

GLUCIDES DE RÉSERVE ET BIOTECHNOLOGIE

Jean-Louis PRIOUL
Université de Paris-Sud
Institut de Biotechnologie des Plantes
Bâtiment 630
91405 ORSAY Cedex

1 -INTRODUCTION

Les progrès en biotechnologie ouvrent des perspectives nouvelles en amélioration des plantes. Deux techniques présentent un intérêt particulier : la transgénèse et la sélection assistée par marqueur, appuyée sur l'identification de gènes à effet quantitatif (CAUSSE *et al.*, 1995). Ce sont les perspectives offertes par la transgénèse qui vont nous intéresser dans ce qui suit, et cela au travers de la modification de l'expression d'un certain nombre de gènes codant pour des fonctions liées à la formation de glucides de réserve dont les plus importants sont le saccharose et l'amidon. Ces derniers représentent des matières primaires essentielles dans l'industrie agro-alimentaire. L'utilisation des techniques de transgénèse suppose le franchissement de trois obstacles : 1) la maîtrise d'un moyen d'introduction de l'ADN transformant (plasmides dérivés d'*Agrobacterium*, biolistique par canons à particules...), 2) un système de régénération de plantes fertiles à partir des cellules transformées, 3) le clonage des gènes cibles dont on veut modifier les propriétés ou l'expression par mutagenèse dirigée, par stratégie ARN anti-sens, ou encore le clonage des gènes nouveaux que l'on souhaite introduire (résistance aux herbicides, aux pathogènes...). En pratique, ces trois conditions sont facilement réunies chez les dicotylédones comme le tabac, la pomme de terre, *Arabidopsis*. L'objectif est, en revanche, beaucoup plus difficile à atteindre chez les monocotylédones et en particulier chez les céréales comme le riz, le blé et le maïs, à cause de deux problèmes : la quasi-impossibilité d'utiliser *Agrobacterium* et les grandes difficultés de régénération des plantes. Des exemples de réussite sont maintenant décrits chez ces trois espèces, mais ils sont peu nombreux et l'on ne peut pas encore considérer que c'est une technique de routine. Les cas présentés ci-dessous porteront donc sur des dicotylédones cultivées et se focaliseront sur les gènes potentiellement susceptibles de modifier la croissance des plantes ou la composition des organes récoltables. Ceci revient à s'intéresser au niveau de la plante soit aux organes, appelés sources, qui synthétisent et exportent les photosynthétats, soit aux organes dits puits où s'accumulent les produits finaux.

2 - CHOIX DES ÉTAPES ENZYMATIQUES CLEFS QUI PEUVENT SERVIR DE CIBLES

2.1 - Au niveau des organes "Sources"

Un schéma simplifié du métabolisme des produits essentiels de la photosynthèse que sont le saccharose et l'amidon permet d'identifier quelques cibles potentielles (figure 1).

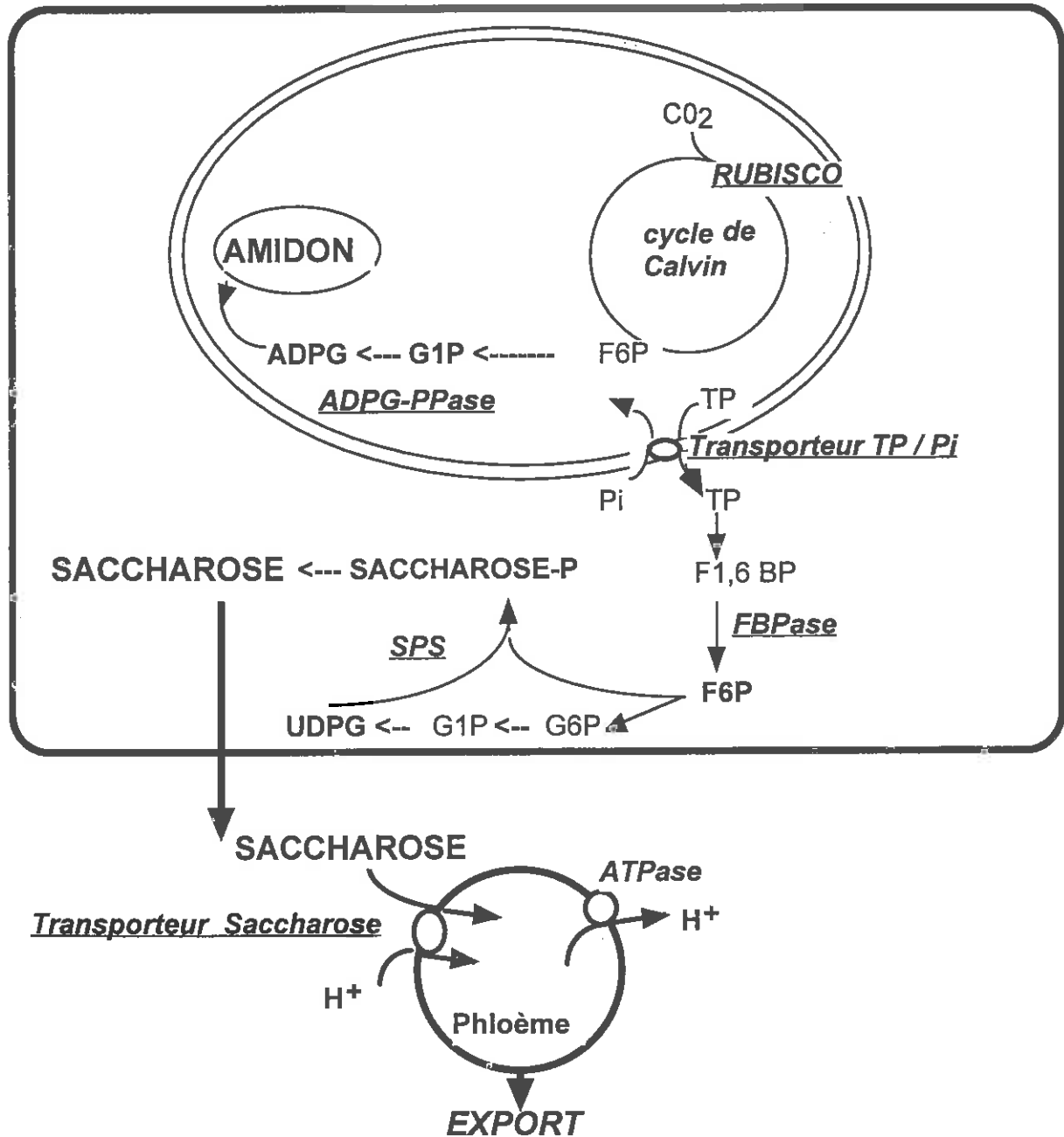


Figure 1. Voies simplifiées de synthèse du saccharose et de l'amidon dans les feuilles et exportation du saccharose par le phloème.

La ribulose 1,5 bis-phosphate carboxylase oxygénase (Rubisco), première enzyme impliquée dans la fixation photosynthétique du carbone est un point de passage obligé chez tous les organismes autotrophes, des plus primitifs aux plus évolués. C'est néanmoins une enzyme peu active, aussi doit-elle être présente en quantité très importante pour remplir sa fonction : elle représente ainsi, à elle seule, environ 50 % des protéines foliaires. Elle a été l'une des premières enzymes végétales dont les gènes ont été clonés et la transformation de plantes avec un gène anti-sens du peptide de sa petite sous-unité a montré rapidement qu'on pouvait en modifier considérablement le niveau d'expression (RODERMEL *et al.*, 1988). Les tabacs transgéniques portant cet anti-sens ont pu être utilisés pour étudier le rôle potentiellement limitant de la Rubisco pour la photosynthèse foliaire et, au-delà, pour la croissance de la plante. Les résultats montrent que le coefficient de contrôle de la Rubisco sur la photosynthèse (définie par l'accroissement de photosynthèse par unité d'accroissement de la Rubisco) varie de 0 à 0,8 selon les conditions et qu'en moyenne ce coefficient est assez faible. Cela signifie qu'en général l'augmentation ou la diminution de l'activité a peu d'effet sur la photosynthèse. C'est seulement en conditions extrêmes (lumière saturante) qu'une limitation importante apparaît. Une excellente mise au point sur ces travaux vient d'être faite par STITT et SCHULZE (1994).

D'autres enzymes du métabolisme glucidique des sources ont été modifiées, comme la fructose biphosphatase, la saccharose-P synthase (SPS) ou des enzymes du cycle de CALVIN, sans que les conséquences sur le fonctionnement de la plante soient très spectaculaires. Ainsi, la transformation de la tomate par le gène de SPS du maïs aboutit à une forte surexpression de l'enzyme mais à une augmentation assez faible de la synthèse et de l'exportation du saccharose par la feuille (GALTIER *et al.*, 1993). **Cette conclusion, qui paraît assez générale, suggère l'existence de nombreuses voies compensatrices au niveau du métabolisme intermédiaire.**

Un changement plus spectaculaire intervient lorsqu'on agit sur le transport de glucides dans le mésophylle foliaire. Ce transport met en jeu un système de chargement actif du saccharose dans les tubes criblés du phloème (figure 1). Un co-transporteur saccharose- H^+ qui utilise le gradient de pH créé par une ATPase située dans le plasmalemmes phloémien, prend en charge spécifiquement le saccharose de l'apoplaste et le charge dans la sève contre le gradient de concentration (DELROT, 1993). Beaucoup d'arguments physiologiques militent en faveur de ce système et, de plus, ce transporteur a été cloné. Cependant, certains auteurs ont cherché une preuve directe du fonctionnement *in vivo* de ce système. Un moyen de l'obtenir est de montrer que la présence de saccharose dans l'apoplaste est indispensable. Le principe a donc consisté à faire exprimer dans les parois des cellules du mésophylle, l'invertase, une enzyme qui hydrolyse le saccharose en glucose et fructose. Le gène de l'invertase pariétale de levure a ainsi été introduit dans le tabac (SONNEWALD *et al.*, 1991). Le choix du gène d'un organisme éloigné phylogénétiquement des plantes supérieures a été délibéré car il était ainsi plus probable qu'il ne serait pas soumis aux systèmes de régulation propres aux enzymes endogènes. L'expression du gène conduit à une quasi disparition du saccharose foliaire et à une augmentation très notable des hexoses libres. Les conséquences au niveau de la plante sont un jaunissement des feuilles adultes et une très forte réduction de la croissance qui sont fonction du niveau d'expression de l'invertase. La concentration du saccharose dans le phloème est aussi très réduite, alors que la teneur en glucose de l'apoplaste est très fortement accrue. Une observation attentive des feuilles montre que la transformation n'a pas d'effet sur les parties jeunes et que les symptômes de vieillissement et de jaunissement

n'apparaissent que dans les feuilles adultes, c'est-à-dire à partir du moment où elle deviennent exportatrices. L'ensemble de ces informations démontre clairement le rôle du saccharose dans le chargement du phloème et dans l'exportation des glucides. On retrouve également que l'accumulation de glucides dans une feuille à la lumière peut avoir des effets délétères indirects sur la stabilité des systèmes photosynthétiques.

2.2 - Au niveau des organes "puits"

L'utilisation du saccharose en provenance de la sève phloémienne est extrêmement diverse selon les organes puits. Cependant, deux enzymes seulement réalisent la première étape, l'invertase et/ou la saccharose-synthase (figure 2). Leur importance relative est variable selon les organes et leur type de métabolisme. Le passage par la voie de la saccharose-synthase, *a priori* moins coûteux sur le plan énergétique, se rencontre plutôt dans les organes jeunes où le besoin d'UDPglucose est important pour la synthèse de parois et dans les organes des réserves synthétisant l'amidon. Les produits de l'invertase sont plutôt utilisés par la voie respiratoire et pour la synthèse des lipides de réserve. Comme dans les feuilles, la synthèse d'amidon dans les puits passe obligatoirement par l'ADPglucose-pyrophosphorylase (cf. discussion PRIOUL *et al.*, 1994).

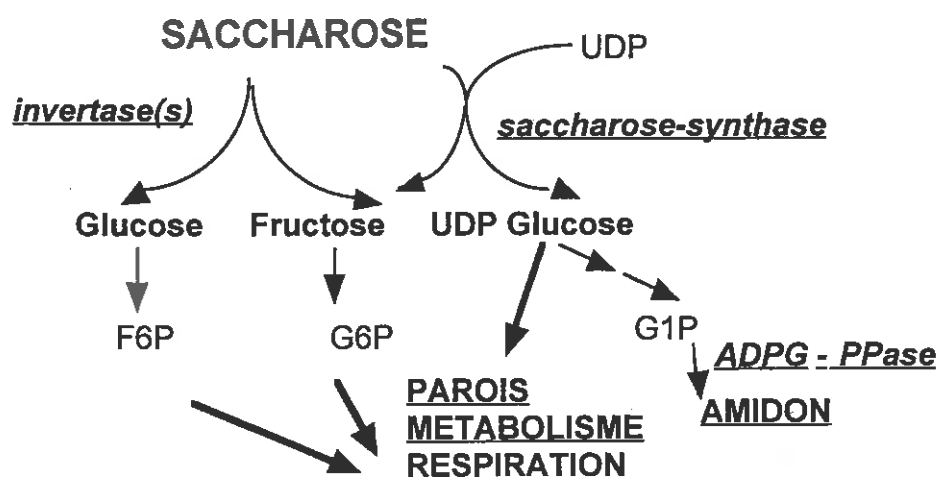


Figure 2. Schéma très simplifié des voies d'utilisation du saccharose importé par les organes "puits".

L'importance d'un bon fonctionnement de ces trois enzymes invertase, saccharose-synthase et ADPglucose-PPase a été mise en évidence depuis longtemps par l'existence de mutants qui perturbent considérablement la production de grains. La mutation "pois ridé" de MENDEL est due à un dysfonctionnement de l'ADPglucose-PPase de l'albumen. Il en est de même des phénotypes *shrunk-2* et *brittle-2* de maïs. Toujours chez le maïs, les grains "*miniature-1*" n'ont pas d'invertase dans la zone placentaire et le phénotype *shrunk-1* est dû à une déficience de la saccharose-synthase dans l'albumen. La compréhension actuelle des modifications subies par le saccharose déchargé du phloème, au niveau du pédicelle du grain, jusqu'à la synthèse d'amidon dans l'albumen permet de replacer l'intervention des différentes enzymes et la position des principales mutations (figure 3).

Afin de vérifier le caractère éventuellement limitant de ces étapes enzymatiques, les techniques de transgénèse avec des gènes anti-sens ou des gènes dérégulés ont été appliquées à certaines d'entre elles (cf. mise au point, SONNEWALD *et al.*, 1994). Comme dans le cas des feuilles, les effets spectaculaires sont obtenus quand les modifications portent sur les réactions terminales, en particulier celles conduisant à la synthèse d'amidon. Les modifications de l'ADPglucose-PPase seront traitées dans le paragraphe suivant. Mais on peut aussi montrer qu'une inhibition de l'expression de la saccharose-synthase de pomme de terre conduit à une très forte diminution de la teneur en amidon des tubercules. En revanche, la réduction de la pyrophosphate-phosphofruktokinase (PAUL *et al.*, 1995) ou la surexpression de la pyrophosphorylase n'ont que peu d'effet, sans doute à cause de réactions compensatrices au niveau du métabolisme intermédiaire (STITT et SONNEWALD, 1995).

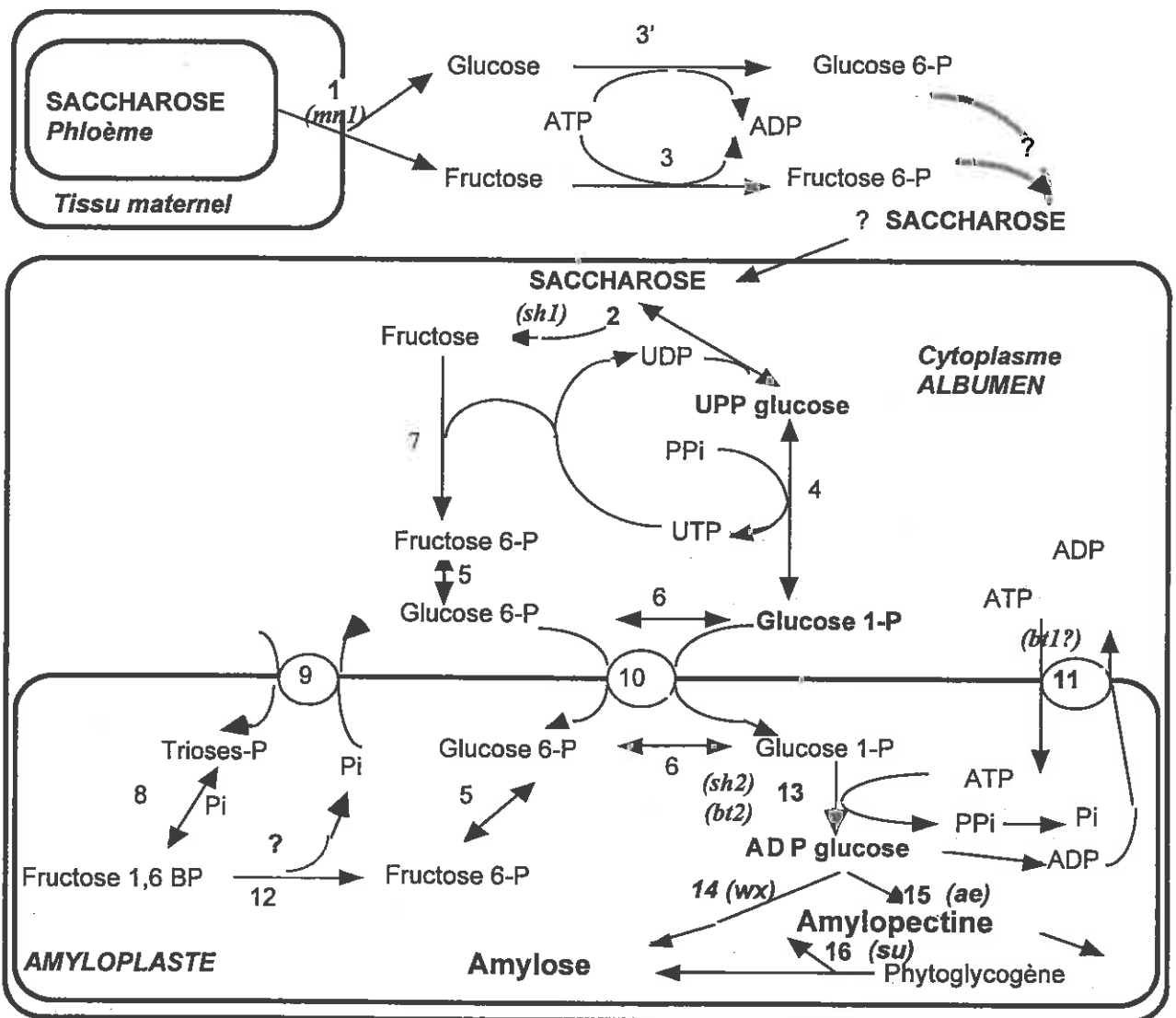


Figure 3. Etapes essentielles de la synthèse des deux composantes de l'amidon, l'amylose et l'amylopectine à partir du saccharose entrant dans le grain de maïs et position de quelques mutations (d'après PRIOUL 1995). 1 : invertase sécrétée par les cellules basales de l'albumen (mutant *mnl*), 2 : saccharose-synthase (mutant *sh1*), 3 et 3' : fructokinase et glucokinase, 4 : UDPglucose-pyrophosphorylase, 5 : phosphoglucoisomérase, 6 : phosphoglucomutase, 7 : ATP-phosphofruktokinase, 8 : aldolase, 9 : Triose-P:Pi transporteur, 10 hexose-P transporteur,

11 : adenylate translocateur (mutant *bt1?*), 12 : fructose 1,6 bisphosphatase, 13 : ADPglucose-pyrophosphorylase (mutants *sh2* et *bt2*), 14 : amidon synthases (mutant *wx*), 15 : enzyme de branchement (mutant *ae*), 16 : enzyme de débranchement (mutant *su*).

3 - EXEMPLE DE MANIPULATION DE LA QUANTITÉ ET DE LA QUALITÉ DE L'AMIDON

3.1 - Rappels sur la structure, la composition et la biosynthèse de l'amidon

L'amidon est un glucide très polymérisé formant une structure très compacte organisée en grains constitués d'une série de couches concentriques. La morphologie de ces grains est caractéristique de chaque espèce. Leur taille varie de 2 à 100 μm . Les deux constituants essentiels sont l'amylose formé de longues chaînes linéaires de glucopyranoses attachés par des liaisons α -1,4 et l'amylopectine, forme ramifiée présentant des nombreux branchements α -1,6 glucosyl. Au voisinage du branchement primaire sur le polymère axial se trouvent d'autres branchements secondaires tertiaires, etc., aboutissant à une structure en grappes qui se répète régulièrement (figure 4).

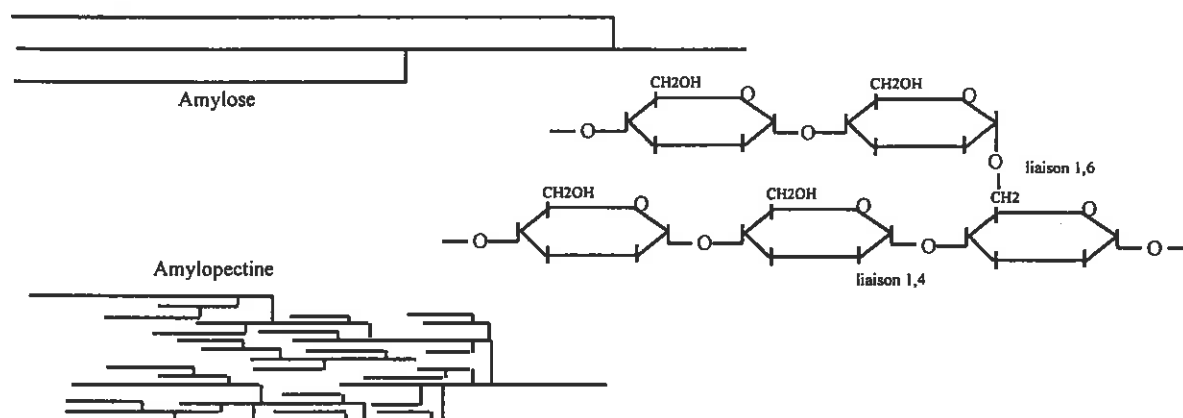


Figure 4. Schéma de l'organisation des polymères d'amylose et d'amylopectine constitutifs de l'amidon (d'après SHEWMAKER et STALKER, 1992).

L'architecture des molécules d'amylopectine est très précise (figure 4) et c'est elle qui introduit la spécificité. Les différences de structure moléculaire de l'amylose et de l'amylopectine conduisent à des propriétés rhéologiques assez contrastées qui sont exploitées dans l'industrie agro-alimentaire. L'amylose forme facilement des gels grâce aux nombreuses liaisons hydrogène qui peuvent s'établir entre les chaînes linéaires alors que l'amylopectine est un agent épaississant très efficace, en raison de sa structure ramifiée et de sa relative solubilité. Les amidons de céréales contiennent une majorité d'amylopectine, les rapports amylose/amylopectine variant de 20/80 à 30/70. Dans des conditions particulières, avec par exemple la mutation *sugary*, une molécule beaucoup plus ramifiée, proche du glycogène des animaux peut apparaître, c'est le phytoglycogène. Le fait que cette forme de réserve n'ait pas été conservée au cours de l'évolution des végétaux est sans doute à mettre en rapport avec le

fait qu'elle est peu compacte et hydrophile, donc peu compatible avec le dessèchement très important nécessaire à la préservation de la plupart des semences amyloacées.

Les enzymes impliquées dans la synthèse des deux composantes sont connues, sans pour autant que l'intervention des différentes formes isoenzymatiques soit connue dans le détail (voir discussion dans SMITH *et al.*, 1995). Il est maintenant clair que le précurseur unique de l'amidon est l'ADPglucose produit par l'action, irréversible *in vivo*, de l'ADPglucose-pyrophosphorylase. L'analyse des mutants *sh2* et *bt2* qui affectent les gènes de l'une et de l'autre des deux sous unités a apporté la première preuve (figure 3, position 13). Deux types d'enzymes interviennent alors : les amidon-synthases qui forment les chaînes linéaires et les enzymes de branchement qui coupent les liaisons 1-4 et établissent les liaisons 1-6. Des enzymes de débranchement simplifient ensuite les ramifications et ramènent d'une structure de type phytoglycogène à celle de l'amylopectine. La principale limite à une compréhension fine du rôle des différentes enzymes vient du fait que de multiples isoformes existent. Pour l'amidon-synthase, deux formes solubles et deux autres liées aux grains d'amidon ont été décrites. De même, il existe deux classes d'enzymes de branchement qui ont des affinités différentes selon la ramification des substrats ; chaque classe est présente, sous une forme différente, soit dans la phase soluble de l'amyloplaste soit dans les grains d'amidon. Les points d'appui les plus sûrs, quant au rôle de certaines isoformes, proviennent de l'étude des mutants. Ainsi, la mutation *waxy* (albumen cireux) qui produit des grains de céréales sans amylose est due à la déficience de l'une des amidon-synthases liées (GBSSI, Granule Bound Starch SynthaseI). Une mutation similaire *amf* (amylose-free) existe chez la pomme de terre. Réciproquement, certaines mutations réduisent la teneur en amylopectine, sans toutefois l'annuler, en supprimant l'activité de l'une des enzymes de branchement (exemple du mutant *amylose-extender*, *ae*, de maïs). Le cas du mutant *sugary* (*su1*) est particulièrement intéressant car il met en relief le rôle paradoxal, dans la synthèse de l'amylopectine, de l'enzyme de débranchement, sur laquelle porte la mutation (PAN et NELSON, 1984). En effet, cette mutation qui provoque une forte accumulation de phytoglycogène aux dépens de l'amylopectine, conduit à proposer un schéma cyclique de synthèse de l'amylopectine à partir du phytoglycogène (figure 3, réactions 14, 15, 16).

3.2 - Résultat des expériences de transgénèse

a - stratégie antisens

Les expériences les plus spectaculaires ont été réalisées sur la pomme de terre par le groupe de Willmitzer, à Berlin, en prenant pour cible l'ADPglucose-PPase (MÜLLER-RÖBER *et al.*, 1992). Les plantes ont été transformées par un gène codant pour un ARN antisens de l'une des sous-unités de l'enzyme. Les plantes transformées se développent presque normalement avec seulement une tendance à produire davantage de tiges axillaires et un peu plus d'anthocyanes dans les parties supérieures. La morphogenèse des tubercules est aussi modifiée ; on observe une ramification beaucoup plus importante des stolons qui conduit à un plus grand nombre de tubercules de petite taille. Les faibles modifications de la morphologie aérienne cachent une profonde réduction de l'activité de l'enzyme qui est corrélée à celle de la teneur en amidon et à une augmentation symétrique des teneurs en saccharose et glucose aussi bien dans les feuilles que dans les tubercules. On obtient ainsi des tubercules sucrés qui, au cours de la conservation, prennent un phénotype ridé. Une répercussion importante sur la composition protéique du tubercule est également observée.

La même stratégie appliquée à l'amidon-synthase, dite GBSS, a conduit à la production de tubercules sans amylose, mimant ainsi la mutation *amf* (VISSER *et al.*, 1991). Un essai similaire dans le riz avec une portion de gène n'a abouti qu'à une réduction partielle de l'amylose accompagnée d'une polyploïdie des plantes régénérées (SHIMADA *et al.*, 1993).

b. stratégie de surexpression

Si l'on se place d'un point de vue des applications, l'utilisation d'antisens introduit de sérieuses limitations puisqu'on ne peut que supprimer, plus ou moins, l'expression d'un gène indésirable. L'opération réciproque qui consisterait à surexprimer un gène conduisant à une substance d'intérêt pratique est *a priori* plus intéressante. Un résultat positif est toutefois plus difficile à atteindre car les régulations biochimiques de la plante tendent à en gommer les effets. L'exemple de la surexpression de la SPS, cité dans le paragraphe précédent en donne une illustration.

Pour contourner ces phénomènes de régulation, le groupe MONSANTO, en association avec le laboratoire de J. PREISS aux USA, a eu l'idée d'effectuer la transformation avec un gène d'enzyme bactérienne, *a priori* insensible aux régulateurs métaboliques de la plante. En effet, *E. coli* possède une ADPglucose-PPase qui sert à la synthèse de glycogène. Dans certains mutants, l'enzyme n'est pas inhibée par l'ion phosphate comme l'est celle des plantes ou de la souche sauvage. L'expression du gène de cette enzyme dérégulée dans une série de plantes de tabac, soja, pétunia et pomme de terre (STARK *et al.*, 1992) conduit en général à une augmentation de la teneur en amidon.

En revanche, les essais d'augmentation de la teneur en amylose au-delà de sa valeur normale par une augmentation du nombre de copie du gène GBSS se sont révélés peu concluants, bien que la complémentation du mutant *amf* puisse être obtenue (FLIPSE *et al.*, 1994).

4 - SYNTHÈSE DE GLUCIDES "NOUVEAUX", D'INTÉRÊT INDUSTRIEL

Au lieu de modifier les niveaux des productions naturelles de la plante, on peut aussi tenter de détourner le métabolisme de la plante pour lui faire synthétiser de nouvelles molécules qui auraient un intérêt industriel. Il faut cette fois introduire l'équipement enzymatique que la plante ne possède pas. En raison des difficultés inhérentes aux transformations multiples, on est limité à un ou deux gènes codant pour des enzymes nouvelles. Une stratégie de ce type a été appliquée à la synthèse des cyclodextrines. Ces molécules cycliques sont des oligosaccharides présents sous trois formes (α , β et γ) et constitués de 6, 7 ou 8 α -1,4-gluco-pyranoses. Elles ont des propriétés pratiques très intéressantes : la présence d'une région centrale hydrophobe leur confère des capacités d'adsorption utilisables en pharmacie, en agrochimie ou dans l'agro-alimentaire pour la stabilisation des parfums et des saveurs, pour la complexation de produits à libération progressive, pour l'extraction de substances spécifiques (caféine, cholestérol) dans des mélanges (SHEWMAKER et STALKER, 1992). Des enzymes présentes chez certaines bactéries (*Bacillus* et *Klebsiella*), les cyclodextrine-glycosyl-transférases (α , β et γ CGT), prélèvent des dextrines sur les ramifications du glycogène et les cyclisent. Le gène d'une enzyme de *Klebsiella* introduit dans la pomme de terre (OAKES *et al.*, 1991) s'exprime et

conduit à la formation de cyclodextrines dans les tubercules. Cependant, le faible niveau de synthèse implique d'optimiser la procédure si un usage commercial est recherché. Il n'en reste pas moins que cette tentative montre la faisabilité du concept et ouvre la voie à d'autres tentatives de production par les plantes, de molécules à forte valeur ajoutée, dérivées de l'amidon.

CONCLUSION

Alors que la modification, par les techniques de transgénèse, des réactions du métabolisme primaire des plantes se révèle souvent décevante, en raison des multiples mécanismes régulateurs et compensateurs existants, l'action sur le métabolisme des produits terminaux est beaucoup plus efficace. Ceci est particulièrement vrai pour les glucides des organes de réserve, l'amidon en particulier. Son niveau de synthèse peut être modifié en agissant sur les gènes de l'ADPglucose-pyrophosphorylase tandis que sa composition en amylopectine et en amylose peut l'être en intervenant sur les amidons synthases, les enzymes de branchement et de débranchement. Enfin la synthèse de nouvelles formes de glucides dérivés de l'amidon est réalisable.

Journée de l'A.S.F. du 1^{er} février 1996

BIBLIOGRAPHIE

- CAUSSE M., ROCHER J.P., HENRY A.M., CHARCOSSET A., PRIOUL J.L., de VIENNE D. - 1995 - Genetic Dissection of the Relationship between Carbon Metabolism and early Growth in Maize, with Emphasis on Key-Enzyme Loci. *Molecular Breeding* 1 : 259-272
- DELROT S. - 1993 Membrane and Assimilate Translocations. *Curr. Topics Plant Physiol.* 1, 229-244.
- FLIPSE E., HUISMAN, de VRIES B.J., BERGERVOET J.E.M., JACOBSEN E., VISSER, R.G.F. - 1994 - Expression of a Wild-Type GBSS Gene Introduced into an Amylose-Free Potato Mutant by *Agrobacterium tumefaciens* and the Inheritance of the Insert at the Microsporic Level. *Theoretical and Applied Genetics* 88 : 369-375
- GALTIER N., FOYER C.H., HUBER J., VOELKER T.A., HUBER S.C. - 1993 - Effects of Elevated Sucrose-Phosphate Synthase Activity on Photosynthesis, Assimilate Partitioning, and Growth in Tomato (*Lycopersicon esculentum* var. UC82B). *Plant Physiology* 101 : 535-543
- 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 Journal* 11 : 1229-1238
- OAKES J.V., SHEWMAKER C.K., STALKER D.M. - 1991 - Production of Cyclodextrins, a Novel Carbohydrate, in the Tubers of Transgenic Potato Plants. *Bio/Technology* 9 : 982-986
- PAN D., NELSON O.E. - 1984 - A Debranching Enzyme Deficiency in Endosperms of the *sugary-1* Mutants of Maize. *Plant Physiology* 74 : 324-328
- PAUL M., SONNEWALD U., HAJIREZAEI M., DENNIS D., STITT M. - 1995 - Transgenic Tobacco Plants with Strongly Decreased Expression of Pyrophosphate : Fructose-6-Phosphate 1-Phosphotransferase Do not Differ Significantly from Wild Type in Photosynthate Partitioning, Plant

- Growth or their Ability to Cope with Limiting Phosphate, Limiting Nitrogen and Suboptimal Temperatures. *Planta* 196 : 277-283
- PRIOUL J.L. -1995 - Corn. In *Distribution of Photoassimilates and Source-Sink Relationships*. E. Zamski and A. Schaffer (Eds), Marcel Dekker, Inc. Publishers, New-York (in press). Chapitre (45 pages)
- PRIOUL J.L., JEANNETTE E., REYSS A., GREGORY N., GIROUX M., HANNAH L.C., CAUSSE M. - 1994 - Expression of ADP-Glucose Pyrophosphorylase in Mays (*Zea mays* L.) Grain and Source Leaf During Grain Filling. *Plant Physiology* 104 : 179-187
- RODERMEL S.R., ABOIT M.S., BOGORAD L. - 1988 - Nuclear-Organelle Interactions: Nuclear 'Antisense' Gene Inhibits Ribulose-Bisphosphate Carboxylase Enzyme in Transformed Tobacco Plants. *Cell* 55 : 673-681
- SHEWMAKER C., STALKER D.M. - 1992 - Modifying Starch Biosynthesis with Transgenes in Potatoes. *Plant Physiology* 100 : 1083-1086
- SHIMADA H., TADA Y., KAWASAKI T., FUJIMURA T. - 1993 - Antisense Regulation of the Rice Waxy Gene Expression Using a PCR-Amplified Fragment of the Rice Genome Reduces the Amylose Content in Grain Starch. *Theoretical and Applied Genetics* 86 : 655-672
- SMITH A.M., DENYER K., MARTIN C.R. - 1995 - What Controls the Amount and Structure of Starch in Storage Organs ? *Plant Physiology* 107 : 673-677
- SONNEWALD U., BRAUER M., VON SCHAEVEN A., STITT M., WILLMITZER L. - 1991- Transgenic Tobacco Plants Expressing Yeast-Derived Invertase in either the Cytosol, Vacuole or Apoplast : a Powerful Tool for Studying Sucrose Metabolism and Source/Sink Interactions. *Plant Journal* 1 : 95-106
- SONNEWALD U., LERCHL L., ZRENNER R., FROMMER W. - 1994 - Manipulation of Sink-Source Relations in Transgenic Plants. *Plant Cell and Environment* 17 : 649-658
- STARK D.M., TIMMERMAN K.P., BARRY G.F., PREISS J., KISHORE G.M. -1992 - Regulation of the Amount of Starch in Plant Tissues by ADPglucose-Pyrophosphorylase. *Science* 258 : 287-291
- STITT M., SCHULZE D. - 1994 - Does Ribisco control the Rate of Photosynthesis and Plant Growth ? An Exercise in Molecular Ecophysiology. *Planta* 17: 465-487
- STITT M., SONNEWALD U - 1995 - Regulation of metabolism in Transgenic Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46 : 341-368
- VISSER R.G.F., SOMHORST I., KUIPERS G.J., RYUS N.J., FEENSTRA W.J., JACOBSEN E. - 1991 - Inhibition of the Expression of the Gene for Granule-Bound Starch Synthase in Potato by Antisense Constructs. *Molecular and General Genetics* 225 : 289-296