



ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN TISULAR Y EN RESPUESTA A LUZ DEL GEN *Ateq-1-SSH* DE LA 1-SSH FRUCTOSILTRANSFERASA DE *Agave tequilana* Weber var. Azul.

José Orlando Puc-Uitz¹, Alfredo Sánchez-Villareal¹, Luís Herrera-Estrella² y Aída Martínez-Hernández^{1*}.

¹Colegio de Postgraduados *campus* Campeche, Nicaragua No 91, 3er. Piso. Col. Sta. Ana. CP 24050 Campeche, Camp. Tel. y Fax 01(981)8112112. ²LANGEBIO, CINVESTAV *campus* Gto * aidamh@colpos.mx

Palabras clave: 1-SST (Sucrosa: Sucrosa 1-Fructosiltransferasa); Análisis de la expresión genética; RT-PCR

Introducción. Las Fructosiltransferasas son enzimas responsables de la biosíntesis de oligofruktanos, polímeros lineales y ramificados principalmente con enlaces β (2-1) fructosil-fructosa utilizados en la industria de los alimentos como aditivos por su bajo valor calórico y propiedades nutracéuticas y prebióticas (1). En plantas, además de ser los principales metabolitos de reserva en las especies que los producen, los oligofruktanos parecen estar involucrados como osmolitos en la protección durante la sequía y estrés por frío y salinidad, previniendo daños en las membranas celulares (1). En los Agaves, se considera que los oligofruktanos son los principales productos fotosintéticos acumulados en sus “piñas”, tallos modificados como órganos de reserva (3), probablemente como reserva metabólica para procesos como la floración. Los carbohidratos acumulados en las “piñas” de los agaves son aprovechados industrialmente como sustrato para la fermentación durante la producción del tequila.

A pesar de la importancia de la producción de oligofruktanos, pocas fructosiltransferasas han sido clonadas, las rutas biosintéticas han sido bien estudiadas en relativamente pocas especies, y muy pocos trabajos abordan el estudio de la regulación de la expresión de las enzimas que participan en su biosíntesis en respuesta a estímulos ambientales o intrínsecos (ej 3). Los escasos estudios hasta ahora realizados sugieren que la expresión y actividad de estas enzimas es regulada a nivel transcripcional y postranscripcional, por el estatus como fuente/consumidor del tejido fotosintético, la luz, y la disponibilidad de N_2 . El estudio de las rutas biosintéticas de oligofruktanos en *A. tequilana*, así como los factores que las regulan, conducirá a comprender el papel de los oligofruktanos en la fisiología de plantas CAM evolutivamente adaptadas a zonas áridas, y la regulación de su producción en el agave por el estado metabólico.

Con el objetivo de analizar la regulación de la expresión del gen que codifica la enzima Sucrosa:Sucrosa 1-Fructosiltransferasa (1-SST) de *A. tequilana* Weber var. Azul; en respuesta a factores extrínsecos e intrínsecos; en este trabajo se determinó, mediante RT-PCR, el patrón de expresión tisular del gen *Ateq 1-SSH*, analizando sus niveles de expresión en tejidos fotosintéticos y de reserva con diferente estado de desarrollo, y comparando la regulación de su expresión en respuesta al ciclo luz/oscuridad con la del gen de la enzima rubisco de *A. tequilana* (*Ateq-rbcS*).

Metodología. 2.5 μ g de RNA total, extraído con TRIZOL (Invitrogen), a partir de diferentes tejidos de *Agave tequilana* Weber var. Azul (hoja inmadura, hoja fotosintéticamente madura, colectada a diferentes horarios durante el ciclo luz/oscuridad, base de la hoja, “piña”,

meristemo vegetativo, meristemo de inflorescencia en desarrollo, y raíz), de plantas de 1 y 5 años de edad; fue utilizado para detectar mediante RT-PCR los genes *1-SST* y *rbcS* de *A. tequilana*; utilizando 10 pmol de iniciadores específicos, las enzimas SuperScript II RT y PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen), bajo condiciones estándar, y 30 ciclos para amplificación (30s a 55°C, 1 min a 72°C y 15s a 94°C).

Resultados y discusión. Iniciadores específicos para los genes de *rbcS* y *1-SST* de *A. tequilana* fueron diseñados a partir de las secuencias completas de los cDNAs reconstruidos en base a secuencias identificadas por homología en una base de datos de 30,000 ESTs de *A. tequilana* previamente generada (4,5). Se montaron las condiciones de amplificación por RT-PCR de los genes evaluados. La amplificación de genes de actina, utilizando oligos universales, fue realizada como control de carga. El patrón tisular de expresión del gen *1-SST* de *A. tequilana* y su regulación por el ciclo/oscuridad fue comparativamente analizada respecto al gen *rbcS*, confirmando la expresión del gen de *rbcS* en tejidos fotosintéticamente activos, y determinando que el gen de la *1-SST* de *A. tequilana* se expresa en diversos tejidos, no solo en los de reserva, y que su expresión depende del estatus metabólico de los mismos.

Conclusiones. Este es el primer reporte del patrón de expresión de una fructosiltransferasa en agaves; en el cuál mostramos la presencia de mensajeros de la Sucrosa:Sucrosa 1-Fructosiltransferasa (1-SST) en diversos tejidos de *A. tequilana*. El espectro de expresión tisular del gen *Ateq 1-SSH* sugiere un papel de los oligofruktanos en este tipo de plantas más amplio que el de metabolitos de reserva.

Agradecimientos: Este trabajo se realizó con apoyo de los Proyectos SEP-CONACYT C. Básica 44404 y FOMIX-Campeche 23821

Bibliografía:

1. Ritsema, T, and Meekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*. (6): 223-230
2. Lopez, M, Mancilla, N. and Mendoza, G. (2003). Molecular structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *J Agric Food Chem*. 51(27):7835-7840.
3. Luscher, M, Hochstrasser, U, Vogel G, et al. (2000) Cloning and Functional Analysis of Sucrose:Sucrose Fructosyltransferase from Tall Fescue1. *Plant Physiology* (124):1217-1227.
4. Martínez-Hernández, A. (2006). Comparative and Functional Genomic of *Agave tequilana*. 8th International Congress of Plant Mol. Biol. ISPMB. Adelaide Australia, 2006, pag 82.
5. Martínez-Hernández A., et al. *Artículo en preparación*.