con la disminución de aporte de carbohidratos en los tejidos demanda, las plantas presentaron raíces más pequeñas y un menor rendimiento de tubérculos (Hirose *et al.*, 1997; Lalonde *et al.*, 1999)

En tabaco, la supresión antisentido del transportador causa enrollamiento de las hojas y zonas de necrosis que llevaron a la planta a la muerte. Las hojas no tenían capacidad de exportar el CO_2 fijado y, por lo tanto, los carbohidratos solubles se acumularon en ellas, de modo que la fotosíntesis se redujo. También, se demostró que no existía el movimiento de los productos entre las células del mesófilo en estas plantas transgénicas (Bürkle *et al.*, 1988).

1.7. Regulación de los transportadores de carbohidratos

1.7.1. Regulación transcripcional

Los datos del control por carbohidratos de la expresión de genes para los transportadores de monosacáridos y de sacarosa son pocos y algunas veces contradictorios (Tabla III). En *C. kessleri*, el transportador de hexosas HUP1 y el transportador de galactosa HUP2 son co-inducidos cuando se agrega glucosa al medio (Stadler *et al.*, 1995). El gen para el transportador de sacarosa en remolacha (Chiou y Bush, 1998) se reprime por sacarosa, mientras que el gen para un transportador de sacarosa específico de células acompañantes de *Oryza sativa* (Matsukura *et al.*, 2000) es regulado positivamente por este mismo sustrato (Tabla 3). Sin embargo, la sacarosa es capaz de inducir genes implicados en la regulación fuente-demanda como el gen que codifica para la invertasa apoplástica de *Chenopodium rubrum* (Roitsh *et al.*, 1995) y otros genes relacionados con el transporte como las dos isoformas de ATPasa de protones en *Lycopersicon esculentum* (Mito *et al.*, 1996).

En el laboratorio se ha encontrado que el transportador de sacarosa se localiza preferentemente en el escutelo de embriones de maíz germinados; sin embargo, la exposición de los embriones a glucosa y fructosa produce un decremento en los niveles de los transcritos para el transportador, mientras que la sacarosa no produce un efecto activador ni represor (Greaves-Fernández, 2001) como se ha postulado que ocurre para el transportador en las hojas de betabel y de jitomate (Schultze *et al.*, 2000; Vaughn *et al.*, 2002).

TABLA III. Regulación por carbohidratos de algunos transportadores de carbohidratos.

Transportador	Especie	Tejido y/o estadio de desarrollo	Efactor probado		Referencia
			Glucosa	Sacarosa	
HXT1	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>		Induce su transcripción (60mM)	No probado, pero rafinosa y sorbitol no tienen efecto	Tomas-Cobos <i>et al.</i> , 2004.
VvHT1	<i>Vitis vinifera</i>		Induce su transcripción (56mM Glu)	Induce su transcripción (58 mM Sac)	Atanassova <i>et al.</i> , 2003
BvSUT1	<i>Beta vulgaris</i>	Hojas maduras (imbibición de los peciolo)	Sin efecto	Reprime su transcripción y traducción (25-250 mM)	Chiou y Bush 1998 Vaugh <i>et al.</i> , 2002
VfSUT1	<i>Vicia faba</i>	Embrión en desarrollo (imbibición)	Reprime su transcripción (150mM Glu)	Reprime su transcripción (150mM Sac)	Weber <i>et al.</i> 1998
OsSUT1	<i>Oriza sativa</i>	Embrión germinado en carbohidratos	Induce su transcripción (100mM Glu)	Induce su transcripción (100mM)	Matsukura <i>et al.</i> 2000
ZmSUT1	<i>Zea mays</i>	Germinación de embriones en carbohidratos	Induce su transcripción y traducción (100mM Glu)	Sin efecto	Greaves-Fernández, 2001 y Ramírez-

1.7.2. Interacción proteína-proteína

La actividad de varias proteínas es afectada o regulada a través de complejos macromoleculares. Estos consisten en homoligómeros o heteroligómeros, que en el caso del transportador de glucosa existe como dímeros de dímeros. En los últimos años la oligomerización se ha reportado para siete transportadores bacterianos de solutos (Veldhuis *et al.*, 2006). Un ejemplo es el transportador de glucosa que existe como dímero de dímeros (Hebert y Carruthers, 1992; Hamill *et al.* 1999).

Se ha sugerido que la subfamilia de transportadores de sacarosa SUT2/SUC3 podría participar como proteínas sensoras, ya que presentan una baja actividad de transporte, presentan un larga asa intracelular- que podría participar en la interacción de proteínas en el interior celular, como sucede con el transportador de glucosa en animales- (Barker *et al.*, 2000). Reinders y colaboradores (2002) encontraron que LeSUT2 co-localiza con los transportadores LeSUT1 y LeSUT4 en los elementos cribosos del floema de jitomate y demostraron que tenían el potencial de interactuar uno con otro para formar complejos oligoméricos. De manera similar, se ha sugerido para *Arabidopsis* que AtSUC2, AtSUT2 y AtSUT4 podrían encontrarse interactuando *in vivo* (Schulze *et al.*, 2003). Estos datos sugieren que la percepción del carbohidrato podría modular la interacción de los transportadores y así su actividad. No obstante, a la fecha no hay evidencias sólidas para la función de sensor de la subfamilia SUT2/SUC3 ni tampoco de la oligomerización *in vivo* de los transportadores de sacarosa.

1.7.3. Regulación por asociación con micorrizas

Para el transportador de hexosas de plantas se tienen dos reportes en los que se ha encontrado que la colonización de las raíces de *Medicago trunculata* por la micorriza *G. yersiforme* induce la expresión del transportador MtST1 en las zonas que se encuentran altamente colonizadas por el hongo (Harrison, 1996). Mientras que LeST3 de jitomate se induce en las hojas y no en las raíces que fueron infectadas con *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* y *Phytophthora parasitica* (García-Rodríguez *et al.*, 2005). Lo anterior sugiere que el transporte de monosacáridos es importante para responder al incremento en la demanda de carbohidratos de las células colonizadas al alterarse su metabolismo de carbono.

1.8. Estrés en plantas

El estrés se define como cualquier factor biótico o abiótico que puede alterar significativamente un proceso fisiológico en el organismo afectado (Larcher, 1995).

En las plantas cualquier factor de estrés puede dar lugar a un complejo número de respuestas que comienzan con la percepción del mismo, seguido por las rutas de transducción de señales que se manifestarán en cambios a nivel celular, fisiológico y, consecuentemente, en el desarrollo de la planta. Esta serie de respuestas también va a depender de la severidad y duración del estrés, de la especie y genotipo de la planta, de su estado de desarrollo, del órgano vegetal y del tipo celular (Bray, 1997). En las plantas cultivadas estos factores de estrés reducen la producción y calidad de la cosecha. Poco se sabe acerca de cómo las plantas reconocen el estrés; sin embargo, evidencias considerables indican que la regulación de las respuestas de la planta al estrés involucra hormonas especialmente ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico, etileno, y segundos mensajeros como el Ca^{2+} (Buchanan, 2000).

1.8.1. Estrés hídrico

El agua constituye el 85-95% de la masa total de las plantas, por lo que al reducirse este porcentaje se ocasiona un estrés hídrico en la célula vegetal, alterando diversos procesos bioquímicos y fisiológicos (Taiz y Zeiger, 2002). Uno de los efectos de la restricción de agua en las plantas es la reducción del crecimiento, cuando el turgor celular se acerca a cero, el crecimiento se inhibe ya que el crecimiento depende del turgor celular. La presión del turgor en contra de la pared celular, es la fuerza que causa la expansión celular (Bray, 2001). Por lo tanto, se presenta una inhibición en la elongación de hojas y tallos cuando el potencial hídrico decrece por debajo de un umbral, esto varía dependiendo del órgano. Así, los órganos en desarrollo son muy afectados por la inhibición del intercambio fotosintético, así como por las modificaciones metabólicas frecuentemente asociadas con la osmorregulación (Pelleschi *et al.*, 1997).

La transpiración, que es la liberación de agua de la planta a través de los estomas, ocurre en condiciones de riego normales en las que el agua está disponible. Bajo condiciones de sequía en el campo, los contenidos de agua en el suelo disminuyen, se reduce el movimiento de agua en el interior de las células de las

raíces y el agua que se pierde a través de la transpiración no es reemplazada, causando una pérdida del turgor celular. Como una respuesta a la pérdida de agua, la transpiración decrece, el turgor celular disminuye en las células guarda que circundan al poro estomatal y las células cierran el poro (Bray, 2001). Sin embargo, aún es materia de debate si esta disminución de la turgencia de las hojas o la reducción del agua de suelo es la señal para cerrar el poro estomatal. Por ejemplo, al medir la cinética de cerrado del poro estomatal en un suelo en el que se controló el nivel de deshidratación, se encontró que el cerrado del poro está más relacionado con la cantidad de agua en el suelo que con la cantidad de agua en las hojas; es más, el poro comienza a cerrarse antes de que haya una disminución significativa del contenido hídrico de la hoja (Liang *et al.*, 1997).

La apertura y cierre de los estomas depende en gran medida de las concentraciones de la hormona ácido abscísico (ABA). La biosíntesis del ABA se incrementa en respuesta al déficit de agua. Los niveles del ABA se incrementan en todos los órganos de la planta, regulando importantes respuestas fisiológicas y moleculares al déficit de agua. Por ejemplo, la acumulación del ABA promueve la adaptación a la condición de déficit hídrico a través de la inducción de genes específicos (Bray, 2001).

Como los estomas se cierran parcialmente, la toma de CO₂ se ve también reducida y hay una disminución de la tasa fotosintética, (Keiser, 1987; Pelleschi *et al.*, 1997) que lleva a la consecuente disminución en la producción total de carbohidratos e influencia el reparto de carbohidratos; en este caso, la competencia por los carbohidratos ocurriría entre los diferentes tejidos demanda como raíces, flores o frutos.

1.8.2. Protección de las estructuras celulares

El déficit hídrico, el estrés salino y el frío, llevan a cambios en la osmolaridad celular, la respuesta de la planta a estas diferentes formas de estrés osmótico es la producción de solutos compatibles que generalmente son moléculas orgánicas

solubles, de bajo peso molecular; que a altas concentraciones intracelulares no interfieren con las reacciones bioquímicas habituales. Pocos son los compuestos considerados como solutos compatibles y se pueden dividir en dos grupos: el primero formado por carbohidratos y polioles y el segundo por α - y β -aminoácidos y sus derivados, incluyendo a las metilaminas. La función de estos solutos es la de actuar como reguladores osmóticos, estabilizadores de macromoléculas y/o antioxidantes (Nuccio *et al.*, 1999).

Los carbohidratos solubles son algunos de los solutos que se han encontrado como osmoprotectores -dentro de ellos la sacarosa y algunos oligosacáridos de la familia de la rafinosa- estos son capaces de interactuar con las cabezas polares de los fosfolípidos, reemplazando a las moléculas de agua ayudando a mantener la integridad de la membrana durante la desecación. Adicionalmente, un alto contenido de carbohidratos, puede en algunos casos, llevar a la formación del estado vítreo en el citoplasma de las células deshidratadas, mejorando la estabilidad estructural y minimizando la desnaturalización de proteínas (Crowe *et al.*, 1988)

Se han realizado esfuerzos en los últimos 20 años tratando de producir plantas que toleren mejor a la sequía, haciendo que produzcan, altos niveles de alguno de estos compuestos: prolina, manitol, trehalosa, sorbitol y glicina-betaína. Sin embargo, en algunos casos, el aumento en su biosíntesis produce efectos secundarios indeseables en el fenotipo de las plantas, en general disminuye el crecimiento de la planta o deforma el crecimiento de las hojas (Nuccio *et al.*, 1999), por lo que aún son necesarios más estudios sobre el metabolismo en general de las plantas sometidas a estrés, y sobre los factores que sustentan la resistencia o tolerancia a este y sobre las estrategias genéticas que subyacen a los fenotipos con tolerancia al estrés (Cushman y Bohnert, 2000).

1.9. Metabolismo de carbono durante el estrés

El intercambio gaseoso en las hojas se afecta significativamente durante el estrés hídrico, esta reducción es la principal causa del decremento en la velocidad fotosintética, ya que tanto las reacciones fotoquímicas como los intermediarios de la fase reductiva del ciclo de Calvin permanecen inalterados (Quick *et al.*, 1989). La actividad de la RUBISCO, disminuye solo en condiciones de estrés severo en maíz (<-1.2MPa). Mientras que Vasey y Sharkey (1989) observaron que la SPS se inhibe cuando hay una reducción del CO₂ disponible para la célula, pero 5h de exposición a 1% de CO₂ permite que la SPS regrese a sus valores normales de actividad. Estos datos han mostrado que la actividad fotosintética tiene una alta resistencia al estrés hídrico; sin embargo, el estrés es capaz de modificar la concentración de sus carbohidratos totales.

En cuanto a las alteraciones metabólicas que ocurren entre los tejidos que sintetizan sacarosa y aquellos que la demandan es muy variada. Por ejemplo, en maíz se ha encontrado un incremento del 42% en los carbohidratos totales cuando se expone el maíz a estrés, pero al medir el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa, como representantes mayoritarios de los carbohidratos solubles totales, hay plantas que inducen el contenido de los tres carbohidratos, mientras que en algunos casos sólo aumenta la sacarosa y en otros sólo las hexosas. El estrés hídrico generalmente induce cambios en el índice hexosas/sacarosa y, frecuentemente, este índice está asociado con la hidrólisis del almidón. Se ha propuesto que este cambio en el reparto de carbono puede contribuir a regular la osmolaridad celular, además de ayudar a que las estructuras celulares se preserven a bajos contenidos de agua (Bohnert *et al.*, 1995).

Por ejemplo, la sacarosa podría tener un papel en el reemplazo de moléculas de agua para mantener la membrana fosfolipídica en su fase líquida cristalina y para prevenir cambios estructurales en proteínas solubles. Sin embargo, el papel de glucosa y fructosa en los mecanismos adaptativos es muy controversial (Kerepesia y Galibab, 2000).

Por otro lado, además de los efectos en el metabolismo celular, se ha observado que durante el estrés hídrico la expresión de varios tipos de genes. Un grupo de estos genes es el que constituye a la familia de genes *lea* “late embryogenesis abundant”, que primero se identificaron como genes que aparecen durante las fases de maduración y desecación durante el desarrollo de las semillas (Barker *et al.*, 1988). Las proteínas LEA generalmente son muy hidrofílicas y su expresión se ha propuesto que juega un papel en la protección y en el ajuste osmótico. También hay otros genes que se expresan durante el estrés hídrico como: genes involucrados en los dos tipos de mecanismos de degradación de proteínas (proteasas y ubiquitina); así como genes potencialmente involucrados en regulación y señalización como proteínas cinasas, proteínas nucleares y proteínas de unión a RNA (Cushman y Bohnert, 2000).

Por ejemplo, en *Arabidopsis* la función precisa de aproximadamente la mitad de todos los genes, que predice su genoma no son conocidos, por lo que su variación por efecto del estrés hídrico, no se le puede adjudicar función. En el caso del aumento en la expresión de los genes para las proteínas *LEA* es probable que tenga que ver con el papel protector de estas proteínas sobre otros componentes proteicos, no obstante su función aún se desconoce del todo.

2. Justificación

La capacidad de las plantas para acumular el carbono asimilado es función de su capacidad fotosintética y de la capacidad de distribución de la sacarosa entre sus diferentes tejidos, es decir, la fuerza de demanda de un tejido (Sonnewald 1997). Según Boyer (1982), en la naturaleza, esta capacidad depende de la habilidad de las plantas de mantener constante la acumulación de biomasa durante períodos de estrés. Por lo tanto, la distribución del carbono juega un papel importante en la integración de las respuestas de la planta al estrés, incluyendo el mantenimiento de la translocación en el floema y la dirección del transporte de los carbohidratos. Estos no provienen únicamente de la asimilación inmediata del carbono, sino de la movilización de las reservas almacenadas, como el almidón (Geiger y Servaites 1994). El estrés hídrico puede inducir alteraciones en las relaciones fuente-demanda, cambios metabólicos y de transporte. Si el estrés hídrico continúa por un periodo de tiempo prolongado, tendrá como consecuencia la reducción en el crecimiento de la planta, llevando a pérdidas considerables en su desarrollo y productividad.

A pesar de que es de suma importancia el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan el reparto de carbohidratos, no se tiene información sobre cómo el cambio en los niveles de los carbohidratos puede modificar diferentes señales metabólicas. En particular, el movimiento de carbohidratos a través de los múltiples sistemas de transporte de azúcares que se encuentran localizados en las diferentes membranas. Por todo lo anterior, el estrés hídrico se utilizó en el presente trabajo como herramienta experimental para analizar la expresión de los transportadores de carbohidratos cuando las concentraciones de carbohidratos solubles se han modificado de manera fisiológica para contender con el estrés, en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

2.1. Hipótesis

Si durante el estrés hídrico se altera la distribución de carbohidratos en tejidos fuente y demanda, entonces, la expresión de los transportadores de sacarosa y hexosas cambiará en cada tipo de tejido.

2.2. Objetivo general

Determinar el efecto del estrés hídrico en plantas de jitomate sobre el crecimiento, contenido de carbohidratos y la expresión de sus transportadores en raíz y folíolos.

2.3. Objetivos particulares

1. Establecer un modelo reproducible de estrés hídrico en plantas de jitomate.
2. Evaluar parámetros fisiológicos de las plantas control y sometidas a estrés.
3. Determinar el contenido de diferentes carbohidratos: glucosa, fructosa, sacarosa y almidón, en hojas y raíces de plantas de jitomate control y sometidas a estrés hídrico.
4. Determinar los perfiles de expresión de los transportadores de carbohidratos (hexosas y sacarosa).
5. Analizar la posible relación entre los niveles de los transportadores de azúcares y los cambios en los contenidos de carbohidratos en los dos tejidos estudiados.

3. Materiales y métodos

3.1. Crecimiento y establecimiento de déficit hídrico

Se sembraron semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* L. Var. Río Grande de la compañía Sun Seeds, Parma, CA. USA) en una mezcla 2:1 de tierra de hojas y agrolita, luego de dos semanas de desarrollo se transplantaron 2 plántulas de jitomate en macetas de 6 L que contenían la misma mezcla. Las plantas se mantuvieron bajo riego y después de 81 días de la germinación, se inició el tratamiento de déficit hídrico, las plantas control se regaron a capacidad de campo (cc, volumen necesario para saturar la tierra en la que la planta se encuentra sembrada) y las plantas bajo estrés a 1/8 cc, manteniendo estas condiciones durante 17 días. Cada dos días se colectaron los folíolos (ver Figura 6), el tallo y las raíces, los tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

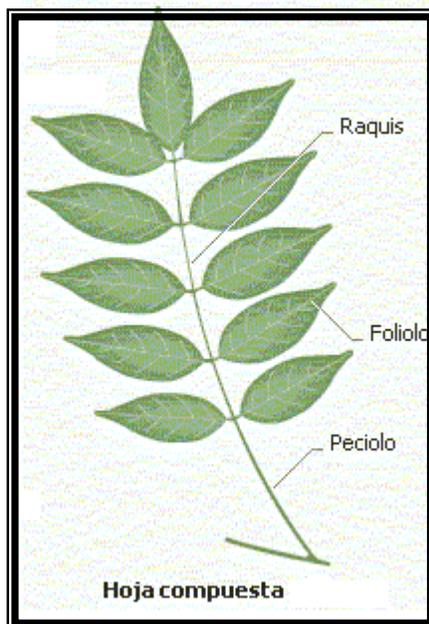


Figura 6. Estructura de una hoja compuesta. El jitomate presenta hojas compuestas, es decir aunque pareciera que esta formada por un grupo abundante de hojas, estas parten de una sola yema denominada pecíolo, así que los brotes del pecíolo se denominan folíolos (Moreno, 1984).

3.2. Determinación de acumulación de biomasa, la talla de planta y número de folíolos

Para conocer cual era el efecto en el peso, talla y número de folíolos de las plantas estresadas, se colectaron los tejidos y se les midió la altura, y se contó el número de folíolos por planta. Se pesaron los folíolos y raíces, en una balanza analítica. Parte de este material se seco en un horno a 60°C con vacío por 72 h (Sánchez-Nieto *et al.*, 1998). Se obtuvo el peso seco por diferencia de pesos, entre el húmedo y el seco, expresándose en porcentaje respecto al peso seco.

3.3. Determinación de conductancia estomática, % de humedad relativa, transpiración

Se conoce que el estrés hídrico modifica la apertura estomatal de las hojas, por lo que, una vez iniciado el estrés hídrico y que los folíolos de las plantas alcanzaron un diámetro aproximado de 2 cm, se determinaron los niveles de conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2}/\text{s}$), humedad relativa (%) y transpiración ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 7 plantas control, y 7 plantas tratamiento utilizando un porómetro (Licor Modelo LI-1600) las mediciones se realizaron a lo largo del tratamiento siempre en el mismo folíolo.

El procedimiento para realizar las mediciones de conductancia estomática consistió en introducir en la celda de lectura del porómetro el folíolo presente en la quinta hoja de la planta de jitomate, el cual se prensó por espacio de 20 segundos, mientras la irradiación de la luz era alta (alrededor de 1000 quanta), se liberó el folíolo y entonces se tomaron las lecturas, la mayoría de las mediciones se hicieron alrededor de las 12:00 PM.

3.4. Extracción de carbohidratos

Se determinaron los contenidos de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en plantas control y sometidas a estrés, para determinar si el reparto de carbohidratos se estaba modificando durante el estrés hídrico. Para ello se pesaron 0.2 g de tejido y se añadió 1 mL de etanol al 80% en ebullición, seguido por una extracción

con 1 mL de agua, se mezclaron ambas fracciones, el extracto se centrifugó a velocidad máxima 14000 rpm, en una centrífuga IEC Micro-MB (Internacional Equipment Company) por dos minutos. El sobrenadante se colocó en un tubo de vidrio y se evaporó el disolvente en un bloque de calentamiento a 60°C. El extracto se reconstituyó en 500µL de agua desionizada y los niveles de glucosa y fructosa se determinaron mediante una técnica enzimática.

El botón obtenido de la centrifugación anterior se resuspendió en 1 mL de agua y se calentó a 90°C durante 4 h, posteriormente, se usó para la determinación de almidón. Un volumen del almidón ya gelatinizado se mezcló con 1 volumen de 14 mg/ml aminoglucosidasa de *Rhizopus* (Fluka, No. Catalogo 2328772) disuelta en amortiguador de acetatos 0.2 M, pH 4.5, la mezcla se incubó toda la noche a 37°C en agitación, después se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos (Padilla-Chacon, 2004). El sobrenadante se usó para medir glucosa proveniente de la hidrólisis de almidón mediante el ensayo enzimático.

3.5. Determinación del contenido de glucosa, fructosa y sacarosa mediante un método enzimático

Se modificó el protocolo de determinación de fructosa del kit de SIGMA (número de catálogo FA-20), con el propósito de determinar no sólo las concentraciones de fructosa, sino también las de glucosa y además, incrementar el número de determinaciones que con el kit se podían realizar. Los volúmenes se redujeron 10 veces por lo que en lugar de 20 determinaciones que originalmente el kit ofrecía ahora se pueden realizar 200 determinaciones en volúmenes pequeños de 214 µl, y que pueden leerse en un lector de ELISA. En la Figura 7, se muestra la curva que se obtuvo con el método optimizado.

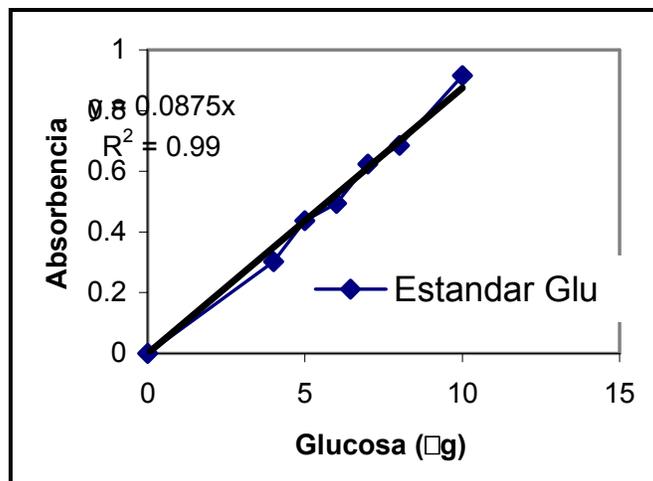


Figura 7. Curva estándar de glucosa. Se muestra la curva de glucosa que se produce cuando se realiza una determinación con el método optimizado.

El fundamento para la determinación es el siguiente: para determinar glucosa y/o fructosa, la muestra problema (12 µL de volumen máximo) se pone en contacto con 200 µL de una mezcla enzimática que contiene a la hexocinasa (1 U/mL) y a la glucosa-6P deshidrogenasa (1 U/mL) (G6PDH), al dejar transcurrir la reacción por 20 minutos a 25°C tanto la glucosa como la fructosa se fosforilan y sólo la Glucosa-6P es usada por la G6PDH, los productos de la reacción de oxidación son 6-fosfogluconato y una cantidad equimolar de NAD^+ es reducida a NADH^+ , se lee a 340 nm, por lo que la diferencia entre el blanco y la muestra nos da un incremento en la absorbancia a 340 nm el cual es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

Después de la primera lectura, se le añade al mismo pozo de reacción 2 µL de la enzima glucosa-6P isomerasa (600 U/mL), la cual cataliza la conversión de la fructosa-6P (que no reaccionó en el paso anterior) en glucosa-6P y entonces la G6PDH ya puede usar este sustrato; se hace una segunda lectura y ahora el incremento en absorbancia a 340 nm corresponde a la concentración de fructosa. Las determinaciones de fructosa y glucosa para cada muestra de los diferentes tejidos y tiempos se realizaron por cuadruplicado, por planta en tres diferentes lotes de plantas.

Para la determinación enzimática de sacarosa utilizando este kit, primero se tiene que realizar un primer paso que es la hidrólisis de la sacarosa, esto se logra adicionando invertasa de levadura, para la optimización de la metodología se probaron varias condiciones como diferentes concentraciones de invertasa: 0.8, 1.1 y 1.44U, y tiempo de reacción (0.5, 1, 1.5 y 2 h), para producir la hidrólisis total de la sacarosa. Las condiciones óptimas fueron incubar 1.1 U de invertasa a 37°C por 2 h con lo que se obtenía entre un 88 y 90 % de hidrólisis de una solución madre de sacarosa y el contenido de sacarosa se determinó como glucosa por el método enzimático ya descrito.

3.6. Obtención de la fracción microsomal

Para determinar si el estrés hídrico modifica la expresión de los transportadores de sacarosa y hexosas en tejidos fuente (hojas) y demanda (raíces), se obtuvieron las fracciones microsomales de dichos tejidos, se cuantificaron las proteínas y se determinaron los niveles de transportador de hexosas y sacarosa mediante inmunoréplica tipo Western.

Se homogeneizaron con nitrógeno líquido 10 g de hojas y raíces tanto de las plantas control como de las plantas sometidas a estrés, se les añadió 20 mL de amortiguador de homogeneización (50 mM HEPES/KOH pH 7.5, 300 mM de Sacarosa, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) y se molieron en mortero con arena. El homogenizado se centrifugó a 1500 xg por 10 minutos a 4°C en la ultracentrífuga Optima TL Beckman con rotor TLA 100.4. Se eliminó la capa de grasa que quedó en la parte superior y se tomó con cuidado el sobrenadante. Éste se centrifugó a 13000 xg por 10 minutos. En este paso se eliminaron las mitocondrias que quedaron en el botón. Finalmente se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente, pero ahora a 100,000 xg durante 1.5 horas a 4°C para obtener la fracción microsomal, de esta centrifugación el botón se resuspendió en 150µL del amortiguador de homogeneización (Sánchez Nieto *et al.*, 1997)

3.7. Cuantificación de proteínas

Se siguió el protocolo de Ghosh *et al.*, (1988) brevemente, alícuotas de 1 μ l de una solución estándar (0.05 hasta 1 μ g/ μ L de albúmina de suero bovino disuelto con amortiguador de carga) y de los extractos de proteína se colocaron en papel Whatmann 3MM, las manchas se dejaron secar y se tiñeron con una solución de azul de Coomassie brillante R-250 0.2 % p/v, en 10 % de ácido acético, 50 % metanol, por 20 minutos. Después de secarse se determinó la cantidad de proteína en las manchas por comparación de las manchas de las muestras problema con respecto a la curva de albúmina ó por comparación mediante densitometría de las manchas en el programa Quantity one (Fluor S-TM Multimager Biorad).

3.8. Determinación de los niveles del transportador de sacarosa y hexosas mediante inmunoréplica tipo Western.

Se prepararon geles desnaturalizantes al 12 % de acrilamida según la técnica de Laemmli, 1970. Se cargaron los carriles con 30 μ g de proteína en amortiguador de muestra (0.35M Tris base, 5 % SDS, 0.16M DTT, 7.5 % glicerol, 0.4 % de azul de bromofenol) por duplicado para cada tiempo, se corrieron los geles utilizando amortiguador de corrida (0.25 M Tris base; 1.9M Glicina, 0.5 % SDS) a 10-15 mA hasta que el azul de bromofenol llegará al final del gel. Para visualizar las bandas de proteínas en el gel, estos se tiñeron con una solución de Azul de Coomassie R250 (0.125 % w/v) disuelto en metanol 50 % (v/v) y ácido acético 10 %, por 10 minutos.

Para transferir las proteínas a una membrana de fluoruro de polivilideno (PVDF), se utilizó el amortiguador de transferencia (0.1 M NaPO₄, pH 6.8, 0.5 % SDS, 20 % Metanol), la transferencia se llevo a cabo por 2 h a 25 V a temperatura ambiente en una cámara húmeda marca Hoefer.

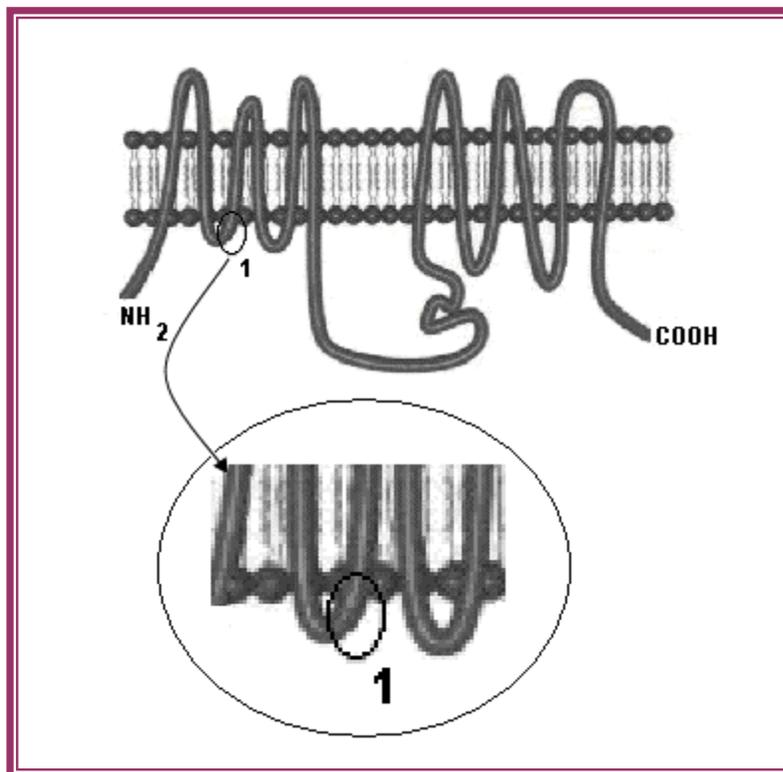


Figura 8. Caricatura del transportador de sacarosa de maíz y la localización de la secuencia que se usó para inmunizar a los conejos. El 1 indica la primer asa intracelular en donde se localiza la secuencia *TARWGRRPFILIGC* que se usó para inmunizar a los conejos (Zavala-Zendejas, 2001).

La detección del transportador de sacarosa se realizó utilizando un anticuerpo que reacciona con la secuencia **TARWGRRPFILIGC** que se encuentra en la primer asa intracelular del transportador de sacarosa de maíz (Zavala-Zendejas, 2001, Figura 8). El anticuerpo utilizado se inmovilizó mediante una columna de sefarosa CNBr y se purificaron siguiendo las instrucciones del fabricante (BIOSOURCE INTERNATIONAL, Quality Biochemicals. MA). La dilución del anticuerpo que se utilizó para detectar al transportador fue de 1:2000 en TTBS.

Para la detección del transportador de hexosas se utilizó un anticuerpo que reacciona con la secuencia **LGWLPSEIFPLEIRSAC**-KHL, el antígeno se diseñó a partir del alineamiento de varias secuencias para el transportador de hexosas en plantas (Figura 9), este anticuerpo fue producido en conejos por la compañía

Genescript Corporation, New Jersey, EU. El anticuerpo contra el transportador de hexosas se utilizó en una dilución 1:1000 por toda la noche.

El anticuerpo secundario que se utilizó fue un anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, la detección de las proteínas que reaccionaron con los anticuerpos primarios se realizó mediante una técnica luminiscente. La membrana de PVDF se colocó por 4 minutos en una solución que contenía: 10 ml de Tris-HCl 100mM pH 8.5, 17 μ l de peróxido de hidrógeno 2 %, 25 μ L de solución A (0.35 g ácido p-cumárico en 25 ml de DMSO) y 50 μ l solución B (1.1g de luminol en 25 ml de DMSO). Después, la membrana se colocó entre una bolsa de plástico y se eliminó el exceso de solución luminiscente y se le colocó una película fotográfica encima.

Las bandas que se revelaron en las placas fotográficas se digitalizaron en un escáner HPscanjet 3500c y se realizó la densitometría y el análisis de las mismas con el programa Quantity one (Fluor S-TM Multimager Biorad). La intensidad de las bandas detectadas con el anticuerpo se reporta en **Unidades de Densidad Óptica /mm²**. IE/C, corresponde al valor resultante de dividir el valor de la intensidad de la banda detectada en el estrés a un tiempo n, entre el valor detectado de intensidad del control a ese mismo tiempo.

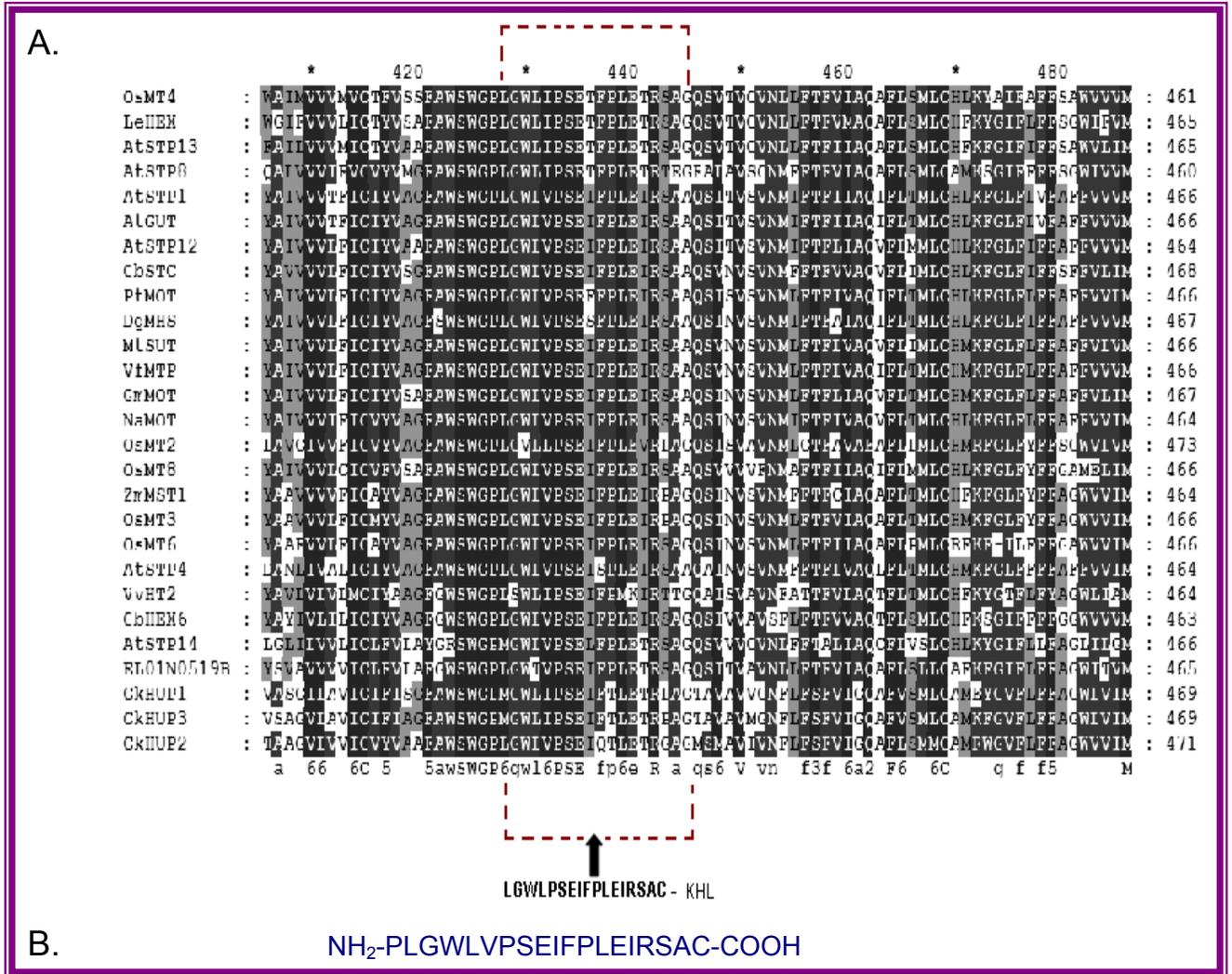


Figura 9. Alineamiento parcial de la zona consenso de los transportadores de hexosas de plantas y péptido que se diseñó para detectar al transportador de sacarosa de la membrana plasmática en maíz. A. Zona consenso. B. Péptido antigénico usado para obtener los anticuerpos contra el transportador de hexosas de la membrana plasmática. Las zonas con sombra en negro corresponden a una identidad del 100%, en todas las secuencias; las sombreadas en gris indican una presencia alta del aminoácido o de uno con una polaridad semejante en las diferentes secuencias.

4. Resultados

4.1. Optimización de las condiciones para establecer el estrés hídrico en las plantas de jitomate

Para establecer el efecto que el estrés hídrico produjo en el transporte de carbohidratos, se crecieron plantas de jitomate en condiciones óptimas de riego y temperatura, después se disminuyó la cantidad de agua de riego y se muestrearon las plantas durante diferentes tiempos, según se indica en la Figura 10. Para evaluar que el estrés hídrico se había establecido en las plantas de jitomate se registraron: el peso húmedo de folíolos, raíces y tallos así como la conductancia estomática, la transpiración y la humedad relativa de los folíolos maduros (Figura 11).

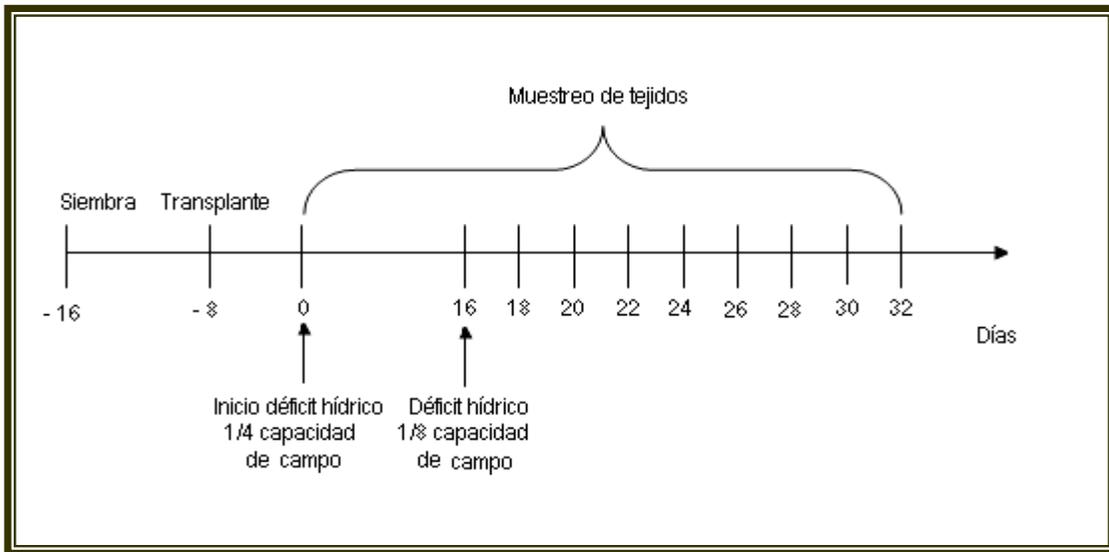


Figura 10. Primer esquema para el establecimiento del estrés hídrico en plantas de jitomate. Se indican los días de siembra de las semillas, el transplante de las plantas a macetas de 5 L de capacidad y el inicio del déficit o estrés hídrico, el cual se indica como día cero, para posteriormente comenzar con la cosecha de los tejidos.

Al inicio se sometieron las plantas a estrés hídrico reduciendo la cantidad de agua a $\frac{1}{4}$ de la cc. Como se observa no hubo un cambio en el peso húmedo tanto de folíolos, tallos y raíces bajo esta condición (Figura 11 A, B y C). Por lo que el estrés se acentuó, disminuyendo el riego a $\frac{1}{8}$ de la cc, encontrándose que a los dos días del establecimiento de esta nueva condición de estrés se pudo observar

una disminución de 1.3 veces en el peso húmedo en folíolos, tallos y raíces y las diferencias en pesos aumentaron conforme el periodo de estrés hídrico se hizo más largo (Figura 11).

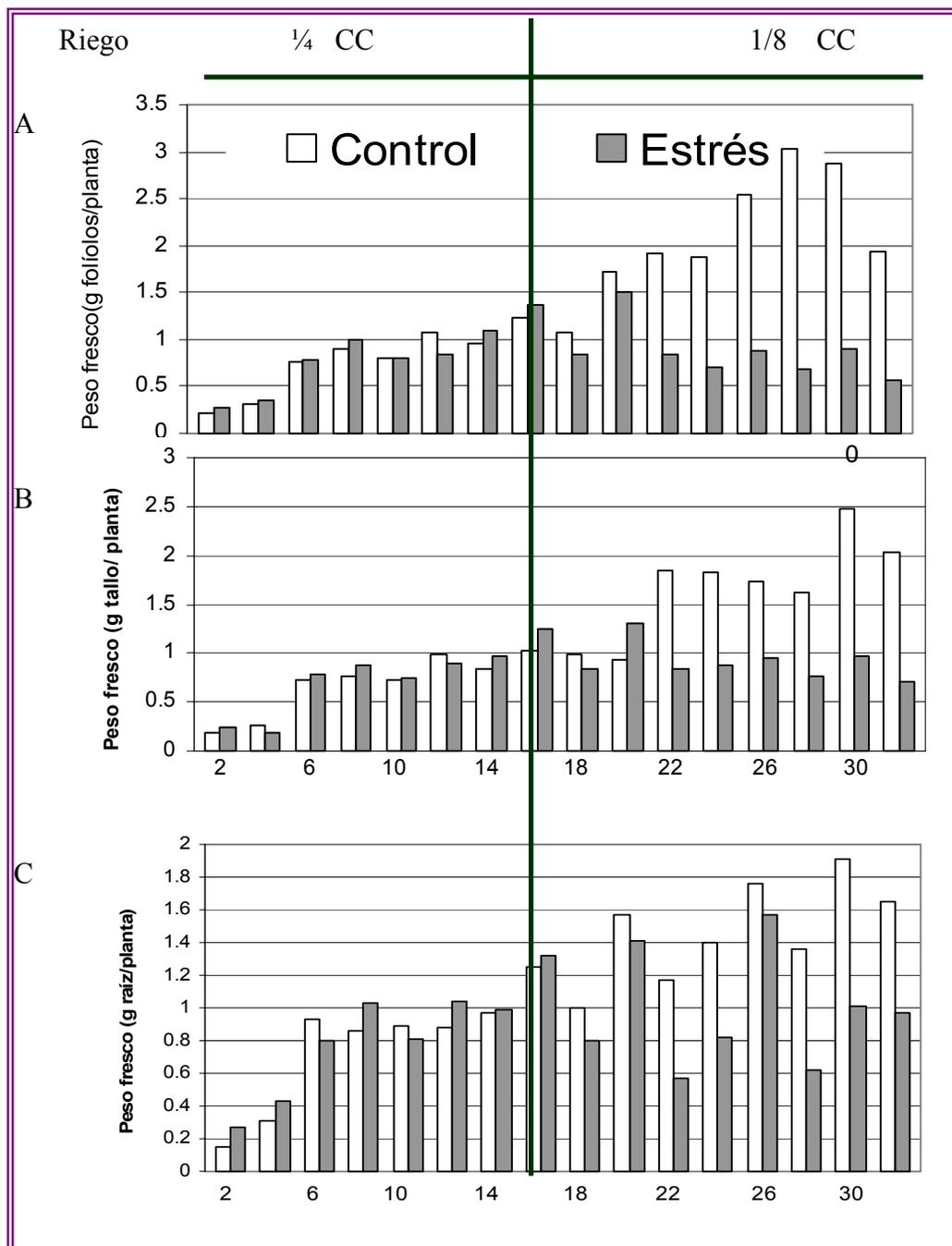


Figura 11. Efecto del estrés hídrico en el peso fresco de folíolos, tallos y raíces durante el riego a $\frac{1}{4}$ de la cc y después de la reducción a $\frac{1}{8}$ de la cc. Se siguió el cambio en el peso fresco de los tres diferentes tejidos, como no hubo cambios entre las plantas estrés y las control cuando se realizó el estrés hídrico a $\frac{1}{4}$ de la cc entonces disminuimos el riego para obtener $\frac{1}{8}$ de la cc. La línea separa ambos riegos.

Adicionalmente, a las determinaciones de pesos húmedos, se midieron la conductancia estomática, la transpiración y la humedad relativa. Los parámetros indicaron que el riego para alcanzar $\frac{1}{4}$ de la capacidad de campo no causó una diferencia significativa entre las plantas control y las sometidas a estrés hídrico al menos durante los primeros 15 días del estrés, pero al regar a $\frac{1}{8}$ de la capacidad de campo sí se observaron diferencias notorias (Tabla IV). Si se compara al octavo día, los folíolos de las plantas control con los folíolos de las plantas sometidas a estrés hídrico disminuyó 1.4 veces la humedad relativa, 2.5 veces la conductancia estomática y 2 veces la transpiración en los folíolos de las plantas en estrés hídrico.

Tabla IV. Efecto del estrés hídrico en la humedad relativa, la conductancia estomática y la transpiración. Determinaciones realizadas en 7 diferentes plantas por tiempo, según se detalló en materiales y métodos.

Riego a	Tiempo de Estrés (días)	Humedad relativa (%)		Conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Transpiración ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	
		Control	Estrés	Control	Estrés	Control	Estrés
$\frac{1}{4}$ CC	8	11.7 \pm 2.0	14.6 \pm 3.3	66.1 \pm 21	121.4 \pm 48.5	2.2 \pm 0.68	3.8 \pm 1.4
	9	16.5 \pm 3.3	17.0 \pm 3.4	141.0 \pm 49	146.2 \pm 51.6	5.6 \pm 1.1	5.5 \pm 1.9
	15	29.6 \pm 4.7	27.9 \pm 3.2	84.5 \pm 40.0	62.4 \pm 32.8	2.2 \pm 1.0	1.9 \pm 0.8
$\frac{1}{8}$ CC	16	33.8 \pm 5.3	31.3 \pm 2.6	28.6 \pm 16.0	19.3 \pm 5.5	0.77 \pm 0.4	0.56 \pm 0.2
	24	33.4 \pm 2.1	23.0 \pm 3.8	235.4 \pm 19.0	91.9 \pm 26.5	6.8 \pm 0.7	3.3 \pm 0.9
	25	34.1 \pm 3.1	24.1 \pm 2.4	216.1 \pm 45.8	84.9 \pm 19.1	6.4 \pm 0.8	3.1 \pm 0.7
	28	42.9 \pm 6.0	30.7 \pm 1.8	218.2 \pm 71.2	80.1 \pm 22.5	4.6 \pm 0.9	2.0 \pm 0.6

Por lo anterior, se decidió que en los siguientes experimentos, el riego de las plantas fuera a $\frac{1}{8}$ de la capacidad de campo, siguiendo el esquema que se muestra en la Figura 12.

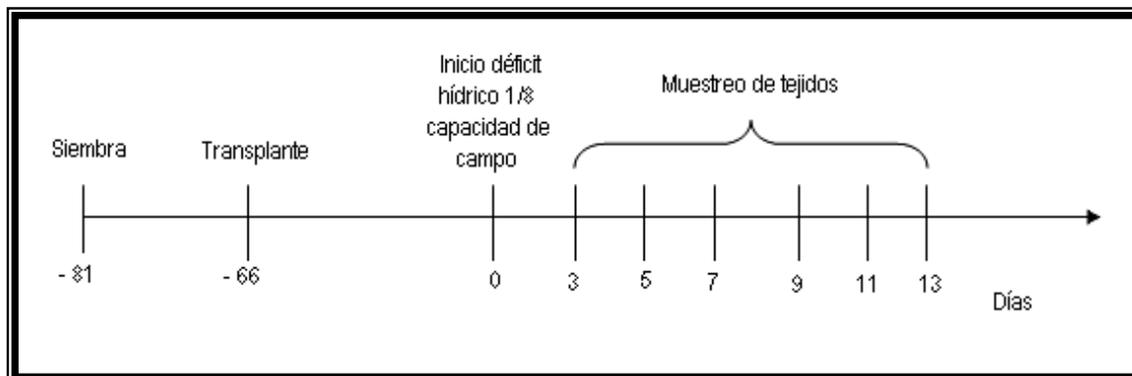


Figura 12. Esquema final para el establecimiento de estrés hídrico en plantas de jitomate. Las plantas se dejaron crecer por un periodo de 81 días y después se inició el tratamiento con déficit hídrico a 1/8 cc (día 0) y muestreando cada dos días.

4.2. Efecto del estrés hídrico en el fenotipo sobre las plantas de jitomate

Para monitorear el efecto del estrés hídrico en el fenotipo de las plantas de jitomate, se tomaron datos del aspecto que presentaron las plantas durante todo el periodo de tratamiento, para documentar los cambios en el aspecto de los folíolos y de las raíces.



Figura 13. Plantas de jitomate antes de iniciar el estrés hídrico. La fotografía muestra el aspecto que mostraron las plantas de jitomate al inicio del tratamiento (día 0).

Al comienzo del estrés hídrico las plantas presentaban el aspecto que se muestra en la Figura 13, folíolos turgentes verde brillante; sin embargo, conforme avanzó el desarrollo en condiciones de estrés hídrico éstas fueron cambiando; como se

muestra en la (Figura 15), las plantas sometidas a déficit hídrico fueron más pequeñas, el número de los folíolos ya no se incrementó (Figura 16) y el color ya no fue brillante y algunas se tornaron púrpuras (posiblemente por acumulación de antocianinas), como se observa en las Figura 14 las raíces de las plantas sometidas a estrés hídrico también cambiaron, fueron mucho más delgadas y con muchas ramificaciones.

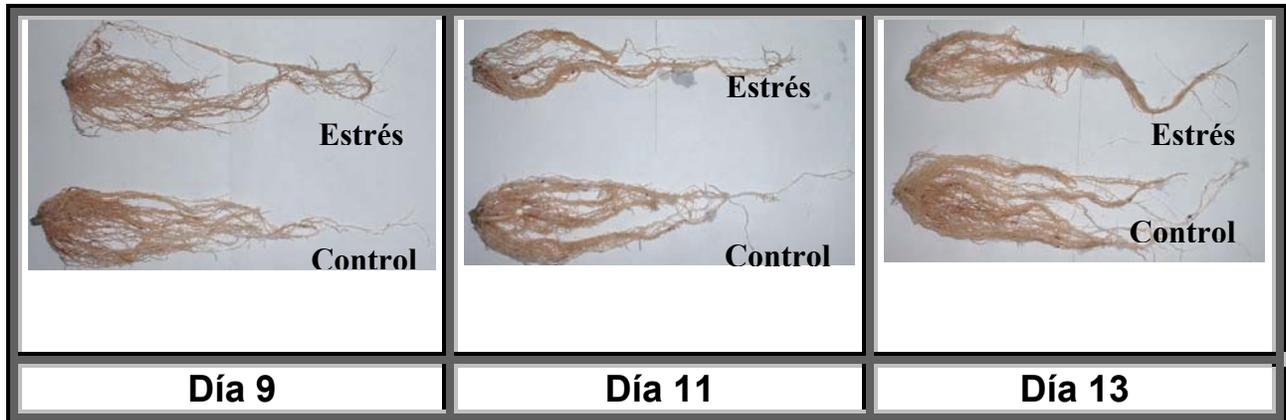
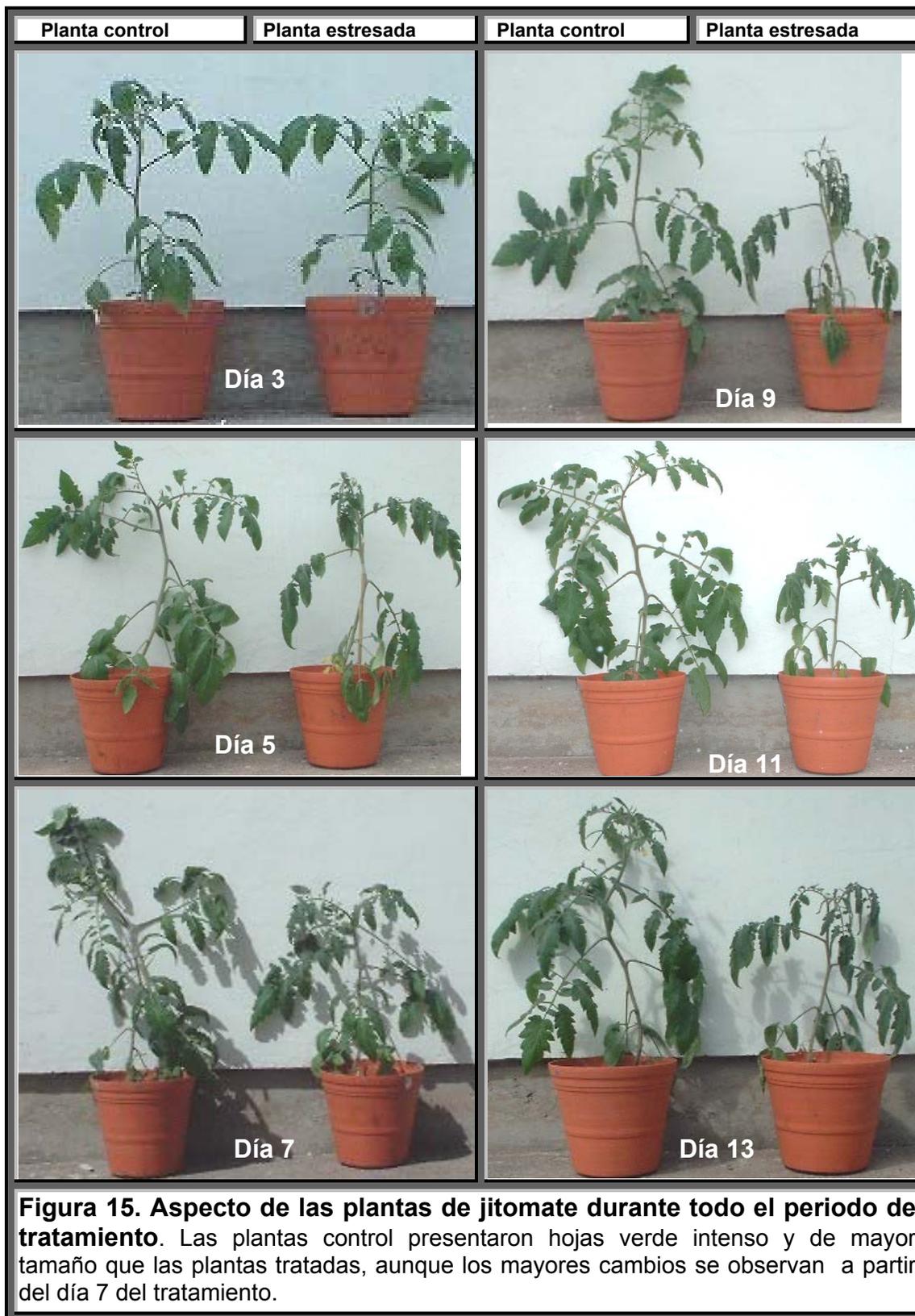


Figura 14. Aspecto de las raíces a diferentes días del tratamiento. Se muestra el aspecto que presentaron las raíces control y tratadas, en tres diferentes días de muestreo.



4.2.1. Número de folíolos de plantas control y con déficit hídrico

Debido a que observamos que estaban ocurriendo cambios visibles en las plantas de jitomate tratadas con déficit hídrico con respecto a las plantas control, decidimos contar el número de folíolos maduros y jóvenes por planta, durante todo el tratamiento.

Como se observa en la Figura 16 a partir del día 9 de iniciado el estrés hubo una diferencia de alrededor de dos veces en el número de folíolos jóvenes de las plantas sometidas a estrés hídrico comparadas con las plantas control y la diferencia se acentuó con el tiempo, probablemente debido a que las plantas en estrés no estaban formando más hojas jóvenes, el número de folíolos se mantuvo alrededor de 40 desde el día 5 días y hasta los 11 días de estrés hídrico.

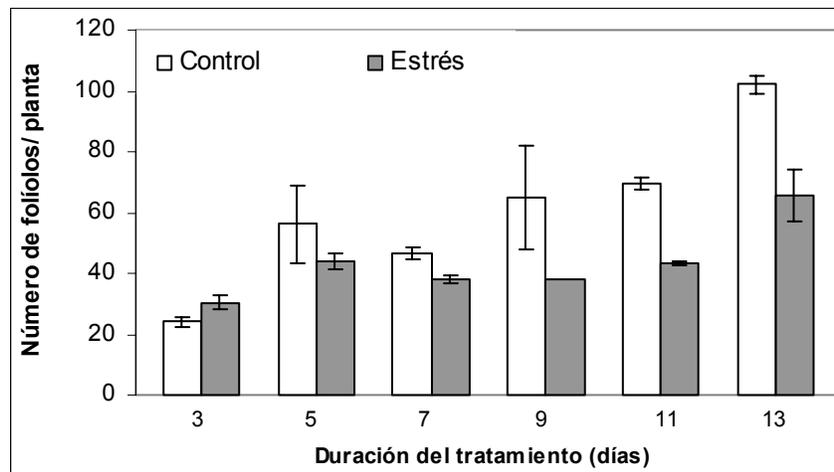


Figura 16. Número de folíolos jóvenes en plantas de jitomate control y sometidas a estrés hídrico. Se encontró que no hay un incremento en el número de folíolos jóvenes en las plantas sometidas a estrés $n=24$.

En contraste, no hubo diferencia entre el número promedio de folíolos maduros en las plantas control y sometidos a estrés hídrico en los primeros 9 días del tratamiento, oscilando entre las 40 y 60 folíolos y hasta los 11 días cuando comenzó a notarse que las folíolos maduros de las plantas estresadas no aumentaron en número (Figura 17).

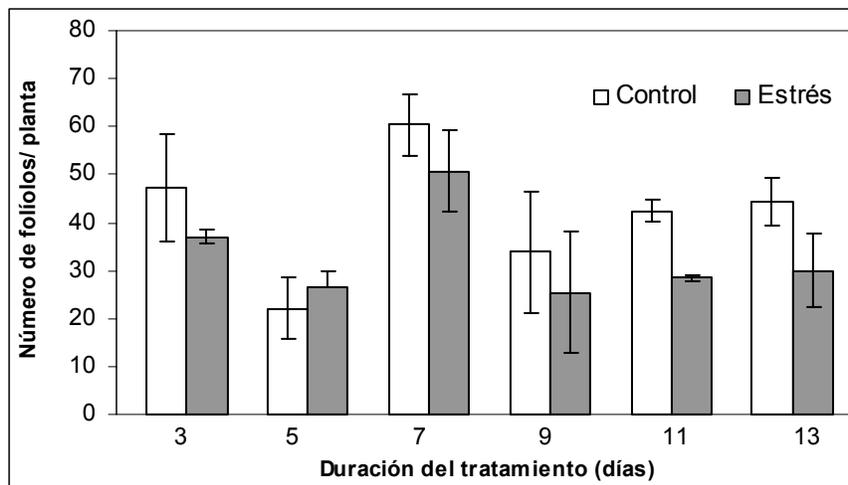


Figura 17. Número de folíolos maduros en plantas de jitomate control y plantas sometidas a estrés hídrico. El número de folíolos maduros en las plantas estresadas no cambio durante el tratamiento por lo que no se observaron diferencias en los folíolos de las plantas control.

4.2.2. Longitud de los tallos de las plantas control y con déficit hídrico

También se midió la longitud del tallo de las plantas control y sometidas a estrés hídrico, para registrar cuantitativamente los cambios en la talla de las plantas estresadas.

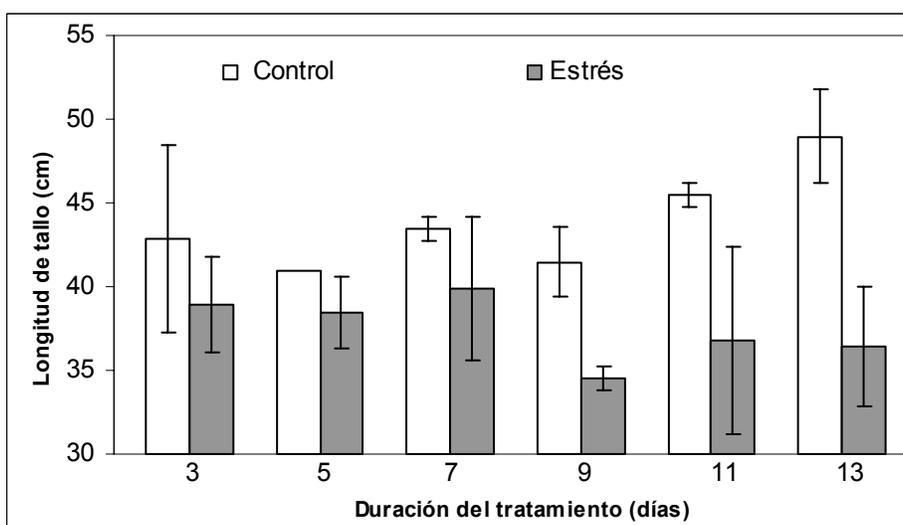


Figura 18. Longitud del tallo de plantas control y plantas sometidas a estrés hídrico. Los tallos de las plantas sometidas a estrés no aumentaron su tamaño durante el tratamiento. **N=36 plantas control y 36 plantas estresadas.**

Una diferencia entre las plantas control y las plantas estrés es que éstas últimas son más pequeñas. Es a partir de los nueve días de iniciado el estrés hídrico que



se observó una reducción en la tasa de crecimiento en el tamaño de las plantas estresadas, que mantuvieron una talla que oscila entre los 36 - 41 cm., mientras que las plantas control al día 13 presentaron 48 cm. de altura (Figura 18).

4.2.3. Efecto del estrés hídrico en el peso fresco y peso seco de la planta

Debido al claro decremento en el crecimiento de las plantas sometidas a estrés hídrico, determinamos el peso fresco y peso seco de los folíolos jóvenes, maduros, tallos y raíces tanto para plantas control como para las plantas estresadas.

A partir de los nueve días del establecimiento del estrés hídrico los folíolos maduros presentaron una disminución de alrededor de tres veces en el peso fresco con respecto a las folíolos maduros de las plantas control (Figura 19 A). Esta diferencia se mantuvo desde los 9 hasta los 13 días. Mientras, los folíolos jóvenes redujeron su peso fresco alrededor de dos veces con respecto a los folíolos jóvenes control (Figura 19 B), el peso húmedo de los folíolos jóvenes se mantuvo desde los 3 hasta los 13 días de duración del estrés hídrico.

Por otra parte, los tallos de las plantas sometidas a estrés hídrico presentaron una disminución a partir de los 9 días en el peso fresco con respecto al control, esta disminución fue de 2.2 veces a los 11 y a los 13 días del tratamiento. (Figura 19 C).

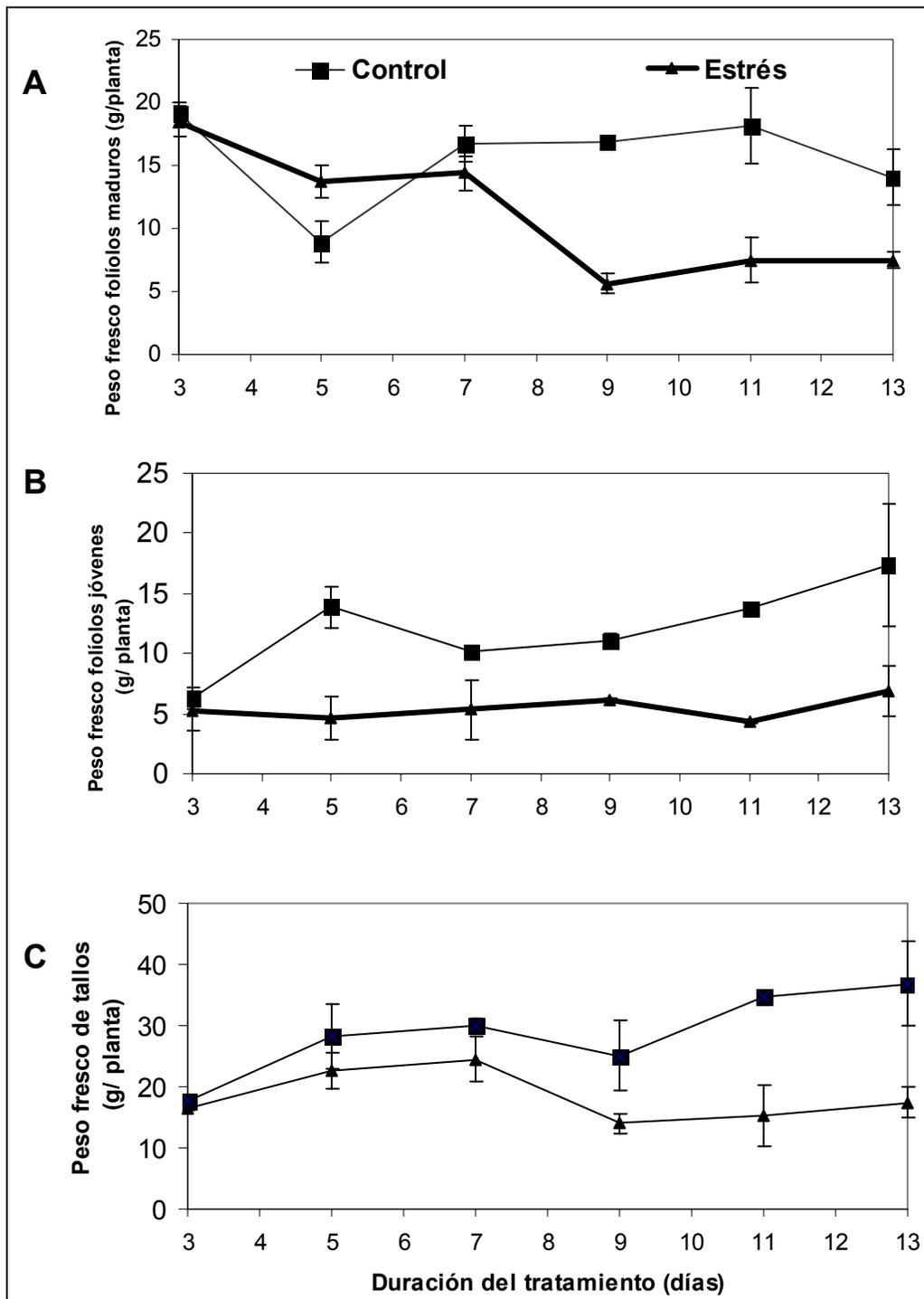


Figura 19. Peso fresco de la parte área de plantas de jitomate control y plantas sometidas a estrés hídrico por un periodo de 17 días. Los cambios en el peso fresco de los tejidos control y estrés fueron discretos para A) Folíolos maduros, B) Folíolos jóvenes y C) tallos. Los folíolos jóvenes presentaron las mayores diferencias y en tiempos tempranos en el peso húmedo en comparación con las hojas maduras en donde la diferencia se establece hasta el día 9, de igual forma ocurre con el peso de los tallos.

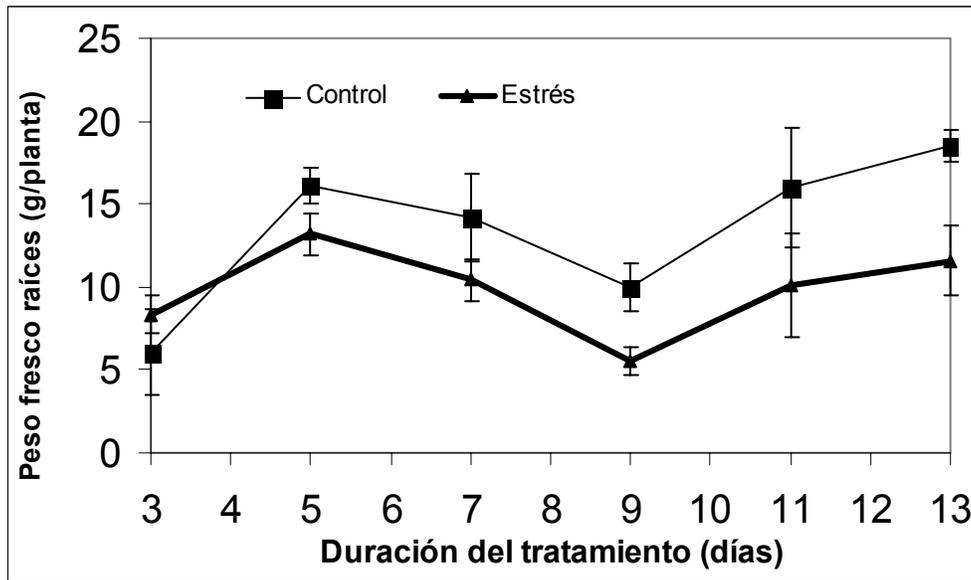


Figura 20. Peso fresco de raíces de plantas de jitomate control y plantas sometidas a estrés hídrico. No hubo un cambio importante en el peso fresco de las raíces de plantas sometidas a estrés respecto a las raíces provenientes del control.

Como se observa en la Figura 20 no hubo diferencias dramáticas en el peso fresco de las raíces de las plantas sometidas a estrés hídrico con respecto al control, excepto para los días 9 y 13; sin embargo, las raíces tienden a permanecer con un menor peso húmedo que las raíces de plantas control.

Por otra parte los pesos secos de folíolos y raíces tanto de plantas control como de las sometidas a estrés hídrico no presentaron cambios significativos durante los 13 días que se monitoreo como se muestra en la Figura 21.

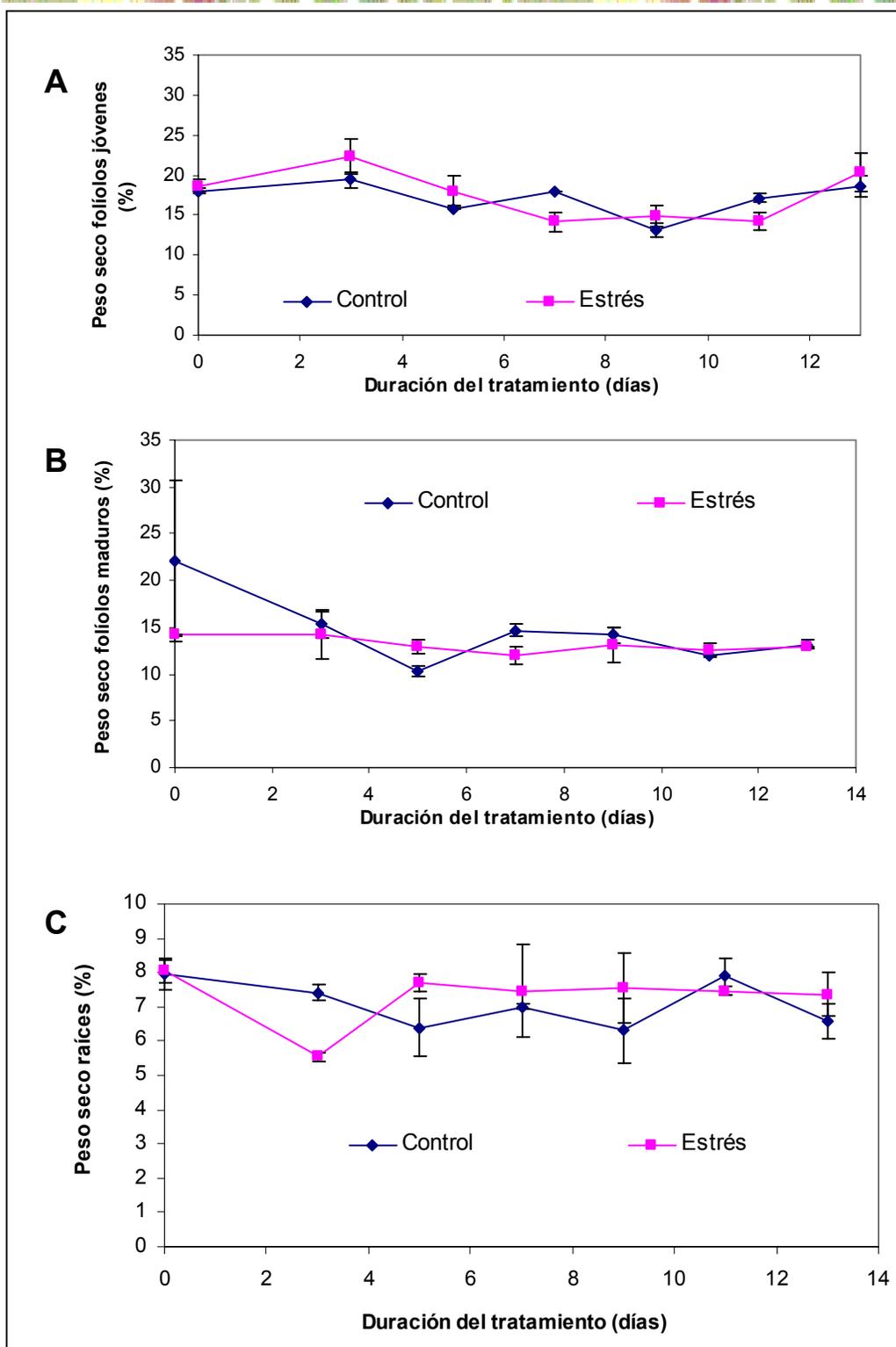


Figura 21. Peso seco de diferentes tejidos de plantas de jitomate sometidas a estrés hídrico. Peso seco de A) folíolos jóvenes, B) folíolos maduros y C) raíces durante el período de tratamiento. Aún cuando existieron diferencias en los pesos húmedos de los diferentes tejidos no se encontraron cambios en el peso seco entre los tejidos de las plantas control y de las sometidas a estrés.

4.3. Efecto del estrés hídrico en la conductancia estomática, la transpiración y la humedad relativa de los folíolos

Conociendo que el estrés hídrico induce un cierre parcial de los estomas para disminuir la pérdida de agua (Keiser, 1987), se determinaron algunos parámetros que nos indicaron el estado fisiológico de las plantas, como es la conductancia estomática, la humedad relativa de folíolo y la transpiración.

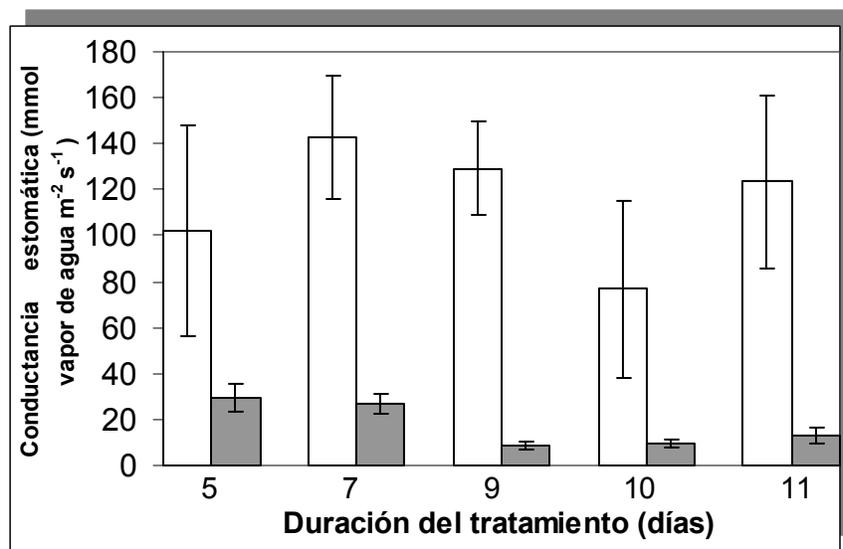


Figura 22. Efecto del estrés hídrico en los niveles de conductancia estomática en las plantas de jitomate. Se midió la conductancia estomática a partir del día 5 del tratamiento, encontrándose que desde ese tiempo hubo una disminución en la conductancia estomática de los folíolos de las plantas sometidas a estrés.

No se tienen datos de la conductancia estomática antes de los cinco días de estrés debido a que los folíolos no medían los 2 cm. de diámetro necesarios para cubrir la ventana del detector del porómetro. El estrés hídrico causó una disminución de 3.5 veces en los niveles de conductancia estomática desde los cinco días de iniciado el estrés, teniendo una diferencia de 11 veces al día 11 (Figura 22).

Estos resultados confirman que como respuesta al estrés hídrico hubo un cierre parcial de estomas, lo que llevaría a la disminución de la tasa fotosintética, por el decremento en la toma de CO₂ del medio, teniendo como consecuencia la alteración en el metabolismo de carbono en diferentes tejidos de la planta (Keiser, 1987).

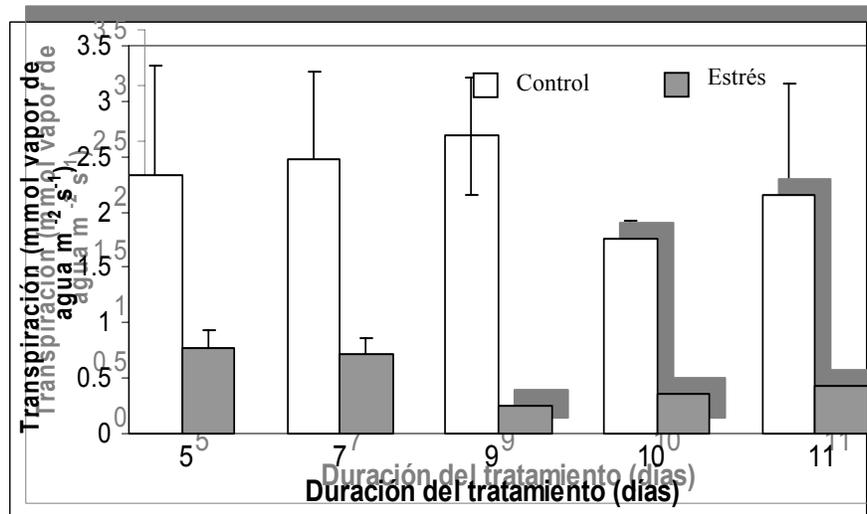


Figura 23. Efecto del estrés hídrico en los niveles de transpiración en plantas de jitomate. Desde el día 5 del tratamiento de estrés hídrico ya hay una disminución en la transpiración que se mantiene durante el período de tratamiento.

Una consecuencia del cierre de estomas es la disminución en la tasa de transpiración, lo anterior quedó confirmado, ya que desde el inicio del estrés hídrico los niveles de transpiración fueron 3 veces menores a los niveles que se detectaron en las plantas control al día 5 de estrés, y de 5.1 veces menos al día 11 de estrés (Figura 23).

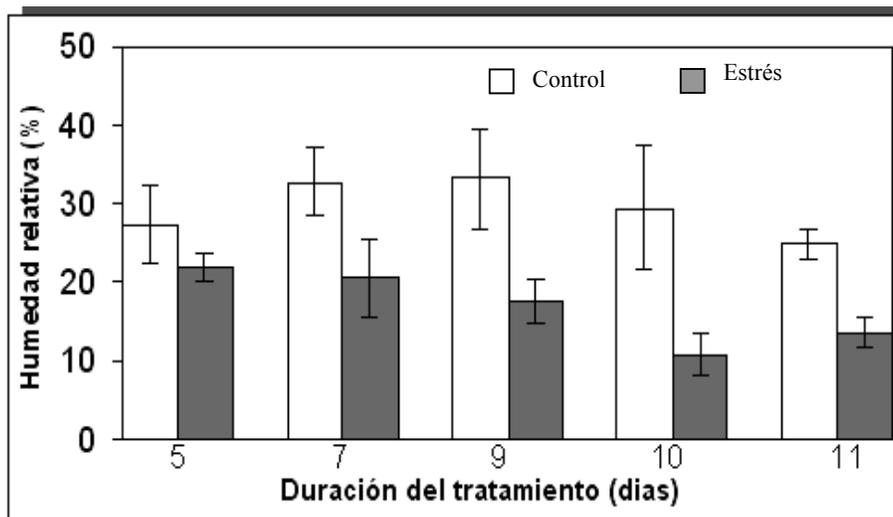


Figura 24. Efecto del estrés hídrico en los niveles de humedad relativa en plantas de jitomate. Al igual que la conductancia y la transpiración, la humedad relativa del área circundante a los folíolos disminuyó así encontramos valores por debajo de los de las plantas control durante el periodo de 5 a 11 días en las plantas sometidas a estrés.



La humedad relativa de la zona que circunda al folíolo disminuyó durante el periodo del estrés hídrico, siendo notoriamente diferente a partir de los 7 días con respecto a las plantas control (Figura 24).

4.4. Determinación de contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa en folíolos

Se encontró que las plantas sometidas a 1/8 de la capacidad de campo lograron sobrevivir, pero la reducción en el riego produjo un cierre parcial de estomas para reducir la pérdida de agua, teóricamente dicho cierre resultaría en un decremento en la toma de CO₂ y en una disminución en la tasa fotosintética, teniendo como consecuencia la alteración en el metabolismo del carbono en diferentes tejidos de la planta (Keiser, 1987). Para determinar si efectivamente hay un cambio en el metabolismo de carbono se midió el contenido de algunos carbohidratos en folíolos (tejido fuente) y en raíces (tejido demanda), para posteriormente, evaluar la posible alteración en los contenidos de los transportadores de carbohidratos en ambos tejidos.

En la Figura 25A se muestra que el estrés hídrico produjo un incremento en el contenido de glucosa en los folíolos maduros a los días 5, 11 y 13, aunque a niveles diferentes dependiendo de la duración del estrés. Por ejemplo, a los 5 días, este aumento en glucosa fue de 1.9 veces, mientras que a los 13 días el incremento fue de casi 4 veces con respecto al control en ese día.

Los niveles de fructosa en folíolos con déficit hídrico comenzaron a incrementarse a los cinco días del tratamiento de estrés (2.2 veces), este aumento se mantuvo hasta los trece días, pero a este tiempo la diferencia fue de 13.1 veces (Figura 25 B).

El aumento en glucosa y fructosa podría deberse a la hidrólisis de sacarosa; sin embargo, no es el caso ya que la sacarosa también está aumentando a los cinco y a los trece días, este incremento fue de alrededor de dos veces (Figura 25C). La acumulación de sacarosa es un proceso que puede deberse a una o varias de las

siguientes posibilidades: 1) a una síntesis incrementada de sacarosa, 2) a una disminución en su hidrólisis, o bien, 3) ó un deficiente transporte.

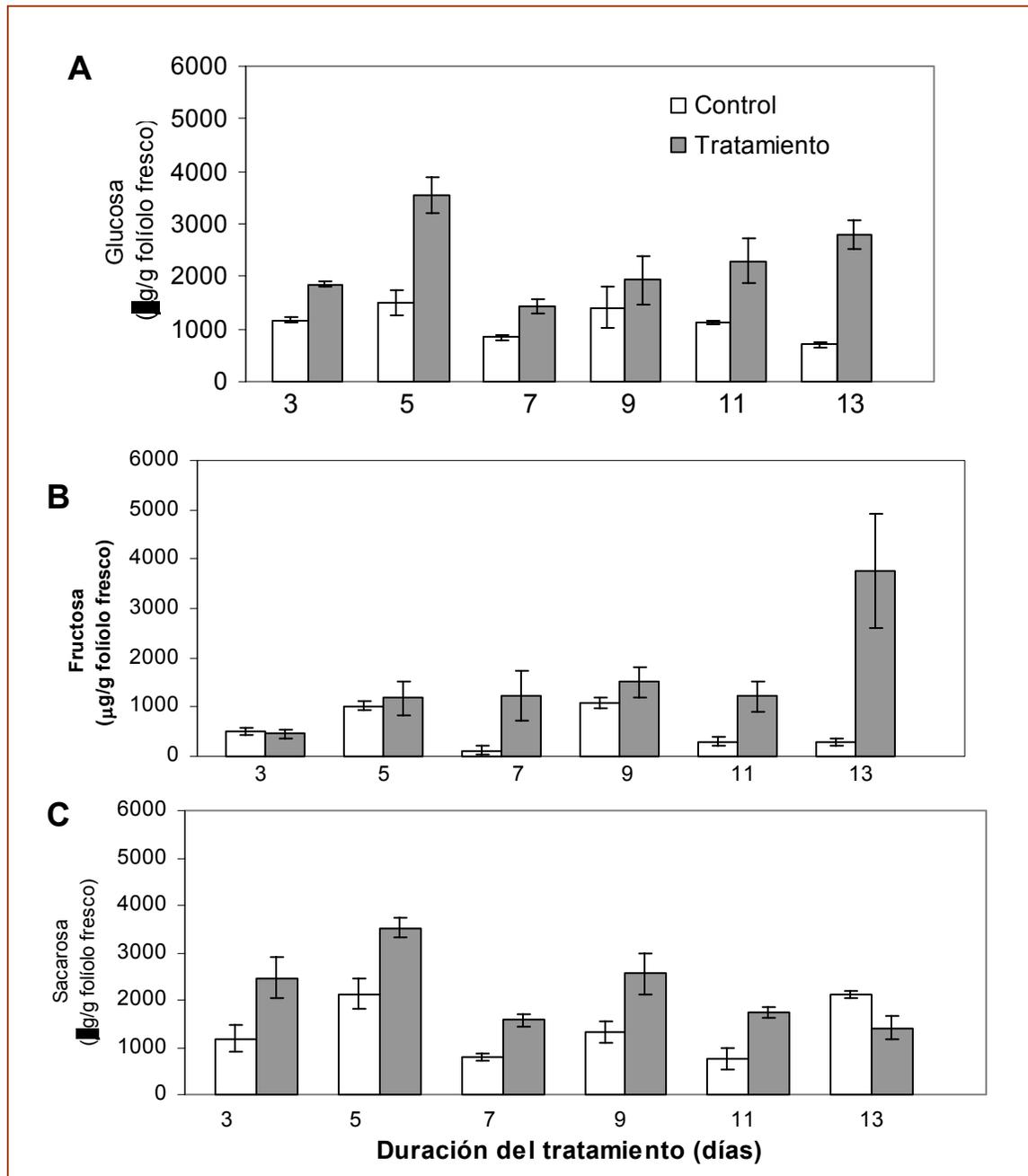


Figura 25. Efecto del estrés hídrico en los niveles de los carbohidratos solubles en folíolos de plantas de jitomate, control y sometidas a estrés. Niveles de carbohidratos en folíolos de plantas control y sometidas a estrés hídrico. A) Contenido de glucosa, B) fructosa y C) sacarosa. Se observa que la sacarosa se acumuló desde los 3 días del tratamiento, también se modificó el contenido de fructosa pero a partir del día 3 y la glucosa no cambió durante el tratamiento de estrés.

4.5. Determinación de contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa en raíces.

En cuanto al efecto del estrés hídrico en los contenidos de carbohidratos de un tejido demanda como las raíces, se encontró que desde el día 3 hubo un contenido incrementado de glucosa y se mantuvo a lo largo del estrés, la diferencia entre los niveles de glucosa en las raíces en estrés hídrico y las control se encuentra en un intervalo de 2.2-3 veces (Figura 26A). Este incremento en glucosa apareció dos días antes que al observado en los folíolos.

Por otra parte los niveles de fructosa permanecieron constantes desde el día 3 y durante los tiempos de estrés indicados, pero siempre por arriba de las plantas control, alrededor de 2-2.6 veces incrementada la fructosa. Al comparar estos datos con los de los folíolos, además de que se observó el incremento desde el día 3, el incremento en fructosa fue discreto (Figura 26B).

En cuanto al contenido de sacarosa en las raíces se observó que, contrario a lo que ocurrió en folíolos, las raíces no acumularon sacarosa, excepto por los días 11 en donde hubo un discreto aumento de sacarosa (Figura 26C).

En resumen, observamos que el metabolismo en folíolos y raíces fue diferente durante el estrés, los tres azúcares solubles ensayados en los folíolos aumentaron a partir del día 5, aunque este aumento no fue sostenido para la glucosa, mientras que en las raíces lo hacen desde el día 3 y solo la glucosa y fructosa aumentaron. La acumulación de ambas hexosas en las raíces fue menor que en los folíolos, esto es el incremento en hexosas se encontró en el intervalo de 1.5 a 3.5, mientras que en folíolos fue de 1.5 a 5.6 veces.

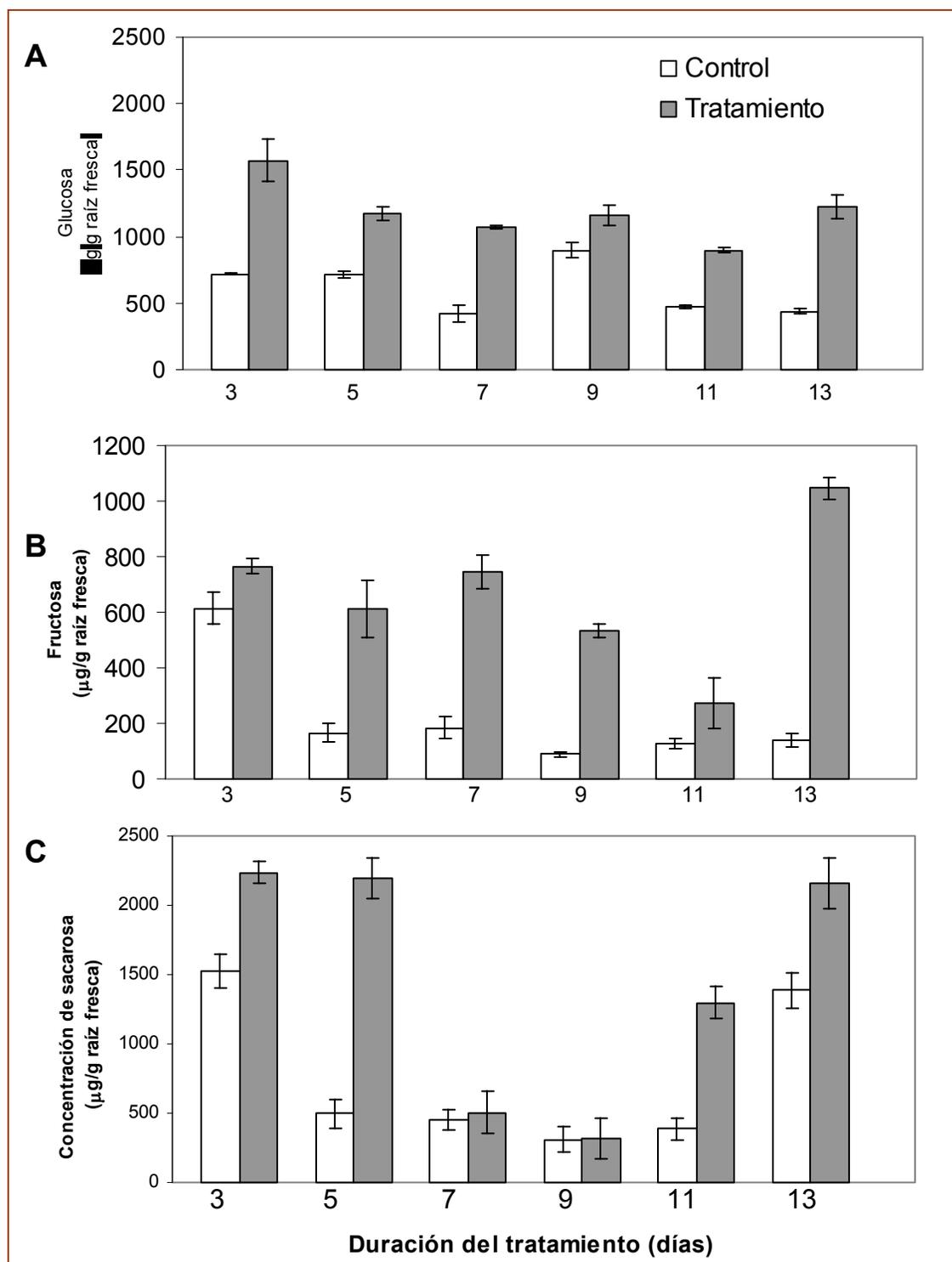


Figura 26. Efecto del estrés hídrico en los niveles de carbohidratos solubles en raíces de plantas de jitomate. Contenidos de carbohidratos en las raíces. A) Contenidos de glucosa, B) fructosa y C) sacarosa. La glucosa fue el carbohidrato que principalmente aumento por efecto del estrés hídrico, si bien sacarosa de manera transitoria también aumento en los días 3, 5, 11 y 13.

4.6. Determinación de contenidos de almidón en folíolos y raíces

Dado que se observó un aumento en los niveles de hexosas durante el estrés hídrico en los folíolos y raíces con respecto a los tejidos control, se exploró si el almidón era la fuente de estos cambios estuvieran ocurriendo.

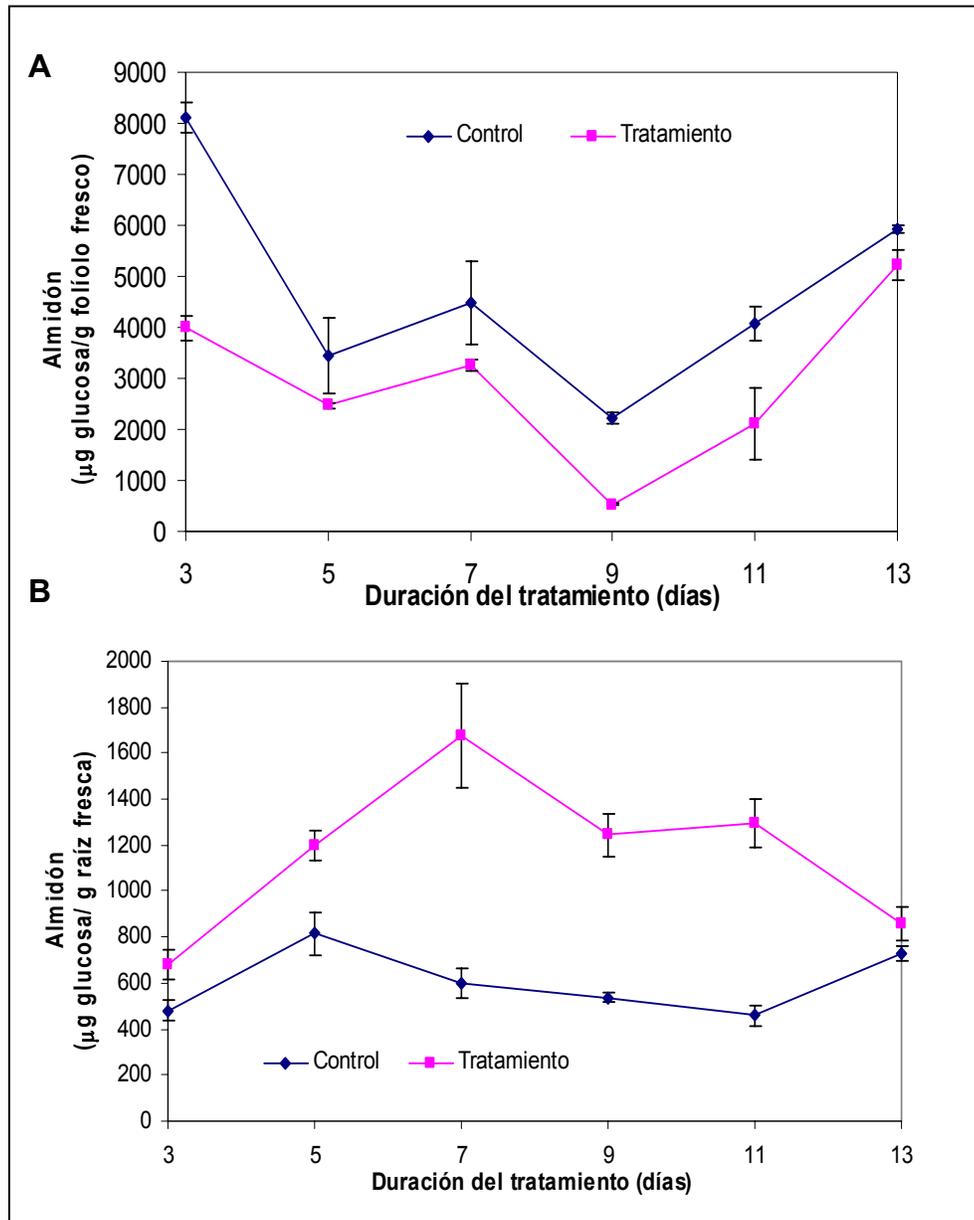


Figura 27. Niveles de almidón en folíolos y raíces de plantas de jitomate sometidas a estrés hídrico. A) Contenidos de almidón que se encontraron en los folíolos, B) Contenidos de almidón que se encontraron en las raíces.

Durante el estrés los niveles de almidón se redujeron en los folíolos, aún cuando la mayor diferencia se encontró al inicio del estrés, día 3 con una diferencia de 2.1



veces sin embargo se observó un comportamiento similar a las plantas control durante el período de tratamiento (Figura 27 A).

Es probable que la disminución que observamos de este carbohidrato se traduzca en un incremento en los azúcares solubles, la sacarosa es el principal producto de la fotosíntesis en las hojas verdes, en donde las triosas fosfato sintetizadas en el cloroplasto, son exportadas al citosol para la producción de hexosas y subsecuentemente para la producción de sacarosa. La sacarosa es el metabolito principal utilizado en el transporte a larga distancia en la mayoría de las plantas y en algunas otras como zanahoria, caña de azúcar etc., y se considera un compuesto de reserva (Buchanan *et al.*, 2000).

En las raíces se observó un menor contenido de almidón; el cual osciló entre 600 μg glucosa/g y 1200 μg glucosa/g de tejido fresco durante todo el periodo de estrés con respecto a los contenidos en los folíolos que llegan a ser de casi 3900 μg glucosa/g y 5000 μg glucosa/g de tejido fresco (Figura 27 B). Los contenidos de almidón en las raíces de las plantas sometidas a estrés hídrico está ligeramente por arriba de los contenidos de las plantas control.

4.7. Efecto del estrés hídrico en los niveles de expresión de los transportadores de sacarosa y hexosas en hojas maduras

Debido a que se ha propuesto que los carbohidratos pueden modificar la expresión de sus transportadores, se decidió medir si durante el estrés hídrico, los niveles de estos habían cambiado. Se obtuvieron las fracciones microsomales de hojas y raíces y se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida SDS y se tiñeron las proteínas con azul de Comassie, ó bien se transfirieron a una membrana de PVDF, para detectar en ella al transportador de sacarosa ó hexosas usando los anticuerpos específicos.

Se logró detectar una banda de 58 kDa con el anticuerpo contra el transportador de sacarosa (Figura 28A). El análisis de la expresión de cada uno de los transportadores se hizo por la densitometría de la banda que se observó en la inmunoréplica tipo Western, y se expresó en unidades de densidad óptica /mm² de área (UDO/mm²). En las hojas control se observó una expresión del transportador de sacarosa ligeramente cambiante durante el periodo de trece días (Figura 28B), la intensidad de la banda detectada es similar a los 3 y 5 días, después aumenta 1.7 veces al día 7 y se mantiene en ese valor a los 9 días, posteriormente la cantidad de transportador regreso al valor detectado a los 13 días.

El patrón del transportador de sacarosa en las hojas de las plantas sometidas a estrés presentó un patrón diferente al del control, disminuyendo la cantidad de transportador conforme paso el tiempo de tratamiento del día 3 al 7, para mantenerse mas o menos constante hasta el día 13 (Figura 28B).

Al comparar la intensidad de la banda detectada con el anticuerpo del transportador de sacarosa, entre las obtenidas de las hojas control y las bandas obtenidas a todos los tiempos en las hojas sometidas a estrés hídrico, encontramos que no hay coincidencia entre las intensidades detectadas en el control con las estresadas (Figura 28B). La cantidad de transportador de sacarosa en las plantas en las hojas control es mayor en las plantas sometidas a estrés a

los días 3 y 5. Pero, al día 7 y 9 disminuyó llegando a ser 2.4 y 2 veces menos transportador respectivamente.

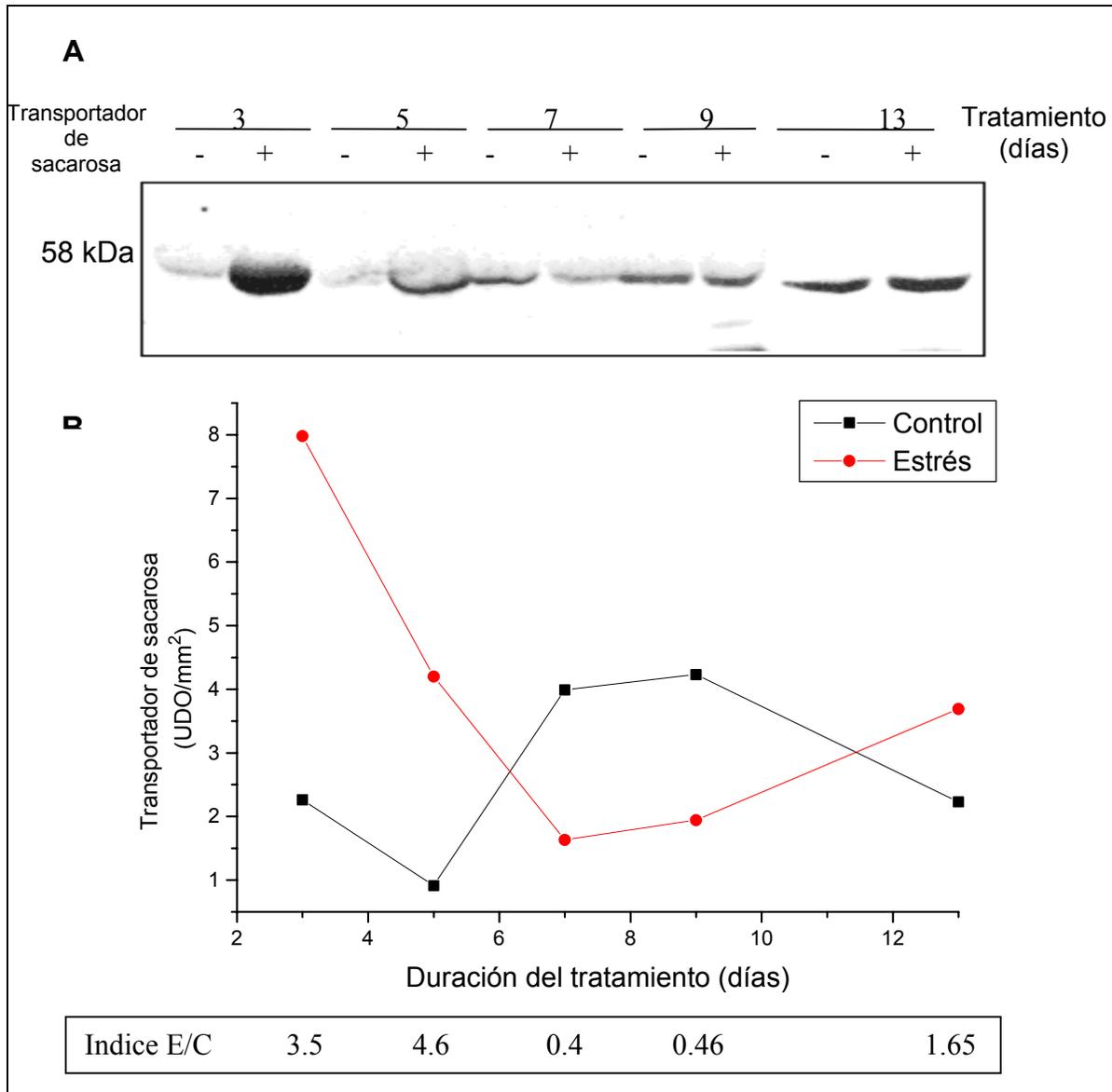


Figura 28. Efecto del estrés hídrico en la expresión del transportador de sacarosa en las fracciones microsomales de hojas durante 13 días de tratamiento de estrés hídrico. A) Inmunorréplica tipo Western de las fracciones microsomales de las hojas de plantas de jitomate, se detectó al transportador de sacarosa según se describió en materiales y métodos. (-) control (+) tratamiento de estrés hídrico. **B)** Curva comparativa de la expresión del transportador de sacarosa en hojas de plantas control y plantas sometidas a estrés hídrico, durante el período de tratamiento, La intensidad de la banda detectada con el anticuerpo se reporta en Unidades de Densidad Óptica /mm². Diferencias mayores de 2 veces entre ambos perfiles densitométricos se encontraron a los 3 y 5 días de tratamiento, aumentos que ocurrieron en las hojas de las plantas sometidas a estrés.



Respecto al transportador de hexosas, el anticuerpo específico logró detectar una banda de 60 kDa (Figura 29A). En las hojas de las plantas control se observó un aumento gradual en la cantidad de transportador de hexosas conforme paso el tiempo del tratamiento, finalizando al día 13 con 2.6 veces más transportador que al día 3 (Figura 29B). Por el contrario, las hojas de plantas sometidas a estrés, mostraron un perfil cambiante de transportador durante los 13 días muestreados, observándose una cantidad alta de transportador a los días 3 y 5 días, disminuyendo al séptimo día (2.6 veces menor con respecto al día 3), y posteriormente se volvió a incrementar el contenido de transportador. En el índice E/C se observa que las mayores diferencias entre ambos lotes de hojas, se presentaron en los días 3 y 5, con 3 y 2.2 veces de aumento en las plantas sometidas a estrés (Figura 29B).

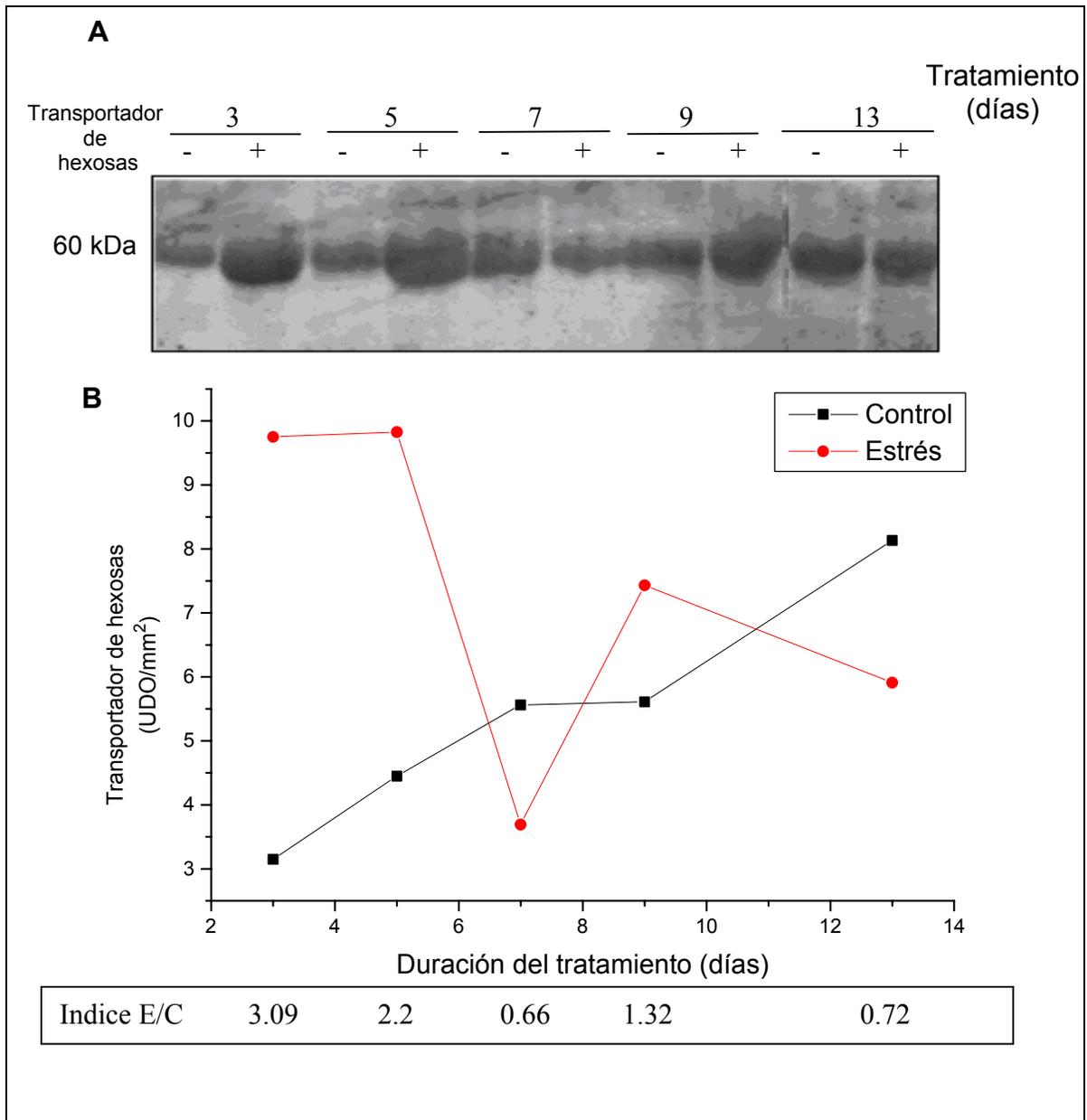


Figura 29. Efecto del estrés hídrico en la expresión del transportador de hexosas en las fracciones microsomales de hojas durante diferentes tiempos de estrés hídrico. A) Inmunoréplica tipo Western de las fracciones microsomales de hojas de plantas de jitomate, se detectó al transportador de hexosas según se describió en materiales y métodos. (-) control (+) tratamiento con estrés hídrico **B)** Curva comparativa de expresión del transportador de hexosas en hojas de plantas control y plantas sometidas al estrés hídrico durante el tratamiento. La intensidad de la banda detectada con el anticuerpo se reporta en Unidades de Densidad Óptica /mm².

4.8. Efecto del estrés hídrico en los niveles de expresión de los transportadores de sacarosa y hexosas en raíces

El fraccionamiento electroforético de las fracciones microsomales de las raíces permitió resolver bandas de reacción al anticuerpo sin deformaciones (Figura 30A). La curva de expresión del transportador de sacarosa en las raíces de las plantas control fue bifásica, del día 3 y al día 7 aumento 19 veces, después disminuyó la cantidad de transportador encontrándose a los 13 días un valor similar al del día 3. (Figura 30B). En contraste, las raíces de las plantas sometidas a estrés presentaron un patrón oscilante de su transportador de sacarosa, con un máximo a los 5 días, para posteriormente disminuir a los 7 días a un valor 10.6 veces menor que el encontrado al día 3, aumentando gradualmente en los días 9 y 13 (Figura 30B).

Al comparar las dos curvas de expresión de transportador de sacarosa en las raíces control y las raíces de las plantas sometidas a estrés hídrico, se observó que el estrés produjo un aumento en el transportador de sacarosa a los días 3, 5 y 13, encontrándose la mayor diferencia (14 veces) al día 3. Pero también hubo un decremento en el nivel de transportador en las raíces de las plantas sometidas a estrés, al día 7 de 14 veces.

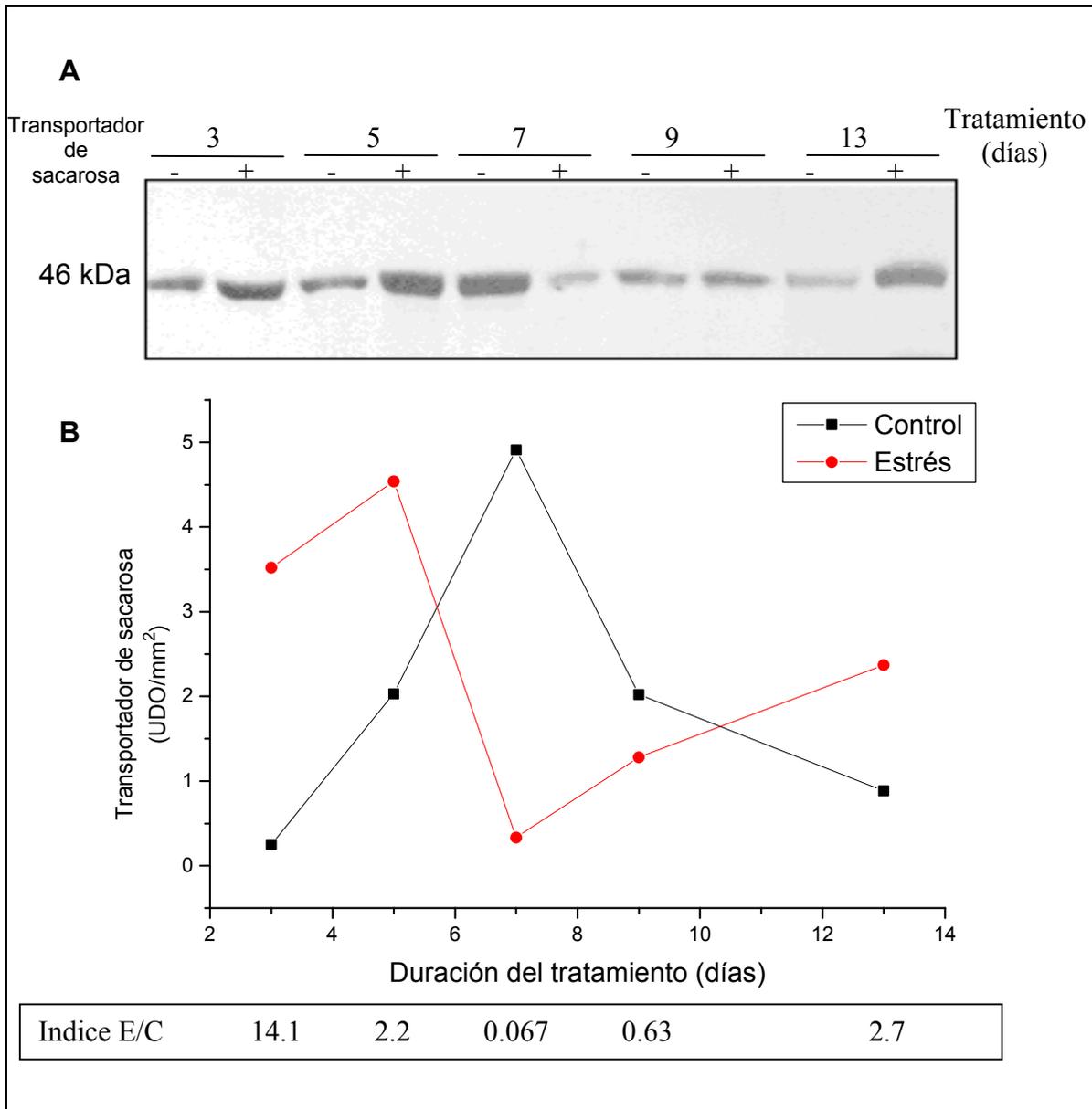


Figura 30. Efecto del estrés hídrico en la expresión del transportador de sacarosa en las fracciones de raíces durante diferentes tiempos de estrés hídrico. A) Inmuno-réplica tipo Western de las fracciones microsomales de raíces de plantas de jitomate, se detectó al transportador de sacarosa según se describió en materiales y métodos. (-) control (+) tratamiento con estrés hídrico. **B)** Curva comparativa de la expresión del transportador de sacarosa en raíces de plantas control y plantas sometidas a estrés hídrico durante el tratamiento. La intensidad de la banda detectada con el anticuerpo se reporta en Unidades de Densidad Óptica /mm². La cantidad de transportador detectada con el anticuerpo en el control fue diferente a la detectada en las plantas sometidas a estrés, excepto en el día 9 donde la diferencia es menor a 1 vez.



La expresión del transportador de hexosas en las raíces de las plantas control, se mantuvo más o menos constante, con excepción del día 7 donde aumento 3.7 veces respecto al día 3 (Figura 31B).

Las raíces de las plantas sometidas a estrés tuvieron un comportamiento diferente al de las raíces control, presentando una curva bifásica, iniciando con un valor alto de transportador que gradualmente disminuyó, llegando a ser 10 veces menor al día 7, para posteriormente aumentar y al día 13 regresar a un valor similar al observado al día 3.

Al comparar ambas curvas, la expresión del transportador de hexosas durante el estrés fue alta a los días 3 y 5, disminuyó a los 7 días y continuó en valores menores que en las plantas control al día 9 (Figura 31B).

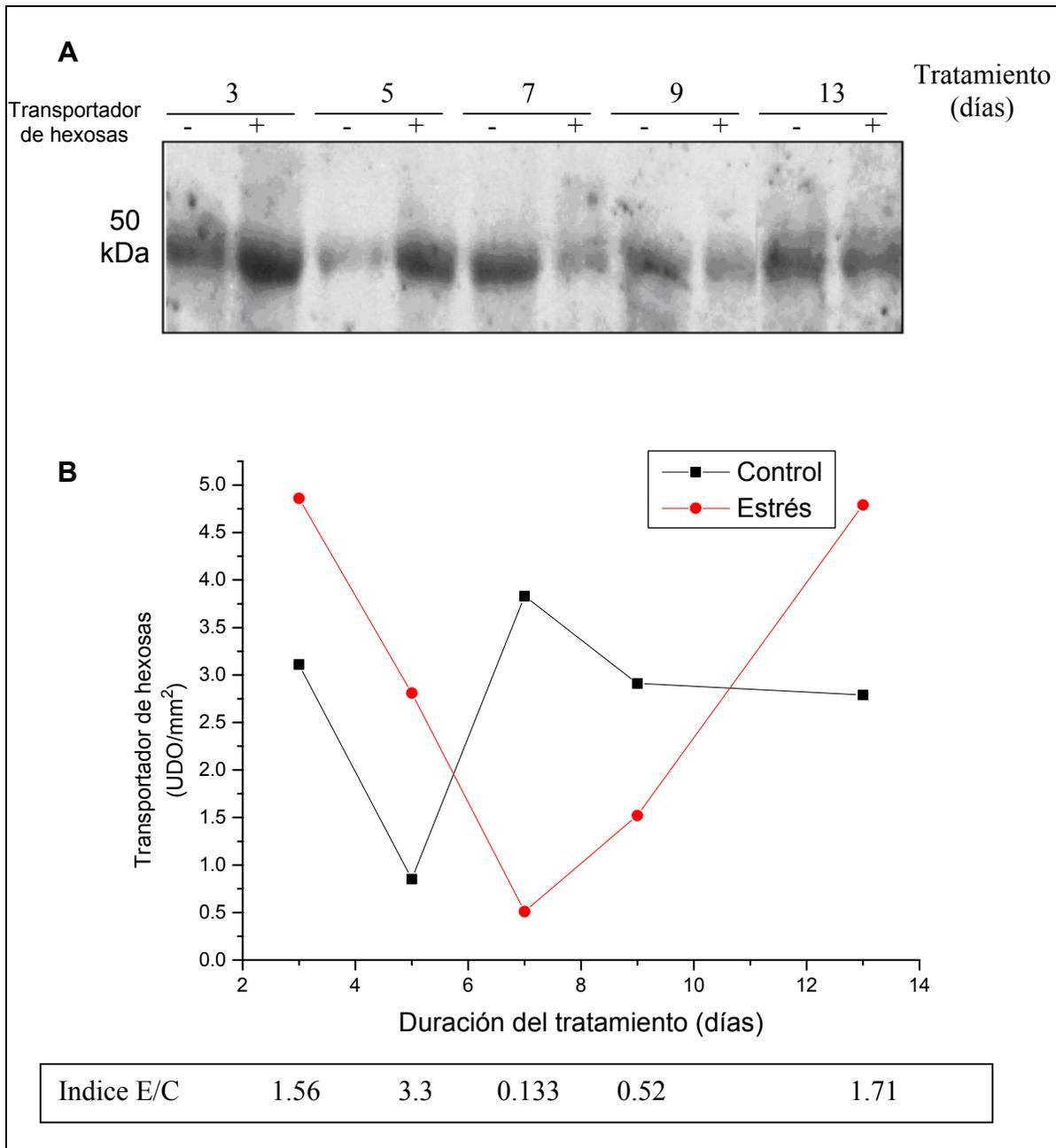


Figura 31. Efecto del estrés hídrico en la expresión del transportador de hexosas en las fracciones de raíces durante diferentes tiempos de estrés hídrico. A) Inmuno-réplica tipo Western de las fracciones microsomales de raíces de plantas de jitomate, se detectó al transportador de hexosas según se describió en materiales y métodos. (-) control (+) tratamiento con estrés hídrico. **B)** Curva comparativa de la expresión del transportador de hexosas en raíces de plantas control y raíces de las plantas estresadas, durante el tratamiento. La intensidad de la banda detectada con el anticuerpo se reporta en **Unidades de Densidad Óptica /mm²**. A los días 5 y 7 del tratamiento, en las raíces de las plantas control se encontraron diferencias en la cantidad de transportador detectada con el anticuerpo respecto a lo que se observó en las raíces estresadas, a los 5 días 3 veces mayor y a los 7 días 7.5 veces menos control.

5. Discusión

5.1. Efectos fisiológicos del estrés hídrico

Los factores ambientales adversos como el déficit de agua, impuesto a través de la sequía, la alta salinidad o temperaturas extremas, limitan la productividad de los cultivos. Es ampliamente aceptado que se modifica el crecimiento del tallo, el aspecto de las hojas y también el de las raíces. (Bohnert *et al.*, 1995; Bray 1993). Se ha documentado el daño producido, que comienza con señales que se dan en las raíces, y que reducen la división celular, y el crecimiento de las hojas, a través de la síntesis y movilización de ácido abscísico, citocininas, cambios del pH, iones, aminoácidos, entre otros (Davies y Zhang, 1991).

En este estudio el tratamiento de riego reducido a 1/8 de la capacidad de campo, produjo los efectos conocidos del estrés hídrico en las plantas de jitomate, reducción en el crecimiento, mayor número de raíces secundarias y disminución en la transpiración debida a la reducción de la conductancia estomática.

Generalmente, se ha encontrado que aún cuando se llega a reducir la conductancia estomática en las hojas de plantas sometidas a déficit hídrico, su potencial hídrico es similar al de las hojas de plantas bien hidratadas (Davies y Zhang, 1991; Gowing *et al.*, 1990; Sobeih *et al.*, 2004). En este trabajo se encontró que en efecto, el tratamiento de estrés hídrico redujo la conductancia estomática y la transpiración de las hojas, pero no modificó el peso húmedo de las hojas y los tallos hasta los 9 días de haber iniciado el tratamiento de estrés. El fenotipo en general se encontró modificado, es decir, se redujo la talla de las plantas, las hojas presentaban una coloración menos intensa, verde opaca, en algunas ocasiones púrpura y sin un aumento aparente en el número de hojas jóvenes; signos posibles de envejecimiento foliar o maduración prematura de las hojas jóvenes. Se conoce que el incremento en ABA, además de inducir el cierre estomatal, está relacionado con el proceso de senescencia de las hojas, junto con las citocininas o



etileno (Nooden *et al.*, 1997). Por ejemplo, Yang y colaboradores (2002) observaron que existía una relación inversa entre la concentración de ABA y la de las citocininas en los exudados de raíces y hojas de arroz sometidas a déficit hídrico, y que el aumento en ABA y la reducción en la concentración de las citocininas elevaba la senescencia foliar.

Adicionalmente, otro de los efectos fisiológicos observados en las plantas de jitomate sometidas a déficit hídrico fue que, acompañado a la reducción del crecimiento aéreo de la planta, se incrementó el número de raíces secundarias, aún cuando el peso total de la raíz no fue diferente al de las raíces control. Presumiblemente, la aparición de raíces secundarias se debe a que la planta, durante el déficit hídrico, antepone su crecimiento sobre el de la raíz primaria. Otros reportes también han encontrado que las plantas sobreviven a bajo potencial de agua, sacrificando el crecimiento aéreo sobre la raíz, probablemente porque se mantiene la búsqueda de agua para su supervivencia (Westgate y Boyer, 1985; Wu y Crosgrove, 2000; Walter y Schurr, 2005). Si bien ésta no es una respuesta única del estrés por agua, ya que también se ha encontrado el cambio morfológico de las raíces cuando la disponibilidad de nutrientes ha disminuido en la vecindad de la rizosfera (Walter y Schurr, 2005).

El acelerado crecimiento de las raíces secundarias durante el estrés hídrico también es un efecto probable del incremento en la concentración en ABA (Bray, 1993; Bray, 2001; Davies y Zhang, 1991), aunque también se ha sugerido que es el causante de la inhibición del crecimiento del tallo. Se ha encontrado que ABA es un promotor del crecimiento de diferentes tejidos en diferentes especies vegetales que fueron expuestas a diferentes condiciones de estrés, por lo que el efecto inhibitorio en el crecimiento del tallo durante el estrés es una tema controversial (Barrero *et al.*, 2005). Por ejemplo, algunos autores como Sharp y LeNoble, 2002 han propuesto a ABA como un inhibidor de crecimiento bajo condiciones de estrés, pero un promotor de crecimiento en ausencia de este. A la

fecha aún se desconoce el papel del ABA en el estrés hídrico y también en su papel promotor de crecimiento cuando no hay estrés.

5.2. Alteraciones en el contenido de carbohidratos en las plantas sujetas a estrés hídrico

El cierre parcial de los estomas promovido por el estrés hídrico produce una reducción en la fijación de CO₂ (Kaiser, 1987) y se establecen relaciones entre los tejidos fuente y los tejidos demanda diferentes a las normales (Pelleschi *et al.*, 1997). El tejido fuente tiene que modificar su metabolismo para conservar su papel donador de sacarosa hacia los tejidos demanda, aunque dependiendo de la situación de estrés, el reparto se verá modificado no sólo porque la disponibilidad de CO₂ se reduce, sino también porque se realiza el ajuste a la situación de bajo contenido de agua, generalmente a través de la biosíntesis de compuestos osmóticos, de modificar la entrada de iones a la célula, de realizar un balance metabólico, como mantener el índice de adenilatos y por supuesto a la síntesis de proteínas necesarias para contender con el estrés (Bohnert *et al.*, 1995; Bohnert y Sheveleva, 1998).

Si bien se han documentado los efectos adversos del estrés hídrico en el crecimiento de la planta, principalmente en la reducción en la talla de la planta y la acumulación de peso seco (Bray, 2001; Kaiser, 1987; Pelleschi *et al.*, 1997). Recientemente se ha pretendido utilizar al estrés hídrico, como una estrategia para adelantar el proceso de movilización de nutrientes de los tejidos vegetativos hacia los granos, con la finalidad de que en un menor tiempo el grano comience y alcance su concentración normal de almidón, y se reduzcan los costos de riego y cuidado de las plantas (Yang *et al.*, 2002, Zinselmier *et al.*, 1999). Por lo que estudios en los que se abordan los cambios que el estrés hídrico produce en la acumulación o movilización de carbohidratos, son importantes para mejorar la producción agrícola.

En el presente trabajo se analizó el reparto de carbono durante el estrés hídrico, al medir tanto los contenidos de carbohidratos solubles y el almidón, así como la abundancia de los transportadores de carbohidratos en sus membranas plasmáticas.

Con relación a los contenidos de carbohidratos, se encontró que en el tejido fuente, las hojas maduras incrementaron la fructosa y la sacarosa, el primero a partir del día 7 y el segundo desde el día 3, manteniéndose altas concentraciones hasta los 13 días. El aumento en la síntesis de sacarosa puede deberse a un incremento en la actividad de la sacarosa fosfato sintetasa, enzima que generalmente aumenta por estrés por agua. Yang y colaboradores (2002) demostraron que en arroz sometido a estrés hídrico se induce la actividad de la SPS, tanto en tallo como en hojas y que esta actividad correlaciona con la acumulación de sacarosa en los tallos, actividad que concuerda con el papel conocido de la SPS en la re-síntesis de la sacarosa. El significado del incremento en la actividad de la SPS bajo estrés hídrico no es para que la planta acumule el disacárido en respuesta a estrés, sino más bien para sostener la respuesta asimilatoria de los flujos de carbono entre los tejidos fuente y demanda (Yang *et al.*, 2002).

El incremento en la concentración de fructosa durante el estrés es discreto y puede deberse a la hidrólisis incrementada de sacarosa. Por otro lado, existió un aumento oscilante de la glucosa, a los días 3, 5, 11 y 13, que se puede explicar por el incremento en la hidrólisis del almidón en conjunto con el de sacarosa, ya que se observó que las hojas provenientes de plantas en déficit hídrico redujeron su contenido de almidón entre 1 a 2.5 veces y aunque no se observa una reducción en el contenido de sacarosa, si es probable que se este hidrolizando. Las plantas que sobreexpresan a la SPS en tomate produjeron la elevación en el contenido de sacarosa con una disminución en la síntesis de almidón en las hojas, lo que sugiere que el carbono fijado se canaliza preferentemente a la formación del disacárido (Worrell, 1991). Es probable entonces que la actividad de la SPS



amente durante el estrés hídrico en las plantas de jitomate y conlleve a un incremento en el contenido de sacarosa y a la disminución en la concentración de almidón. En papa, se ha observado que en respuesta al déficit hídrico la acumulación de sacarosa mediada por la SPS y que, de manera paralela al incremento en su actividad, hay una reducción de 3PGA, ambos producen la inhibición de la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa con la consecuente reducción en el contenido de almidón (Geingenberg *et al.*, 1997).

Como se menciona anteriormente, el incremento de fructosa y glucosa podría ocurrir de la degradación de sacarosa; en la célula vegetal se presentan dos enzimas que pueden utilizar sacarosa, la sacarosa sintetasa o las invertasas. Resultados en nuestro laboratorio demostraron que la actividad de la invertasa vacuolar es menor en las plantas estresadas (resultados Cuellar de la Serna F), lo que sugiere que esta enzima no colabora en la producción de glucosa, al menos en la vacuola. Sin embargo, sí se encontró que la actividad de la invertasa de la pared celular de la hoja aumentó (1 a 6 veces comparado con las hojas de plantas control), lo cual explicaría el incremento en el contenido de fructosa y glucosa en las hojas.

El aumento constante y sostenido de la fructosa y que no es paralelo al perfil del contenido de glucosa, podría explicarse primero asumiendo que ambas hexosas son recuperadas para el metabolismo en la célula de las hojas y que una vez en el citosol, la velocidad de uso sea diferente, ya que se conoce que las células presentan mayor capacidad para utilizar la glucosa que la fructosa. Por ejemplo, la K_m de las hexocinasas de plantas para glucosa se encuentran en el intervalo micromolar (30-100 μM), mientras que la K_m para fructosa se encuentran en el rango milimolar (2.5 a 26 mM; Dai *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 2002; Guglielminetti *et al.*, 2000; Martínez-Barajas *et al.*, 1998).

En las raíces el estrés hídrico aumentó tanto el contenido de glucosa como de fructosa, el primero desde el día 3 y el segundo a partir del día 5 del tratamiento de déficit hídrico. Y, contrario a lo observado en las hojas, el aumento en el

contenido de sacarosa no fue sostenido sino oscilante, aumento a los días 3, 5, 11 y 13 y el de almidón se mantuvo siempre por arriba de los valores de las plantas bien hidratadas, entre 2 y 2.5 veces.

Es posible que las raíces se encuentren creciendo gracias a que el tejido fuente les sigue proporcionando compuestos carbonados en forma de sacarosa, y las invertasas de pared celular y/o las intracelulares se encuentran activas produciendo tanto glucosa como fructosa. Nuestros resultados preliminares muestran que las invertasas de la pared celular se encuentran incrementadas a todos los tiempos del tratamiento pero sobre todo entre el día 1 y 7 (19.8 a 70.7 nmolGlu min⁻¹mg⁻¹ al día 1 y de 8.2 a 45.5 nmolGlu min⁻¹mg⁻¹ al día 7; Cuellar-de la Serna F, 2006 no publicados), esto favorecería que ambas hexosas sean canalizadas hacia el catabolismo de la célula demanda para sustentar su crecimiento. Otro posible papel de las hexosas en la célula sería el de favorecer la protección de las estructuras celulares ya que el potencial hídrico en las raíces está disminuyendo por efecto del estrés. El aumento en el contenido de almidón podría derivarse de un abastecimiento aumentado de hexosas y sacarosa a este tejido y que le permita de manera transitoria almacenar almidón para continuar su crecimiento.

Actualmente se reconoce que los carbohidratos no sólo son sustratos para el crecimiento de los tejidos demanda, sino también pueden regular la expresión de una variedad de genes. Se ha encontrado que la expresión de los genes que codifican enzimas específicas de tejido demanda como la sacarosa sintetasa, la sintetasa unida a los gránulos de almidón y la invertasa extracelular, se incrementan ya sea por glucosa o sacarosa (Nguyen-Quoc y Foyer, 2001). Adicionalmente se ha encontrado que al aumentar la actividad de la invertasa vacuolar y por tanto llevar a un aumento en el contenido de hexosas, se produce una co-inducción del transportador de hexosas y de las propias invertasas, hecho que se ha postulado como necesario para aumentar la toma de hexosas por las células demandas (Conde *et al.*, 2006, Roitsch *et al.*, 1995, Roitsch, 2004)

Se ha sugerido, que las hexosas producto de la actividad de las invertasas favorecen la división celular y la expansión, mientras que la sacarosa favorece la diferenciación y maduración (Koch, 2004). Por lo que es probable que las invertasas tengan un papel importante en la movilización de carbono en las raíces durante el estrés hídrico, al aumentar el contenido de hexosas en ese tejido. Mientras que la sacarosa fosfato sintetasa al incrementar el contenido de sacarosa en las hojas favorecería la diferenciación y maduración del tejido durante el estrés hídrico. Sin embargo, hay que reconocer que la afectación que el estrés hídrico produce en los contenidos de carbono en ambos tejidos, es seguramente multifactorial y que nuestra sugerencia es simplista aunque probable.

5.3. El transporte de carbohidratos durante el estrés hídrico y su relación con el contenido de carbohidratos.

Los transportadores de carbohidratos son proteínas que pueden ser reguladas por las concentraciones de sus sustratos, lo anterior ha sido ampliamente documentado para el transportador de sacarosa y poco en el transportador de hexosas, aunque las concentraciones de carbohidratos y el tipo modifica la expresión de manera diferente dependiendo de la isoforma y la especie de planta que se haya examinado (Delrot *et al.*, 2000; Lalonde *et al.*, 1999).

Durante el estrés hídrico la reducción en la capacidad de fijación de CO₂ y por tanto en la capacidad del tejido fuente de sintetizar sacarosa o glucosa, podría alterar los contenidos de las proteínas transportadoras en las membranas celulares de los diferentes tejidos de la planta. Examinamos el patrón de expresión de los transportadores de sacarosa y hexosas durante el estrés hídrico tanto en hojas como en las raíces y encontramos diferencias en ambos transportadores y en los dos tejidos examinados.

Hemos considerado como diferente aquellos valores 2 veces distintos en la expresión de ambos transportadores. Encontramos que el estrés hídrico produjo

aumentos en el transportador de sacarosa y hexosas en las hojas a los días 3 y 5, y disminución en el transportador de sacarosa a los días 7 y 9, mientras que para el transportador de hexosas el decremento se presentó sólo al día 7 (Figura 32). En la célula fuente durante el estrés hubo un aumento en la concentración de glucosa, sacarosa y fructosa. Sacarosa y glucosa se encuentran altos a los días 3 y 5 del tratamiento, mientras que fructosa aumenta hasta el día 7 (Figura 32). Entonces el aumento en la cantidad del transportador de sacarosa en las hojas podría ser una respuesta al incremento en el contenido tanto de glucosa como de sacarosa o por el aumento de solo uno de ellos. La disminución posterior (día 7) de ambos transportadores coincide con el incremento de sacarosa.

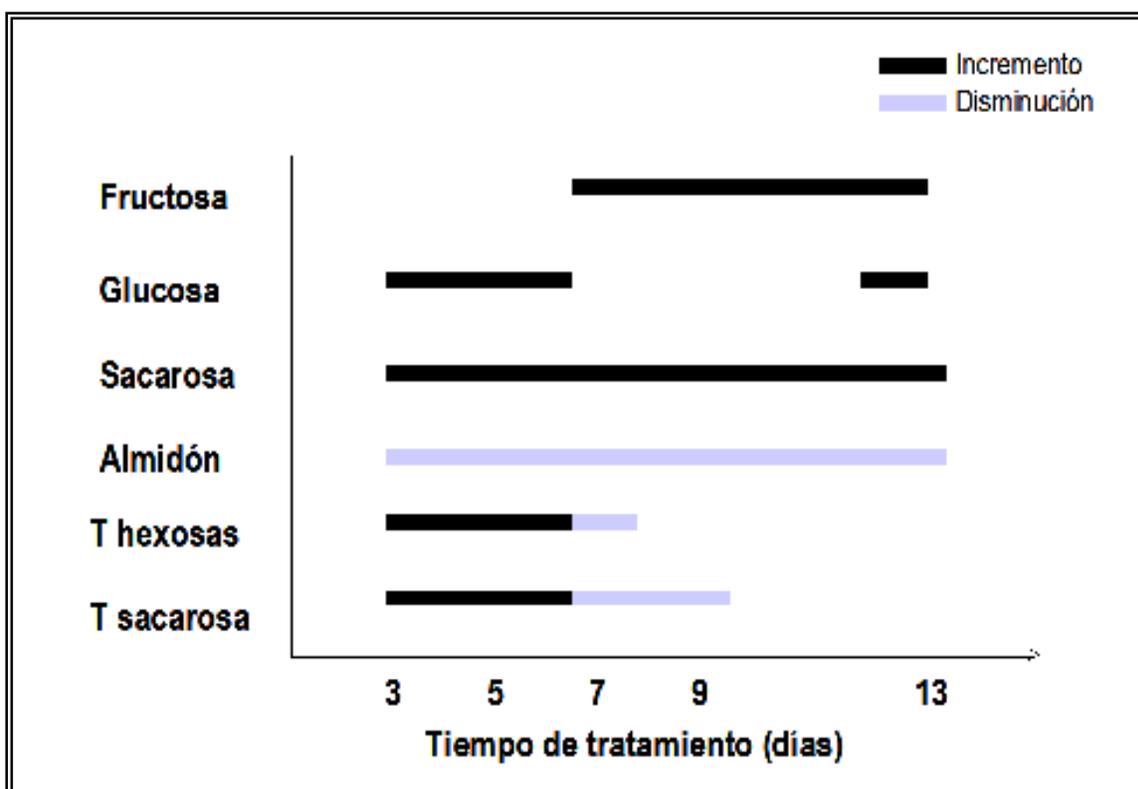


Figura 32. Efecto del estrés hídrico sobre el reparto de carbohidratos en las hojas de jitomate. Se resume de manera cualitativa el efecto que tuvo el tratamiento de estrés hídrico en los dos componentes del reparto de carbohidratos, es decir, el contenido de carbohidratos y los niveles de sus transportadores. Como se indica la línea negra representa incremento, la línea gris representa disminución y la ausencia de línea representa un valor similar al nivel de cualquiera de los parámetros indicados en relación al encontrado en las hojas control, sin contar el día 11 en donde no se determinaron los niveles de los dos transportadores.

Existen evidencias a favor de que ambos carbohidratos pueden llevar a un aumento en la expresión tanto del transportador de sacarosa como el transportador de hexosas, por ejemplo la transcripción del gene para el transportador de hexosas en células en suspensión de uva se incrementa, al colocar en el cultivo 58 mM de cualquiera de los dos carbohidratos, encontrándose el nivel máximo de transcrito para el transportador de hexosas a las 24 h de incubación con glucosa y a las 48 h de incubación con sacarosa (Atassanova *et al.*, 2003). En embriones de arroz incubados con 100 mM de glucosa o sacarosa se induce el incremento en la transcripción del gene para el transportador de sacarosa OsSUT1, a partir de las 72 h, aunque el nivel de expresión es mayor cuando se incuba con glucosa que con sacarosa (Matsukura *et al.*, 2000).

En nuestro laboratorio, hemos encontrado que la imbibición del tejido embrionario de maíz en 100 mM glucosa, es capaz de inducir la transcripción y traducción del único transportador de sacarosa descrito en esta planta, ZMSUT1, y la sacarosa no tiene ningún efecto en su expresión al menos a las 24 horas del tratamiento (Greaves-Fernández, 2001; Ramírez-Verdejo, 2007).

Un ejemplo en contra de que los transportadores de sacarosa se regulan por sacarosa *in vivo*, lo podemos encontrar en las mutantes de *Arabidopsis thaliana* que no expresan al transportador tipo 2 de sacarosa en las membranas plasmáticas de las hojas. Las plantas mutantes experimentan cambios importantes tanto en el contenido de sacarosa como en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbono y en el metabolismo secundario. En esta mutante se incrementa la concentración de sacarosa, disminuye la expresión de la sedoheptulosa 1,7 bifosfatasa, enzima clave en el ciclo de Calvin para la producción de hexosas, disminuyen también la UDPG pirofosforilasa, la fructosa 1,6 bifosfatasa, el translocador de triosas fosfato y aumenta la expresión de la sacarosa fosfato sintetasa y también la de la sacarosa sintetasa, llevando a una disminución en el contenido de almidón, sin embargo las otras isoformas de los transportadores de sacarosa presentes en las hojas no cambian, aún cuando el

contenido de carbohidratos y el metabolismo del tejido fuente se haya modificado (Lloyd y Zakhleniuk, 2004).

La modulación de la expresión de los transportadores de sacarosa por carbohidratos, que se han reportado en haba (VFSUT1; Weber *et al.*, 1997) y en betabel (BvSUT1; Chiou y Bush, 1998; Vaughn *et al.*, 2002), muestran un efecto supresor. VfsUT1 se expresa en el embrión en desarrollo de las semillas de haba y su nivel de transcrito disminuye por el tratamiento con una concentración alta de sacarosa o glucosa (150mM) y también a concentraciones bajas de ambos carbohidratos (10mM). Mientras que BvSUT1 principalmente se expresa en la hoja madura de betabel y se reprime con la imbibición del tejido en 100mM de sacarosa, pero no por glucosa.

Es difícil dar una explicación inequívoca sobre la regulación de los transportadores de carbohidratos, ya que en la literatura se encuentran evidencias de que la regulación de la transcripción de los transportadores por carbohidratos puede ser insensible, reprimida o estimulada. Algunas de las causas podrían ser la existencia de múltiples isoformas para los transportadores en las membranas de plantas, cada una con una función particular en cada estadio del desarrollo y probablemente en cada órgano de la planta. El contenido de sacarosa en la hoja, en el apoplasto y en el floema puede también estar continuamente cambiando y esto llevar a variaciones en los niveles de los transportadores.

Adicionalmente, no se debe descartar que además de una regulación transcripcional, puede ocurrir la modificación post-traducciona. Por ejemplo, la localización del transportador de sacarosa en los elementos amorfo de la savia, células sin núcleo, involucra la transferencia de los transcritos para el transportador a través de los plasmodesmata, los que conectan a la célula acompañante con las células del elemento amorfo de la savia (Kühn *et al.*, 1997). Además, se ha planteado la posibilidad de la regulación covalente de la proteína, ya sea por fosforilación (Roblin *et al.*, 1998; Vaughn *et al.*, 2002) o bien por las



variaciones en el índice de aminoácidos en la forma de sulfuro o formando puentes disulfuro (Delrot *et al.*, 2001).

Por lo anterior, es difícil establecer la exacta causal de las variaciones en los niveles de transportadores. Reconocemos que aún cuando encontramos que el estrés hídrico produce cambios en la expresión de los transportadores de hexosas y sacarosa en las hojas, los niveles de una proteína durante el estrés pueden estar regulados por un cambio general en el metabolismo de carbono (carbohidratos y aminoácidos), y en las pozas de compuestos de alta energía como el ATP, y estos podrían ocasionar cambios en la transcripción de muchos genes y producir una modificación generalizada y no específica de la expresión de cualquiera de los dos transportadores. Sin embargo, la posibilidad de que los carbohidratos regulen a ambos transportadores *in vivo* es plausible.

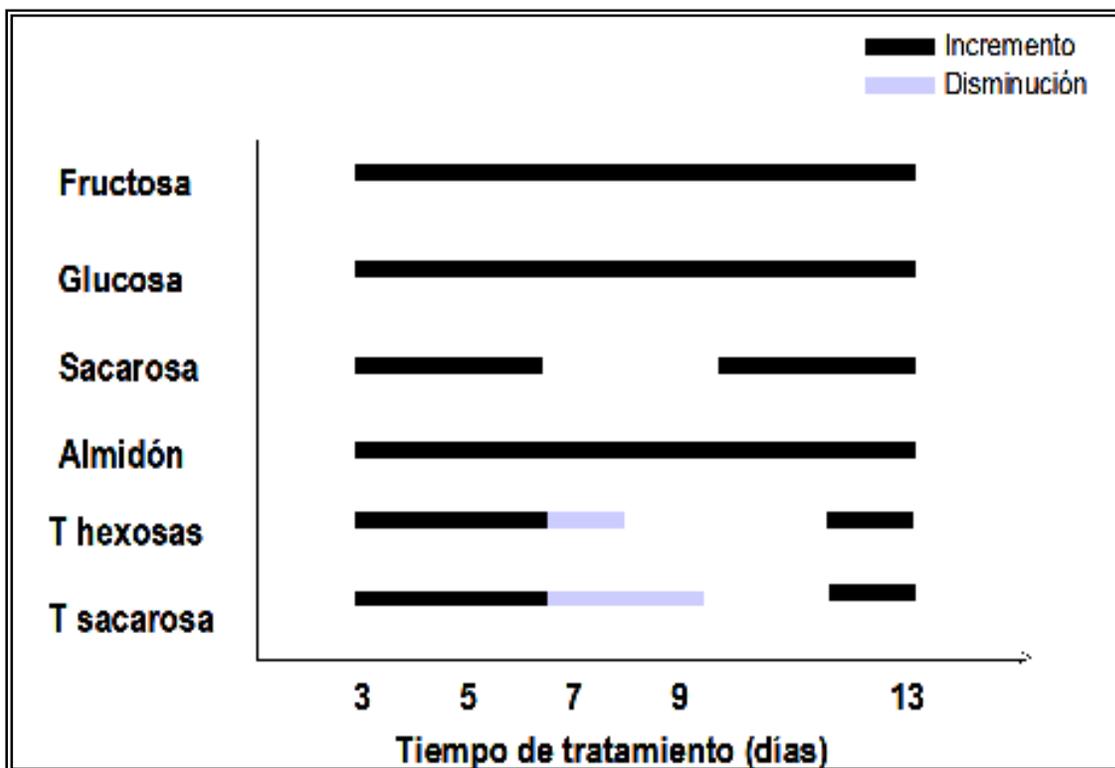


Figura 33. Efecto del estrés hídrico sobre el reparto de carbohidratos en las raíces de jitomate. Se resume de manera cualitativa el efecto que tuvo el tratamiento de estrés hídrico en las raíces en el contenido de carbohidratos y los niveles de sus transportadores. Como se indica la línea negra representa incremento, la línea gris representa disminución y la ausencia de línea representa un valor similar en el nivel de cualquiera de los parámetros indicados en relación al encontrado en las hojas control, sin contar el día 11 en donde no se determinaron los niveles de los dos transportadores.

En las raíces el panorama es similar, el estrés hídrico produjo un aumento en los niveles de ambos transportadores de carbohidratos a los días 3, 5 y 13 días, aunque el incremento fue mayor para el transportador de sacarosa que para el de hexosas. Además, se encontró una disminución entre 10-14 veces en ambos transportadores a los 7 días del estrés.

Si comparamos los cambios en los niveles de transportadores con las alteraciones en los contenidos de los carbohidratos, encontramos que coincide que cuando hay aumento en el contenido de glucosa y sacarosa, hay aumento en los niveles de ambos transportadores, días 3, 5 y 13 (Figura 33). Y cuando sólo se presenta el

aumento en sacarosa hay una disminución en los niveles de ambos transportadores al día 7 y en menor grado en el día 9.

Así tanto en hojas como en raíces encontramos que existe incremento en la expresión del transportador cuando han aumentado en conjunto glucosa y sacarosa (días 3 y 5), mientras que hay una reducción cuando sólo sacarosa se encuentra presente (día 7). Para apoyar el efecto en la modificación de la expresión de ambos transportadores por carbohidratos necesitamos más evidencias, como es la exposición de las raíces o las hojas aisladas a concentraciones diferentes de sacarosa y glucosa, en mezcla o separados, y determinar si en sus membranas se presentan más transportadores de sacarosa o hexosas, ya sea determinando el nivel de transcritos o de la proteína.

Para confirmar los resultados obtenidos también sería deseable detectar a los transportadores de carbohidratos no sólo en extractos membranales de raíces de plantas sino también en las diferentes zonas de la raíz, mediante improntas del tejido o mediante inmunohistoquímica, esto apoyaría a que el tejido ha cambiado su perfil temporal y tejido específico de expresión del transportador, para adaptarse al crecimiento acelerado de las raíces secundarias.

Adicionalmente, se hace necesario detectar los niveles de RNAm para los transportadores de sacarosa y hexosas, para confirmar o descartar mediante otra técnica de que realmente existe la regulación de la expresión de los transportadores en las raíces y en las hojas de plantas sometidas a estrés hídrico. Una multitud de transportadores de carbohidratos presentan localización en una misma membrana celular, en el caso del transportador de hexosas de jitomate se han reportado tres y dos de ellos se expresan exclusivamente en la raíz, LeHT1 y LHT3 (Gear et al., 2000), mientras que para el transportador de sacarosa sólo se ha encontrado a LeSUT1 en las raíces de jitomate (Lalonde *et al.*, 2004), estos serían los candidatos a buscar, para determinar los cambios de expresión de los

RNAm para los transportadores de carbohidratos en las membranas plasmáticas de plantas sometidas a estrés hídrico.

Al realizar otros experimentos que involucren el estrés hídrico se pueden considerar tiempos más prolongados en el tratamiento del estrés o un cambio en la intensidad del mismo, y determinar si la tendencia de que hay una modificación en el contenido de glucosa o sacarosa, se refleja en un cambio en el contenido del transportador.

El estrés hídrico modifica la expresión de los transportadores de carbohidratos tanto en hojas y raíces, una de las posibilidades es que sea en respuesta a la alteración que se encontró en los contenidos de carbohidratos, sin embargo es necesario como ya se describió realizar un análisis cuidadoso de que efectivamente son los carbohidratos los que están participando en esta regulación.

6. Conclusiones

1. El estrés hídrico produce un incremento de sacarosa desde el día 3 hasta el día 13 del tratamiento de estrés. La fructosa aumentó a partir del día 7 y se mantuvo hasta el día 13, mientras que la sacarosa aumentó a los días 3, 5, 11 y 13. Al contrario del almidón que disminuyó en las hojas sometidas al tratamiento de estrés desde el día 3 hasta el 13.
2. En las raíces de las plantas que fueron sometidas a estrés acumularon glucosa, fructosa y almidón a todos los tiempos del tratamiento. Mientras que la sacarosa se incrementó a los días 3, 5, 11 y 13.
3. Aumentó el contenido del transportador de hexosas y del transportador de sacarosas en las hojas de las plantas sometidas a estrés hídrico, en los tiempos iniciales del tratamiento, 3 y 5 días. Decremento al día 7 en ambos transportadores. Disminución del transportador de sacarosa al día 9.
4. En las raíces aumentó el contenido de ambos transportadores a los días 3, 5 y 9, mientras que disminuyeron al día 7. Sólo se mantuvo bajo el nivel del transportador de sacarosa al día 9.
5. El reparto de carbohidratos entendido como el contenido de carbohidratos y los niveles de transportador si se modificaron por efecto del estrés hídrico.
6. La causal de cambio del contenido de transportadores no es única. Pero observamos que el aumento de glucosa y sacarosa coincide con el aumento en ambos transportadores de carbohidratos y el aumento de solo sacarosa, coincide con un decremento en ambos transportadores de carbohidratos en los dos tejidos examinados.

7. Referencias

- Aoki N, Hirose T, Scofield G, Whitfield P, Furbank R. 2003. The sucrose transporter gene family in rice. *Plant Cell Physiol.* 44: 223-232.
- Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thévenot P, Delrot S. 2003. Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiol.* 131: 326-334.
- Baker J, dennSteele C, Dure L. 1988. Plant .Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Mol. Biol.* 11: 277-291.
- Ballicora M, Laughlin MJ, Fu Y, Okita TW, Barry GF, Preiss J. 1995. Adenosine 5'-diphosphate-glucose pyrophosphorylase from potato tuber. Significance of the N terminus of the small subunit for catalytic properties and heat stability. *Plant Physiol.* 109: 245-252.
- Barker L, Kuhn C, Weise A, Schultz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB. 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell.* 12: 1153-1164.
- Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodríguez PL, Ponce MR, Micol JL. 2005. A mutational analysis of the *ABA1* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J. Exp. Bot.* 56: 2071-2083
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plants Physiologists. Rockville Maryland.
- Bohnert J., Nelson E., Richard G. Jensenayb. 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.* 7:1099-1 11 1.
- Bohnert H, Scheveleva E. 1998. Plant stress adaptations-making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 267-274.
- Boyer, J, 1982. Plant productivity and environment. *Sci.* 218: 443-448.
- Bray, A., 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
- Bray, A., 1997. Plant responses to water deficit. *Trend Plant Sci.* 2: 48-54.
- Bray A. 2001. Plant response to water-deficit stress. *Ency. Life Sci.* 1-5.
- Clegg S, Gobran GR. 1995. Effects of aluminium on growth and root reactions of phosphorus stressed *Betula pendula* seedling. *Plant Soil* 168:173-178.
- Bürkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kühn C, Hirner B, Frommer B. 1988. The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol.* 118: 59-68.
- Büttner M, Sauer N. 2000. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 263-274.
- Bush D. 1990. Electrogenicity, pH-dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. *Plant Physiol.* 93: 1590-1596.
- Bush D. 1993. Inhibitors of the proton-sucrose symport. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 355-360.
- Conde C, Agasse A, Glissant D, Tavares R, Gerós H, Delrot S. 2006. Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape Cells. 141: 1563-1577.
- Crowe J, Crowe LM, Carpenter JF, Rudolph AS, Aurell-Wistrom C, Spargo BJ, Anchozdoguy TJ. 1988. Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 947: 367-384.
- Cushman C, Bohnert HJ. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin Plant Biol.* 3:117-124.
- Chandran D, Reinders A, Ward JM. 2003. Substrate specificity of the *Arabidopsis thaliana* sucrose transporter AtSUC2. *J. Biol. Chem.* 278: 44320-44325.

- Chevalier C, Bourgeois E, Pradet A, Raymond P. 1995. Molecular cloning and characterization of six cDNAs expressed during glucose starvation in excised maize (*Zea Mays* L.) root tips. *Plant. Mol. Biol.* 28: 473-485.
- Chiou T, Bush DR. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 4784-4788.
- Dai N, Kandel-Kfir M, Petreikov M, Hanael R, Levin I, Ricard B, Rothan C, Schaffer A, Granot D. 2002. The tomato hexokinase LeHXK1 cloning, mapping, expression pattern and phylogenetic relationships. *Plant Sci.* 163: 581-590.
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner , Levine A. 1999. Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits Growth, reduced Photosynthesis, and induces Rapid Senescence. *Plant Cell* 11: 1253-1266.
- Davies W, Zhang J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42: 55-76.
- Delrot S, Atanassova R, Gomés E, Coutos-Thévenot P. 2001. Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Sci.* 161: 391-404.
- Eckardt N. 2003. The function of SUT2/SUC3 sucrose transporters: The debate continues. *Plant Cell.* 14: 1259-1262.
- Ehness R, Ecker M, Godt DE, Roitsch T. 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell.* 9: 1825-1841.
- Fernie A, Willmitzer L, Trethewey RN. 2002. Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Trends Plant Sci.* 7: 35-41.
- Flemetakis E, Dimou M, Cotzur D, Efroze R, Aivalakis G, Colebatch G, Udvardi M, Katinakis P. 2003. A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during Lotus japonicus nodule development. *J. Exp. Bot.* 54: 1789-1791.
- Foyer C. 1988. Feedback inhibition of photosynthesis through source-sink regulation in leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 483-492.
- Foyer C, Paul MJ. 2001. Source-sink relationships. *Ency. Life Sci.* 1-11.
- García-Rodríguez S, Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. 2005. Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal of *Phytophthora parasitica*-infected plants. *Mycorrhiza.* 15: 489-496
- Gear M, McPhillips ML, Patrick JW, McCurdy DW. 2000. Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization. *Plant Mol. Biol.* 44: 687-697.
- Geigenberg P. 2003. Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *J. Exp. Bot.* 54: 457-465.
- Geigenberg P, Kolbe A, Tiessen A. 2005. Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *J. Exp. Bot.* 56: 1469-1479.
- Geigenberg P, Reimholz R, Geiger M, Merlo L, Canale V, Stitt M. 1997. Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta* 201: 502-518.
- Geiger D y Servaites JC. 1994. Diurnal Regulation of Photosynthetic Carbon Metabolism in C3 Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 45: 235-256
- Giaquinta R. 1977. Possible role of pH gradient and membrane ATPase in the loading of sucrose into the sieve tubes. *Nature.* 267: 369-370.
- Ghosh S, Gepstein S, Heikkila JJ, Dumbroff EB. 1988. Use of a scanning densitometer or an ELISA plate reader for measurement of nanogram amounts of protein in crude extracts from biological tissues. *Anal. Biochem.* 169: 227-233.
- Gowing D, Davies WJ, Jones HG. 1990. A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus X domestica* Borkh. *J Exp. Bot.* 41: 1535-1540.

- Greaves-Fernández N. 2001. Estudio de la expresión del transportador de sacarosa/H⁺ en la germinación de maíz. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Graham I, Denby KJ, Leaver CJ. 1994. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *Plant cell*. 6: 761-772.
- Guglielminetti L, Perata P, Morita A, Loreti E, Yamaguchi J, Alpi A. 2000. Characterization of isoforms of hexose kinases in rice embryo. *Phytochem*. 53: 195-200
- Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kühn C. 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant J*. 45: 180–192.
- Hamill S, Cloherty EK, Carruthers A. 1999. The human erythrocyte sugar transporter presents two sugar import sites. *Biochem*. 38: 16974 -16983.
- Harrison M. 1996. A sugar transporter from *Medicago trunculata*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant J*. 9: 491-503.
- Hattori T, Nakagawa S, Nakamura K. 1990. High level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown in vitro on sucrose medium. *Plant Mol Biol*. 14: 595- 604.
- Hebert D. y Carruthers A. 1992. Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function. Reversible redox-dependent interconversions of tetrameric and dimeric GLUT1. *J. Biol. Chem*. 267: 23829-23838.
- Hirose T, Imaizumi N, Scofield GN, Furbank RT, Oshugi R. 1997. cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol*. 38: 1389-1396.
- James F, Brouquisse R, Pradet A, Raymond P. 1993. Changes in proteolytic activities in glucose-starved maize root tips: regulation by sugars. *Plant Physiol Biochem*. 31: 845-856.
- Keiser W. 1987. Effect of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiol. Plant*. 71: 142-149
- Kerepesia I, Galibab G. 2000. Osmotic and Salt Stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Sci*. 40: 482-487.
- Koch K. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol*. 47: 509-540.
- Koch K, Nolte KD, Duke ER, McCarty DR, Avigne WT. 1992. Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* 4: 59-69.
- Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin. Plant Biol*. 7: 235-246.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker J, Patrick J, Frommer WB. 1999. The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11: 707-726.
- Larcher W. 1995 Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer. Germany. 506
- Lemoine R. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta*. 1465: 246 - 262.
- Lloyd M, Zakhleniuk OV. 2004. Responses of primary and secondary metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the Arabidopsis mutant, pho3. *J. Exp. Bot*. 55: 1221-1230.
- Liang J, Zhang J, Wong MH. 1997. How do roots control xylem sap ABA concentration in response to soil drying?. *Plant Cell Physiol*. 38: 908-913.
- Martínez-Barajas E, Randall D. 1998. Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L.Mill.) fruit. *Planta*. 205: 567-573.
- Matsukura C, Sayito T, Hirose T, Oshugi R, Perata P, Yamaguchi J. 2000. Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiol*. 124: 85-94.

- Meyer S, Meltzer M, Tuernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N. 2000. AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J.* 24: 869-882.
- Minchin P, Lacoite A. 2004. New understanding on phloem physiology and possible consequences for modeling long-distance carbon transport. *New Phytol.* 166: 771-779.
- Mito N, Wimmers L, Bennett A. 1996. Sugar regulated mRNA abundance of H⁺-ATPase gene family members in tomato. *Plant Physiol.* 112: 1229-1236.
- Moreno NP. 1984. Glosario Botánico Ilustrado. Instituto Nacional sobre recursos bióticos. Primera edición, Editorial CECSA. México. ISBN 968-26-0434-6. pp 55.
- Müller-Röber B, Sonnewald U, Willmitzer L. 1992. Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* 11: 1229-1238.
- Nguyen-Quoc B, Foyer C. 2001. A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *J. Exp. Bot.* 52: 881-889.
- Nooden L, Guaiant JJ, John I. 1997. *Senescence mechanism. Physiol. Plant.* 101: 746-753.
- Nuccio M, Rhodes D, McNeil SD, Hanson AD. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 128-134
- Padilla-Chacon D. 2004. El aumento en la capacidad para tomar azúcares en tejidos demanda de Arabidopsis thaliana como sistema para el análisis de metabolismo de carbono. Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Pao S, Paulsen I, Saier M, JR. 1998. Major facilitator superfamily. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 62: 1-34.
- Pego J, Kortstee AJ, Huijser C, Smeekens SCJ. 2000. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J. Exp. Bot.* 51: 407-416.
- Pelleschi S, Rocher JP, Prioul JL. 1997. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in immature maize leaves. *Plant Cell Environ.* 20: 493-503.
- Quick P, Siegl G, Neuhaus E, Feil R y Stitt M. 1989. Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. *Planta* 177: 535-546.
- Ramírez-Verdejo S. 2007. Detección *in situ* de la expresión diferencial de los transportadores de azúcares en los tejidos embrionarios de maíz y su posible regulación por carbohidratos. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Ransom-Hodgkins W, Vaughn MW, Bush DR. 2003. Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton-sucrose symporter. *Plant Physiol.* 218: 121-130
- Raven P, Evert R, Eichhorn S. 1992. Biology of plants. 5ª edición. Worth Publishers. EUA.. pp 66-68, 441-452, 575-572.
- Reinders A, Schulze W, Kühn C, Barker L, Schulz A, Ward JM, Frommer WB. 2002. Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. *Plant Cell* 14: 1567-1577.
- Riesmeier J, Willmitzer L, Frommer WB. 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* 11: 4705-4713.
- Riesmeier, J. W., Hirner, B., Frommer, W. B. 1993. Expression of source transporter from potato correlates with the sink-to-source transition in leaves. *Plant Cell.* 5: 1591-1598.
- Roitsch T, Bittner M, Godt DE. 1995. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-regulation. *Plant Physiol.* 108: 285-294.
- Roitsch T, González MC. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9 : 606-613.

- Sánchez-Nieto S, García-Rubio O, Pacheco MF, Carballo A, Rodríguez-Sotres R, Gavilanes-Ruiz M. Purification of plasma membranes from maize embryos. *Physiol. Plant.* 101; 157-164.
- Sánchez-Nieto S., Tuena de Gómez-Puyou M, Rodríguez-Sotres R, Carballo A, Gavilanes-Ruiz M. 1998. Comparison of plasma membrane H⁺-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos. *Biochim. Biophys. Acta* 1414: 175-187
- Sauer N, Tanner W. 1989. The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eucaryotic H⁺-cotransporter. *FEBS Lett.* 259: 43-46.
- Sauer N y Stolz J. 1994. Issue 1SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant Journal.* 6: 67.
- Shaffer A, Petreikov M. 1997. Sucrose-to starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation. *Plant Physiol.* 113: 739-746.
- Sharp RE, LeNoble ME. 2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J. Exp. Bot.* 53: 33-37.
- Schultze W, Weise A, Frommer WB, Ward JM. 2000. Function of the cytosolic N-terminus of sucrose AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Lett.* 485: 189-194.
- Shulze W, Reinders A, Ward J, Lalonde S, Frommer W. 2003. Interactions between co-expressed *Arabidopsis* sucrose transporters in the split-ubiquitin system. *BMC Biochem.* 4:3
- Schurr U, Heckenberg U, Herdel K, Walter A, Feil R. 2000. Leaf development in *Ricinus communis* during drought stress: dynamics of growth processes, of cellular structure and of sink-source transition. *J. Exp. Bot.* 51: 1515-1529.
- Slone J, Buckhout TJ, VanDerWoude WJ. 1991. Symport of Proton and Sucrose in Plasma Membrane Vesicles Isolated from Spinach Leaves. *Plant Physiol.* 96: 615-618.
- Smith A, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM. 2003. Starch mobilization in leaves. *J. Exp. Bot.* 54: 577-583.
- Sobeih W, Dood IC, Bacon MA, Grierson D, Davies WJ. 2004. Long –distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. *J. Exp. Bot.* 55: 2353-2363.
- Sonnewald U, Hajirezaei M, Kossmann J, Heyer A, Trethewey RN, Willmitzer L. 1997. Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnol.* 15: 794-797.
- Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrz M y Sauer N. 1995. *Plant Cell.* 7: 1545-1554.
- Tamoi M, Nagaoka M, Yabuta Y, Shigeoka S. 2005. Carbon metabolism in the Calvin Cycle. *Plant Biotech.* 22. 355-360.
- Taiz L, Zeiger E. 2002. Plant physiology. 3rd Edición.
- Tegeder M, Wang XD, Frommer WB, Offler CE, Patrick JW. 1999. Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* L. *Plant J.* 18: 151-161.
- Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geigenberger P. 2003. Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signaling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J.* 35: 490-500.
- Tomás-Cobos L, Casadomé L, Mas G, Sanz P, Posas F. 2004. Expression of the HXT1 low affinity glucose transporter requires the coordinated activities of the HOG and glucose signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 279: 22010-22019.
- Turgeon R. 2006. Phloem loading: How leaves gain their independence. *Bioscience.* 56:15-24
- Vaughn M, Harrington GN, Bush DR. 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 10876-10880
- Van Bel A., 2003. Transport phloem: low profile, high impact. *Plant Physiol.* 131: 1509-1510.

- Vassey T, Sharkey T. 1989. Mild Water Stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase Activity. *Plant Physiol.* 89: 1066–1070.
- Veldhuis G, Hink M, Krasnikov V, van den Bogaart G, Hoeboer J, Visser JAW, Broos J, Poolman B. 2006. The oligomeric state and stability of the mannitol transporter, Enzymellmtl, from *Escherichia coli*: A fluorescence correlation spectroscopy study. *Protein Sci.* 15: 1977-1986.
- Voet D, Voet JG. 1995. Biochemistry. John Wiley and Sons. New York. Pp. 649-661.
- Walter A, Schurr U. 2005. Dynamics of leaf and root growth: endogenous control versus environmental impact. *Annal. Bot.* 95: 891-900.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1997. A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in *Faba Bean* seeds. *Plant Cell.* 9: 895-908.
- Weber A, Servatius CJ, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Heberker U, Flügge UI. 2000. Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* 12: 787-801.
- Weise A, Barker L, Kun, Lalonde S, Bushmann H, Frommer WB, Ward JM. 2000. A new subfamily of sucrose transporters SUT4 with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* 12: 1345-1356.
- Westgate M y Boyer JS. 1985. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* 164:540-549
- Worrell A, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersig M, Voelker TA. 1991. Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* 3: 1121-1130.
- Wu Y, Crosgrave DJ. 2000. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *J. Exp. Bot.* 51: 1543-1553.
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L. 2002. Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta* 215: 645-652
- Yu S-M, Lee Y-C, Fang S-C, Hwa S-F, Liu L-F (1996) Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of α -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. *Plant Mol Biol* 30: 1277-1289
- Zavala-Zendejas S. 2001. Caracterización del simportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz. Patrón de la proteína y de la actividad. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Zeeman S, Smith SM, Smith AM. 2004. The breakdown of starch in leaves. *New Phytol.* 163: 247–261.
- Zhu J. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 247–273.
- Zinselmeier C, Jeong B, Boyer J. 1999. Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant Physiol.* 121: 25–35.