

Importancia de la isoforma-1 de la sacarosa sintasa en el metabolismo del carbono durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis thaliana**

Importance of isoform-1 of sucrose synthase in carbon metabolism during seed development *Arabidopsis thaliana*

Juan Gabriel Angeles-Núñez^{1§}, Carlos Herrera-Corredor¹ y Talina Olivia Martínez-Martínez¹

¹Campo Experimental Bajío- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5. 38010 Celaya, Guanajuato, México. Tel. 01 461 61-15-323 Ext. 212. (herrera.corredor@inifap.gob.mx; martinez.talina@inifap.gob.mx). [§]Autor para correspondencia: angeles.gabriel@inifap.gob.mx.

Resumen

La sacarosa sintasa (SUS) es una enzima clave en el metabolismo de la sacarosa. Esta enzima cataliza la conversión reversible de sacarosa y UDP a UDP-Glucosa y fructosa. En *Arabidopsis*, la familia de genes SUS consta de 6 miembros. Uno de estos, el gen *SUS1* (At5g20830) se expresa durante la fase de desarrollo de la morfogénesis de la semilla, periodo que corresponde a la fase de la acumulación masiva de almidón y de hexosas, a la fecha se desconoce la función metabólica que tiene esta isoforma-1 en la síntesis de estos compuestos carbonados. Con la finalidad de aportar elementos que contribuyan a determinar las funciones de esta enzima (*SUS1*) en el desarrollo de la semilla, se llevó a cabo un análisis funcional, el cual comprende la caracterización bioquímica de un alelo nulo de esta isoforma. Los resultados obtenidos muestran la importancia de esta enzima (*SUS1*) para el metabolismo de la sacarosa en la semilla de *Arabidopsis* en la etapa de desarrollo. Por otro lado, la mutación *SUS1* afecta principalmente el cociente hexosas/sacarosa; lo cual provoca una disminución importante en la acumulación de ácidos grasos y de almidón transitorio durante los estadios tempranos del desarrollo de la semilla.

Palabras clave: almidón, ácidos grasos, isoforma-1 de sacarosa sintasa, semillas en desarrollo.

Abstract

Sucrose synthase (SUS) is a key enzyme in the metabolism of sucrose. This enzyme catalyzes the reversible conversion of sucrose and UDP to UDP-glucose and fructose. In *Arabidopsis*, the family SUS of genes consists of 6 members. One of these, the *SUS1* gene (At5g20830) is expressed during the development phase of the morphogenesis of the seed, which corresponds to the phase of the massive accumulation of starch and hexoses to date unknown metabolic function has this isoform-1 in the synthesis of these carbon compounds. In order to provide elements that contribute to determine the roles of this enzyme (*SUS1*) in seed development was carried out a functional analysis, which comprises the biochemical characterization of a null allele of this isoform. The results show the importance of this enzyme (*SUS1*) for sucrose metabolism in *Arabidopsis* seeds in the development stage. Moreover, the mutation affects mainly *SUS1* hexoses/sucrose ratio; which results in a significant accumulation of fatty acids and of transitory starch in the early stages of seed development decreased.

Keywords: starch, fatty acid, isoform-1 sucrose synthase, developing seeds.

* Recibido: enero de 2014
Aceptado: mayo de 2014

Introducción

Evolutivamente una de las estrategias de las plantas superiores fue la capacidad de formar semillas. Estas estructuras confieren propiedades intrínsecas (protección física y bioquímica a través de los tegumentos, tolerancia a la desecación, metabolismo inactivo, acumulación de compuestos de almacenamiento) que contribuyen a la supervivencia y a la dispersión. En el ciclo de vida de las plantas superiores, el desarrollo de la semilla es un proceso crucial que proporciona el enlace entre dos generaciones esporofíticas distintas. Con base en múltiples modelos de plantas, estos procesos pueden dividirse en dos etapas: morfogénesis y maduración (Manfield *et al.*, 1992; Baud *et al.*, 2002; Becerra-Baeza, 2007).

En *Arabidopsis*, la fase de morfogénesis precoz comienza después de la doble fecundación y se termina a lo largo del sexto día después de la floración (DDF). Después de esta etapa, el embrión adquiere la arquitectura de base de la planta y el albumen se desarrolla a través de divisiones celulares activas (Baud *et al.*, 2002). Durante la etapa de maduración, los compuestos de almacenamiento son sintetizados y acumulados principalmente en el embrión (Mansfield *et al.*, 1992; Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez y Tiessen, 2010, 2011, 2012). Finalmente en la fase de la maduración tardía, el embrión es metabólicamente inactivo y adquiere tolerancia a la desecación. En semillas de *Arabidopsis*, las fuentes de carbono y nitrógeno son almacenadas en la forma de lípidos y proteínas (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez y Tiessen, 2010).

Estas reservas son la principal fuente de alimento para la plántula en la germinación temprana (Bewley y Black, 1994), por lo tanto la sacarosa representa la forma principal en la que el carbono fotosintéticamente asimilado es transportado a las plantas. Después de ser sintetizada en las hojas o en las paredes de las silicuas, la sacarosa se transporta vía floema para proveer a los órganos demanda (semillas) (Zhang *et al.*, 2007). La degradación de la sacarosa en las plantas es catalizada por invertasas (β -D-fructofuranosilfructohidrolasa, EC 3.2.1.26) o por la sacarosa sintasa (UDP-glucosa: Transferasa 2- α -D-glucosiltransferasa EC 2.4.1.13, SUS).

Las invertasas están implicadas en diversos aspectos del ciclo de vida de la planta así como en la respuesta de la planta a los estímulos ambientales (Roitsch y Gonzalez, 2004). La actividad de degradación de la sacarosa sintasa (SUS) está correlacionada con la fuerza de demanda de los órganos

Introduction

Evolutionarily one of the strategies of higher plants was the ability to form seeds. These structures give intrinsic properties (physical and biochemical protection through the integument, desiccation tolerance, sluggish metabolism, accumulation of storage compounds) that contribute to the survival and dispersion. In the life cycle of higher plants, seed development is a crucial process that provides the link between two distinct sporophytic generations. Based on multiple models of plants, these processes can be divided into two stages: morphogenesis and maturation (Manfield *et al.*, 1992; Baud *et al.*, 2002; Becerra-Baeza, 2007).

In *Arabidopsis*, the early phase of morphogenesis begins after double fertilization and ends along the sixth day after flowering (DAF). After this stage, the embryo acquires the basic architecture of the plants and the albumen is developed through active cell divisions (Baud *et al.*, 2002). During the maturation stage, storage compounds are synthesized and accumulated mainly in the embryo (Mansfield *et al.*, 1992; Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez and Tiessen, 2010, 2011, 2012). Finally in the late maturation phase, the embryo becomes metabolically inactive and desiccation tolerance. In seeds of *Arabidopsis*, the carbon and nitrogen sources are stored in the form of lipids and proteins (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez and Tiessen, 2010).

These reserves are the main source of nourishment for the young plants in the early germination (Bewley and Balck, 1994), therefore represents the main sucrose way photosynthetically assimilated carbon is transported to plants. After being synthesized in the leaves or on the walls of pods sucrose is transported via the phloem to provide demand organs (seeds) (Zhang *et al.*, 2007). Sucrose degradation in plants is catalyzed by invertase (β -D-fructofuranosilfructohidrolasa, EC 3.2.1.26) or sucrose synthase (UDP-glucose: α -transferase 2-D-glucosyltransferase EC 2.4.1.13, SUS).

Invertases are involved in various aspects of the life cycle of the plants and in the plants response to environmental stimuli (Roitsch and González, 2004). The degradation activity of sucrose synthase (SUS) is correlated with the strength of demand for storage organs; it provides substrates for starch synthesis in embryos of corn or peas and potato tubers (Zrenner *et al.*, 1995; Chourey and Nelson, 1976; Dejardin *et al.*, 1997). Weber *et al.* (1997) in subsequent studies found that the expression of SUS in *Vicia faba* seed

de almacenamiento, ésta provee sustratos para la síntesis de almidón en embriones de maíz o de chicharos así como en tubérculos de papa (Zrenner *et al.*, 1995; Chourey y Nelson, 1976; Déjardin *et al.*, 1997). Weber *et al.* (1997) en estudios posteriores encontraron que la expresión de SUS en la semilla de *Vicia faba* o de tubérculos de papa (Zrenner *et al.*, 1995) está implicada principalmente en la síntesis y almacenamiento de almidón y de proteínas. En las especies examinadas, la sacarosa sintasa está codificada por una familia de genes.

El genoma de *Arabidopsis* contiene seis genes que participan en la síntesis de sacarosa sintasa, los cuales poseen diferentes perfiles de expresión regulados por diversas condiciones de estrés ambiental tal como la privación de oxígeno (anoxia), deshidratación, tratamiento al frío, así como respuesta a soluciones con azúcares y regulación por factores de transcripción (Baud *et al.*, 2004; Bieniawska *et al.*, 2007; Angeles-Núñez *et al.*, 2008; Angeles-Núñez y Tiessen, 2010, 2012). El gen *AtSUS1* (At5g20830) fue clonado por Martin *et al.* (1993). Un análisis del transcriptoma así como una serie de estudios, indican que este gen se expresa en diferentes órganos de la planta (<http://www.genevestigator.ethz.ch/at/>; Cieresko y Kleczkowski, 2002; Baud *et al.*, 2004; Bieniawska *et al.*, 2007).

El análisis de ciertos mutantes de SUS tales como *rugosus4* en chícharo (*rug4*, Craig *et al.*, 1999) o *shrunk1* en maíz (*Sh1*, Chourey *et al.*, 1998) indica que las semillas son severamente afectadas en la acumulación de almidón durante su desarrollo. El catabolismo de la sacarosa por la SUS apoya directamente la síntesis de la celulosa, por lo que la supresión de la SUS en la epidermis del óvulo de la semilla del algodón, reprime la liberación y la elongación de la fibra (Ruan *et al.*, 2003). La expresión de diferentes genes de SUS es (espacio-temporal) regulada y diferencialmente modulada en respuesta a la anoxia, a bajas temperaturas y a estrés osmótico (Maraña *et al.*, 1990; Chourey *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1998; Déjardin *et al.*, 1999).

Estudios sobre mutantes simples y dobles de sacarosa sintasa indican que las semillas maduras no presenta ningún fenotipo metabólico (Bieniawska *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios más recientes realizados durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis* mostraron que la localización de *AtSUS* está correlacionada con la acumulación de almidón a nivel del tegumento durante la fase de la maduración-intermedia (15 DDF) (Fallahi *et al.*, 2008; Angeles-Núñez *et al.*, 2008). Ésta expresión es conforme a la acumulación de la proteína *AtSUS2* y nivel de transcritos del gen *AtSUS2*; sin embargo, los autores(as) no descartan la posible presencia de actividades de otras isoformas de SUS, particularmente

or potato tubers (Zrenner *et al.*, 1995) is mainly involved in the synthesis and storage of starch and protein. In the species examined, a gene family encodes sucrose synthase.

The *Arabidopsis* genome contains six genes involved in the synthesis of sucrose synthase, which have different expression profiles regulated by various environmental stresses such as deprivation of oxygen (anoxia), dehydration, cold treatment, and in response to solutions with sugars and regulation by transcription factors (Baud *et al.*, 2004; Bieniawska *et al.*, 2007; Angeles-Núñez *et al.*, 2008; Angeles-Núñez and Tiessen, 2010, 2012). The *AtSUS1* gene (At5g20830) was cloned by Martin *et al.* (1993). A transcriptome analysis as well as a number of studies indicate that this gene is expressed in various organs of the plants (<http://www.genevestigator.ethz.ch/at/>; Cieresko and Kleczkowski, 2002; Baud *et al.*, 2004; Bieniawska *et al.*, 2007).

The analysis of some mutants such as *SUS rugosus4* in pea (*rug4*, Craig *et al.*, 1999) or corn *shrunk1* (*Sh1*, Chourey *et al.*, 1998) indicates that seeds are severely affected in starch accumulation during development. Sucrose catabolism *SUS* directly supports the synthesis of cellulose, so that the suppression of *SUS* in the epidermis of the egg of the cottonseed, and suppresses the release of the fiber elongation (Ruan *et al.*, 2003). The expression of different genes is *SUS* (space-time) and regulated differentially modulated in response to anoxia, low temperature and osmotic stress (Maraña *et al.*, 1990; Chourey *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1998; Déjardin *et al.*, 1999).

Studies of single mutants and double sucrose synthase mature seeds indicate that presents no metabolic phenotype (Bieniawska *et al.*, 2007). However, more recent studies during seed development of *Arabidopsis* showed that the location of *ATSUS* is correlated with starch accumulation at the level of the integument during the mid-maturation (15 DAF) (Fallahi *et al.*, 2008; Angeles-Núñez *et al.*, 2008). This expression is consistent with the accumulation of protein and *AtSUS2* level *AtSUS2* gene transcripts; however, the author do not rule out the possible presence of activities of other isoforms of *SUS*, particularly *SUS3*, strongly expressed in the seed during the maturation phase (Angeles-Núñez *et al.*, 2008; Angeles-Núñez and Tiessen, 2010, 2012).

In addition, these findings indicate that *SUS2* is located in the seed coat, endosperm or embryo, and that the protein is associated with membranes of plastids in seeds, during the maturation phase (Angeles-Núñez *et al.*, 2008). Recently, the work done by Angeles-Núñez and Tiessen (2010, 2012) have shown that genes *SUS3* *SUS2* and modulate metabolic homeostasis

SUS3, fuertemente expresada en la semilla durante la fase de maduración (Angeles-Núñez *et al.*, 2008; Angeles-Núñez y Tiessen, 2010, 2012).

En adición, estos hallazgos señalan que *SUS2* está localizada en el tegumento, en el endospermo y embrión, y que la proteína está asociada a membranas de plastos en la semilla, durante la fase de maduración (Angeles-Núñez *et al.*, 2008). Recientemente, los trabajos desarrollados por Angeles-Núñez y Tiessen, (2010, 2012) han mostrado que los genes *SUS2* y *SUS3* modulan la homeostasis metabólica de la semilla de *Arabidopsis*. Con base en la información presentada, se planteó la hipótesis que la enzima *SUS1* al igual que las otras isoformas de sacarosa sintasa está implicada de manera activa en la vía metabólica del carbono durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*.

Para evaluar esta hipótesis, en este trabajo se caracterizó bioquímicamente la mutante *SUS1*, a través de la determinación de la actividad total de sacarosa sintasa, del contenido de carbohidratos (hexosas, sacarosa, almidón), así como del contenido de lípidos y proteínas totales durante el desarrollo de las semillas de *Arabidopsis*.

Materiales y métodos

Material biológico y condiciones de cultivo

Para determinar la función de la isoforma *SUS1* durante el desarrollo de la semilla, se utilizó una línea de inserción T-DNA afectada en el gen At5g20830 del instituto de Salk (<http://signal.salk.edu/>). Un alelo nulo para esta isoforma fue utilizado para el desarrollo de los análisis de este trabajo. La mutante *SUS1* (DRL 61) se encuentra en el fondo genético Wassilewskija (Ws). Utilizando el ADN genómico de plantas *SUS1* los bordes derecho e izquierdo del T-DNA fueron identificados, amplificados por PCR y secuenciados, confirmando los FSTs encontrados en la base de datos de FLAGdb/FST. Se obtuvo una línea homocigota para este mutante (comunicación directa).

Las semillas fueron esterilizadas y sembradas sobre placas conteniendo medio Murashige y Skoog (MS) (M02 555, pH 5.6; Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands). Después de un tratamiento con frío (48-h a 4 °C) en obscuridad, las placas fueron transferidas a una cámara de crecimiento e incubadas a temperaturas de 20 °C/15 °C día/noche bajo un régimen de 16-h/8-h/ luz/obscuridad. Después de 15 días, las plántulas fueron transferidas a composta estéril,

Arabidopsis seed. Based on the information submitted, it was hypothesized that the enzyme *SUS1* like the other isoforms of sucrose synthase is involved actively in the metabolic pathway of carbon during seed development of *Arabidopsis*.

To test this hypothesis, in this work we biochemically characterized the mutant *SUS1*, through the determination of the total sucrose synthase activity, carbohydrate content (hexoses, sucrose, starch) and lipid content and total protein during developing seeds of *Arabidopsis*.

Materials and methods

Biological material and culture conditions

In order to determine the role of the isoform *SUS1* during seed development, a line of T-DNA insertion in the At5g20830 gene affected the Salk Institute (used <http://signal.salk.edu/>). A null allele for this isoform was used for the development of the analysis in this work. *SUS1* mutant (DRL 61) is in the genetic background Wassilewskija (Ws). Using the genomic DNA of plants *SUS1* the left and right edges of the T-DNA were identified, amplified by PCR and sequenced, confirming the FSTs found in the database FLAGdb/FST. Homozygous for this mutant line (direct communication) was obtained.

Seeds were sterilized and sown on plates containing Murashige and Skoog (MS) (M02 555, pH 5.6; Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands). After a cold treatment (48-h at 4 °C) in dark, the plates were transferred to a growth chamber and incubated at temperatures of 20 °C/15 °C day/night under a regime of 16 h/8-h/light/darkness. After 15 days, seedlings were transferred to sterile compost, under a regime of growth 16-h/8-h light/dark, associated with temperatures 21 °C/18 °C day/night. The plants were watered twice a week with a solution of fertilizer (Plants-prod, fertile, www.fertilpot.com).

Determination of total sucrose synthase activity during seed development

In order to evaluate the significance of the sucrose synthase (SUS) during seed development in *Arabidopsis*, this in vitro activity was determined using protein extracts prepared from isolated seeds for the null allele and the wild *SUS1* Ws ecotype. Samples of 200 seeds isolated for each developmental stage analyzed (9, 12, 15, 18 days after flowering (DAF)) were used to determine the total SUS activity in one trial two

bajo un régimen de crecimiento de 16-h/8-h luz/obscuridad, asociado con temperaturas de 21 °C/18 °C día/ noche. Las plantas fueron regadas dos veces por semana con una solución de fertilización (Plant-prod, fertile, www.fertilpot.com).

Determinación de la actividad total de sacarosa sintasa durante el desarrollo de la semilla

Con la finalidad de evaluar la importancia de la enzima sacarosa sintasa (SUS) durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*, se determinó esta actividad *in vitro* utilizando extractos de proteínas preparadas de semillas aisladas correspondientes al alelo nulo *SUS1* y del ecotipo silvestre Ws. Muestras de 200 semillas aisladas para cada estadio de desarrollo analizado (9, 12, 15, 18 días después floración (DDF)) fueron usadas para determinar la actividad total SUS en un ensayo de dos pasos descrito por Egger y Hampp (1992) con los siguientes cambios: El polyclar fue omitido y 0.2% de Triton X-100 (Sigma, Lyon, France) fue adicionado en la solución de extracción.

Determinación del peso seco de la semilla

Se determinó la evolución del peso seco en el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis thaliana* a través de una balanza analítica de ultra precisión Sartorius ISO 9001 como fue descrito por Baud *et al.* (2002).

Análisis de carbohidratos y lípidos

Para cada análisis, se tomaron muestras de 20 semillas liofilizadas para determinar el contenido de lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS (peso seco) y carbohidratos (hexosas y sacarosa en $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS); almidón en (ng)/semilla), como fue descrito por Baud *et al.* (2002); Angeles-Núñez y Tiessen, (2010).

Análisis de proteína total en el desarrollo de la semilla

Muestras de 10 semillas liofilizadas para cada estadio de desarrollo analizado fueron usadas para determinar el contenido de proteína total, como fue descrito por Baud *et al.* (2002); Angeles-Núñez y Tiessen, (2010). Los resultados se expresaron en $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS (peso seco).

Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con ≤ 0.05 . Se calcularon las medias así como el error estándar (ES), mediante el programa estadístico R (R Development Core Team 2008) y Excel[®] de Microsoft office 2007.

steps described by Egger and Hampp (1992) with following changes: Polyclar was omitted and 0.2% Triton X-100 (Sigma, Lyon, France) was added to the extraction solution.

Determination of dry weight of seed

The evolution of the dry weight in developing *Arabidopsis* seeds *thaliana* through a precision analytical balance Sartorius ultra ISO 9001 as described by Baud *et al* was determined. (2002).

Analysis of carbohydrates and lipids

For each analysis, lyophilized samples of 20 seeds were taken to determine the lipid content (mg / mg PS (dry weight) and carbohydrates (hexoses and sucrose in mg / mg PS) Starch (ng) / seed), as was described by Baud *et al.* (2002); Ángeles-Núñez and Tiessen (2010).

Analysis of total protein in the developing seed

Lyophilized samples of 10 seeds for each developmental stage analyzed were used to determine total protein content, as described by Baud *et al.* (2002); Ángeles-Núñez and Tiessen (2010). Results were expressed in mg/mg PS (dry weight).

Statistical analysis

With the results, analysis of variance (ANOVA) was performed with ≤ 0.05 . Average and standard error (SE), by R (R Development Core Team 2008) and Microsoft Excel[®] for office 2007 statistical program were calculated.

Results

Activity total sucrose synthase (SUS)

The profile of the total ITS activity for the mutant was modified in the early stages of seed development compared to the control (Ws). The total SUS activity in the mutant *SUS1* decreased 60% at 12 days after flowering (DAF) (Figure 1).

Seed development

The evolution of the dry weight of the seed followed a sigmoidal profile with a rapid increase between morphogenesis and maturation phase-intermediate,

Resultados

Actividad total sacarosa sintasa (SUS)

El perfil de la actividad total SUS para el mutante se modificó en estadios tempranos del desarrollo de la semilla con respecto al control (Ws). La actividad total SUS en el mutante *SUS1* disminuyó 60% a los 12 días después floración (DDF) (Figura 1).

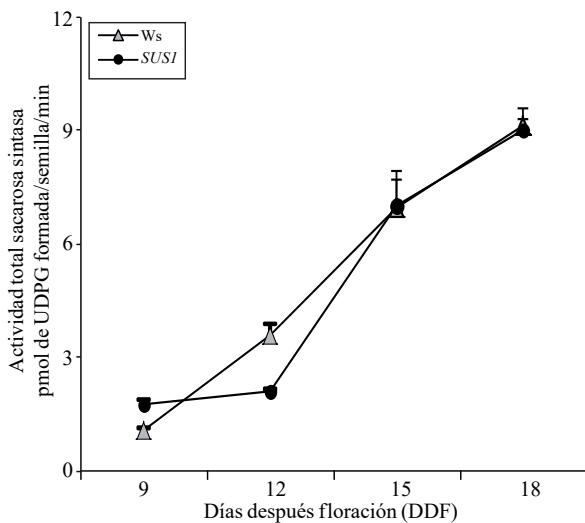


Figura 1. Actividad total sacarosa sintasa durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis* para el ecotipo silvestre (Ws) y el mutante (*SUS1*). Los valores son la media \pm SE ($n=3$). Error estándar (SE), y uridina difosfato glucosa (UDPG).

Figure 1. Overall sucrose synthase activity during seed development in *Arabidopsis* for wild ecotype (Ws) and the mutant (*SUS1*). Values are the mean \pm SE ($n=3$). Standard error (SE), and uridine diphosphate glucose (UDPG).

Desarrollo de la semilla

La evolución del peso seco de la semilla siguió un perfil sigmoideo con un incremento rápido entre la morfogénesis y la fase de maduración-intermedia, sin embargo a pesar de las diferencias observadas en estos estadios ninguna diferencia estadísticamente significativa en la masa de la semilla madura (21 DDF) fue detectada entre el mutante (*SUS1*) y el control (Ws). El periodo comprendido de 12 a 18 DDF presentó una diferencia significativa de 30% menos peso para la mutante (Figura 2).

however, despite the differences in these stages no statistically significant difference in the mass of the mature seed (21 DDF) was detected between the mutant (*SUS1*) and (Ws) control. The period of 12 to 18 DDF affected significantly less than 30% weight for the mutant (Figure 2).

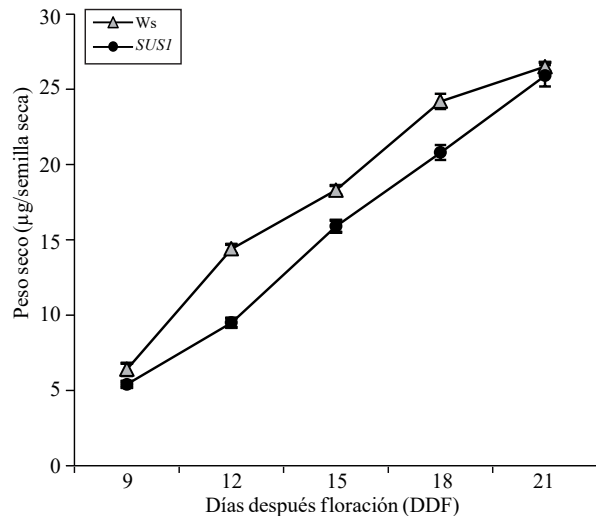


Figura 2. Peso seco de la semilla en desarrollo de *Arabidopsis* para el ecotipo silvestre (Ws) y el mutante (*SUS1*). Los valores son la media \pm SE ($n=9$). Peso seco (PS); y error estándar (SE).

Figure 2. Dry weight of the developing seed to the wild *Arabidopsis* ecotype (Ws) and the mutant (*SUS1*). Values are the mean \pm SE ($n=9$). Dry weight (PS); and standard error (SE).

The carbohydrate profile during development of the seed

In order to determine whether the mutation of sucrose synthase-1 did have an impact on the carbohydrate content in developing seed, various parameters were determined using lyophilized developing seeds. The starch content in the mutant *SUS1* increased 2.5-fold relative to the wild at 15 DDF (maturation-intermediate). However, outside this period no difference (Figure 3) was detected. The profile of hexoses (fructose and glucose) in this mutant was affected during the late maturation (18 DAF). The fructose content increased 8-fold relative to wild (Ws). While its glucose content increased 3.2 times over the same period (Figure 4). A decrease of 25% sucrose was detected at 18 DDF for this mutant (Figure 4). The ratio of hexoses / sucrose decreased the mutant *SUS1* 40% at 9 DDF and 60% at 12 DAF (Figure 4).

Perfil del contenido de carbohidratos durante el desarrollo de la semilla

A fin de determinar si la mutación de sacarosa sintasa-1 tuvo un impacto sobre el contenido de carbohidratos en la semilla en desarrollo, varios parámetros fueron determinados utilizando semillas liofilizadas en desarrollo. El contenido de almidón en el mutante *SUS1* se incrementó 2.5 veces con respecto al silvestre a los 15 DDF (maduración-intermedia). Sin embargo, fuera de este periodo no se detectó ninguna diferencia (Figura 3). El perfil de hexosas (fructosa y glucosa) en este mutante, fue afectado durante la fase de maduración tardía (18 DDF). El contenido en fructosa se incrementó 8 veces con respecto al silvestre (Ws). Mientras que su contenido en glucosa se incrementó 3.2 veces para el mismo periodo (Figura 4). Una disminución de 25% en sacarosa fue detectada a los 18 DDF para este mutante (Figura 4). El cociente de hexosas/sacarosa en el mutante *SUS1* disminuyó 40% a los 9 DDF y 60% a los 12 DDF (Figura 4).

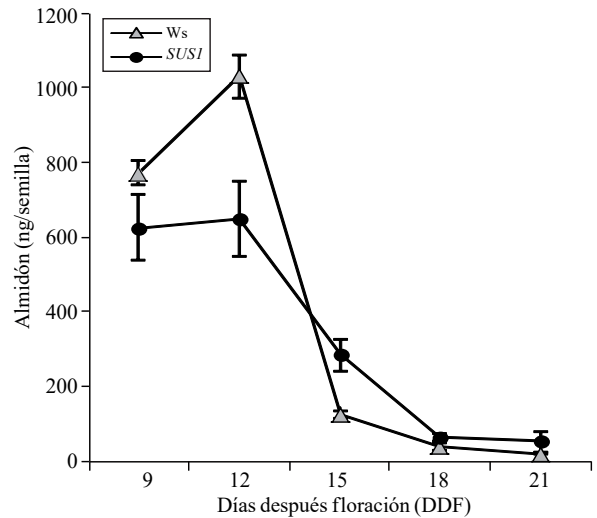


Figura 3. Contenido de almidón durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis* para el ecotipo silvestre (Ws) y el mutante (*SUS1*). Los valores son la media ±SE (n= 3). Error estándar (SE).

Figure 3. Starch content in developing seed of wild *Arabidopsis* ecotype (Ws) and the mutant (*SUS1*). Values are the mean ± SE (n= 3). Standard error (SE).

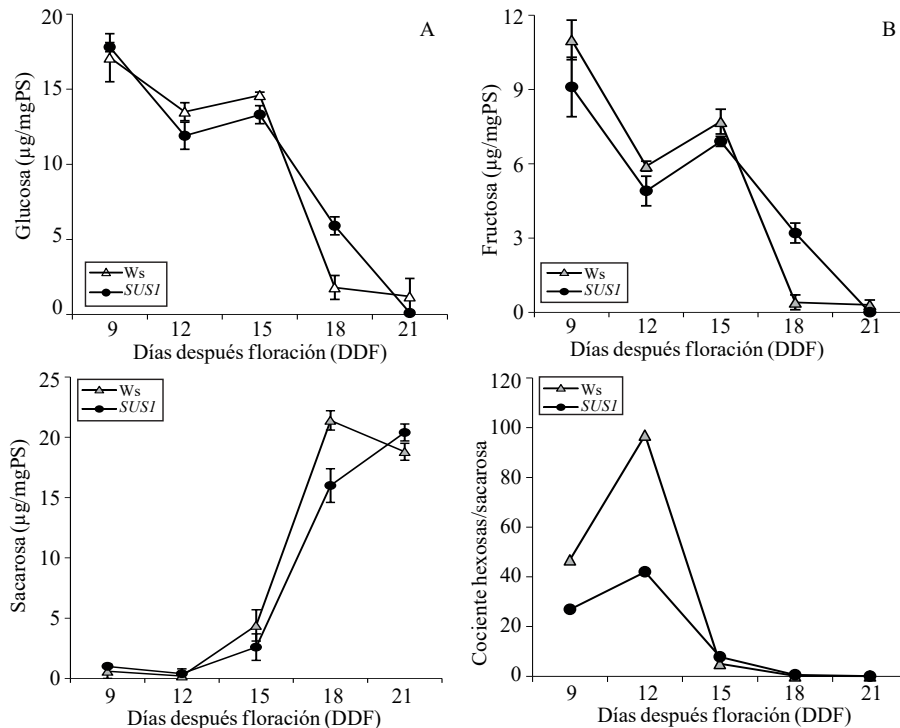


Figura 4. Contenido de carbohidratos durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis* para el ecotipo silvestre (Ws) y el mutante (*SUS1*). A). Contenido en glucosa; B). Contenido en fructosa; C). Contenido en sacarosa; y D). Cociente hexosas/sacarosa. Los valores son la media ± SE(n= 3). Peso seco (PS), y error estándar (SE).

Figure 4. Carbohydrate content during seed development of *Arabidopsis* for wild ecotype (Ws) and mutant (*SUS1*). A). Glucose content; B). Fructose; C). Sucrose content; and D). Hexoses/sucrose ratio. Values are the mean ± SE (n= 3). Dry Weight (PS), and standard error (SE).

Síntesis de ácidos grasos durante el desarrollo de la semilla

El perfil de acumulación de ácidos grasos totales en el mutante *SUSI* se modificó al comienzo de la fase de maduración (12 DDF). Durante este periodo, el contenido en ácidos grasos disminuyó 25% con respecto al control (Ws), sin embargo fuera de este periodo, ninguna diferencia fue detectada (Figura 5). El mutante presenta un perfil semejante en ácidos grasos de cadena larga (VLCFA)/C16-C18, presentando una disminución de 60% a 9 DDF y de 20% a 12 DDF (Figura 5B).

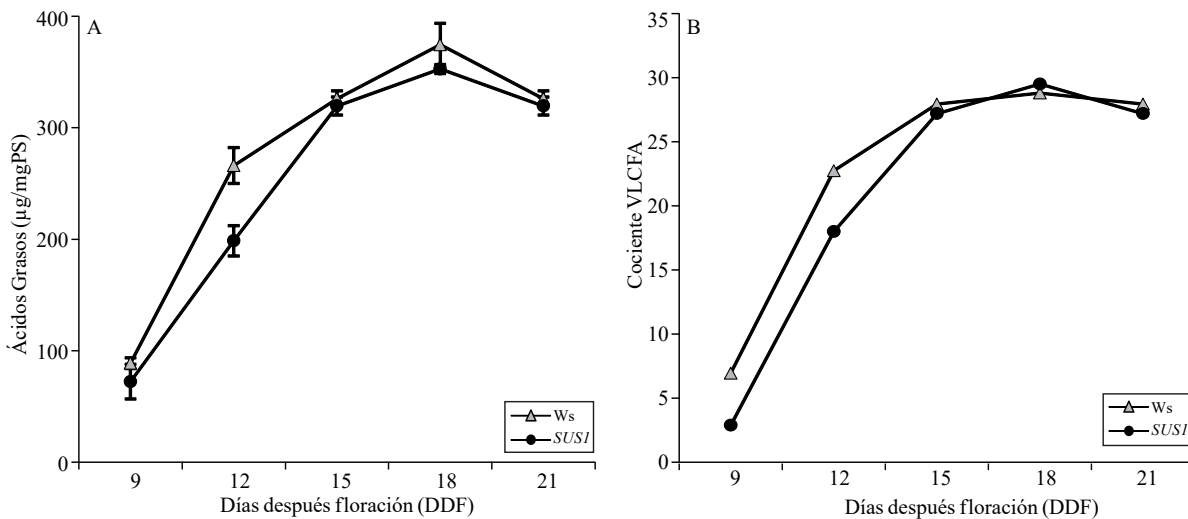


Figura 5. Contenido y composición de ácidos grasos durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis* para el ecotipo silvestre (Ws) y el mutante (*SUSI*). A). Contenido en ácidos grasos totales; y B). Cociente de VLCFA. Los valores son la media \pm SE (n=3). “Very long chain fatty acid” (VLCFA). VLCFA= 20:0 + 20:1 + 20:2 + 22:1) / (16:0 + 18:0 + 18:1 + 18:2 + 18:3); Peso seco (PS), y error estándar (SE).

Figure 5. Content and fatty acid composition in developing *Arabidopsis* seeds for wild ecotype (Ws) and the mutant (*SUSI*). A). Content of total fatty acids; and B). VLCFA ratio. Values are the mean \pm SE (n= 3). “Very long chain fatty acid” (VLCFA) VLCFA= 20:0 + 20:1 + 20:2 + 22:1)/(16:0 + 18:0 + 18:1 + 18:2 + 18:3); Dry Weight (PS), and standard error (SE).

Síntesis de proteínas totales durante el desarrollo de la semilla

No fue detectada ninguna diferencia estadísticamente significativa en el contenido de proteínas totales en las semillas del mutante *SUSI* durante el desarrollo de la semilla con respecto al silvestre (Ws) (Figura 6).

Discusión

En la mayoría de las plantas, una parte de carbono orgánico producido por la fotosíntesis está asignada a la síntesis de sacarosa, que es transportada a los órganos demanda, donde la sacarosa puede ser utilizada como fuente de esqueletos

Fatty acid synthesis during seed development

The profile of total fatty acid accumulation in the mutant *SUSI* was modified at the beginning of the maturation phase (12 DAF). During this period, the fatty acid content decreased 25% compared to control (Ws); however, beyond this period, no difference was detected (Figure 5). The mutant has a similar profile to the long chain fatty acids (VLCFA)/C16-C18, a decrease of 60% and 9 20% DDF and 12 DAF (Figure 5B).

Total protein synthesis during seed development

There was detected a statistically significant difference in the content of total protein in seeds of mutant *SUSI* during seed development compared to the wild (Ws) (Figure 6).

Discussion

In most plants, part of the organic carbon produced by photosynthesis is assigned to the synthesis of sucrose, which is transported to the organ demand, where sucrose can be used as a source of carbon skeletons for the synthesis of structural elements as metabolic fuel or it can build up and be stored at high concentrations (Martin *et al.*, 1993).

de carbono para la síntesis de elementos estructurales como carburante metabólico o bien puede acumularse y ser almacenado a concentraciones elevadas (Martin *et al.*, 1993). La degradación de la sacarosa es esencial para las plantas, no sólo por el aporte de fuente de carbono, sino por la liberación de señales de azúcares a partir de hexosas en las estructuras en formación. Sólo las invertasas y la sacarosa sintasa catalizan la degradación de la sacarosa en las vías metabólicas conocidas *in vitro* (Koch, 2004).

En este trabajo se presenta la implicación de la isoforma *SUS1* en el metabolismo de la sacarosa durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*, a través del análisis de un alelo nulo para esta isoforma. En el mutante *SUS1*, la actividad total SUS está afectada principalmente al comienzo de la maduración (Figura 1). El cambio del perfil de actividad total SUS está acompañada de modificaciones importantes en el metabolismo del carbono durante el desarrollo de la semilla (Figura 2-6). Estos cambios metabólicos son discutidos a continuación.

La disminución del contenido de almidón en el mutante *SUS1* está correlacionado con la disminución de la actividad total SUS durante la maduración.

En las semillas de *Arabidopsis*, el almidón se acumula transitoriamente durante la primera mitad del desarrollo, posteriormente es rápidamente degradado durante la fase tardía del desarrollo de la semilla (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez y Tiessen, 2010, 2011, 2012). En colza se ha propuesto que la acumulación del almidón puede reforzar el estatus de la semilla como órgano-fuente principal antes de la síntesis de compuestos de almacenamiento (aceite) y que éste podría regular la asignación de nutrientes entre los diferentes tejidos de la semilla durante el desarrollo (da Silva *et al.*, 1997).

En este estudio, se observó que la disminución del contenido de almidón acumulada al inicio de la maduración (12 DDF) en el mutante *SUS1* está correlacionado con la disminución de la actividad de SUS (Figura 1 y 3). Este resultado sugiere que la sacarosa sintasa podría estar implicada en el suministro de esqueletos de carbono para la síntesis de almidón. Esta idea es coherente con la co-localización de la proteína SUS en gránulos de almidón observados en la semilla de *Arabidopsis* para este mismo periodo (Fallahi *et al.*, 2008; Angeles-Núñez *et al.*, 2008), así como en la disminución del contenido de almidón observado en semillas de *Arabidopsis* durante los estadios tempranos del desarrollo para los mutantes *Atsus2* y *Atsus3* (Angeles-Núñez y Tiessen, 2010, 2012).

Sucrose degradation is essential to plants, not only by the supply of carbon source, but also by releasing signals from hexose sugars in forming structures. Only invertase and sucrose synthase catalyze the degradation of sucrose into known metabolic pathways *in vitro* (Koch, 2004).

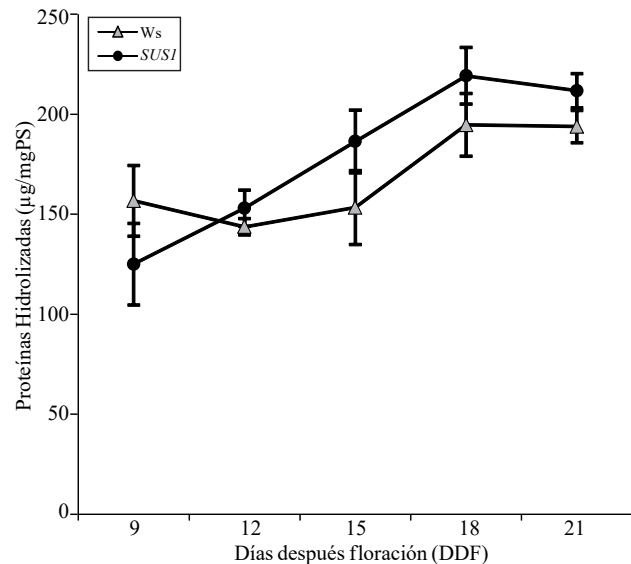


Figura 6. Proteínas totales durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis* para el ecotipo silvestre (Ws) y el mutante (*SUS1*). Los valores son la media \pm SE (n=3); peso seco (PS), y error estándar (SE).

Figura 6. Proteínas totales durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis* para el ecotipo silvestre (Ws) y el mutante (*SUS1*). Los valores son la media \pm SE (n=3); peso seco (PS), y error estándar (SE).

In this study, the involvement of the *SUS1* isoform occurs in the metabolism of sucrose in developing *Arabidopsis* seeds, through the analysis of a null allele for this isoform. In the mutant *SUS1*, total ITS activity is mainly affected the onset of maturation (Figure 1). Change profile total SUS activity is accompanied by major changes in carbon metabolism during seed development (Figure 2-6). These metabolic changes are discussed below.

The reduced content of starch in the mutant *SUS1* correlates with the decrease in the total activity during maturation SUS.

In *Arabidopsis* seeds, starch accumulates temporarily during the first half of the development, and then is rapidly degraded during the late phase of seed development (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez and Tiessen, 2010, 2011, 2012). In rapeseed has been proposed that the accumulation of starch can enhance the status of the seed as

En la maduración intermedia (15 DDF) se observó que la velocidad de la degradación del almidón disminuyó con respecto al silvestre (Ws) (Figura 3). Este resultado sugiere que durante este periodo (15 DDF), el mutante *SUS1* es capaz de sintetizar los productos de almacenamiento (proteínas y lípidos) sin esta reserva de almidón, esta explicación se ajusta a los resultados obtenidos para este periodo donde la mutante no presenta diferencias en lípidos y proteínas de almacenamiento (Figura 5A y 6). Es posible que este almidón sea degradado más tarde para proporcionar los esqueletos de carbono originados de su degradación en la fase de maduración tardía de la semilla, por ejemplo, en la síntesis de sacarosa carbohidrato que se acumula en estadios tardíos del desarrollo de la semilla. Esta idea coincide con la teoría que la biosíntesis de sacarosa y de oligosacáridos deriva de la degradación de almidón a partir de una acumulación transitoria de hexosas (Yazdi-Samadi *et al.*, 1977; Leprince *et al.*, 1990).

El cambio de la actividad total de SUS observado en el mutante *SUS1* lleva a la modificación del cociente hexosas/sacarosa en las semillas de *Arabidopsis* durante el desarrollo

En las plantas superiores, el metabolismo de sacarosa es esencial para el control del desarrollo de la semilla, principalmente por la regulación de la relación fuente-demanda (Herbers y Sonnewald, 1998). En *Vicia faba*, la fase de la división celular está caracterizada por un alto cociente de hexosas/sacarosa (Weber *et al.*, 1997). En la semilla la transición de la fase de pre almacenamiento a la fase de maduración (almacenamiento), se caracteriza por un interruptor metabólico que modifica el cociente de hexosas/sacarosa (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez y Tiessen, 2010). En el presente trabajo se muestra que la disminución de la actividad total SUS observada al inicio de la maduración (Figura 1) conduce a una disminución en el contenido de sacarosa (Figura 4C) y a un incremento del contenido de glucosa y fructosa (Figura 4A-B), lo cual tiene como resultado un cociente inferior de hexosas/sacarosa al comienzo de la maduración (12 DDF) (Figura 4D).

La sacarosa es el sacárido soluble más abundante en la semilla seca de un gran número de accesiones de *Arabidopsis thaliana* (Bentsink *et al.*, 2000). Su acumulación comienza al inicio de la maduración y termina simultáneamente con la síntesis de productos de almacenamiento (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez y Tiessen, 2010). En este trabajo se mostró que la disminución de la sacarosa observada a los 18 DDF en las semillas del mutante *SUS1*

a body-source main before synthesis of storage compounds (oil) and that it might regulate the allocation of nutrients among different tissues of the seed for development (da Silva *et al.*, 1997).

In this study, it was found that the starch decreased cumulative onset of maturation (12 DDF) in *SUS1* mutant correlates with the decreased activity of SUS (Figure 1 and 3). This result suggests that the sucrose synthase might be involved in the supply of carbon skeletons for starch synthesis. This idea is consistent with the co-localization of SUS protein in starch granules observed in *Arabidopsis* seed for the same period (Fallahi *et al.*, 2008; Ángeles-Núñez *et al.*, 2008) and in decreasing starch content observed in *Arabidopsis* seeds during the early stages of development for *Atsus2* and *Atsus3* mutants (Ángeles-Núñez and Tiessen, 2010, 2012).

In the intermediate maturation (15 DAF) showed that the rate of starch degradation diminished relative to wild-(Ws) (Figure 3). This result suggests that during this period (15 DAF), the *SUS1* mutant is able to synthesize storage products (proteins and lipids) without this reserve of starch, this explanation is consistent with the results obtained for this period where no mutant differences in lipid and storage proteins (Figure 5A and 6). It is possible that this starch is degraded later to provide the skeleton originating carbon degradation in the phase later seed maturation, for example, in the synthesis of carbohydrate sucrose accumulates in later stages of seed development. This view corresponds to the theory that the biosynthesis of sucrose and oligosaccharides derived from the degradation of starch from a transient accumulation of hexoses (Yazdi-Samadi *et al.*, 1977; Leprince *et al.*, 1990).

The change in total activity observed in the ITS *SUS1* mutant leads to modification of hexose/sucrose ratio in *Arabidopsis* seeds during development

In taller plants, sucrose metabolism is essential for the control of seed development, mainly by regulating the supply-demand (Herbers and Sonnewald, 1998) relationship. In *Vicia faba*, the phase of cell division is characterized by a high ratio hexoses/sucrose (Weber *et al.*, 1997). In the transition from seed preproduction storage maturation phase (reserve), is characterized by a metabolic switch amending ratio hexoses/sucrose (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006; Ángeles-Núñez and Tiessen, 2010). In this paper it is shown that the decrease in the total activity observed

es concomitante con la acumulación transitoria de hexosas (Figura 4A-C), sugiriendo que la acumulación de hexosas es utilizada como fuente de carbono en los procesos implicados durante la fase de maduración tardía de la semilla. Esta idea coincide con la degradación de la glucosa durante la fase de desecación (Norton *et al.*, 1975; Yazdi-Samadi *et al.*, 1977).

La disminución de la actividad total de SUS en el mutante *SUS1* lleva a la disminución de la concentración en lípidos durante el desarrollo de la semilla

La biosíntesis de ácidos grasos y de almidón depende de la misma fuente de carbono: la sacarosa proveniente de la planta madre. La interacción bioquímica entre estas dos vías metabólicas se desconoce (Lin *et al.*, 2006; Angeles-Núñez y Tiessen, 2010). En este trabajo se ha mostrado que el mutante *SUS1* está afectado en la vía de biosíntesis de lípidos al inicio de la maduración (12 DDF), esto podría estar correlacionado con la disminución de la actividad total SUS para el mismo periodo. Éste resultado sugiere que la disminución de la actividad total de SUS en este periodo conduce a la disminución en esqueletos de carbono disponibles para la vía de biosíntesis de lípidos.

Ésta hipótesis es coherente con la co-localización de la proteína *SUS2* con las membranas de plastos durante la fase de maduración, lo cual sugiere una función para *SUS2* en el enrutamiento del metabolismo de la sacarosa a (glucosa-6-fosfato) G-6-P o fosfoenolpiruvato (PEP) (Angeles-Núñez *et al.*, 2008), éstos compuestos carbonados entran en las plantas para ser utilizados como esqueleto de carbono en diferentes procesos de biosíntesis (Fox *et al.*, 2000, Rolletschek *et al.*, 2007; Baud *et al.*, 2007; Angeles-Núñez y Tiessen, 2010).

Conclusiones

La mutación en la isoforma-1 de la sacarosa sintasa afecta el peso seco de la semilla al inicio de la maduración, lo cual afecta el cociente hexosas/sacarosa, provocando una disminución importante en la acumulación de ácidos grasos y de almidón transitorio en estadios tempranos del desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*. Las aportaciones de este trabajo contribuyen de manera importante al entendimiento de la función metabólica que esta isoforma-1 tiene en el

in ITS onset of maturation (Figure 1) leads to a decrease in the sucrose content (Figure 4C) and a rise in glucose and fructose content (Figure 4A- B), which results in a lower ratio of hexoses/sucrose beginning of ripening (12 DDF) (Figure 4D).

Sucrose is the most abundant in dry seeds of a number of accessions of *Arabidopsis thaliana* soluble saccharide (Bentsink *et al.*, 2000). Its accumulation starts at the beginning of ripening and ends simultaneously with the synthesis of storage products (Baud *et al.*, 2002; Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez and Tiessen, 2010). In this work it was shown that decreasing the sucrose observed at 18 DDF in seeds of mutant *SUS1* is concomitant with the transient accumulation of hexoses (Figure 4A-C), suggesting that the accumulation of hexoses is used as carbon source the processes involved during the *Ángeleste* seed maturation. This view corresponds to the degradation of glucose during the drying phase (Norton *et al.*, 1975; Yazdi-Samadi *et al.*, 1977).

The decrease in the total activity of mutant *SUS1* SUS in leading to reduction in lipid concentration during seed development

The biosynthesis of fatty acids and of starch depends on the same carbon source: sucrose from the mother plants. The biochemical interaction between these two metabolic pathways is unknown (Lin *et al.*, 2006; Angeles-Núñez and Tiessen, 2010). In this work we have shown that mutant *SUS1* is affected in lipid biosynthesis pathway at the onset of maturation (12 DDF), this could be correlated with the decrease in total ITS activity for the same period. This result suggests that the decrease in the total activity of SUS in the period leading to the decrease in available carbon skeletons for lipid biosynthesis pathway.

This hypothesis is consistent with co-localization of the protein with membranes *SUS2* plastids during the maturation phase, suggesting a role for routing *SUS2* in the metabolism of sucrose (glucose-6-phosphate), G-6 -P or phosphoenolpyruvate (PEP) (Angeles-Núñez *et al.*, 2008), these carbon compounds enter in the plants to be used as a carbon skeleton in various biosynthetic processes (Fox *et al.*, 2000; Rolletschek *et al.*, 2007; Baud *et al.*, 2007; Angeles-Núñez and Tiessen, 2010).

metabolismo del carbono durante el desarrollo de la semilla. Los resultados que se presentan son los primeros que se publican con respecto al metabolismo carbonado para esta isoforma-1 de sacarosa sintasa en la semilla de *Arabidopsis*.

Agradecimientos

Agradecemos al laboratorio de biología de semillas del Instituto Jean-Pierre Bourgin (IJPB), del Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA-Versailles) en Francia por la facilidad otorgada para el desarrollo del presente trabajo.

Literatura citada

- Angeles-Núñez, J. G. and Tiessen, A. 2010. *Arabidopsis* sucrose synthase 2 and 3 modulate metabolic homeostasis and direct carbon towards starch synthesis in developing seeds. *Planta*. 232:701-718.
- Angeles-Núñez, J. G. and Tiessen, A. 2011. Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of *Arabidopsis* seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds. *J. Plant Physiol.* 168:1891-1900.
- Angeles-Núñez, J. G. and Tiessen, A. 2012. Regulation of *AtSUS2* and *AtSUS3* by glucose and transcription factor LEC2 in different tissues and at different stages of *Arabidopsis* seed development. *Plant mol. Biol.* 1-16.
- Angeles-Núñez, J. G.; Kronenberger, J.; Wuilleme, S.; Lepiniec, L. and Rochat, C. 2008. Study of *AtSUS2* localization in seeds reveals a strong association with plastids. *Plant Cell Physiol.* 49:1621-1626.
- Baud, S.; Vaultier, M. N. and Rochat, C. 2004. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 55:397-409.
- Baud, S.; Boutin, J. P.; Miquel, M.; Lepiniec, L. and Rochat, C. 2002. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol. Biochem.* 40:151-160.
- Baud, S.; Wuilleme, S.; Dubreucq, B.; de Almeida, A.; Vuagnat, C.; Lepiniec, L.; Miquel, M. and Rochat, C. 2007. Function of plastidial pyruvate kinases in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 52:405-419.
- Becerra-Baeza, C. M. C. 2007. Genes Implicados en el Desarrollo de la Semilla de *Arabidopsis thaliana* (L.) caracterización de los genes *AtAnkTm*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 13-15 p.
- Bentsink, L.; Alonso-Blanco, C.; Vreugdenhil, D.; Tesnier, K.; Groot, S. and Koornneef, M. 2000. Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124:1595-1604.
- Bewley, J. D. and Black, M. 1994. *Seeds: physiology of development and germination 2^a* (Ed.). New York: Plenum. 10-31 p.
- Bieniawska, Z.; Paul-Barratt, D. H.; Garlick, A. P.; Thole, V.; Kruger, N. J.; Martin, C.; Zrenner, R. and Smith, A. M. 2007. Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant J.* 5:810-828.
- Cieresko, I. and Kleczkowski, L. 2002. Glucose and mannose regulate the expression of a major sucrose synthase gene in *Arabidopsis* via hexokinase-dependent mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* 40:907-911.
- Chourey, P. S. and Nelson, O. E. 1976. The enzymatic deficiency conditioned by *shrunk-1* mutations in maize. *Biochem. Genet.* 14:1041-1055.
- Chourey, P. S.; Talierco, E. W. and Kane, E. J. 1991. Tissue-specific expression and anaerobically induced posttranscriptional modulation of sucrose synthase genes in *Sorghum bicolor* M. *Plant Physiol.* 96:485-490.
- Chourey, P.; Talierco, E. W.; Carson, S. J. and Ruan, Y. L. 1998. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 259:88-96.
- Craig, J.; Barrat, P.; Tatge, H.; Déjardin, A.; Gardner, C. D.; Barber, L.; Wang, T. L.; Hedley, C. L.; Martin, C. and Smith, A. M. 1999. Mutations at the *rug4* locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant J.* 17:353-362.
- Déjardin, A.; Rochat, C.; Willeme, S. and Boutin, J. P. 1997. Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant Cell Environ.* 20:1421-1430.
- Déjardin, A.; Sokolov, L. N. and Kleczkowski, L. 1999. Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem J.* 344:503-509.
- DaSilva, P. M. F. R.; Eastmond, P. J.; Hill, L. M.; Smith, A. M. and Rawsthorne, S. 1997. Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta* 203:480-487.

Conclusions

The mutation in the isoform-1 of sucrose synthase affects the dry weight of the seed at the beginning of ripening, which affects the hexose/sucrose ratio, causing a significant decrease in the accumulation of fatty acids and transitory starch in early stages developing *Arabidopsis* seeds. The contributions of this work contribute significantly to the understanding of metabolic function so that this isoform-1 has on carbon metabolism during seed development. The results presented are the first to be issued with respect to the carbon metabolism for this isoform-1 of sucrose synthase in *Arabidopsis* seed.

End of the English version



- Egger, B. and Hampp, R. 1992: Invertase, sucrose synthase and sucrose phosphate synthase in lyophilized spruce needles; microplate reader assays. *Trees* 7:98-103.
- Fait, A.; Angelovici, R.; Less, H.; Ohad, I.; Urbanczyk-Wochiniak, E.; Fernie, A. R. and Galili, G. 2006. *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant physiol.* 142:839-854.
- Fallahi, H.; Scofield, G. N.; Badger, M. R.; Chow, W. S.; Furbank, R. T. and Ruan, Y. L. 2008. Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *J. Ext. Bot.* 59:3283-3295.
- Fox, S. R.; Hill, L. M.; Rawsthorne, S. and Hills, M. J. 2000. Inhibition of the glucose-6-phosphate transporter in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis. *Biochem. J.* 352:525-532.
- Herbers, K. and Sonnewald, U. 1998. Molecular determinants of sink strength. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:207-216.
- Koch, K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:235-246.
- Leprince, O.; Bronchart, R. and Deltour, R. 1990. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seeds. *Plant Cell Environ.* 13:539-546.
- Lin, Y.; Ulanov, A. V.; Lozovaya, V.; Widholm, L.; Zhang, G.; Guo, J. and Goodman, H. M. 2006. Genetic and transgenic perturbations of carbon reserve production in *Arabidopsis* seeds reveal metabolic interactions of biochemical pathways. *Planta.* 225:153-164.
- Mansfield, S. G. and Briarty, L. G. 1992. Cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve deposition. *Can. J. Bot.* 70:151-164.
- Maraña, C.; García-Olmedo, F. and Carbonero, P. 1990. Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. *Gene.* 88:167-172.
- Martin, T.; Frommer, W. B.; Salanoubat, M. and Willmitzer, L. 1993. Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *Plant J.* 4:367-377.
- Norton, G. and Harris, J. F. 1975. Compositional changes in developing rape seed (*Brassica napus* L.) *Planta.* 123:163-174.
- R Development Core Team R. 2008. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- Roitsch, T.; González, M. C. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9:606-613.
- Rolletschek, H.; Nguyen, T. H.; Hausler, R. E.; Rutten, T.; Gobel, C.; Feussner, I.; Radchuk, R.; Tewes, A.; Claus, B.; Klukas, C.; Linemann, U.; Weber, H.; Wobus, U. and Borisjuk, L. 2007. Antisense inhibitions of the plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocator in *Vicia* seeds shifts cellular differentiation and promotes protein storage. *Plant J.* 51:468-484.
- Ruan, Y. L.; Llewellyn, D. J. and Furbank, R. T. 2003. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell.* 15:952-964.
- Weber, H.; Borisjuk, L. and Wobus, U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* 2:169-174.
- Yazdi-Samadi, B.; Rinne, R. W.; Seif, R. D. 1977. Components of developing soybean seeds: oil, proteins, sugars, starch, organic acids and amino acids. *Agro. J.* 69:481-486.
- Zeng, Y.; Wu Y.; Avigne, W. T. and Koch, E. 1998. Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. *Plant Physiol.* 116:1573-1583.
- Zhan W. H.; Zhou, Y.; Dibley, K.; Tyerman, S.; Furbank, R. T. and Patrick, J. W. 2007. Nutrient loading of developing seeds. *Funct. Plant Biol.* 34:314-331.
- Zrenner, R.; Salanoubat, M.; Willmitzer, L. and Sonnewald, U. 1995. Evidence of crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 7:97-107.