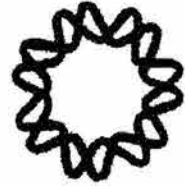


00591



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

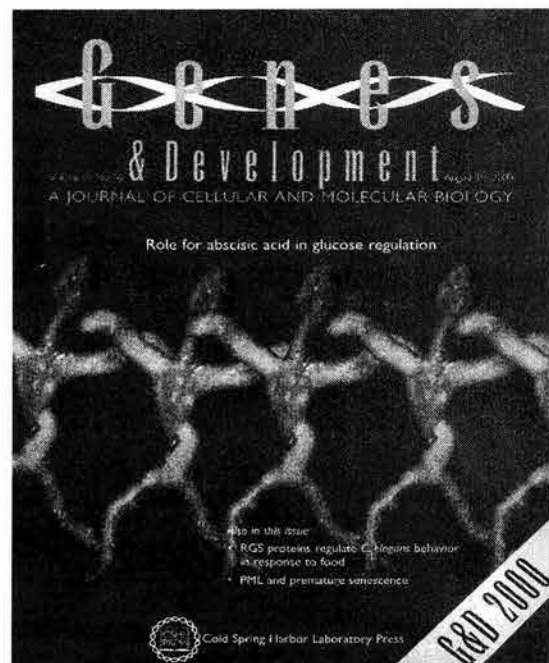
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *Arabidopsis thaliana*
AFECTADAS EN LA DETECCIÓN Y/O SEÑALIZACIÓN DE LA GLUCOSA”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A:

ANALILIA ARROYO BECERRA

Cuernavaca, Morelos, 2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ana Lita Arroyo
Becerra

FECHA: 18 de Junio, 2004

FIRMA: [Firma]

Dedico este trabajo a mis Padres Oscar Arroyo Porrã y Ana María Becerra Ramírez, SIMPRE MAESTROS del amor y del trabajo.

A mi hermana Linda por ser constante ejemplo de fortaleza, perseverancia y alegría.

A mi abuelita Isabel Ramírez Salado, la mujer más fuerte e inteligente que he conocido.

A mi sobrino Albert Coutolenc Arroyo, simplemente por ser quien eres.

Agradecimientos:

Si algo me ha motivado a la hora de escribir esta tesis ha sido, sin duda, la oportunidad de expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización de este trabajo.

Ante todo, a Dios por absolutamente TODO.

A la Dra. Patricia León Mejía, gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio, por la oportunidad de comenzar juntas esta aventura, por arriesgarte conmigo y a la vez por creer en mí, y por el apoyo económico. A tí mi más sincero agradecimiento.

A la asesoría y la supervisión de los miembros de mi comité tutorial y a la comisión revisora de tesis, Doctores: Alejandra Covarrubias Robles, Herminia Loza Tavera, Georgina Hernández Delgado, Svetlana Shishkova, Elena Alvarez-Buylla Roces, Luis Rafael Herrera-Estrella, Mario Soberón Chávez y Miguel Angel Cevallos Gaos, gracias por los jalones de orejas.

Al Dr. Crisanto Gutiérrez Armenta; gracias por hacer bien su trabajo, por su estímulo, por su espacio, por sus sabios consejos, por disfrutar de su profesión y por su Amistad.

Al Dr. José Antonio Villalón Berlanga y al Dr. David Kyle Willis, quienes me permitieron hacer mis primeros pininos en esto de la biología molecular, gracias por darme la oportunidad de empezar a aprender.

A la Dra. Jen Sheen por la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio.

A Caro, por estar cerca por tantos años, gracias por tu paciencia, por tu ayuda incondicional, por tu amistad.

A Miguel Angel por coincidir en un punto del camino y por tu apoyo al final de este camino.

A Juan y a Cristina, por enseñarme las pequeñas cosas y los grandes trucos, por su filosofía de la vida.

A AngelesCansino (angelópolis), por tu sonrisa diaria, por irradiar entusiasmo, por ser una persona con tanta sensibilidad, una gran amiga y una buena compañera.

A mis compañeros de los laboratorios M. Rocha/P. León, los de antes y los de ahora (para que no se me olvide nadie) y a todos los que me es difícil enlistar, por no escatimar su ayuda y por hacer que día a día la vida en el laboratorio haya sido agradable, por haber compartido conversaciones de trabajo, pláticas de pasillo.

A mis compañeros de los laboratorios 122 y 123 del CBM en Madrid por su hospitalidad y generosidad, por estar siempre dispuestos a compartir. En especial a la Dras. Elena Ramírez Parra, Mar, Sara, Pili y al Dr. Pedro Pemau.

A Martha Trujillo y Edgar Baldemar por su ayuda con todo.

A Josué Reyesy Enrique Balderas, por compartir sus amplios conocimientos, por su amistad y apoyo en los buenos y malos tiempos y por la siempre reconfortante charla.

A la unidad de docencia por la ayuda con todos los trámites de inscripciones, becas, congresos, etc. Y a la unidad de cómputo.

A las personas más importantes de mi vida, a mi familia:

A mis padres, gracias por tantas y tantas cosas...., por darme el mejor trato, la mejor infancia, su compañía, por darme a mi hermana. Por su amor infinito, por siempre estar dispuestos a darme todo, por ser tan buenos y por no poder ser mejores. Sin duda esta tesis también la hicieron ustedes y es para ustedes, los amo.

A mi abuelita y a todos mis tíos y primos, paternos y maternos, por sus ánimos y oraciones en cada exámen tutorial.

A mi hermana, mi mejor amiga, gracias por apoyarme incondicionalmente, por estar siempre ahí, por ser como eres.

A Lupina y la Sra. Evangelina, por su generosidad y hospitalidad, por las charlas nocturnas y cuidarme como su propia hija.

A las instituciones:

A CONACYT por la beca-crédito otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A la DGAPA-UNAM y PAEP-UNAM por los apoyos complementarios.

A Howard Hughes por el apoyo para una estancia de investigación en el Departamento de Genética Molecular de la Universidad de Harvard, USA.

Al programa "For young woman in science" de UNESCO-Loreal' por la beca otorgada para una estancia de investigación en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", España.

A la fundación BASF por el apoyo otorgado para la culminación de mis estudios de posgrado.

*Este trabajo de tesis se realizó en el Departamento
de Biología Molecular de Plantas del Instituto de
Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la
Dra. Patricia León Mejía.*

ÍNDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE GENERAL	1
RESÚMEN	5
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS Y SIGLAS	9
TÉRMINOS INGLESES	10
I. INTRODUCCIÓN	11
I.1. Señalización de los azúcares en las plantas: Breve reseña.	11
I.2. Azúcares detectados en las plantas.	13
I.2.1. La sacarosa como molécula señalizadora.	13
I.2.2. Detección de otros disacáridos.	14
I.2.3. La glucosa como señal y morfógeno.	16
I.2.4. La fructosa y otras hexosas.	17
I.2.5. La relación del CO ₂ con la detección de azúcares.	19
I.3. El papel de los azúcares durante el desarrollo de las plantas.	19
I.3.1. Control del ciclo celular por azúcares.	20
I.3.2. Efecto de los azúcares en las etapas de desarrollo de la planta.	22
I.4. Regulación de la expresión génica por azúcares.	23
I.4.1. Regulación transcripcional.	24
I.4.1.1. Elementos de acción en <i>cis</i> de respuesta a los azúcares.	25
I.4.1.1.1 Elementos de acción en <i>cis</i> involucrados en la inducción de genes en respuesta a azúcar.	26
I.4.1.1.2 Elementos de acción en <i>cis</i> involucrados en la represión de genes en respuesta a azúcar.	27
I.4.2. Regulación postranscripcional.	29
I.4.2.1. Estabilidad del RNAm.	29
I.4.2.2. Iniciación de la traducción.	30
I.4.3. Regulación postraducciona.	31
I.4.3.1. Participación de las proteínas tipo SnRK.	31
I.4.3.2. Participación de las proteínas 14-3-3.	33
I.4.3.3 Papel de la maquinaria de degradación de proteínas mediada por ubiquitina en las respuestas a azúcar.	35
I.5. Vías de transducción de señales de azúcares en las plantas.	37
I.5.1. Mecanismos múltiples de detección de azúcares en las plantas.	37
I.5.1.1. Sistema de percepción mediado por hexocinasa.	38
I.5.1.2. Sistema dependiente del metabolismo de hexosas.	40
I.5.1.3. Sistema independiente del metabolismo de hexosas.	42
I.5.1.4. Vía de detección de disacáridos.	42
I.5.2. Transductores intermediarios.	42
I.5.3. Factores transcripcionales involucrados en las respuestas a azúcar.	44
I.6. Plantas mutantes en las respuestas de azúcares y su relación con las hormonas vegetales.	47
I.7. Interacción de la señalización de azúcares con otras vías de señalización.	49
I.7.1. Interacción entre las señales de azúcar y luz.	50
I.7.2. El estado redox y los azúcares.	52

I.7.3. Estrés por hipoxia.	54
I.7.4. Estrés biótico.	55
II. JUSTIFICACIÓN	57
III. OBJETIVOS	59
IV. RESULTADOS	61
IV.1 Formación de una colección de mutantes de <i>A. thaliana</i> afectadas en el proceso de detección de glucosa, capaces de resistir altas concentraciones de este azúcar.	61
IV.2 Caracterización fenotípica preliminar de las mutantes resistentes a glucosa.	65
IV.2.1. Análisis del patrón de inserción del T-DNA en las mutantes seleccionadas.	66
IV.2.2. Capacidad de internalización de Glc en las mutantes <i>gin6</i> , <i>gin7</i> , <i>gin8</i> .	68
IV.2.3. Resistencia de las mutantes <i>gin</i> a diversas fuentes carbonadas.	70
IV.2.4. Resistencia de las mutantes <i>gin</i> a diversas fuentes carbonadas durante la germinación.	72
IV.2.5. Efecto de la ausencia de la fuente nitrogenada en la respuesta fenotípica a Glc.	74
IV.2.6. Crecimiento foto/skotomorfogénico de las mutantes <i>gin</i> .	76
IV.3 Análisis fenotípico, genético y molecular de la mutante <i>gin6</i>.	78
IV.3.1. Análisis genéticos.	78
IV.3.2. Análisis fenotípico y molecular de la mutante <i>gin6</i> .	79
IV.3.3. Artículo: "Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, <i>gin5</i> and <i>gin6</i> , reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar".	81
IV.4 Aislamiento y caracterización molecular del gen <i>GIN6</i>.	82
IV.4.1. Aislamiento del gen afectado en la mutante <i>gin6</i> y <i>gin5</i> .	82
IV.4.2. Análisis de la expresión de los genes <i>GIN6/ABI4</i> , <i>ABI5</i> y <i>CTR1</i>	83
IV.4.3. Artículo: "Three genes that affect sugar sensing: <i>ABA INSENSITIVE 4</i> , <i>ABA INSENSITIVE 5</i> and <i>CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1</i> , are differentially regulated by glucose in <i>Arabidopsis thaliana</i> ".	86
IV.5 Resultados y conclusiones adicionales.	87
IV.5.1. <i>ABI4</i> es un trans-activador en el sistema de un híbrido de levadura.	87
IV.5.2. <i>gin1</i> , una mutante deficiente en ABA.	89
IV.5.2.1. Artículo: "A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and Abscisic acid biosynthesis and functions".	90
IV.5.3. <i>gin8</i> , la primera mutante en el gen involucrado en la biosíntesis de ABA: <i>NCED3</i> ?	91
IV.5.3.1. Caracterización genética.	91
IV.5.3.2. Caracterización fenotípica.	91
IV.5.3.3. Análisis de expresión génica.	97
IV.5.3.4. Identidad de <i>GIN8</i> : ¿ <i>gin8</i> , la primera mutante en el gen involucrado en la biosíntesis de ABA <i>NCED3</i> ?	99
IV.5.4. <i>gin7</i> , una mutación que no afecta la biosíntesis ni la señalización de ABA.	102
IV.5.4.1. Caracterización genética.	102
IV.5.4.2. Caracterización fenotípica.	102
IV.5.4.3. Análisis de expresión génica.	109
IV.5.5. Análisis preliminares de nuevas mutantes <i>gin</i> .	111
V. DISCUSIÓN	114
V.1 Detección de señales múltiples por las plantas y la importancia de las selecciones génicas.	114
V.2 Intercomunicación entre las vías de señalización de Glc, ABA y etileno.	116
V.3 La señal de Glc regula positivamente a elementos de su propia vía de señalización..	119

V.4 <i>ABI4</i> , <i>ABI5</i> y <i>CTR1</i> también responden a estrés osmótico y ABA.	120
V.5 Las señales de azúcar interactúan también con las vías de transducción de otras fitohormonas.	122
V.6 Las mutantes <i>gin</i> son osmotolerantes y resistentes a condiciones salinas.	124
V.7 El fenotipo <i>gin</i> no es simplemente un fenotipo de resistencia a estrés osmótico.	129
V.8 Relación de la señalización de azúcares y de N.	129
V.9 Efecto diferencial de los azúcares en las distintas etapas de desarrollo de las plantas.	132
V.10 Comentario final.	133
VI. CONCLUSIONES.	134
VII. PERSPECTIVAS.	137
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	139
ANEXOS	157
A. Artículo: Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants.	157
León P, Arroyo A, Mackenzie S. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. 49:453-80.	
B.	

RESÚMEN

La glucosa (Glc) tiene funciones señalizadoras que controlan procesos fisiológicos vitales y de desarrollo en las plantas. Los mecanismos de señalización así como los componentes regulatorios de la señal de la Glc se desconocen en gran medida. Con el fin de aislar y caracterizar componentes que participen en la(s) vía(s) de señalización activadas por este azúcar, en este trabajo se formó una colección de 163 plantas de *Arabidopsis thaliana* que potencialmente se encuentran afectadas en la detección y/o señalización de la Glc.

La caracterización fenotípica, genética y molecular de las primeras mutantes de esta colección, llamadas *gin* (“*glucose insensitive*”), demostró que la hormona ácido abscísico (ABA) tiene un papel esencial en la señalización de la Glc durante el desarrollo temprano de la planta. La clonación del gen mutado en la planta *gin6*, reveló al factor transcripcional ABI4 (“*ABA Insensitive 4*”) como un elemento partícipe en esta vía. Este factor importante también para la señalización del ABA es necesario para el bloqueo del desarrollo causado por la Glc. La participación de los genes *ABI* en la respuesta a Glc es particular para *ABI4* y *ABI5*, cuyas mutaciones causan fenotipo *gin*. En cambio, otros genes señalizadores del ABA como *ABI1*, *ABI2* y *ABI3* no parecen afectar este proceso, dado que mutaciones en tales genes no causan insensibilidad a Glc.

El análisis de plantas silvestres crecidas en diferentes concentraciones de Glc reveló que los niveles de ABA aumentan durante la respuesta a Glc y este aumento está afectado en las mutantes *gin5*, *gin8* y *gin1*, mismas que resultaron ser deficientes en dicha hormona. Este mismo efecto se observa en otras mutantes deficientes en la biosíntesis de ABA como *aba1*, *aba2* y *aba3*, las cuales también presentan fenotipo *gin*. Actualmente sabemos que la mutante *gin5* es alélica a *aba3*, que *gin1* es alélica a *aba2* y que *gin8* podría ser una mutante en el gen *NCED3*. Tanto *ABA2*, como *ABA3* y *NCED3* codifican para enzimas de la biosíntesis de ABA y de hecho, la adición exógena de concentraciones nanomolares de ABA revierten el fenotipo *gin* al fenotipo silvestre, lo que reitera su relación con las respuestas a Glc.

Por otra parte, estudios paralelos a este trabajo han mostrado que la señalización de la hormona etileno antagoniza a la señalización de la Glc, de tal manera que la activación de la vía del etileno bloquea los efectos de la Glc. Así, la mutante con señalización constitutiva de etileno, *ctr1*, presenta fenotipo *gin*, indicando que *CTR1* participa también en la respuesta a Glc. Con el fin de evaluar la regulación de componentes de la vía de señalización de la Glc, como un primer acercamiento se analizó la expresión de los genes *ABI4*, *ABI5* y *CTR1*. Este análisis reveló que la Glc modula la acumulación del transcrito de estos tres genes. Los transcritos de *ABI4* y *ABI5* se acumulan en

respuesta a la Glc, mientras que los transcritos de *CTR1* se reducen de forma transitoria y se recuperan posteriormente. Esto apoya la idea de que se requiere la presencia de estos elementos durante la respuesta de la planta a la Glc.

Durante este análisis también se demostró que los tres genes responden diferencialmente a múltiples señales incluyendo al estrés osmótico y al ABA, además de la Glc; y esta respuesta es modificada durante el desarrollo de la planta. Adicionalmente se vio que la regulación por Glc tanto de *ABI4* como de *ABI5* está afectada en mutantes *gin* (*gin5*, *gin6*, *gin1* y *gin8*), *aba* (*aba1*, *aba2* y *aba3*), *abi4*, *abi5* y en *ctr1*. Esta afección no se observó en mutantes que aún estando relacionadas con ABA, no presentan fenotipo *gin* como son *abi1*, *abi2* y *abi3*. En base a estos resultados podemos concluir que la señal de Glc es diferenciable de otras señales como el estrés osmótico y el ABA y además regula positivamente la expresión de elementos de su propia vía de señalización.

El análisis fenotípico de las mutantes *gin* adicionalmente contribuyó a establecer que los azúcares tienen un efecto diferencial en los distintos procesos de desarrollo de las plantas. Así mismo, este análisis reveló que la señalización por Glc se interrelaciona con otros procesos como la detección de la fuente nitrogenada e incluso las respuestas a estrés osmótico y salino.

Actualmente sabemos que otras mutantes de nuestra colección con fenotipo *gin* no parecen afectar ni la biosíntesis ni la señalización de ABA ni etileno, lo que apoya la existencia de otros componentes separables de estas hormonas que participan en la señalización de Glc.

En conclusión, la caracterización de las mutantes *gin* evidenció que una de las características más sobresalientes de la plasticidad de las plantas, es la frecuente intercomunicación entre vías señalizadoras a través de una red compleja en la que existen componentes tanto específicos como comunes. Estos componentes parecen interactuar, integrar y controlar una diversidad de respuestas específicas. Algunos de estos componentes podrían ser de hecho los factores transcripcionales *ABI4* y *ABI5*, los cuales parecen ser capaces de discernir e integrar una variedad de señales, contribuyendo así a la capacidad de las plantas para responder a los cambios internos y externos.

ABSTRACT

Glucose (Glc) has signaling functions that control a wide variety of physiological and developmental processes in plants. The signaling mechanisms and regulatory components of the Glc signal are mostly unknown. In this work, a collection of 163 *Arabidopsis thaliana* plants potentially affected in Glc sensing/signaling was isolated, in order to identify components of the signaling pathway(s) activated by this sugar.

Phenotypic, genetic and molecular characterization of the first mutants of this collection, called *gin* (“*glucose insensitive*”), showed that the phytohormone abscisic acid (ABA) has an essential role in Glc signaling during the early vegetative development of the plant. The T-DNA-tagged *gin6* mutant abrogates the Glc-induced expression of the transcription factor ABI4, which was previously shown to be involved in seed-specific ABA responses. This factor is necessary for the Glc-induced developmental arrest during early seedling morphogenesis. The participation of the *ABI* genes in the Glc signaling is specific for *ABI4* and *ABI5*, whose mutations cause a *gin* phenotype. In contrast, other *ABI* signaling genes like *ABI1*, *ABI2* and *ABI3*, do not seem to participate in this process, as mutations in such genes do not cause a *gin* phenotype.

Analysis of wild type plants grown in Glc concentrations revealed that ABA levels accumulate in response to Glc. Mutants *gin5*, *gin8* and *gin1* affect such ABA accumulation and they turned out to be ABA-deficient mutants. Consistent with these results, previously isolated ABA-deficient mutants, *aba1*, *aba2* and *aba3*, have also a Glc-insensitive phenotype. Genetic, physiological and molecular analyses showed that *gin5* is allelic to *aba3*, *gin1* is allelic to *aba2* and that *gin8* seems to be a mutant in the *NCED3* gene. In fact, *ABA2*, *ABA3* and *NCED3* encode for enzymes involved in ABA biosynthesis and the exogenous addition of nanomolar concentrations of ABA restore Glc sensitivity in the mutants.

It has been shown that ethylene antagonizes Glc signaling; thus, constitutive ethylene signaling in *ctr1* mutant renders a *gin* phenotype, demonstrating that *CTR1* kinase is involved in Glc responses. With the aim to study the regulation of Glc signaling components, as a first approach we analyzed the expression of *ABI4*, *ABI5* and *CTR1* genes. *ABI4* and *ABI5* transcripts accumulated in response to Glc, whereas *CTR1* transcripts were transiently reduced followed by a rapid recovery. These observations support the requirement of these elements during the Glc responses.

During the expression analyses, it was also shown that *ABI4*, *ABI5* and *CTR1* genes have a differential response to multiple signals including osmotic stress and ABA in addition to Glc, and such responses are modified during plant development. Furthermore, it was shown that *ABI4* and *ABI5* Glc regulation is affected in *gin* mutants (*gin5*, *gin6*, *gin1* and *gin8*), *aba* mutants (*aba1*, *aba2* and *aba3*), *abi4*, *abi5* and *ctr1*. Other ABA related mutants (*abi1*, *abi2* and *abi3*) that do not show *gin* phenotype, do not affect Glc regulation of these genes. Based on these results it was concluded that Glc signal is distinguished from other signals like osmoticum and ABA, and Glc positively regulates the expression of elements of its own signaling pathway.

Phenotypic analyses of *gin* mutants additionally contributed to establishing that sugars have a differential effect on different developmental processes of the plant. Moreover, it was revealed that Glc signaling interacts with other processes like nitrogen source detection and even osmotic and saline stress responses.

Currently, we have evidences that other *gin* mutants of this collection do not seem to affect neither the biosynthesis nor the signaling of ABA or ethylene, which supports the existence of other elements involved in Glc responses that are not related directly to such hormones.

In conclusion, characterization of *gin* mutants evidenced that one of the most highlighting characteristics of plant plasticity, is the extensive cross-talks between signaling pathways thought a complex regulatory web, in which specific and shared components co-exist. Such components seem to interact, integrate and control a diversity of specific responses. Some of these components could be the transcriptional factors *ABI4* and *ABI5*, which seem to be capable of distinguishing a variety of signals, thus contributing to the capacity of plants to respond to internal and external changes.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

aa.	aminoácidos	min.	minuto
ABA	ácido abscisico	Man	Manosa
aba	" <i>ABA deficient</i> "	Mb	Mega bases
abi	" <i>ABA insensitive</i> "	mM	milimolar
At.	<i>Arabidopsis thaliana.</i>	MOPS	ácido 3-N-morfolino-propan-sulfónico
ATP	trifosfato de adenosina	mRNA	RNA mensajero
AMPc	adenosin monofosfato cíclico	MS	Medio Murashige Skoog
AMPK	proteína cinasa activada por AMP	Mtl	Manitol
BAC	Cromosoma artificial de bacteria	N	Nitrógeno
C	Carbono	NAA	ácido naftalenacético
CAK	quinasa activadora de CDK	NLS	señal de localización nuclear
CaMV	Virus del Mosaico de la Coliflor	nM	nanomolar
cDNA	DNA complementario	nt	nucleótido
CDK	quinasa dependiente de ciclina	ORC	complejo de reconocimiento del origen
CKI	inhibidor de CDK	ORF	fase de lectura abierta
Col	Columbia	Os	<i>Oryza sativa</i>
Cyc	ciclina	pb	par de bases, pares de bases
d	días	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
D.O.	densidad óptica	p. e.	por ejemplo
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol	pg	picogramos
DNA	ácido desoxirribonucleico	PTS	Sistema-fosfotransferasa de transporte de azúcares
EDTA	ácido etilen-diamin-tetraacético	Rb	Designa genéricamente la proteína retinoblastoma y cualquier miembro relacionado en todas las especies.
EMSA	ensayo de retraso de la movilidad electroforética	RNA	ácido ribonucleico
et al.	y colaboradores	RNA^m(s)	ácido ribonucleico mensajero (s)
Fig.	Figura	RNA^r	ácido ribonucleico ribosomal
Frc	Fructosa	RNA^t	ácido ribonucleico de transferencia
FT	Factor transcripcional	Sac	Sacarosa
GA	giberelinas	Sc.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
gin	" <i>glucose insensitive</i> "	SCF	Complejo Skip-Culina-proteína con motivo F
Glc	Glucosa	SPS	Sacarosa fosfato sintasa
GLK	glucocinasa	SS	Sacrosina sintasa
GM	Medio de germinación estándar	Ws	<i>Wassilewskija</i>
hrs, h	hora	2DG	2-deoxi-glucosa
HXK	hexocinasa	3-OmGlc	3-oximetil-glucosa
IPP	isopentenil difosfato		
Ivr	Invertasa		
kb	kilobase		
kDa	kilodalton		
Km	kanamicina		
Ler	Landsberg <i>erecta</i>		

TÉRMINOS INGLESES

En la escritura de esta Memoria de Tesis Doctoral se ha evitado, en la medida de lo posible, el empleo de términos en lengua inglesa. No obstante, se ha mantenido la nomenclatura original de ciertos términos por estar ampliamente reconocidos en la comunidad científica internacional y para facilitar su comprensión. Entre dichos términos están los siguientes:

cDNA

DNA

RNA

T-DNA

También se mantuvo la nomenclatura original de algunos términos técnicos de difícil y/o confusa traducción a la lengua española como los siguientes:

"crosslinking"

"cross-talks"

"footprint"

"Northern blot"

"pool"

"screening"

"Southern blot"

"splicing"

"uORF" (upstream Open Reading Frame)

"UTR"

"wilty"

I INTRODUCCIÓN

I.1 Señalización de los azúcares en las plantas:

Breve reseña.

Los nutrientes, además de constituir los bloques esenciales de los componentes celulares, también actúan como señales reguladoras centrales que controlan el desarrollo, el metabolismo y la fisiología integral de todos los organismos procariontes y eucariontes tanto unicelulares como pluricelulares. Particularmente, los azúcares actúan como señales reguladoras esenciales en la adaptación de los organismos a las condiciones ambientales cambiantes; a este proceso se le conoce como regulación por carbono (Gancedo, 1998; Grupe *et al.*, 1995; Saier *et al.*, 1995; Sheen, 1999; Wang *et al.*, 1995).

El proceso de "regulación por carbono" ha sido estudiado tanto en procariontes como en eucariontes. En el caso de los organismos procariontes, la detección de azúcares preferenciales como es la glucosa (Glc), permite que el metabolismo celular se ajuste a los cambios en la disponibilidad de estos nutrientes esenciales, de tal manera que las vías del catabolismo de estos azúcares se desreprimen, mientras que las vías catabólicas para fuentes carbonadas alternas son simultáneamente reprimidas (Saier *et al.*, 1995). En organismos multicelulares, los sistemas de detección de azúcares son considerablemente más complejos, porque el estado energético de las células individuales debe ser integrado a las vías de señalización que regulan el crecimiento y desarrollo del organismo completo. Estudios en levadura y en organismos más complejos como los mamíferos, han aportado una gran cantidad de evidencias moleculares y bioquímicas sobre la regulación de la detección de azúcares, sin embargo, aún se desconoce mucho acerca de dichos procesos (Grupe *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Gancedo, 1998; Hardie *et al.*, 1998; Johnston, 1999; Vaultont *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2001). En la tabla 1 se ilustran los sistemas involucrados en la detección de azúcares que se han identificado hasta el momento, en cuatro organismos representativos.

Tabla 1. Sistemas involucrados en la detección de azúcares en cuatro organismos representativos.

ORGANISMO	SISTEMAS	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i>	Sistema-fosfotransferasa de transporte de azúcares (PTS) y el AMPc. - Vía independiente de la fosforilación de azúcares - Vías dependientes de fosforilación de azúcares:	Saier <i>et al.</i> , 1995.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	* Vía de represión por glucosa: respuesta sostenida, mediada por sensores específicos (Snf3 y Rgt2), HXK2, complejo Snf1 y represor Mig1 (entre otros). * Vía de Ras-AMPc: respuesta rápida mediada por HXKs,	Thevelein, 1994; Gancedo, 1998; Rolland <i>et al.</i> , 2001.

	GLK1 y Gpr1.	
Ratón o Humano	Sensores propuestos: GLK, GLUT-2, SGLT3. Otros factores: requerimiento de glicólisis en algunos casos ,ATP, AMPc, Ca ⁺⁺ , AMPK (homólogo a Snf1).	Grupe <i>et al.</i> , 1995; Herdie, 1998; Rolland <i>et al.</i> , 2001; Díez-Sampedro <i>et al.</i> , 2003.

En las plantas superiores los sistemas de detección de azúcares son muy sensibles por ser organismos césiles y además autótrofos, lo que les permite y obliga a reaccionar de manera muy flexible a los cambios ambientales. Esto implica que producen sus propias fuentes carbonadas (azúcares), y se ven obligadas a coordinar de manera muy fina la homeostasis de los azúcares con: *i*) su actividad fotosintética (producción de azúcares); *ii*) su utilización (metabolismo de estos azúcares) y distribución hacia los diferentes tejidos demandantes, durante su ciclo de vida (Jang y Sheen, 1997; Koch, 1996) y *iii*) la asimilación de otros nutrientes esenciales como el nitrógeno (Paul y Driscoll, 1997). La realización de todas estas actividades se ve afectada además por señales internas metabólicas, hormonales (DeWald *et al.*, 1994; Perata *et al.*, 1997; Németh *et al.*, 1998; Salchert *et al.*, 1998) y de desarrollo (Herbers *et al.*, 1996); así como por estímulos externos como la luz (Harter *et al.*, 1993), la concentración de CO₂ (Sttit, 1991) y diversos tipos de estrés como el frío (Livingston III *et al.*, 1998; Strand *et al.*, 1997), calor, herida, anaerobiosis (Salanoubat *et al.*, 1989) y ataque por patógenos (Herbers *et al.*, 1996). Resulta por tanto, que la señalización de la respuesta a azúcares, debe integrar los programas endógenos de desarrollo y los estímulos externos, para dar como resultado final una respuesta metabólica integral que asegure la sobrevivencia óptima de la planta. Tal respuesta se refleja en el enorme número y diversidad de genes y procesos controlados por estas fuentes carbonadas (Koch, 1996).

La distribución del carbono (C) en las plantas, está mediada esencialmente por el transporte de la sacarosa (Sac) producida en los órganos fotosintéticos (tejidos productores) hacia otras partes de la planta (tejidos demandantes). El control que ejerce la distribución de fuentes carbonadas sobre el crecimiento, parece llevarse a cabo a nivel celular, a través de la señalización mediada predominantemente por hexosas, que son el producto de la degradación de la Sac por la enzima invertasa (Ivr) (Sttit y Sonnewald, 1995). En especial la glucosa (Glc) parece tener un papel preferente como molécula señal tanto en las plantas como en otros organismos (Jang y Sheen, 1994). Por ende, es de suma importancia entender de qué manera las plantas monitorean los cambios de los niveles de azúcares (Glc); y cómo estas vías de transducción interactúan con las vías que responden a los diferentes estímulos internos y externos.

Hasta el momento se sabe muy poco de los componentes de las vías de señalización de azúcares y de sus interacciones en plantas superiores. Este trabajo a la par de otros grupos (Jen Sheen, Sjef

Smeeckens y Sue Gibson) fueron pioneros en la identificación de elementos esenciales en la señalización de azúcares, y evidenció a su vez la complejidad que encierra dicha vía. Este hecho cambió el panorama que se tenía sobre la naturaleza de la regulación por azúcares en plantas.

1.2 Azúcares detectados en las plantas.

1.2.1 La sacarosa como molécula señalizadora.

La sacarosa (Sac) es la principal forma de carbohidrato soluble de transporte en la mayoría de las plantas. También regula una variedad de procesos tales como la fotosíntesis y el almacenamiento de C y nitrógeno (N). La distribución de C en las plantas está mediada por el transporte de la Sac producida en los tejidos fotosintéticos (productores), hacia el resto del cuerpo de la planta (tejidos demandantes). Recientemente se ha demostrado que la Sac participa en la regulación de la expresión génica antes de ser desdoblada en las hexosas Glc y fructosa (Frc), lo que implica la existencia de una vía de respuesta específica para la Sac (en la cual sólo este azúcar es capaz de activar una respuesta). Entre los genes regulados por esta vía de señalización específica para la Sac se encuentran genes involucrados en el transporte de la Sac, en la biosíntesis de almidón, en la biosíntesis de fructanos y factores transcripcionales (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplos de genes y/o proteínas regulados por la señal específica producida por la Sac.

Gen/proteína	Efecto de la Sac	Referencia
simportador de protones-Sac	represión transcripcional y de actividad	Chiou y Bush, 1998.
iGPL1-1	inducción transcripcional	Hark <i>et al.</i> , 2000.
ATB2	represión transcripcional	Rook <i>et al.</i> , 1998.
1-SST	inducción transcripcional y actividad enzimática	Müller <i>et al.</i> , 2000.
6-SFT	inducción transcripcional y actividad enzimática	Müller <i>et al.</i> , 1999.

Así mismo, la acción de este azúcar se ha visto reflejada a nivel fisiológico. Por ejemplo, los estudios sobre la síntesis de almidón en rebanadas del tubérculo de la papa, muestran que este tejido responde de manera diferente a la adición de Sac o Glc (Geiger *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha demostrado que los fructanos (homopolisacáridos de D-fructosa utilizado como reserva en muchas plantas), así como la actividad y nivel del RNAm de dos enzimas clave de la biosíntesis de estos compuestos (Sac:Sac-1-fructosiltransferasa [1-SST] y Sac:fructano-6-fructosiltransferasa [6-SFT]), aumentan marcadamente en respuesta a la Sac en hojas de cebada (Müller, 2000). Estos efectos se incrementan en presencia de un inhibidor de la Ivr (2,5-dideoxi-2,5 imino-D-manitol). También el papel

de la Sac en la formación del tubérculo de la papa fue demostrado usando la tuberización *in vitro*, proceso que es altamente dependiente de la concentración de Sac (Xu *et al.*, 1998).

También algunos estudios sobre el desarrollo de la semilla en plantas transgénicas de *Vicia narbonensis* que expresan una Ivr derivada de levadura, apoyan la idea de que la Sac induce específicamente la diferenciación y la síntesis de productos de almacenamiento (Weber *et al.*, 1998a). Un estudio de desarrollo comparativo de semillas de haba, reveló que el cambio entre la fase de pre-almacenaje (o la fase de división celular), a la de almacenamiento (o fase de diferenciación), también se acompaña por un cambio de una proporción de altas cantidades de hexosas (principalmente Glc y Frc/Sac), a una mayor proporción de Sac vs. hexosas en los embriones; mientras que los niveles de hexosas de la cubierta de la semilla son siempre bajos. (Borisjuk *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1995, 1997b). Estas hexosas provienen del desdoblamiento de la Sac por una Ivr ácida localizada en la capa interna del espacio apoplástico de la cubierta de la semilla, y son tomadas por el embrión. La integración de muchas evidencias, conlleva a concluir que un alto índice de hexosas/Sac favorece la división celular, mientras que una alta razón de Sac/hexosas favorece la diferenciación de las células del parénquima (Weber *et al.*, 1997a).

1.2.2 Detección de otros disacáridos.

La utilización de disacáridos no metabolizables como la lactulosa (β -galactosa [Gal β][1-->4]Fru), palatinosa (Glc α [1-->6]Fru), y turanosa (Glc α [1-->3]Fru) ha demostrado que estos azúcares tienen efectos de represión en la expresión de la enzima α -amilasa en embriones de cebada. Esta enzima degrada el almidón almacenado en la semilla. Sin embargo, la melibiosa (Gal α [1-->6]Glc) no tiene efecto sobre este gen. Si se reemplaza la Frc de estos disacáridos por Glc o galactosa, se pierde la capacidad de represión de la α -amilasa, sugiriendo que el componente fructosil es esencial para tal respuesta (Loreti *et al.*, 2000). Por el contrario el gen *VvHT1*, que codifica para un transportador de hexosas, es inducido por concentraciones fisiológicas (58 mM presente comúnmente en tejidos demandantes) de palatinosa, melibiosa y turanosa, cada uno con un componente de Glc; y la lactulosa que no tiene el componente de Glc no afecta la expresión de este gen. Esto sugiere que la inducción de *VvHT1* por disacáridos que no pueden ser desdoblados, transportados, ni metabolizados, parece requerir de al menos un componente glucosil (Atanassova *et al.*, 2003). La habilidad de detectar análogos de azúcares como la palatinosa y la turanosa, también ha sido demostrado en hojas de tabaco (Sonnewald y Herbers, 1999). Otros análisis posteriores sugieren que estos azúcares son percibidos a nivel de la membrana plasmática independientemente del transporte de la Sac (Loreti *et al.*, 2000).

Otros disacáridos que no contienen Frc también tienen efectos específicos. Por ejemplo la Sac-sintasa y la Ivr son estimuladas no sólo por Sac, sino también por trehalosa (un disacárido α -D-glucopiranosil-[1,1]- α -D-glucopiranosido), incluso en la presencia de validamicina A (un inhibidor poderoso y específico de la trehalasa); mientras que la Glc no tiene el mismo efecto (Müller *et al.*, 1998). Por mucho tiempo la presencia de la trehalosa fue confinada a las plantas conocidas como plantas de resurrección y muchos microorganismos, en los cuales sirve como protección contra el estrés por deshidratación/osmótico. Sin embargo, la secuenciación del genoma de Arabidopsis y los estudios de complementación de mutantes de levadura, revelaron la presencia de genes vegetales funcionales que codifican para enzimas del metabolismo de la trehalosa (Goddijn y Smeekens, 1998; Goddijn y van Dun, 1999; Leyman *et al.*, 2001). De 11 genes *TPS* (que codifican para la trehalosa fosfato sintasa) codificados en el genoma de Arabidopsis, sólo se ha demostrado que el gen *TPS1* codifica para una TPS funcional (Blazquez *et al.*, 1998).

En la levadura, este carbohidrato de reserva y protector contra el estrés, está implicado también en el control del flujo glicolítico y la señalización de azúcares (Thevelein y Hohmann, 1995). La trehalosa-6-fosfato es un inhibidor potente de la HXKII (hexocinasa II) de levadura, y existe evidencia de que tanto la propia Tps1 de levadura como la trehalosa-6-fosfato controlan el flujo glicolítico (Bonini *et al.*, 2000; Van Vaeck *et al.*, 2001).

En Arabidopsis, se ha detectado trehalosa aunque en cantidades mínimas, lo cual indica que no funciona como un osmoprotector, sino que juega un papel más bien regulador. La aplicación exógena de trehalosa (25 mM) es capaz de inhibir la elongación de la raíz de las plántulas y causa una acumulación de almidón en los tallos. Este efecto es causado por la inducción de los componentes de la biosíntesis de almidón, pues la trehalosa aumenta la actividad de la AGPasa (ADP-Glc pirofosforilasa) e induce la expresión de su gen correspondiente *APL3* (Wingler *et al.*, 2000; Fritzius *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando se inhibe la trehalasa, hay una acumulación de trehalosa endógena y una reducción fuerte en el contenido de almidón y Sac (Müller *et al.*, 2001). Tales efectos aparentemente contradictorios podrían explicarse mediante la participación de vías de detección diferentes para la trehalosa endógena y la exógena. A pesar de que la trehalosa-6-fosfato no parece tener efecto en la fosforilación de hexosas (Weise *et al.*, 1999), hay estudios que sugieren que puede tener un papel regulador en el metabolismo y distribución de carbohidratos incluyendo la actividad fotosintética (Paul *et al.*, 2001).

El uso de análogos de disacáridos que no pueden ser internalizados en la célula (palatinosa y turanosa) o bien, no metabolizables, apoya la existencia de vías de detección específicas de disacáridos

e incluso de diferentes sensores específicos para la trehalosa y análogos de Sac (Loreti *et al.*, 2000; Fernie *et al.*, 2001).

1.2.3 La glucosa como señal y morfógeno.

A pesar de que la distribución de C en las plantas está esencialmente mediada por el transporte de Sac desde los órganos fotosintéticamente activos al resto de la planta, el control del crecimiento y desarrollo es llevado a cabo en gran parte a nivel celular. Como se mencionó con anterioridad, particularmente la Glc parece tener un papel preferente como molécula señal tanto en las plantas como en la mayoría de los organismos (Sheen, 1994).

A nivel de expresión génica, la regulación por Glc ha sido estudiada tanto en procariontes como en eucariontes. En *E. coli*, la Glc tiene un efecto represor mientras que en la levadura y los mamíferos controla positiva- y negativamente la expresión génica (Jang y Sheen, 1994). La represión de genes fotosintéticos por Glc es un fenómeno único en las plantas superiores, donde los azúcares son generados de forma endógena. Usando fusiones quiméricas de los promotores de 7 genes fotosintéticos y el gen reportero CAT, se demostró que dichos promotores son reprimidos específica- y coordinadamente por Glc y Sac, pero la Glc representa una señal más fuerte dado que la represión puede ser activada con Glc 1-10 mM, mientras que la Sac a estas mismas concentraciones produce muy poca represión (Jang y Sheen, 1994). Estos y otros experimentos también demostraron que dicha regulación se lleva a cabo a nivel transcripcional, y los elementos necesarios para tal respuesta están corriente arriba de la secuencia codificante (Krapp *et al.*, 1993).

A nivel fisiológico, la Glc puede tener efectos dramáticos en el desarrollo de las plantas. Por ejemplo, en las células del mesófilo (el principal sitio de expresión de genes fotosintéticos), la Glc se genera a partir del desdoblamiento de la Sac por la Ivr citoplásmica, la vacuolar o la apoplástica. En tabaco (y jitomate) se observó que cuando se sobre-expresa cualquiera de dichas formas de Ivr, aumentan los niveles de hexosas, las hojas palidecen, el tamaño de la raíz se reduce y se inhibe la fotosíntesis (Dickinson *et al.*, 1991; Sonnewald *et al.*, 1991; Krapp *et al.*, 1993). Otro ejemplo de los efectos de la Glc se observa en la planta de Arabidopsis, la cual bloquea su desarrollo cuando es germinada en presencia de altas concentraciones de glucosa (300-400 mM), de tal manera que los cotiledones no se expanden ni enverdecen (Jang *et al.*, 1997). La Glc también retrasa la germinación de las semillas de esta planta tanto en concentraciones altas de Glc (300-388 mM) como en concentraciones bajas (55- 80 mM) (este trabajo; Dekkers *et al.*, 2004). Así mismo, en Arabidopsis hay una correlación positiva entre la concentración alta de hexosas y la velocidad de elongación y ramificación de raíces (Freixes *et al.*; 2002), de tal manera que la concentración local de hexosas y no de

Sac, parece integrar los cambios en la disponibilidad de C de diferentes fuentes, y actuar como señal para determinar, al menos en parte, la arquitectura de la raíz en respuesta a las condiciones ambientales.

También existen evidencias sobre el papel fisiológico específico de esta hexosa directamente sobre el desarrollo de la semilla. Por ejemplo, en semillas jóvenes de leguminosas y otros tejidos, el nivel alto de hexosas mantiene la capacidad de división de las células, mientras que más tarde en el desarrollo de la semilla, se necesita cierto nivel de Sac para inducir la diferenciación celular asociada a almacenamiento. Borisjuk *et al.*, (1998) concluyen que los altos niveles de Glc en los cotiledones son un marcador de células meristemáticas jóvenes. La aplicación de Sac en lugar de Glc a cotiledones jóvenes, rompe el estado meristemático e inicia la diferenciación y la maduración (Weber *et al.*, 1996).

Un determinante importante en la generación de los niveles de hexosas en el embrión de leguminosas jóvenes, es una Ivr apoplástica que se expresa preferentemente en las capas internas de células de la cubierta de la semilla (Weber *et al.*, 1995). Esta enzima rompe los fotosintatos entrantes (Sac) en Glc y Frc. Durante el desarrollo, el tejido que alberga la Ivr es degradado con un patrón espacial y temporal muy específico, como parte del programa de desarrollo, creando así gradientes de Glc dentro de los cotiledones. Estos gradientes se correlacionan positivamente con la división celular y negativamente con las actividades de diferenciación y almacenamiento celular. La acumulación de un transportador de hexosas y uno de Sac (VfSTP1) solamente en la capa de la epidermis parece ser esencial en crear y mantener dichos gradientes (Weber *et al.*, 1997b); así la expresión coordinada del transportador de hexosas y de la Ivr pueden mantener tejidos mitóticamente activos en presencia de hexosas. El papel de las Ivrs ácidas y de las hexosas en favorecer la división celular durante el desarrollo de la semilla, también fue evidente durante un estudio del tamaño de las semillas del haba, donde el tamaño de la semilla se correlaciona directamente con el número de células, y no con el tamaño de las células (Weber *et al.*, 1996).

Estas y otras evidencias indican que la Glc generada interna y externamente representa una señal que modifica las respuestas metabólicas y morfogénicas de la planta.

1.2.4 La fructosa y otras hexosas.

En la levadura, además de la Glc, la Frc también es capaz de activar la represión catabólica, en cambio la manosa (otra hexosa) no es un azúcar represor. Esta represión es dependiente de la HXK2, que es la enzima responsable de la fosforilación de la Glc y la Frc (Dynesen *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la Frc, así como la Glc y la Sac, reprimen la expresión transitoria de la

C4ppdkZm1CAT, una fusión del promotor de un gen fotosintético de maíz (piruvato fosfodikinasa) con un gen reportero (cloranfenicol acetil transferasa), lo cual apoya la función señalizadora de dicha hexosa (Sheen, 1990). Usando nuevamente la prueba de expresión transitoria en protoplastos de maíz transfectedos e incubados con diversos azúcares a una concentración de 10 mM, se han obtenido evidencias que apoyan no sólo a la Frc, sino también a la manosa y a la galactosa como activadores eficientes de la represión de la construcción génica cabZm5-CAT (Jang y Sheen, 1994). Las formas fosforiladas de la fructosa, F-6-P y F-1,6-BP las cuales regulan el metabolismo de carbohidratos, parecen no tener efecto directo en el control de la expresión génica (Jang y Sheen, 1994). De manera contrastante se ha demostrado que la F-1,6-P, la F-6-P, así como la Glc-6-P, la manosa-6-P, la ribosa-5-P y el 3-PGA inhiben una de las proteínas cinasas con mayor actividad, la PK(III). Esta enzima es un miembro de las proteínas cinasas relacionadas a la familia Snf1 de levadura (SnRKs) y fosforila a la Sac-fosfato sintasa de espinaca (SPS). Sorprendentemente la Glc no resultó ser inhibitoria en este caso (Toroser *et al.*, 2000).

La manosa es un análogo de la Glc que también es fosforilado por la HXK, y además de reprimir la expresión de diversos genes, también es capaz de inhibir la germinación de las semillas de *Arabidopsis*. Este azúcar se utiliza en concentraciones muy bajas (7.5 mM) y sus efectos a nivel fenotípico y de expresión génica parecen estar mediados por la HXK (Graham *et al.*, 1994; Pego *et al.*, 1999). Cabe mencionar que solamente algunas especies de plantas contienen cantidades traza de manosa, las cuales son detectables en la semilla y en algunos tejidos vegetativos durante el proceso de almacenamiento (Herold y Lewis, 1977).

A nivel fenotípico, de manera semejante a la Glc, la Frc también es capaz de detener el desarrollo de una plántula de *Arabidopsis* cuando se aplica al medio de crecimiento en altas concentraciones, evitando la expansión y enverdecimiento de los cotiledones (Arroyo y León, este trabajo). Sin embargo, el efecto aún es más fuerte con la Glc; esto podría deberse a que la HXK, una de las enzimas que fosforilan la Frc y que es postulado como uno de los sensores de hexosas (ver más adelante), tiene una afinidad reducida por este azúcar. En las plantas, la hidrólisis de la Sac mediada por la Ivr genera el doble de azúcares señalizadores, Glc y Frc. Sin embargo, de la hidrólisis mediada por la SS, la cual genera Frc y UDPGlc, sólo la Frc representa un azúcar señalizador. En este sentido, la planta tiene dos sistemas generadores del azúcar señalizador Frc y aún falta por saber si la planta responde de forma diferente a la Frc dependiendo del origen de dicha señal.

I.2.5 La relación del CO₂ con la detección de azúcares.

Uno de los substratos de la fotosíntesis es el CO₂ atmosférico, y es bien sabido que las plantas son capaces de modificar su eficiencia fotosintética en respuesta a los niveles cambiantes de CO₂ (Stitt, 1991). La tasa fotosintética aumenta bajo condiciones de CO₂ elevado, debido un efecto directo en la tasa de carboxilación y oxigenación de Rubisco. Esto conlleva a un incremento en la producción de carbohidratos. Las plantas crecidas en presencia de concentraciones elevadas de CO₂ no son capaces de mantener en aumento la capacidad fotosintética, misma que disminuye notablemente por la represión de genes fotosintéticos en respuesta a los carbohidratos acumulados. Por ejemplo, la aclimatación de plantas de jitomate a niveles elevados de CO₂, en las cuales el incremento inicial de la fotosíntesis es seguido de una disminución a largo plazo, se ha relacionado a la represión de los genes fotosintéticos nucleares por azúcares, y en menor medida a la represión de los genes cloroplásticos (Van Oosten *et al.*, 1994; Van Oosten y Besford, 1994). A pesar de que el aumento en la tasa de fotosíntesis es la respuesta primaria más importante a la alta concentración de CO₂, la magnitud del aumento a largo plazo podría depender de la generación de tejidos demandantes de los carbohidratos. Si el requerimiento de los tejidos demandantes es bajo, como resultado hay acumulación de azúcares (Ghannoum *et al.*, 1997). Sin embargo, otra hipótesis plantea que la represión de genes fotosintéticos podría deberse a una inducción acelerada del proceso de senescencia (Ludewig y Sonnewald, 2000).

Para entender mejor la respuesta de las plantas superiores a los niveles altos de CO₂, se ha comenzado a aislar mutantes que no responden a CO₂, (*cnr*, “CO₂ non-responsive”). Estas plantas presentan una respuesta anormal cuando son crecidas en altas concentraciones de CO₂, como por ejemplo, no presentan una intensa pigmentación por antocianinas, ni hojas curvadas, ni crecimiento achaparrado (enano), mismos que presentan las plantas silvestres bajo estas condiciones (Jebanathirajah *et al.*, 1998). Estas mutantes también tienen afecciones en la respuesta a altos niveles de Glc, lo que confirma la estrecha relación que existe entre las respuestas al CO₂ y a Glc. La identificación de los genes mutados en estas líneas de plantas dará luz sobre la relación Glc- CO₂.

I.3 El papel de los azúcares durante el desarrollo de las plantas.

Las plantas tienen un enorme potencial para modificar sus programas de desarrollo en respuesta a la disponibilidad de azúcares, por lo que el control del crecimiento y desarrollo de la planta a lo largo de todo su ciclo de vida depende de la detección y la señalización de los azúcares que activan los diferentes programas de desarrollo de acuerdo a las condiciones internas y externas. Como se mencionó

anteriormente, tal parece que los tejidos mitóticamente activos no diferenciados contienen niveles altos de Glc, mientras que los tejidos diferenciados contienen mayores niveles de Sac, lo que parece regular la embriogénesis de la planta (Burisjuk *et al.*, 2002).

1.3.1 Control del ciclo celular por azúcares.

Una amplia variedad de estudios en diversos organismos como bacterias, hongos, animales y plantas, han indicado que el ciclo celular está regulado en gran medida por la disponibilidad de fuentes carbonadas (Meijer y Murray, 2000; Riou-Khamlichi *et al.*, 2000; Stocker y Hafen, 2000; Newcomb *et al.*, 2003). Por ejemplo, en las plantas la coordinación entre el estado de azúcares y la proliferación celular durante el desarrollo se puede lograr mediante un efecto directo del azúcar en la señalización del ciclo celular y la expresión génica (Soni *et al.*, 1995). Dado que la división celular en plantas responde a la disponibilidad de energía, la presencia de los azúcares es un muy probable regulador de la progresión del ciclo celular. De hecho, se sabe que muchas células vegetales se detienen en la fase G1 en respuesta a la limitación de nutrientes o la diferenciación, tal como pasa en microorganismos eucariontes y en animales (Jacobs, 1995; Fowler *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 1998; Parviz y Heideman, 1998; Mironov *et al.*, 1999); de tal forma que permiten la progresión celular sólo bajo condiciones adecuadas. De manera similar a los mamíferos y a diferencia de las levaduras, las plantas tienen proteínas del ciclo celular del tipo ciclinas D, proteínas homólogas a retinoblastoma (RB), y factores transcripcionales tipo E2F (Gutierrez, 1998; Ramirez-Parra *et al.*, 1999; Sekine *et al.*, 1999). Cierta número de genes del ciclo celular en plantas se regulan por hormonas y/o por la disponibilidad de azúcares (Meskiene *et al.*, 1995; John, 1998; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Gaudin *et al.*, 2000). En la siguiente tabla se muestran algunos ejemplos de genes o proteínas que participan en el ciclo celular y que responden a azúcares en diversos organismos (Tabla 3).

Tabla 3. Algunos ejemplos de componentes del ciclo celular que responden a azúcares en diversos organismos.

Gen o proteína	Organismo	Efecto	Referencia
<i>CLN3</i>	Levadura	Se induce por Glc y la disponibilidad de nitrato	Parviz y Heideman, 1998.
<i>CycD</i>	Arabidopsis	Se induce por Glc, la disponibilidad de nitrato y citocininas	Meijer y Murray, 2000; Riou-Khamlichi <i>et al.</i> , 2000.
<i>cdc2</i>	Arabidopsis	Se induce por la presencia de carbohidratos	Hemerly <i>et al.</i> , 1995.
<i>CDC6</i>	Arabidopsis	inducidos por la adición de azúcar	de Jager <i>et al.</i> , 2001.
<i>ORC1</i>	Arroz	inducidos por la adición de azúcar	Kimura <i>et al.</i> , 2000.
ciclinas	Mamíferos	Actividad modificada por la hormona insulina , la cual responde directamente a los niveles de Glc	Tang <i>et al.</i> , 1995; Lukas <i>et al.</i> , 1996.

Riou-Khamlichi *et al.* (2000) reportaron que las células de *Arabidopsis* en fase estacionaria temprana, pasan a un estado quiescente en respuesta a una limitación de C. Cuando a estas células se les reprovee de fuente carbonada, reinician en el ciclo celular prosiguiendo hacia la fase S y reanuden la división. Por otra parte las ciclinas D (*CycD*), las cuales son importantes en acoplar la disponibilidad de nutrientes y las hormonas con el ciclo celular, también se regulan por estas señales. De hecho *CycD2* se induce rápidamente (0.5 h) por bajas concentraciones de Glc (1 mM) tanto en células de *Arabidopsis* en suspensión como en plántulas, y el gen *CycD3* se induce posteriormente (4 h). Esto sugiere que la inducción de *CycD2* puede ser la primera señal para la respuesta a azúcares sobre el control de ciclo celular al comienzo de la fase G1, y que *CycD3* participa al final de esta misma fase.

A este respecto, resulta interesante que la cepa mutante *snf1* de la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, que está mutada en una serina/treonina cinasa, no es capaz de detener su ciclo celular en la fase G1 bajo condiciones de ausencia de nutrientes, así como la mutante *snf4* (Thomson-Jaeger *et al.*, 1991; Aon y Cortassa, 1998). Cada vez existen más evidencias que apoyan el papel de la proteína SNF1 como un elemento importante en la intercomunicación de las vías de detección de azúcares y señalización del ciclo celular en levadura, lo cual le permite a este microorganismo detener su división celular bajo condiciones de falta de nutrientes. Como las proteínas SnRK1s (quinasas de plantas relacionadas a SNF1) y la SNF1 son funcionalmente homólogas en la levadura (ambas pueden llevar a cabo la represión por Glc), Dickinson *et al.* (1999) probaron si la sobre-expresión del gen de la RKIN1 (SnRK1 de *Secale cereale*) también podría afectar el ciclo celular en la mutante *snf1*. Lo que observaron fue que había una disminución dramática en el crecimiento de las células, sugiriendo que las proteínas cinasas relacionadas a SNF1 (SnRK1s) también podrían tener una función en el control del ciclo celular en plantas.

Cabe mencionar que en el caso de las plantas, se ha observado que se pueden inducir divisiones celulares en brotes latentes de girasol, mediante la aplicación exógena de azúcar (Ballard y Wildman, 1964). Además de los efectos de los azúcares exógenos, los niveles de azúcares endógenos también afectan el control de la división celular. Es decir, tanto la luz, como las concentraciones elevadas de CO₂ pueden incrementar el rendimiento fotosintético y por lo tanto los niveles endógenos de azúcares. Se ha observado que a concentraciones elevadas de CO₂, hay un aumento en el número de células dividiéndose rápidamente en el meristemo apical y una reducción en el periodo del ciclo; lo cual se ha interpretado como el resultado de una progresión más rápida a través del ciclo celular, (Jitla *et al.*, 1997; Kinsman *et al.*, 1997).

1.3.2 Efecto de los azúcares en las etapas de desarrollo de la planta.

Como se mencionó anteriormente, la presencia de concentraciones altas de azúcares tienen un efecto inhibitorio durante el proceso de germinación y bloquean el desarrollo temprano de la planta de *Arabidopsis*. Los azúcares pueden reprimir la movilización de nutrientes, la elongación del hipocotilo, el enverdecimiento y la expansión de los cotiledones. Es posible que la presencia de niveles muy altos de azúcar durante la germinación y el desarrollo temprano sea reflejo de condiciones de crecimiento desfavorables, lo cual resulta en el retraso de la germinación (este trabajo; Price *et al.*, 2003) y una interrupción del desarrollo (Jang *et al.*, 1997), que actuarían como un mecanismo de protección.

El cambio de crecimiento vegetativo al reproductivo también es regulado por los azúcares. El proceso de floración en *Arabidopsis* requiere de un aumento en la exportación de carbohidratos desde las hojas así como la movilización de almidón, lo cual sugiere que los carbohidratos del floema tienen una función crítica durante la transición floral (Corbesier *et al.*, 1998). Además, se ha visto que la adición de Sac a baja concentración (1%) puede rescatar el fenotipo de floración tardía de diversas mutantes, e incluso puede promover la morfogénesis de hojas y la floración en la obscuridad (Roldan *et al.*, 1999). Sin embargo la aplicación exógena de altas concentraciones de Glc y Sac retrasan la floración de forma significativa (Zhou *et al.*, 1998; Ohto *et al.*, 2001). Estas contradicciones aparentes se podrían explicar por los efectos pleiotrópicos de los azúcares en el proceso de la floración dependiendo de la concentración de azúcar, de la fase del crecimiento vegetativo al momento de la aplicación y del fondo genético, además de la regulación sobre la expresión de genes de identidad floral (p.e. represión de *FT* y *SOC1/AGL20*) (Ohto *et al.*, 2001).

La detección y señalización de azúcares también está involucrada en la regulación de la senescencia de las hojas, proceso que coincide con la disminución en el contenido de clorofila y de la actividad fotosintética, y con el aumento en la actividad de las IvrS durante el envejecimiento (Quirino *et al.*, 2000; Wingler *et al.*, 1998). Este proceso está mediado al menos en parte por la HXK, dado que plantas transgénicas que sobreexpresan esta enzima presentan una senescencia acelerada (Dai *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2000). Adicionalmente, los azúcares regulan la expresión de genes relacionados directamente con la senescencia como el gen que codifica para la fosfolipasa D, y otros genes marcadores de este proceso como *SAG21* y *SAG12* (Noh y Amasino, 1999; Xiao *et al.*, 2000). Estas y otras evidencias dejan ver el papel de los azúcares en el control de los programas de desarrollo de la planta.

I.4 Regulación de la expresión génica por azúcares.

El número y la diversidad de genes controlados por los azúcares refleja la importancia de la regulación por estas fuentes carbonadas. Las plantas pueden controlar la producción de fotosintatos en los tejidos productores (órganos exportadores de C), su distribución hacia los tejidos específicos demandantes (órganos importadores), y su utilización subsiguiente. Estas actividades se llevan a cabo a través de la detección de los cambios en los niveles energéticos y metabólicos, y respondiendo a nivel de expresión génica y actividad enzimática. Tales respuestas tienen efectos profundos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. En general los azúcares favorecen la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis, uso, y almacenamiento de reservas (incluyendo almidón, lípidos y proteínas), mientras que reprimen la expresión de enzimas que participan en su producción (fotosíntesis) y la movilización de reservas.

Algunos ejemplos de genes regulados positivamente por azúcares incluyen a los genes que codifican para:

- * proteínas de almacenamiento de C como son la patatina y la esporamina.
- * proteínas relacionadas con la biosíntesis de almidón como la ADP-Glc pirofosforilasa.
- * proteínas de defensa como el inhibidor de proteinasa II.
- * proteínas del metabolismo de la Sac como la Ivr y la SS.

Por el contrario, otro grupo de genes es regulado negativamente por los azúcares, y su expresión es inducida por la ausencia de azúcares. Ejemplos de estos últimos son los genes de la α -amilasa de arroz, los genes de la endopeptidasa y la Asn sintasa en cofias de maíz, y los genes de la malato sintasa e isocitrato liasa en pepino (resumido en Sheen, 1994, Graham, 1996 y Koch 1996). Sin embargo, aún no se sabe si esta regulación diferencial por los azúcares es mediada por un mecanismo en común.

En la siguiente tabla se incluyen algunos ejemplos de genes regulados por azúcar que se han reportado recientemente, y que ejemplifican la diversidad de procesos fisiológicos controlados por azúcares (Tabla 4).

Tabla 4. Algunos ejemplos de genes modulados por azúcar.

GENES	NATURALEZA DEL PRODUCTO	ORGANISMO	REFERENCIA
<i>Pho1</i>	Fosforilasa plastídica	Espinaca, papa	Duwenig <i>et al.</i> , 1997.
<i>PHSβ</i>	Faseolina β	Tobaco	Bustos <i>et al.</i> , 1998.
<i>NiCDPK</i>	Proteína cinasa	Tobaco	Iwata <i>et al.</i> , 1998.
<i>Frk1, Frk2</i>	Cinasa de hexosas	Tomate	Kanayama <i>et al.</i> , 1998.
<i>ATB2</i>	Factor transcripcional	Arabidopsis	Rook <i>et al.</i> , 1998.
<i>ApS, ApL1, ApL2,</i>	Enzima de biosíntesis de almidón	Arabidopsis	Sokolov <i>et al.</i> , 1998.

<i>Atβfruct1, 2, 3, 4</i>	Familia de invertasas	Arabidopsis	Tymowska y Kreis, 1998.
<i>AK/HSD</i>	Aspartato cinasa/homoserina deshidrogenasa	Arabidopsis	Zhu-Shimoni y Galili, 1998.
<i>GLB1</i>	Proteína cloroplástica homóloga a PII de E. coli	Arabidopsis, <i>Ricinus communis</i>	Hsieh <i>et al.</i> , 1998.
<i>Incw1</i>	Invertasa de pared celular	Maíz	Cheng <i>et al.</i> , 1999.
<i>CYC4;1</i>	Ciclinas	Arabidopsis	De Veylder <i>et al.</i> , 1999.
<i>Sbe1</i>	Enzima ramificadora de almidón	Maíz	Kim y Gultinan, 1999.
<i>Nrt2:1, Nrt1</i>	Transportadores de nitrato	Arabidopsis	Lejay <i>et al.</i> , 1999.
<i>GSI, GS2</i>	Glutamina sintetasa	Arabidopsis	Oliveira y Coruzzi, 1999.
<i>ADH</i>	Alcohol deshidrogenasa	Arabidopsis	Arenas <i>et al.</i> , 2000.
<i>din1, 2, 3, 4, 6, 9,</i>	Genes de respuesta a oscuridad	Arabidopsis	Fujiki <i>et al.</i> , 2000.
<i>iAGPL</i>	Subunidad grande de la ADP-Glc pirofosf	Papa	Hark <i>et al.</i> , 2000.
<i>OsSUT1</i>	Transportador de Sac	Arroz	Matsukura <i>et al.</i> , 2000.
<i>1-SST, 6-SFT</i>	Sac:Sac-1-fructosiltransferasa Sac:fructano-6-fructosiltransferasa	Cebada	Müller <i>et al.</i> , 2000.
<i>CycD2, CycD3</i>	Ciclinas	Arabidopsis	Riou-Khamlichi <i>et al.</i> , 2000
<i>Rab16A</i>	Gen de respuesta a ABA	Arroz, cebada	Toyofuku <i>et al.</i> , 2000.
<i>APL3</i>	Enzima de la biosíntesis de almidón	Arabidopsis	Rook <i>et al.</i> , 2001.
<i>OsMYBS1, 2, 3</i>	Factor transcripcional	Arroz	Lu <i>et al.</i> , 2001.
<i>FT, SOC1/AGL20</i>	Genes de identidad floral	Arabidopsis	Otho <i>et al.</i> , 2001.
<i>STK</i>	Factor transcripcional	Papa	Zourelidou <i>et al.</i> , 2002.
<i>CitSUT1, 2</i>	Transportadores de sacarosa	Arbol "Citrus"	Li <i>et al.</i> , 2003.
<i>VvHT1</i>	Transportador de hexosas	Uva	Atanassova <i>et al.</i> , 2003.
<i>VvMSA,</i>	Factor transcripcional	Uva	Cakir <i>et al.</i> , 2003.
<i>susiba2</i>	Factor transcripcional	Cebada	Sun <i>et al.</i> , 2003.

Como parte de esta tesis encontramos otra serie de genes que son regulados por azúcares y que de hecho forman parte de la cascada de señalización activada por Glc, mismos que serán descritos en la sección de resultados (Arenas *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002; Arroyo *et al.*, 2003).

I.4.1 Regulación transcripcional.

La regulación por azúcares actúa, al menos en parte, a nivel transcripcional tal como ha sido demostrado para una multitud de genes (Bernier *et al.*, 1993; Krapp *et al.*, 1993; Jang y Sheen, 1994; Thomas y Rodríguez, 1994). La señal de azúcar debe ser percibida por uno o más receptores, los cuales podrían ya sea interactuar directamente con la región regulatoria del gen blanco, o bien la información podría que ser transmitida a través de una vía de transducción de señales hasta las proteínas de unión al DNA de los genes blanco.

En general se ha visto que **el agotamiento de carbohidratos:**

* Aumenta la transcripción de genes que codifican para:

- la fotosíntesis
- la degradación de moléculas de almacenamiento como almidón, lípidos y proteínas
- el metabolismo de la Sac y el manitol

* Disminuye la transcripción de genes que codifican para:

- proteínas de almacenamiento
- síntesis de almidón
- reducción y asimilación del N
- respiración
- funciones de defensa

Por el contrario, **el suministro abundante de azúcar** generalmente tiene los efectos opuestos (Koch, 1996).

En el caso de la levadura, se sabe que la represión por Glc es controlada a través de complejos generales de regulación que participan en la modulación de la estructura de la cromatina (Gancedo, 1998). Es probable que mecanismos similares controlen las respuestas a azúcar en las plantas, ya que se han identificado varios genes que participan en la regulación por azúcar que están evolutivamente relacionados con los de levadura (Rolland *et al.*, 2001). Por lo tanto, la modulación de la estructura de la cromatina puede ser un mecanismo general común del control transcripcional para las respuestas a azúcares también en otros organismos, pero este aspecto aún no ha sido estudiado en las plantas. A continuación se describe el primer nivel de regulación por azúcares estudiado en las plantas: la regulación a nivel transcripcional a través de elementos de acción en *cis* de respuesta a azúcares.

I.4.1.1 Elementos de acción en *cis* de respuesta a los azúcares.

La activación o represión coordinada de los genes que responden a azúcar, sugiere que la regulación de estos genes podría estar controlada por mecanismos comunes. Estos mecanismos incluirían la interacción entre factores de acción en *trans* (factores de transcripción o de degradación de RNA), y elementos regulatorios en *cis* (secuencias en el promotor o en el RNAm) en los genes blanco. En determinadas plantas se han propuesto algunos elementos de respuesta a azúcar presentes en varios genes que responden a este tipo de fuentes carbonadas; sin embargo, hasta ahora no se ha reportado un sólo elemento de acción en *cis* evidente que sea común entre tales genes, adicional a la participación de elementos en *cis* generales (cajas G y GATA). Esto podría ser reflejo de la naturaleza compleja de las vías de señalización de azúcares.

I.4.1.1.1 Elementos de acción en *cis* involucrados en la inducción de genes en respuesta a azúcar.

Se han identificado secuencias reguladoras de acción en *cis* necesarias para la **INDUCCIÓN** de genes por azúcar, mediante la disección funcional de algunos promotores de genes regulados por azúcar. Por ejemplo, el análisis detallado del promotor del gen de la patatina de clase I ha permitido identificar secuencias en *cis* y factores de acción en *trans* responsables de su regulación metabólica (Grierson *et al.*, 1994). Una característica común de los promotores de la patatina clase I es una región conservada de 100 pb que comprende dos elementos conservados llamados caja A y caja B. Una de las regiones responsables de la inducción por azúcar es la caja A, que a su vez contiene dos elementos conservados de 9 pb denominados “SUCrose Response Elements”: **AATAGAAA** (SURE-1) y **AATACTAAT** (SURE-2) (Grierson *et al.*, 1994). Los motivos SURE se encuentran también en las regiones promotoras de otros genes inducibles por azúcar tales como el gen que codifica para la SS de Arabidopsis, arroz y maíz (*SUS1*) y de papa (*SUS4*) (Shaw *et al.*, 1994; Fu *et al.*, 1995), el de la β -amilasa de Arabidopsis (Mita *et al.*, 1995), en el de la enzima ramificadora del almidón *SbeI* en maíz (Kim y Guiltinan, 1999) y *sbeIIb* de cebada (Nakamura, 2002), así como en el de la isoamilasa desramificadora de almidón *isol* (Sun *et al.*, 2003). Se ha visto que los motivos SURE son reconocidos de forma específica por un activador transcripcional de la familia WRKY SUSIBA2 (“SUGar Signaling in BARley”) (Sun *et al.*, 2003).

Dentro del promotor de los genes de patatina, además de la caja A que incluye los motivos SURE mencionados arriba, también se encuentra la caja B, dentro de la cual se ha identificado un motivo de 10 pb llamado sitio 1 (GCTAAACAAT) que confiere expresión específica de tubérculo e inducibilidad por Sac (Zourelidou *et al.*, 2002). Este motivo es reconocido específicamente por la proteína llamada “Storekeeper” (STK) que pertenece a una nueva clase de proteínas de unión a DNA y que se induce por azúcar. Otros promotores que contienen secuencias homólogas al sitio 1 de la caja B, o al menos altamente conservadas, incluyen a los promotores de la SS (*SUS4*), de la subunidad pequeña de la ADP-Glc pyrofosforilasa (*sAGP*), del inhibidor de proteinasa II (*PINI*), de proteínas relacionadas a patogénesis (*PR2*), y de esporamina (*gSPO*) (Zourelidou *et al.*, 2002).

Por otra parte, resulta interesante que la caja SURE-2 tiene cierta similitud con los motivos llamados SP8a (**ACTGTGTA**) y SP8b (**TACTATT**) que se encuentran en los promotores de diversos genes que responden a azúcar. Entre tales genes están el de la β -amilasa y el de la esporamina de la papa dulce, el de la enzima desramificadora de almidón *isol* (isoamilasa) en cebada, y el gen del inhibidor de proteinasa II de papa (Ishiguro y Nakamura, 1992; Ohta *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1999). El FT SPF1 es un regulador negativo que se reprime transcripcionalmente por Sac y se une

a los motivos SP8 en la papa dulce (Ishiguro y Nakamura, 1994). SPF1 representa un ortólogo de SUSIBA2, y ambos presentan un dominio de unión tipo WRKY. Se ha reportado que este tipo de dominios se unen a la caja W (tTGACc/t), misma que se encuentra en el promotor del gen α -AMY2 de trigo, cebada y avena silvestre (Rushton *et al.*, 1995).

Un elemento común en los promotores de los genes de la β -amilasa y la esporamina, es la secuencia TGGACGG, la cual se sabe que es esencial para la expresión inducible de estos genes por Sac, (Maeo *et al.*, 2001). Esta secuencia es idéntica a parte de una región que se ha denominado elemento de respuesta a la señal metabólica de carbohidratos CMSRE-1 (“carbohydrate metabolic signal-responsible element” TGGACGGCC), el cual es uno de dos elementos regulatorios en *cis* del promotor mínimo inducible por Sac de la esporamina (Morikami *et al.*, trabajo no publicado). Esta secuencia también se encuentra en los promotores de diversos genes que se inducen por altos niveles de azúcares.

Otra caja de respuesta positiva a azúcar es la caja Sac 3 (“Suc box 3”) AAAATCA-----TAA, descrita tanto en los genes de esporamina como en los de la chalcona sintasa y el del transportador de monosacáridos VvHT1 (Hattori *et al.*, 1990; Tsukaya *et al.*, 1991; Atanassova *et al.*, 2003). Resulta interesante que la presencia de esta caja junto con el motivo SURE1 en el promotor del gen *VvHT1* de uva, es necesaria para su inducción y es unida por una proteína de localización nuclear llamada VvMSA que parece ser parte de un complejo transcripcional (Cakir *et al.*, 2003).

Esta serie de evidencias indican que los genes de respuesta a azúcar presentan en sus regiones regulatorias más de una caja necesaria para tal respuesta, y algunas podrían estar en parte sobrelapadas. La presencia de secuencias similares o idénticas en las regiones regulatorias de un gen regulado por azúcar en diversas especies de plantas, revela la existencia de mecanismos de regulación por azúcar muy conservados evolutivamente. La presencia de diversos elementos de respuesta a azúcares, también evidencia la existencia de múltiples vías de señalización que pueden regular paralela- o sinérgicamente la expresión de los genes blanco. Adicionalmente, la existencia de cierto grado de similitud entre algunas de las cajas mencionadas, podría sugerir la participación de elementos en *trans* que potencialmente podrían competir o bien cooperar en la activación de los genes blanco.

1.4.1.1.2 Elementos de acción en *cis* involucrados en la represión de genes en respuesta a azúcar.

También se han identificado algunos elementos de acción en *cis* necesarios para la **REPRESIÓN** por azúcar utilizando los ensayos de “footprinting”, expresión transitoria y mutagénesis

sitio-dirigida, en el promotor del gen *RAmy3D* y *RAmy1A* de arroz (que codifican para la α -amilasa responsable de la degradación del almidón) (Toyofuku *et al.* 1998; Hwang *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1998). Estos motivos en su conjunto son llamados SRS (“sugar response sequence”), y se ha demostrado que confieren capacidad de respuesta a azúcar a un promotor mínimo (Lu *et al.*, 1998). La SRS contiene tres motivos esenciales: la caja G (CACGTG) involucrada en la respuesta a una variedad de estímulos (luz, anaerobiosis, ABA, etileno, metil jasmonato), y el motivo TATCCAT/c (también llamada AmyBOX2, Huang *et al.*, 1990). Este último contiene el motivo GATA en su secuencia antisentido, misma que se ha identificado como un elemento de respuesta a luz. Todos los genes de α -amilasa aislados de los cereales arroz, cebada y trigo, contienen al menos un elemento TATCCA o sus variantes en las posiciones -90 a -150 pb arriba del inicio de la transcripción. Como el elemento TATCCA también es un componente importante de la caja de respuesta a giberelinas (GARC, “GA Responsive Complex”) así como del SRS, la regulación de la expresión de los genes de α -amilasa podrían compartir proteínas reguladoras que se unan a este mismo elemento. Cabe resaltar que la caja G es muy similar al elemento de respuesta a ABA (ABRE, CCACGTGG) (Pla *et al.*, 1993), y que genes como el de la β -amilasa y β -faseolina que son regulados por azúcar, también son regulados por ABA (Otho *et al.*, 1992; Bustos *et al.*, 1998).

Se ha planteado que la combinación de los motivos G y GATA (también llamado -I) podrían servir como determinantes autónomos mínimos que integran las señales de luz y desarrollo, y modulan la actividad del promotor (Puente *et al.*, 1996). También es interesante que el factor TSF-1 (“tuber-specific and sucrose-inducible factor-1”) de papa, se une al menos a dos sitios de unión en el promotor de la patatina clase I, las cajas C y M, las cuales son altamente homólogas a los elementos de respuesta a luz (sitios de unión GT-1) de los genes *rbcS3-A* (Kim *et al.*, 1994). Dada la estrecha relación entre las cajas de respuesta a azúcar y luz (Thum *et al.*, 2004), quizá no es coincidencia que la expresión de la mayor parte de los genes de fotosíntesis es regulada por carbohidratos metabolizables y por la luz. Probablemente, el nivel celular de los carbohidratos, producto final de la fotosíntesis, sea parte de la señal activadora involucrada en la regulación por luz.

Otro elemento de regulación negativa por azúcar es el motivo AmyBOX1 (TAACAAA), el cual también está conservado en los promotores de los genes de la α -amilasa de arroz, trigo y cebada (Huang *et al.*, 1990). También el análisis de los promotores de genes que codifican enzimas del ciclo del glioxilato (malato sintasa (*ms*) e isocitrato liasa (*icl*)) en pepino, ha permitido identificar a la secuencia IMH2 (AAa/cCCCAc/aCCT) como un elemento putativo de respuesta negativa a carbohidratos (Sarah *et al.*, 1996; De Bellis *et al.*, 1997).

Resulta interesante que la expresión de los genes de la α -amilasa no sólo se reprime en respuesta a azúcar, sino que también se induce fuertemente cuando se elimina la misma (inanición de

azúcar) (Sheu *et al.*, 1996; Chan y Yu, 1998a, 1998b). Esto ha llevado a plantear que elementos como el motivo TATCCA son los responsables de responder a señales tanto de presencia como de ausencia de azúcar, pudiendo coordinar las respuestas de los genes blanco (Ho *et al.*, 2001).

En conjunto, estas evidencias demuestran que los genes que responden a azúcares pueden presentar en sus regiones regulatorias más de una caja necesaria para tal respuesta, o incluso utilizar la misma caja para responder a la presencia o ausencia de la señal de azúcar. La presencia de cajas tanto de inducción como de represión por azúcares en un mismo promotor también está ejemplificada en el promotor del gen *VvHT1* que codifica para un transportador de hexosas, el cual contiene en la región proximal 2 cajas de activación por azúcar (SURE1 y Suc box-3), y en la región distal 2 cajas de represión por azúcar (AmyBOX2). Los análisis de GUS bajo dicho promotor sugieren que existe un efecto de compensación mutuo entre la fuerza de las cajas de inducción y represión (Atanassova *et al.*, 2003). De esta manera se integran las señales mediadas por más de una vía señalización, para así regular la expresión de los genes blanco. Este tipo de regulación explicaría las respuestas aparentemente contradictorias de diversos genes ante la presencia de azúcares, en donde la participación de elementos de acción en *trans* específicos de cada vía activada, podrían competir y determinar la expresión de los genes blanco.

I.4.2 Regulación postranscripcional

I.4.2.1 Estabilidad del RNAm.

La mayoría de los estudios sobre la regulación de la expresión génica regulada por azúcares han enfatizado la regulación a nivel transcripcional. Sin embargo, cada vez son más las evidencias de que los azúcares también pueden actuar a nivel postranscripcional. Se ha visto que la represión por azúcar del gen de la α -amilasa depende tanto de mecanismos transcripcionales como de la estabilidad del transcrito (Sheu *et al.*, 1994, 1996). Chan y Yu (1998a, b) demostraron que la estabilidad del RNAm de la α -amilasa de arroz, y en consecuencia su abundancia, es reducida por la señal de Glc a través de una secuencia conservada de 9 nucleótidos rica en AU en la región 3' no traducida del RNAm de dicho gen. La Glc también afecta negativamente la estabilidad del RNAm del gen *RAB16A*, un gen que se induce por ABA y cuyo mensajero se acumula en etapas tardías de la embriogénesis (Toyofuku *et al.*, 2000). A diferencia del efecto negativo que tiene el azúcar en la estabilidad de los genes mencionados anteriormente, el azúcar puede aumentar la estabilidad de los transcritos de otro grupo de genes como son la ADH2 (alcohol deshidrogenasa 2), la G3PD (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), y la SPS2 (Sac fosfato sintasa 2) de arroz (Ho *et al.*, 2001).

Por lo tanto, los azúcares también pueden actuar tanto positiva como negativamente sobre los RNAm de ciertos genes, estabilizando o desestabilizando su transcrito de acuerdo a la señal detectada.

I.4.2.2 Iniciación de la traducción.

La traducción de los transcritos individuales puede ser afectada por la represión global de la síntesis de proteínas, el programa de desarrollo o cambios en la fisiología celular (p. e. los niveles de azúcares). Este nivel de regulación puede interpretar cambios complejos y dinámicos en la célula a través de la fosforilación, hiperfosforilación o unión de proteínas que bloquean o estabilizan los complejos de inicio de la traducción; modulando así la síntesis proteica (Kawaguchi y Baley-Serres; 2002).

La regulación de la iniciación de la traducción puede contribuir significativamente al nivel de expresión de un gen. Los RNAm que son traducidos eficientemente reclutan activamente factores de iniciación, manteniendo las interacciones entre los extremos 5' y 3' del RNAm, así como la búsqueda y/o reconocimiento del codón de inicio por parte del ribosoma. Se ha visto que la presencia de marcos de lectura abiertos corriente arriba ("uORF") en los RNAm puede inhibir o favorecer su traducción (Kawaguchi y Bailey-Serres, 2002). Ahora se sabe que los azúcares también regulan la expresión génica a este nivel. Por ejemplo, se ha reportado que la Sac (y no las hexosas) puede reprimir la traducción del RNAm del FT tipo bZIP ATB2. Tal efecto está mediado por la región 5' no traducida del mensajero, donde se localizan cuatro "uORFs" necesarios para la represión por Sac (Rook *et al.*, 1998). Se postula que la naturaleza inhibitoria de los "uORFs" podría deberse a la síntesis de un polipéptido pequeño codificado por un "uORF", el cual bloquea localmente la reiniciación de la traducción bajo ciertas condiciones. Otros genes bZIP de *Arabidopsis* y de otras plantas contienen también un "uORF" en su UTR 5', el cual es esencial para la represión de la traducción inducida por Sac (Wiese *et al.*, 2003). Otro ejemplo interesante es el procesamiento y traducción diferenciales en respuesta a azúcar del RNAm de la Ivr de pared celular de maíz (*Incw1*), en el cual la región responsable de este tipo de control se localiza en la región 3' no traducida (Cheng *et al.*, 1999).

Con base en estas evidencias, se puede decir que los azúcares son capaces de regular la traducción de los RNAs mensajeros tanto positiva como negativamente, y esta regulación es llevada a cabo a través de mecanismos quizá diferentes que actúan ya sea en las regiones 5' o 3' no traducidas de los transcritos.

I.4.3 Regulación postraduccional.

I.4.3.1 Participación de las proteínas tipo SnRK.

Las SnRKs son una familia amplia de proteínas cinasas de las plantas con un dominio catalítico similar al de la proteína Snf1 (“Sucrose non-fermenting-1”) de levadura y al de la proteína AMPK (“AMP-activated protein kinase”) de animales.

La proteína Snf1 es un componente primordial en la señalización de azúcares en la levadura, donde ha sido ampliamente estudiada. La Snf1 es una serina/treonina cinasa que se activa en respuesta a bajos niveles celulares de Glc, y es necesaria en condiciones de inanición para la desrepresión de un gran número de genes que se reprimen por Glc. Dicha proteína fosforila al represor transcripcional Mig1 causando su traslocación al citoplasma y con ello, la desrepresión de sus genes blanco (Carlson, 1999). Además, la Snf1 afecta directamente la maquinaria de transcripción mediante interacciones con parte del complejo de la RNA polimerasa II (Kuchin et al., 2000) y a través de la fosforilación de algunas histonas (Lo et al., 2001). La propia Snf1 es activada por fosforilación y en presencia de altos niveles de Glc, la fosfatasa Glc7 la desfosforila e inactiva induciendo un cambio conformacional autoinhibitorio en el complejo que lleva su nombre (Snf1).

A pesar de que la Snf1 no es activada por AMP, pertenece a una familia conservada de proteínas cinasas activadas por AMP, las AMPKs. En los mamíferos, estas cinasas participan en la protección contra estreses ambientales y nutricionales a través de la señalización de variaciones celulares en la proporción de AMP/ATP (Hardie et al., 1997; Hardie et al., 1998; Kemp et al., 1999). La activación de las AMPKs por AMP es antagonizada por altas concentraciones de ATP, de tal manera que una relación alta de AMP/ATP es síntoma de niveles bajos de energía. Cuando la AMPK es activada, puede actuar para conservar la poza de ATP mediante la fosforilación e inactivación de enzimas consumidoras de ATP de las vías anabólicas. De manera similar, la Snf1 asegura una síntesis suficiente de ATP en la levadura en ausencia de Glc, mediante la desrepresión de genes que participan en la utilización metabólica de fuentes carbonadas alternativas.

En las plantas, las SnRKs parecen tener diversas funciones y están divididas en 3 grupos de acuerdo al grado de similitud entre sus secuencias (Halford y Hardie, 1998). Varias de ellas (todas las de la clase 1) complementan el fenotipo de la mutante de levadura *snf1* (Alderson et al., 1991; Muranaka et al., 1994; Bhalerao et al., 1999). Las SnRKs pertenecientes a los otros 2 grupos (clase 2 y clase 3) parecen ser específicas de las plantas y prácticamente no han sido estudiadas (Halford et al., 2003). Se ha propuesto que las SnRKs actúan como reguladores globales del metabolismo del C en las

plantas mediante la fosforilación e inactivación de proteínas biosintéticas claves como la 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA reductasa (HMGR), la nitrato reductasa (NR), la SS y la Sac fosfato sintasa (SPS) (Sugden *et al.*, 1999; Bhalerao *et al.*, 1999). Además se sabe que la expresión de una SnRK en antisentido en plantas de papa impide la activación de la SS por Sac, por lo que se ha sugerido que las SnRKs participan también en la regulación de la expresión génica (Purcell *et al.*, 1998; Halford *et al.*, 2003).

Las SnRKs son reguladas por múltiples factores. Por ejemplo, se ha demostrado que dos SnRKs (AKIN10 y AKIN11) interactúan y son inhibidas por una proteína nuclear llamada PRL1, y dicha interacción es regulada negativamente por Glc en el sistema de levadura. Sin embargo, la mutante de *Arabidopsis prll* presenta un fenotipo hipersensible a azúcar, y aunque no parece tener afectada la actividad de la SnRK, si altera la represión de diversos genes regulados por azúcares (Nemeth *et al.*, 1998; Bhalerao *et al.*, 1999). La evidencia de que algunas SnRKs son activadas por azúcar y que participan en la expresión de genes activados por azúcar, implica una regulación opuesta a las AMPKs de mamíferos y a la Snf1 de levadura. Sin embargo, la Glc-6 fosfato parece actuar como un regulador negativo de la actividad de la SnRK (Toroser *et al.*, 2000), y también el AMP parece inhibir la desfosforilación y la consecuente inactivación de la SnRK (Sugden *et al.*, 1999). Esto ha llevado a plantear que las SnRKs se activan en respuesta a niveles altos de Sac intracelular y/o niveles bajos de Glc intracelular (Halford *et al.*, 2003).

Las SnRKs de las plantas tienen diferencias importantes con las de levadura. Por ejemplo, el hecho de que la SnRK NPK5 de tabaco esté constitutivamente activa en la levadura (Muranaka *et al.*, 1994), resalta la regulación diferencial en la actividad de las SnRKs existentes en las plantas. Estas diferencias se ven aumentadas considerando que diversas SnRKs de *Arabidopsis*, trigo, cebada, maíz y arroz pertenecientes a familias diferentes, se regulan por luz, temperatura, citocininas, ABA y desarrollo, adicionalmente a la regulación por los azúcares (Takano *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 1999; Ohba *et al.*, 2000; Chikano *et al.*, 2001; Gómez-Cárdenas *et al.*, 2001). Más aún, también pueden haber diferencias en relación a las interacciones de las SnRKs con otras proteínas reguladoras, pues tanto en la levadura como en los mamíferos funcionan en complejos heterotriméricos, mientras que en las plantas parecen haber variantes heterodiméricas (Jiang y Carlson, 1996; 1997; Vincent y Carlson, 1999; Bouly *et al.*, 1999; Kleinow *et al.*, 2000; Ferrando *et al.*, 2001; Lumbreras *et al.*, 2001).

La naturaleza exacta de la activación de las SnRKs en respuesta a azúcares aún no es clara; sin embargo, la identificación de substratos del metabolismo y distribución del C y del N las ubica en un lugar central en dichos procesos. De hecho Halford *et al.* (1999) proponen que las SnRKs son

reguladores globales del metabolismo del C en las plantas, participando en la detección y distribución de azúcares. Incluso estas PKs podrían integrar la señalización de citocininas, luz, Glc y brasinoesteroides (Salchert *et al.*, 1998).

1.4.3.2 Participación de las proteínas 14-3-3.

Las proteínas 14-3-3 están altamente conservadas en la evolución y participan en una amplia variedad de funciones regulando la actividad de una gran variedad de enzimas, su localización subcelular, y sus interacciones proteína-proteína. En el caso de las plantas, estas funciones incluyen el control del crecimiento y desarrollo, respuestas a estrés ambiental, regulación del metabolismo primario, así como su participación en la transducción de señales mediada por cinasas. En concordancia con tal variedad de funciones, las proteínas 14-3-3 se encuentran en casi todos los compartimentos celulares: en el citoplasma, en el núcleo, en la matriz y el estroma mitocondriales, así como en las membranas tilacoideas del cloroplasto (Comparot *et al.*, 2003).

Cada vez más evidencias apoyan el hecho de que muchas enzimas metabólicas están controladas por la unión específica de proteínas 14-3-3 a substratos fosforilados, aunque también se han reportado interacciones con substratos no fosforilados (Sehnke *et al.*; 2002). Las proteínas 14-3-3 regulan a proteínas de membrana como la H⁺ATPasa y canales de salida de K. La unión de proteínas 14-3-3 al dominio autoinhibitorio de la H⁺ATPasa resulta en una alta actividad de bombeo de protones (Jahn *et al.*, 1997). De forma similar, la presencia de proteínas 14-3-3 es capaz de aumentar la actividad de canales de K⁺ (Booij *et al.*, 1999). El gradiente electroquímico generado por la H⁺ATPasa contribuye en muchos procesos metabólicos, entre los cuales está la toma de nitrato a través de la membrana de las células de la raíz. En este proceso de asimilación de N la nitrato reductasa (NR) tiene un papel fundamental. Esta enzima es finamente regulada por señales como el nitrato y la Sac, y es inactivada por fosforilación y la consecuente unión de una o más proteínas 14-3-3 durante la transición de luz a obscuridad (Bachmann *et al.*, 1996; Lillo *et al.*, 1997). La unión de la 14-3-3 a la NR la marca como blanco de degradación (Weiner y Kaiser, 1999). La actividad de otra enzima fundamental para la movilización del N, la glutamino sintetasa tanto citosólica como cloroplástica (GS1 y GS2 respectivamente), es altamente activa sólo cuando está fosforilada y unida a las 14-3-3s (Moorhead *et al.*, 1999; Finnemann y Schjoerring, 2000; Reidel *et al.*, 2001).

También las enzimas del metabolismo primario del C están reguladas por las proteínas 14-3-3. Por ejemplo, la actividad de la SPS es inhibida por su interacción con 14-3-3s (Toroser *et al.*, 1998). Así como estas, se han reportado una gran variedad de proteínas que interactúan con las proteínas 14-3-3 y a continuación se enumeran: SS, HMGR (3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A reductasa),

trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS), sintasas de almidón (de la familia III), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fosfenol piruvato carboxilasa cinasa (PEPCK), glutamil-tRNA sintasa, y ATP sintasas citosólicas, cloroplásticas y mitocondriales (MacKintosh, 1998; Moorhead *et al.*, 1999; Roberts, 2000; Sugden *et al.*, 1999; Cotelle *et al.*, 2000; Bunney *et al.*, 2001; Sehnke *et al.*, 2001).

Tal como sucede con las SnRKs, la regulación de enzimas clave del metabolismo del C y del N por las proteínas 14-3-3, sugiere un mecanismo de regulación común mediado por las 14-3-3 para el transporte, uso y generación de metabolitos en plantas incluyendo azúcares y aminoácidos, optimizando así el uso de los recursos disponibles.

Recientemente se ha encontrado que las proteínas 14-3-3 regulan de manera global el corte de sus blancos de unión en células de *Arabidopsis* privadas de azúcar. La privación de azúcar es parte del estilo de vida normal de las plantas, pues la provisión de azúcares generadas por la fotosíntesis no es continua y se detiene parcial o totalmente en la obscuridad, durante el invierno o bajo la sombra. En ausencia de azúcar, las proteínas 14-3-3 parecen regular la proteólisis de las proteínas a las que se unen. Aparentemente la pérdida de protección de las proteínas blanco por parte de las 14-3-3 trae como consecuencia su proteólisis, resultando en un cambio metabólico global que reduce la asimilación de N y estimula la síntesis de Sac (Cotelle *et al.*, 2000). De hecho la unión de las 14-3-3 a sus blancos tales como la NR o SPS se pierde en respuesta a la privación de azúcares o a la provisión de análogos de Glc no metabolizables, lo que resulta en la proteólisis de las proteínas blanco. Esto sugiere que las 14-3-3 deben participar en una vía de detección de nutrientes, controlando así la estabilidad de muchos de sus blancos. Adicionalmente se ha visto que las plantas de papa que sobreexpresan proteínas 14-3-3s presentan retardo en el proceso de senescencia, por lo que permanecen fotosintéticamente activas por más tiempo, mientras que la expresión en antisentido resulta en fenotipos opuestos (Wilczynski *et al.*, 1998).

Las proteínas 14-3-3 además de regular directamente el metabolismo mediante la activación/inactivación de enzimas, también interactúan con componentes de las vías de señalización celulares. Ejemplo de ello es la interacción de 14-3-3s con proteínas cinasas tales como la PKC, una CDPK (proteína cinasa dependiente de calcio) y la proteína cinasa tipo Snf1 WPK4 (Robinson *et al.*, 1995; Camoni *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 2000). Cabe resaltar que la cinasa CTR1 que participa en la señalización de etileno y azúcar (Zhou *et al.*, 1998) también interactúa con este tipo de proteínas (Roberts MR, 2000; MacKintosh y Meek, 2001).

Las proteínas 14-3-3 también se encuentran en el núcleo, a pesar de que no presentan señales reconocibles de localización nuclear (Bihn *et al.*, 1997). De hecho se han descrito interacciones con la maquinaria transcripcional (Lu *et al.*, 1992) y con complejos de factores transcripcionales como el

complejo de unión a la caja G. Tal caja se encuentra en los promotores de genes que codifican enzimas metabólicas como los genes *ADHI*, *CHS*, *CabE* y *RbcS*, e inclusive en los promotores de los genes de las propias 14-3-3. Además, otras proteínas que median la expresión génica inducida por la hormona ABA (ácido abscísico) tales como VPI y EmBPI también interactúan con proteínas 14-3-3 en el núcleo (Schultz *et al.*, 1998). Cabe resaltar que la hormona ABA es indispensable para la señalización de azúcares en *Arabidopsis* (este trabajo en Arenas *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000). De igual manera el activador transcripcional tipo bZIP RSG interactúa con 14-3-3, regulando así las cantidades de giberelinas (GAs, hormona vegetal) a través del control de la expresión de enzimas de la biosíntesis de GAs. El panorama en este sentido es que las proteínas 14-3-3 controlan la localización nuclear de factores de transcripción, restringiendo así su actividad a un número limitado de células durante el desarrollo y en tiempos restringidos.

Dependiendo de los requerimientos durante el desarrollo y dependiendo de las señales ambientales, la actividad de las 14-3-3 podría dirigir el C ya sea hacia la síntesis de Sac y carbohidratos de almacenamiento, o bien, desviar los esqueletos carbonados hacia la síntesis de aminoácidos a través de inactivar el metabolismo del C y activar la asimilación del N. Las plantas podrían usar las diversas posibles combinaciones de homo- o heterodímeros de 14-3-3, para la regulación fina del metabolismo en respuesta a los cambios ambientales y las demandas internas.

1.4.3.3 Papel de la maquinaria de degradación de proteínas mediada por ubiquitina en las respuestas a azúcar.

Hasta hace 5 años, la proteólisis mediada por ubiquitina en plantas era un tema muy innovador. Sin embargo, investigaciones recientes particularmente sobre las hormonas vegetales, han descubierto su importancia creciente mediando los pasos regulatorios más importantes de las vías de transducción de señales; por lo que es de esperarse que la proteólisis mediada por ubiquitina podría ser uno de los componentes más importantes en la percepción y señalización de azúcares en las células vegetales.

El sistema ubiquitina/proteasoma 26S es considerado como la mayor vía proteolítica no lisosomal para la eliminación de proteínas intracelulares en las células eucariontes. La proteólisis mediada por ubiquitina ha surgido como un proceso tan importante como la fosforilación en términos de su participación en diversos eventos celulares como la progresión del ciclo celular, la endocitosis, la regulación hormonal, la dirección de proteínas, la regulación de factores transcripcionales y la desensibilización de receptores. Las proteínas blanco son marcadas para degradación en el proteasoma 26S mediante la adición covalente de una señal de degradación, la cual consiste en una cadena de poliubiquitina. Este proceso consta esencialmente de tres pasos catalizados por las enzimas E1

(activadora), E2 (conjugadora) y E3 (ligasa). La ubiquitilación se debe dirigir hacia blancos específicos, y la enzima E3 es la que media este paso específico y crítico de reconocimiento de substratos. En consecuencia, el número de proteínas tipo E3 debe ser mucho mayor al de las E2 y a su vez al de E1. Este hecho se refleja en los cientos de enzimas E3 de diversas clases codificadas en los genomas eucariontes secuenciados hasta el momento. Comparada con *S. cerevisiae*, *C. elegans* y *Drosophila*, *Arabidopsis* contiene una sobre-representación de ligasas de ubiquitina (E3), mismas que pueden ser un sólo polipéptido, o bien existir como complejos multiproteicos (Bachmair, *et al.*, 2001) (Fig. 1A).

Uno de los complejos de ligasas de ubiquitina más estudiados es el SCF (por Skp1, Culina/Cdc53 y una proteína con caja F). Estos complejos multiméricos están formados por al menos cuatro subunidades que incluyen siempre a un miembro de la familia de las culinas (Jackson, *et al.*, 2000). En conjunto con otra subunidad conocida como RBX1/ROC1/HRT1, la culina cataliza la formación de la cadena de poliubiquitina mediante la interacción con la E2. La culina también se une a un miembro de la familia de proteínas Skp1, la cual a su vez se une a una proteína con caja F. Las proteínas con caja F son las encargadas de seleccionar y unir a las proteínas blanco específicas haciéndolas accesibles al complejo E2-SCF (Fig.1B) (Jakson *et al.*, 2000).

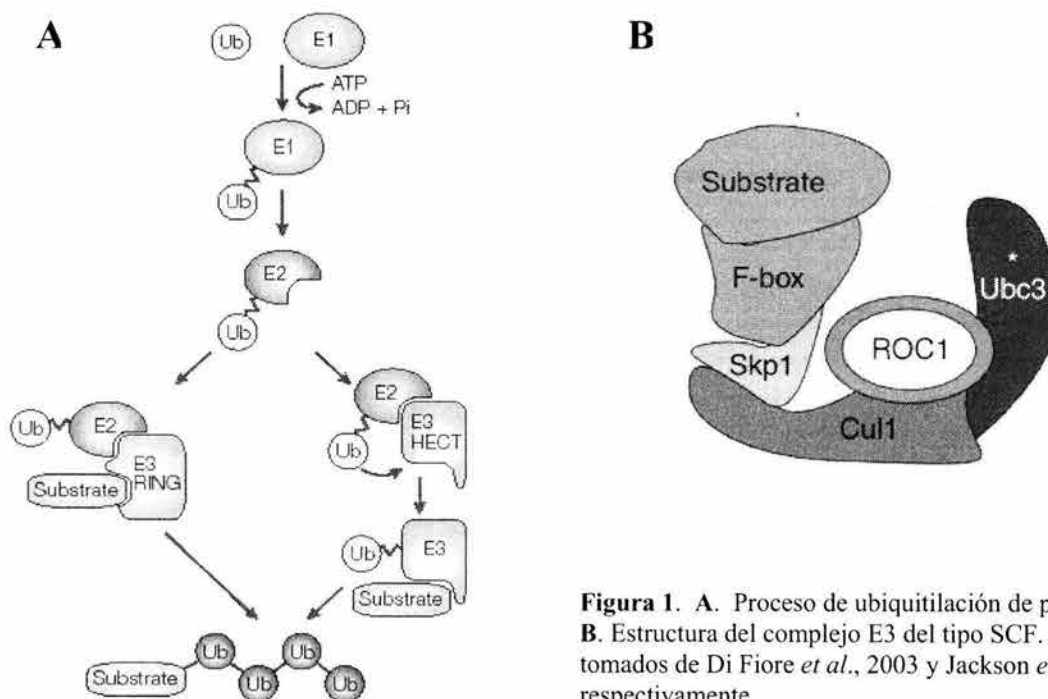


Figura 1. A. Proceso de ubiquitilación de proteínas. B. Estructura del complejo E3 del tipo SCF. Esquemas tomados de Di Fiore *et al.*, 2003 y Jackson *et al.*, 2000 respectivamente.

En levadura, la proteólisis mediada por ubiquitina es un sistema esencial para el control de la progresión del ciclo celular y la desrepresión de genes que codifican para transportadores de Glc (Hoyt MA, 1997). La detección de Glc en levadura requiere de la proteína Skp1 y la proteína con caja F Grr1.

La presencia de Glc aumenta la asociación de Skp1 a Grr1, la cual inhibe al represor Rgt1 posiblemente reclutándolo para degradación, permitiendo así la expresión de los transportadores de Glc (Li y Johnston, 1997; Bernard y Andre, 2001). Se ha propuesto que las contrapartes correspondientes a este sistema de regulación por Glc de levadura, puedan funcionar de manera análoga en las plantas (Schouten *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis* se ha demostrado que existen interacciones muy complejas de las cinasas tipo SnRK AKIN10 y AKIN11 con SKP1/ASK1 (subunidad de la ubiquitina ligasa tipo SCF), y con una subunidad del proteasoma 26S (a4/PAD1); lo cual revela otro aspecto de la función de las SnRKs en la degradación de proteínas (Farras *et al.*, 2001; Bhalerao *et al.*, 1999; Nemeth *et al.*, 1998). Se ha observado recientemente que la interacción de las SnRKs con ASK1/SKP1 y la subunidad proteasomal a4/PAD1 es inhibida por PRL, proteína nuclear cuya mutación afecta la regulación de genes por azúcar y la sensibilidad a múltiples fitohormonas. Además se sabe que PRL1 interactúa con PAM1, una metilasa de histonas localizada en un complejo nuclear que incluye SnRKs *in vivo*. Toda esta red de interacciones PRL1-SnRK, incluyendo a los complejos PAM1 y SCF-proteasoma, sugiere que todas estas proteínas participan en la regulación de múltiples señales y modulan la metilación, fosforilación y ubiquitilación de sustratos proteicos nucleares (Koncz *et al.* 2003), los cuales determinan parte la respuesta final de la planta ante un o más estímulos, entre ellos quizá el de las señales de azúcares.

Con base en estas evidencias, resulta inminente la participación del sistema de degradación de proteínas mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma, en la regulación de las respuestas a azúcares. De hecho, muy recientemente se reportó que el FT que regula la señalización de etileno EIN3, también es degradado por el proteasoma 26S y esta degradación es acelerada por la presencia de Glc (Yanagisawa *et al.*, 2003). Este y otro elemento de la señalización de azúcares y ABA identificado en este trabajo de tesis, son regulados por este mecanismo. Este punto será abordado más adelante.

1.5 Vías de transducción de señales de azúcares en las plantas.

1.5.1 Mecanismos múltiples de detección de azúcares en las plantas.

La detección y regulación de azúcares en las plantas es necesariamente más compleja que en los organismos unicelulares como la levadura, debido a las interacciones entre los diferentes órganos y tejidos vegetales. Además, la función dual de los azúcares como nutriente y como señal, hace más complicado el análisis de los mecanismos utilizados. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que a nivel celular se puedan utilizar algunos de los elementos de detección y señalización de azúcares similares a los de microorganismos como la levadura. De manera reciente, se ha comenzado a abordar el

tema de la señalización activada por azúcares en las plantas superiores, y diversas evidencias sugieren que las plantas tienen por lo menos 4 sistemas de percepción de azúcares diferentes (Figura 2A) que a continuación se describen.

1.5.1.1 Sistema de percepción mediado por hexocinasa.

Se ha propuesto que el flujo de la Glc a través del paso catalizado por la hexocinasa (HXK), constituye un mecanismo primario de detección de azúcar en organismos como *E. coli*, las levaduras y los mamíferos (Stulke y Hillen, 1999; Gancedo, 1998; Matchinsky *et al.*, 1993; Rolland *et al.*, 2001). También en las plantas se ha dilucidado la participación de la HXK en la detección de Glc mediante dos estrategias diferentes. La primera es el uso de análogos de Glc que son sustratos para la HXK pero no son metabolizados, como la 2DG y la manosa, los cuales son capaces de regular la expresión de genes fotosintéticos, del ciclo del glioxilato y otros. Estos análogos reprimen la expresión de genes regulados por azúcar, mientras que la L-Glc, la 6-deoxi-Glc (6DG) y la 3-oximetil-Glc (3OMG) (que son transportados pero no fosforilados) no tienen tales efectos (Sheen, 1990; Graham *et al.*, 1994; Jang y Sheen, 1994). El efecto de represión puede ser revertido con la adición de inhibidores de la actividad de la HXK como la manoheptulosa y la glucosamina (Jang y Sheen, 1994; Perata *et al.*, 1997; Umemura *et al.*, 1998; Pego *et al.*, 1999). La introducción (por electroporación de protoplastos de maíz) de intermediarios glicolíticos, incluyendo azúcares fosforilados como la Glc-6-fosfato (G6P) y otros metabolitos glicolíticos, no son capaces de activar la represión; lo que indica que la fosforilación de la Glc pero no el azúcar fosforilado, representa una señal para la célula (Jang y Sheen, 1994). Además del efecto a nivel de expresión génica, a nivel fenotípico se ha observado que la manosa y la 2DG inhiben la germinación de las semillas de *Arabidopsis*, y la adición del inhibidor de HXK manoheptulosa bloquea la inhibición de la germinación; lo que sugiere que este proceso está mediado por la HXK (Pego *et al.*, 1999).

Los resultados anteriormente mencionados son congruentes con la idea de que la hexocinasa tiene una función reguladora además de su función catalítica. Esta idea ha sido confirmada mediante una segunda estrategia, el uso de plantas transgénicas con niveles alterados de HXK (Jang *et al.*, 1997; Dai *et al.*, 1999). Plantas transgénicas de *Arabidopsis* con niveles aumentados o disminuidos de HXK, muestran un fenotipo de hiper- o hiposensibilidad a altas concentraciones de Glc respectivamente, durante la germinación y el desarrollo temprano de la planta (Jang *et al.*, 1997). También la sobreexpresión de AtHXK1 en plantas transgénicas de jitomate afecta la fotosíntesis, el crecimiento y la senescencia, y provoca un fenotipo hipersensible a Glc (Dai *et al.*, 1999). Estos fenotipos son similares a los observados en plantas transgénicas de tabaco que expresan la Ivr de levadura, aumentando así las

señales de Glc y Frc (Figura 2). Se ha observado que tanto el jitomate como el tabaco son más sensibles que *Arabidopsis* a la muerte celular y senescencia inducida por hexosas, lo que sugiere que la función de la HXK está conservada en las plantas, pero la sensibilidad al azúcar es diferente entre especies (Dai., 1999). A pesar de que el papel de la HXK como sensor de hexosas en plantas aún no es bien aceptado (Herbers *et al.*, 1996; Ehness *et al.*, 1997; Halford *et al.*, 1999; Veramendi *et al.*, 1999), la separación funcional de la actividad enzimática y señalizadora ha sido posible tanto en levadura como en *Arabidopsis* (Hhomann *et al.*, 1999; Kraakman *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2003). En el caso de *Arabidopsis*, el aislamiento y análisis de la primera mutante en HXK1 de esta planta, *gin2*, la cual no presenta represión del desarrollo por Glc sin afectar la función catalítica de la enzima ni el metabolismo del azúcar, permitió demostrar contundentemente que se puede desacoplar la señalización y el metabolismo de la Glc (Moore *et al.*, 2003).

La función de detección y señalización de la HXK depende de su localización subcelular, translocación y de las interacciones con otras proteínas. Por ejemplo, en el caso de la levadura, la Hxk2 interactúa con el complejo de fosfatasa que regula a la cinasa Snf1, estimulando así la represión por Glc (Alms *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000). La misma Hxk2 también se encuentra en el núcleo, donde forma parte de un complejo DNA-proteína que se une a elementos en *cis* de genes reprimidos por Glc (Herrero *et al.*, 1998; Randez-Gil *et al.*, 1998). En el caso de mamíferos, se sabe que la actividad de la HXK es regulada por interacciones con otras proteínas que aseguran su función y localización celular. De hecho la HXK1 de mamíferos está unida a la membrana mitocondrial externa, lo cual permite un acceso directo al ATP generado por la fosforilación oxidativa (Adams *et al.*, 1991; BeltrandelRio y Wilson, 1992a, b). Inclusive, en células pancreáticas β y hepatocitos, las proteínas de interacción con la HXKIV (glucocinasa) controlan su actividad y translocación núcleo-citoplasma de forma regulada por azúcar (Toyoda *et al.*, 1994; Van Schaftingen *et al.*, 1994; Farrelly *et al.*, 1999; Muñoz-Alonso *et al.*, 2000; Shiraishi *et al.*, 2001). Se ha visto que esta misma HXKIV está asociada con el citoesqueleto de actina y dependiendo de las condiciones fisiológicas se puede mover hacia el núcleo y modificar la expresión de genes (Murata *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 1998). En las plantas, por mucho tiempo se ha considerado a la HXK como una enzima citosólica esencial para la glicólisis. Sin embargo se han encontrado formas no citosólicas de la HXK asociadas con diversos compartimentos subcelulares tales como los plástidos (Wiese *et al.*, 1999a, b), la mitocondria (Galina *et al.*, 1995, 1999; Rolland *et al.*, 2002), el aparato de Golgi (Galina y da-Silva, 2000; da-Silva *et al.*, 2001), y la vía secretoria (Herbers *et al.*, 1996). Aunque se han propuesto posibles funciones bioquímicas y señalizadoras de estas HXKs asociadas a dichos tipos membranales, aún se desconoce la relevancia fisiológica de tales asociaciones.

En analogía a la HXK como un sensor de Glc, no se sabe si la fructocinasa, la enzima que fosforila a la Frc, media las respuestas a azúcar en las plantas de forma similar a la HXK. En *Arabidopsis*, la actividad de fosforilación de hexosas es mayor hacia Frc que hacia Glc (Loreti *et al.*, 2001). Además, las fructocinasas son particularmente más activas, mientras que las HXKs además de tener menor afinidad por la Frc, están presentes a niveles relativamente bajos (Loreti *et al.*, 2001). De esta manera, la proporción de glucosa vs. Frc puede influenciar el proceso de detección de azúcar global. Cabe destacar que una mutante de *Arabidopsis* insensible a manosa, hexosa fosforilada por la HXK, (*mig*, “mannose-insensitive germination”) resultó ser una mutante en fructocinasa, sugiriendo que las fructocinasas podrían participar en la detección de hexosas (Pego y Smeekeens, 2000). Sin embargo las fructocinasas normalmente no pueden fosforilar a la manosa (Gonzali *et al.*; 2001), por lo que aún no se sabe con certeza si la mutación es la responsable del fenotipo de insensibilidad a manosa o si la fructocinasa tiene un papel regulador más que catalítico sobre la hexocinasa. Además, Granot *et al.*, 2000 han observado que modulando la actividad de la fructocinasa de jitomate se afecta su crecimiento y desarrollo, pero no se afecta el mecanismo de detección de azúcares; esto sugiere que al menos en esta planta la fructocinasa quizá no participa en la detección de azúcares. Es importante resaltar que hasta ahora no se han identificado transportadores de Frc en *Arabidopsis* (Sherson *et al.*, 2003); sin embargo, tanto el transporte como la detección específica de Frc le daría a la célula la ventaja de distinguir entre la hexosas derivadas de la Sac, y las derivadas de la pared celular o la calosa; y así responder de forma específica a las señales ambientales.

1.5.1.2 Sistema dependiente del metabolismo de hexosas.

La existencia de esta vía también llamada “dependiente de la glicólisis”, está basada en la regulación que ejercen diversos intermediarios de la glicólisis (como la Glc-6-fosfato) y metabolitos derivados (como el piruvato y el acetato) sobre la expresión de diversos genes (p.e. *PR1*, *PR5*, α *Amy8*) y sobre la actividad de una serie de enzimas (p.e. SnRKs) (Sheen 1990; Koch, 1996; Koch *et al.*, 2000, Toroser *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2001). Se ha planteado que dichos intermediarios metabólicos podrían activar sensores metabólicos (aún no identificados) que desencadenarían la respuesta. En plantas que sobreexpresan a la HXK tanto de *Arabidopsis* como de levadura se observa una desrepresión de los genes *PR* (Xiao *et al.*, 2000). Tomando en cuenta que la HXK de levadura no parece tener ningún papel como sensor en plantas (Jang *et al.*, 1997), se ha sugerido que este tipo de regulación depende de la actividad catalítica de la HXK, pero no de su actividad señalizadora (Figura 2A y B).

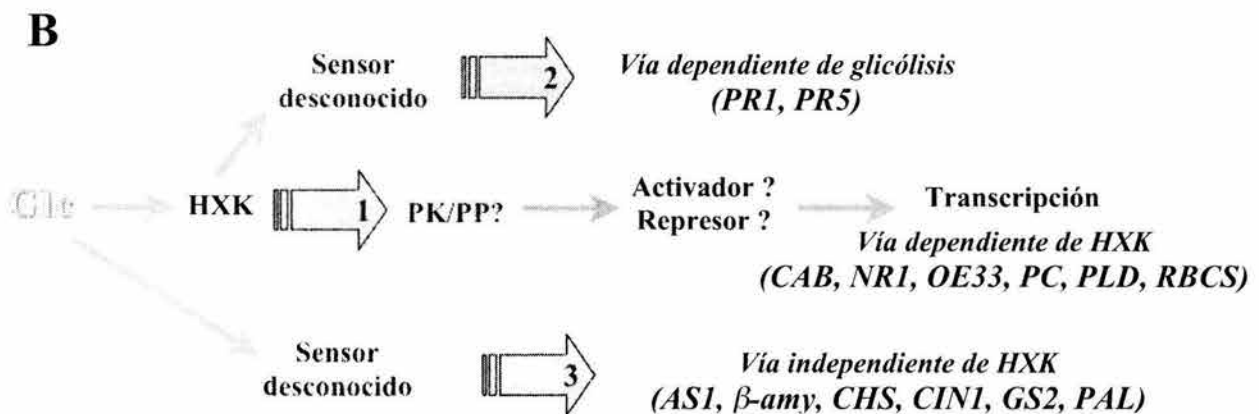
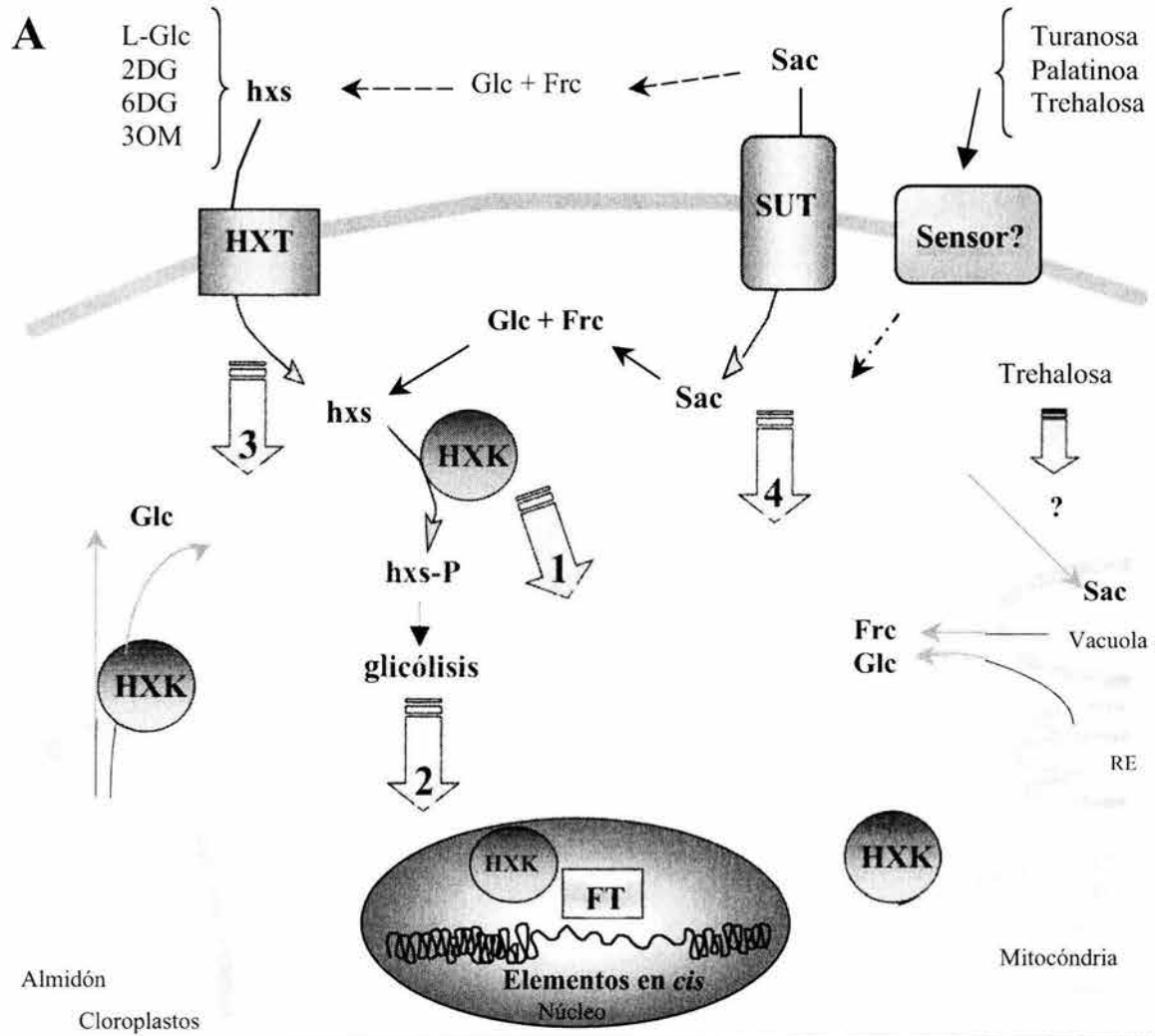


Figura 1. La señalización de los azúcares en las plantas. A. Se han identificado al menos 4 vías de señalización: Vía dependiente de HXK (1), Vía dependiente del metabolismo de hexosas o vía dependiente de glicólisis (2), Vía independiente de HXK (3), y Vía de detección de disacáridos (4). **B.** Las vías de detección y señalización de Glc parecen regular diferentes grupos de genes.

1.5.1.3 Sistema independiente del metabolismo de hexosas.

Este modelo está apoyado por el uso de diversos análogos de Glc que son tomados por la célula pero no son metabolizados, los cuales son capaces de inducir la expresión de genes específicos preferentemente relacionados con patógenos y con la abundancia de nutrientes. Por ejemplo la 3OMG y 6DG inducen a los genes que codifican para la Ivr extracelular (*CIN*), la SS, la fenilalanina amonio liasa (*PAL1*) y la patatina (Roitsch *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1997; Ehness *et al.*, 1997). Esto implica que ya sea el transporte, o bien el propio análogo ya internalizado, es capaz de generar una señal que produce un cambio en la expresión génica (Figura 2A y B).

1.5.1.4 Vía de detección de disacáridos.

Entre las observaciones que apoyan este modelo está la inducción o represión de ciertos genes específicamente por la Sac y no por la combinación de Glc y Frc. Como ejemplo tenemos el gen de la patatina, el gen *rolC*, el *ATB2*, y un simportador de Sac (Jefferson *et al.*, 1990; Yokoyama *et al.*, 1994; Chiou T-J y Bush D, 1998; Rook *et al.*, 1998), además de los mencionados en la tabla 2. De hecho SnRK1 parece mediar la señalización activada por Sacarosa a nivel postraduccional, al menos para una de las enzimas de biosíntesis de almidón, la AGPasa (Tiessen *et al.*, 2003) (Figura 2). También el uso de análogos de disacáridos como la turanosa y la palatinosa, los cuales no son permeables a la membrana ni mucho menos metabolizables, sugiere la existencia de sensores específicos de disacáridos extracelulares (Loreti *et al.*, 2000) (Figura 2A).

Por su parte otro disacárido, la trehalosa, ha demostrado afectar el metabolismo y desarrollo de las plantas, implicando que este disacárido es detectado por la célula mediante vías aún no claramente identificadas incluyendo una vía de detección de trehalosa endógena y otra vía para la detección de trehalosa exógena (Rolland *et al.*, 2002; Paul MJ y Pellny, 2003; Eastmond y Graham, 2003) (Figura 2A).

1.5.2 Transductores intermediarios.

Se ha demostrado a través del uso de inhibidores de la síntesis de proteínas, que parte de los componentes necesarios para la regulación de genes en respuesta a azúcares está presente en la célula aún antes de los tratamientos con azúcar, lo que implica la participación de procesos postraduccionales señalizadores como la fosforilación y desfosforilación de proteínas. La utilización de técnicas bioquímicas y farmacológicas ha permitido identificar diversos componentes de las vías de transducción de esta señal. Por ejemplo, se ha visto que inhibidores farmacológicos de Ser/Tre

fosfatasa (PP1 y PP2A) y de Ser/Tre cinasas (PKs), son capaces de reprimir algunos promotores de genes regulados por azúcar de manera similar a la represión por azúcar; y también son capaces de activar MAPKs e inducir una CDPK (PK dependiente de Ca^{2+}) asociada a membrana de forma dependiente de azúcar e independiente de estrés (Jang y Sheen, 1997; Ehness *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 1994; Iwata *et al.*, 1998).

Otro ejemplo es la PKS11, la cual se ha propuesto como un mediador de la señalización de azúcares en *Arabidopsis* (Gong *et al.*, 2002). Esta PK no se induce o reprime por sal, frío, sequía o ABA; sin embargo, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de la PKS11 resulta en una mayor resistencia de la plántula a Glc, sin afectar las respuestas a estrés. El gen *PKS11* se expresa preferentemente en la raíz y dadas las características estructurales de la proteína se propone que podría interactuar con sensores de Ca^{2+} mediando la señalización de este segundo mensajero en respuesta a las señales de azúcar (Gong *et al.*, 2002).

CTR1, una Ser/Tre cinasa de tipo MAKKK que participa directamente en la señalización de etileno, también es esencial para la transducción de la señal de Glc, pues la mutante *ctr1* presenta fenotipo insensible a Glc (Zhou *et al.*, 1998). Otras Ser/Tre PKs que parecen participar en la señalización de azúcar son las SnRKs (descritas anteriormente en el apartado I.4.3.1), las cuales se ha demostrado que se requiere de su actividad para la activación por azúcar del gen de la SS en papa. Estas SnRKs además controlan la actividad de enzimas del metabolismo primario de la planta (C y N). La fosforilación de estas enzimas por las SnRKs es estimulada por azúcar y permite la unión de proteínas 14-3-3 (también descritas anteriormente en el apartado I.4.3.2), quienes inactivan a dichas enzimas.

También, el uso de inhibidores de calmodulina y de canales de Ca^{2+} ha permitido proponer al Ca^{2+} como segundo mensajero durante la transducción de la señal de azúcar, dado que inhiben la acumulación inducida por azúcar de los RNAs de la esporamina y la β -amilasa (Ohto *et al.*, 1995). Además se ha observado que la aplicación exógena de sacarosa a células en suspensión de arroz inhibe la toma de las Ca^{2+} mientras la ausencia del azúcar estimula la toma de Ca^{2+} (Mitsui *et al.*, 1999). Sin embargo, otra evidencia indica que las concentraciones del Ca^{2+} citoplásmico incrementan en respuesta a la señal de azúcar (Ohto y Nakamura, 1995). Resulta interesante que el sistema animal, específicamente en las células pancreáticas β sucede algo muy semejante, pues se sabe que la toma de la Glc y su metabolismo en estas células provoca un aumento en la concentración de Ca^{2+} suficiente para activar la liberación de insulina. Dicha señalización por Ca^{2+} inducida por Glc, está mediada por

un nuevo segundo mensajero: NAADP (ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato), cuyos niveles endógenos aumentan en respuesta al estímulo de la Glc (Johnson y Mislser, 2002; Masgrau *et al.*, 2003).

La participación de moléculas como las PKs y el Ca²⁺ quizá no resulta sorprendente, ya que son ampliamente utilizadas en las vías generales de transducción de señales de las células; sin embargo es importante resaltar la especificidad de las mismas a cada una de las señales ambientales. Esta especificidad de respuesta podría recaer en parte en los blancos de estos intermediarios señalizadores, de los cuales aún se sabe muy poco.

1.5.3 Factores transcripcionales involucrados en las respuestas a azúcar.

Gran parte de las vías de señalización culminan en la activación o inactivación de genes “maestros”, mismos que llevan a cabo uno de los principales mecanismos de la respuesta de adaptación a la condición ambiental impuesta: el control de la expresión génica a nivel transcripcional. Estos genes “maestros” son los factores transcripcionales (FTs), los cuales pueden actuar a través de interacciones DNA-proteína, interacciones proteína-proteína o modificando la estructura de la cromatina. En el caso de la señal de azúcar, se han identificado aún pocos FTs en las plantas (Tabla 5). A continuación se presenta una breve descripción de dichos factores así como su posible papel en la regulación por azúcares.

Tabla 5. Factores transcripcionales involucrados en las respuestas a azúcares.

Gen o proteína	Organismo	Motivo reconocido	Efecto o posible papel	Referencia
SP8BP, SPF1	papa dulce, pepino	SP8	Regulador negativo en respuesta a azúcar	Ishiguro y Nakamura, 1992, 1994; Kim <i>et al.</i> , 1997
SUSIBA2	cebada	SURE	Activador de genes de la biosíntesis de almidón en respuesta a azúcar	Sun <i>et al.</i> , 2003.
VvMSA	uva	SURE1 y caja Sac 3	Parte de un complejo regulador de la transcripción que participa en una vía común para la señalización de azúcar y ABA	Cakir <i>et al.</i> , 2003.
TSF1	papa		Regulador positivo	Kim <i>et al.</i> , 1994.
STK	papa	“sitio 1”	Regulador positivo de genes de almacenamiento de proteínas así como del metabolismo de azúcares y almidón	Zourelidou <i>et al.</i> , 2002.
HSI2	Arabidopsis	?	Regulador negativo de genes inducibles por azúcar y ABA	Tsukagoshi <i>et al.</i> , 2003.
ATHB13	Arabidopsis	?	Regulador de la expresión de genes regulados por azúcar	Hanson <i>et al.</i> , 2001.
AtMYB61	Arabidopsis		Regulador del metabolismo y desarrollo global de la planta en respuesta a azúcar	Poole <i>et al.</i> , 2003.

OsMYB1	Arroz	AmyBOX2	Activador transcripcional	Lu <i>et al.</i> , 2001.
OsMYB2	Arroz	AmyBOX2	Activador transcripcional	Lu <i>et al.</i> , 2001.
OsMYB3	Arroz	AmyBOX2	Represor transcripcional	Lu <i>et al.</i> , 2001.

En la papa dulce y el pepino se han identificado proteínas de unión a DNA que interaccionan con motivos llamados SP8 de diversos genes regulados por azúcar (ver apartado I.4.1.1), a los que se les ha llamado SP8BP y SPF1 (Ishiguro y Nakamura, 1992, 1994; Kim *et al.*, 1997). La Sac induce la expresión de la β -amilasa y la esporamina, y al mismo tiempo reduce los niveles de RNAm de SPF1, lo cual sugiere que SPF1 podría tener un papel de regulador negativo en esta respuesta (Ishiguro S y Nakamura K, 1994).

En cebada recientemente se aisló el FT SUSIBA2, el cual se une de forma específica a los motivos SURE (y no al motivo SP8). SUSIBA2 pertenece a la familia de FTs tipo WRKY y se induce por azúcares. Adicionalmente este FT parece ser específico de la periferia del endospermo (hacia la capa de aleurona) funcionando como un activador de genes de la biosíntesis de almidón (Sun *et al.*, 2003). VvMSA es otra proteína que se une a una región que incluye al motivo SURE1 y a la caja de Sac 3 (ver apartado I.4.1.1) en el promotor del gen *VvHT1*, que codifica para un transportador de hexosas en la uva. VvMSA es una proteína de localización nuclear cuya expresión es inducida por Sac, y la inducción es potenciada por ABA; ABA por sí solo no tiene efecto en la expresión de este gen. Se propone que VvMSA actúa como parte de un complejo regulador de la transcripción que participa en una vía común para la señalización de azúcar y ABA (Cakir *et al.*, 2003). El reciente aislamiento de la mutante de *Arabidopsis hsi2*, permitió identificar un nuevo FT con un dominio de unión a DNA tipo B3 que también participa en la regulación de genes inducibles por azúcar y ABA. Esta mutante fue aislada por presentar alta actividad del gen reportero LUC bajo el control del promotor de esporamina de la papa dulce, incluso en condiciones de baja concentración de Sac (Tsukagoshi *et al.*, 2003).

También en *Arabidopsis* se identificó un nuevo miembro de la familia de FTs del tipo HDZip (cierre de leucina adyacente a un homeodominio), ATHB13. Este FT parece participar en la expresión de genes regulados por azúcar como la β -amilasa, ya que la expresión ectópica del gen *ATHB13* hiperinduce la expresión del gen de la β -amilasa y causa además alteraciones dependientes específicamente de Sac en la forma de los cotiledones y las hojas (Hanson *et al.*, 2001).

Por otra parte, tanto en tubérculos de papa, como en hojas tratadas con Sac, se han detectado cuatro posibles factores de unión a DNA. Uno de ellos llamado TSFI (por “tuber-specific and sucrose-inducible factor-I”) se une al menos a dos de los sitios de unión del promotor de la patatina, la cual es

claramente regulada por azúcares (Kim *et al.*, 1994). También el factor llamado “Storekeeper” (STK) pertenece a una nueva clase de proteínas de unión a DNA, se induce por azúcar y se une específicamente al motivo “sitio 1” de la caja B del promotor de la patatina (Zourelidou *et al.*, 2002). La conservación de este motivo en los promotores de genes de almacenamiento de proteínas así como del metabolismo de azúcares y almidón sugiere que tales podrían estar bajo el control de factores transcripcionales relacionados a STK (Zourelidou *et al.*, 2002).

Uno de los grupos de FTs más abundantes en *Arabidopsis* es el que conforma los MYBs (Riechmann *et al.*, 2000). Estos fueron identificados inicialmente en animales (Graf, 1992), y el dominio de unión a DNA está altamente conservado en todos los MYBs. Este dominio consiste en tres repetidas imperfectas de 51 a 52 aminoácidos, cada una de ellas designada como R1, R2 y R3. En las plantas casi todos los MYBs tienen dos repetidas, R2 y R3 (131 miembros) aunque también existen de la clase R1R2R3 (5 miembros) y otros con una sola repetida (1R) (Riechmann *et al.*, 2000). *AtMYB61* codifica para un FT tipo MYB-R2R3 que funciona como un regulador de la respuesta a azúcar en *Arabidopsis*. La mutación de este gen afecta el metabolismo y desarrollo global de la planta en respuesta a azúcar. De hecho la expresión de *AtMYB61* es regulada por azúcar, y tiene efectos en la distribución del C en los tejidos demandantes, durante la germinación, el crecimiento vegetativo y la floración de forma dependiente de azúcares (Poole *et al.*, 2003).

Recientemente en arroz se aislaron tres genes *OsMYBS* que codifican para MYBs de la familia de una sola repetida de unión a DNA (1R). Los tres *OsMYBS*s interaccionan con el elemento de respuesta a azúcar TATCCA (también llamada AmyBOX2, ver sección 1.4.1.1) *in vitro* e *in vivo*, y se ha demostrado que juegan un papel esencial en la expresión de los genes de α -amilasa regulada por azúcares y GAs (Lu *et al.*, 2001). De hecho *OsMYBS1* y *OsMYBS2* actúan como activadores transcripcionales mientras que *OsMYBS3* se comporta como un represor transcripcional. Es interesante que tanto *OsMYBS1* como *OsMYBS2* son reprimidos por azúcar, mientras que *OsMYBS3* es inducido; además, *OsMYBS1* y *OsMYBS3* se reprimen por GA y no son afectados por ABA, mientras que *OsMYBS2* es reprimido por ABA y no es afectado por GA (Lu *et al.*, 2001). Se propone que FTs en común como los *OsMYBS*s participan en la regulación por azúcar y hormonas (GA y ABA) de los genes de α -amilasa en los cereales. Dada su capacidad de formar homo- y heterodímeros, estos FTs pueden tener múltiples papeles a través de interacciones combinatorias con otros FTs para generar así patrones de expresión específicos.

Aún falta por conocer el papel específico de estos FTs en la respuesta a azúcares, así como las secuencias *in cis* reconocidas por muchos de ellos. Además, a pesar de que el número de FTs

identificados que controlan la respuesta a azúcares aún es muy escaso, es de esperarse que este número sea mucho mayor, dada la multitud de genes regulados por azúcar. De hecho, en este trabajo de tesis se identificaron 2 FTs que participan en las respuestas a azúcar y ABA, reforzando así el binomio de regulación azúcar-ABA del cual hablaremos detalladamente en las secciones de resultados y discusión.

I.6 Plantas mutantes en las respuestas de azúcares y su relación con las hormonas vegetales.

De forma relativamente reciente se ha tomado ventaja de los efectos tan dramáticos que tienen los azúcares en estados tempranos del desarrollo en *Arabidopsis*, así como de la regulación que ejercen en la expresión génica. De esta manera se han realizado selecciones génicas por fenotipo (genética directa) con el fin de identificar componentes de las vías de detección y señalización de azúcares. Cabe mencionar que casi todas las mutantes aisladas hasta hoy, han sido reportadas después del inicio del presente trabajo (Enero, 1997). En la siguiente tabla se muestran las diferentes selecciones y el fenotipo seleccionado.

Tabla 6. Diseños de selección de mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la respuesta a azúcar.

Nombre de la mutante	Fenotipo y condición de selección	No. de mutantes aisladas	Referencia
Insensibles a azúcar			
<i>cai</i> (<i>carbohydrate insensitive</i>)	Desarrollo de la plántula en bajo N (0.1 mM) y Sac 100 mM	35	Boxal <i>et al.</i> , 1996. Martin <i>et al.</i> , 2002.
<i>gin</i> (<i>glucose insensitive</i>)	Desarrollo de la plántula en Gle 388 mM	>19	Zhou <i>et al.</i> , 1998. Este trabajo (Arenas <i>et al.</i> , 2000).
<i>isi</i> (<i>impaired sucrose induction</i>)	Supervivencia de líneas transgénicas <i>ApL3::P450</i> en Sac 100mM y el herbicida R7402	>10	Rook <i>et al.</i> , 2001.
<i>lba</i> (<i>low level β-amylase</i>)	Baja actividad de β -amilasa en plantas crecidas en Sac 175 mM	2	Mita <i>et al.</i> , 1997b.
<i>lsi</i> (<i>low sucrose induction</i>)	Inducción reducida de la construcción <i>SPORAMINA::LUC</i> en alta Sac	28	Tsukagoshi <i>et al.</i> , 2003
<i>mig</i> (<i>manosse insensitive germination</i>)	Germinación en manosa 7.5 mM	72	Pego <i>et al.</i> , 2000.
<i>ram</i> (<i>reduced β-amylase</i>)	Baja actividad de β -amilasa en el fondo mutante <i>pgm</i>	>4	Donggiun <i>et al.</i> , 1998. Laby <i>et al.</i> , 2001.
<i>rsr</i> (<i>reduced sucrose response</i>)	Expresión reducida del promotor de patatina de papa (<i>Pat(B33)-iudA</i>) en Sac 90 mM	4	Martin <i>et al.</i> , 1997.
<i>sig</i> (<i>sucrose insensitive growth</i>)	Desarrollo de la plántula en Sac 350 mM	59	Pego <i>et al.</i> , 2000.
<i>sis</i> (<i>sugar insensitive</i>)	Desarrollo de la plántula en Sac 300 mM	12	Laby <i>et al.</i> , 2000.
<i>sun</i> (<i>sucrose-uncoupled</i>)	Represión reducida de la construcción <i>PC::LUC</i> en Sac 88 mM	18	Dijkwel <i>et al.</i> , 1997.
<i>uns</i> (<i>unusual sugar response</i>)	Floración temprana y/o bajo contenido de	4	Onai K <i>et al.</i> , 1999.

	clorofila en Sac 146 mM		Ohto M <i>et al.</i> , 2000.
Hipersensibles a azúcar			
<i>fus (fusca)</i>	Interrumpen su desarrollo y acumulan alto contenido de antocianinas en Sac 3%		Castle y Mainke, 1994.
<i>glo (glucose oversensitive)</i>	Interrumpen su desarrollo en Glc 220 mM		Sheen <i>et al.</i> , 1999.
<i>gss (glucose supersensitive)</i>	Interrumpen su desarrollo en Glc 56 mM	22	Pego <i>et al.</i> , 2000.
<i>hba (high level β-amylase)</i>	Alta actividad de β -amilasa en Sac 175 mM	2	Mita <i>et al.</i> , 1997a.
<i>hsi (high sucrose induction)</i>	Alta inducción de la construcción <i>SPORAMINA::LUC</i> en baja Sac	29	Tsukagoshi <i>et al.</i> , 2003
<i>hsr (high sugar response)</i>	Alta actividad de la construcción <i>ApL3::LUC</i> en Sac 34 mM	>10	Baier <i>et al.</i> , 2004.
<i>prl1 (pleiotropic regulatory locus)</i>	Interrumpe su desarrollo en Sac 175 mM	1	Németh <i>et al.</i> , 1998.
<i>sss (sucrose super sensitive)</i>	No germinan en Sac 350 mM	37	Pego <i>et al.</i> , 2000.

La caracterización genética, fenotípica y molecular de varias de estas mutantes, ha revelado una inesperada interconexión directa entre la señalización de los azúcares y las hormonas. Este hecho ha llevado a re-evaluar el fenotipo de otras mutantes en respuesta a hormonas aisladas previamente, encontrándose que muchas de ellas también están afectadas en sus respuestas a azúcares. Algunas de las mutantes que ejemplifican la complejidad dichas interconexiones se enlistan en la tabla 7.

Tabla 7. Ejemplos de mutantes afectadas en respuestas a azúcares y fitohormonas.

Mutantes	Gen	Fenotipos	Identidad molecular	Referencia
<i>prl1</i>	<i>PRL1</i>	Hipersensible a Glc, Sac, citocininas, etileno, ABA, auxinas y frío.	Proteína reguladora nuclear / interacción de azúcar y hormonas	Németh <i>et al.</i> , 1998.
<i>hyl1</i>	<i>HYL1</i>	Resistente a citocininas y auxinas. Hipersensible a ABA, Glc, NaCl y estrés osmótico. Gravitropismo y dominancia apical reducida.	Proteína de unión a RNA de doble cadena / regulación de la expresión por microRNAs	Cheng y Fedoroff, 2000; Meng-Hsuan <i>et al.</i> , 2004.
<i>abi8, eld1, kob1</i>	<i>ABI8</i>	Resistente a ABA y Glc, talla pequeña, floración retardada, macho estéril. Alteraciones en la biosíntesis de celulosa y diferenciación vascular	Proteína con dominios de función desconocida / señalización de ABA y Glc	Brocard <i>et al.</i> , 2004.

La presencia de los múltiples fenotipos en estas mutantes es congruente con una serie de observaciones hechas durante estudios fisiológicos hechos en cultivos de células, de órganos y de plántulas completas así como en otros sistemas. En ellos se ha demostrado que tanto el crecimiento como cada una de las etapas de desarrollo de las plantas, están controlados por la acción concertada de múltiples vías de señalización, incluyendo a las hormonales y de azúcares. A continuación se mencionan algunas de las señales adicionales a los azúcares, que determinan la progresión de los procesos de desarrollo.

Tabla 8.

Proceso de desarrollo	Efecto del azúcar	Efecto de otras señales
División celular durante la embriogénesis	La Glc promueve La Sac inhibe	ABA bloquea en la fase G ₁ /S GAs, auxinas y citocininas promueven
Almacenamiento de reservas de la semilla	La Sac promueve	ABA promueve
Emergencia de la radícula durante la germinación	La concentración baja de Glc o Sac suprime la inhibición por ABA La concentración alta de Glc inhibe	ABA inhibe GAs, etileno, brasinoesteroides y la luz, y promueven
Mobilización de las reservas durante la germinación	La Glc y la Sac inhiben la expresión de la α -amilasa evitando la degradación del almidón	ABA inhibe en la aleurona y aumenta la represión de la α -amilasa GAs promueven la expresión de la α -amilasa
Crecimiento de la plántula	La concentración alta de Glc y Sac inhiben de forma dependiente de ABA La concentración baja de azúcares promueve	ABA a baja concentración promueve ABA en alta concentración inhibe Etileno y citocininas promueven disminuyendo la sensibilidad a azúcar Auxinas inhiben
Tuberización	La Sac promueve	ABA promueve GAs inhiben
Floración	La Sac a baja concentración promueve La Sac y Glc en alta concentración inhibe	ABA inhibe Luz, GAs y reloj endógeno regulan
Senescencia	La Glc y la Sac promueven	Citocininas inhiben

El efecto concertado de las señales de azúcares y de fitohormonas está dado en gran medida por la interconexión de las vías de señalización correspondientes. De hecho el presente trabajo de tesis (a la par de otros trabajos) contribuyó a dilucidar la naturaleza de las interacciones entre la señalización de azúcares, ABA y etileno, así como de otras señales, a través de la caracterización de diversas mutantes en la detección de azúcares. Las interacciones entre la señalización de azúcares, y fitohormonas, serán tratadas ampliamente en la secciones de resultados y discusión.

1.7 Interacción de la señalización de azúcares con otras vías de señalización.

En condiciones naturales, las plantas son afectadas simultáneamente por una gran variedad de estímulos relacionados con los estreses bióticos y abióticos y otros factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes. La presencia de un estrés nutricional por ejemplo, puede cambiar las respuestas de la planta a otros estreses, creando así efectos aditivos o interacciones sinérgicas (Bonhert y Sheveleva, 1998; Roitisch, 1999). Estas interacciones son una consecuencia lógica ya que tanto los estreses bióticos como abióticos tienen efectos importantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas, los cuales dependen del estado energético de la planta. Las variaciones en los factores ambientales abióticos (agua, luz, temperatura, salinidad, hipoxia) pueden resultar en una disminución

significativa de la eficiencia fotosintética en los tejidos productores y con ello reducir en el suministro de carbohidratos a los tejidos demandantes. También se ha visto que algunas respuestas a estrés bióticos (ataques por patógenos, predación, simbiosis micorríticas) son muy semejantes a las activadas por azúcares por lo que se ha planteado que los genes de respuesta a estas señales podrían utilizar vías de señalización en común y/o vías paralelas que activan subgrupos de genes en común (Herbers *et al.*, 1996; Ehness *et al.*, 1997).

El análisis de mutantes afectadas en las respuestas a azúcares también ha evidenciado la estrecha relación existente entre diversos tipos de estrés ambiental y la señalización de los azúcares. Durante el desarrollo del presente trabajo de tesis se encontraron relaciones importantes de la señalización de azúcares con las respuestas a estrés osmótico, sequía, salinidad, frío y la disponibilidad de N, mismas que abordaré ampliamente en las secciones de resultados y discusión. Por tales motivos en esta sección únicamente abordaré las evidencias que apoyan la existencia de interacciones entre los azúcares y otras señales como la luz, el estado redox, la hipoxia y el estrés abiótico.

1.7.1 Interacción entre las señales de azúcar y luz.

La luz es una señal ambiental importante que es percibida directamente por fotoreceptores y controla la morfogénesis de las plantas, su crecimiento, su desarrollo y el proceso de fotosíntesis. La luz provee el poder reductor para la fijación del C, la asimilación del N, la biosíntesis de aminoácidos y otras vías metabólicas y señalizadoras. Diversas evidencias apuntan a una interconexión estrecha entre la señalización por luz y azúcar. De hecho las vías de señalización de auxinas, brasinoesteroides, GAs, citocininas y etileno (que también participan en la respuesta a azúcares) son influenciadas por la señalización de luz ya sea directa o indirectamente (Moller *et al.*, 2002).

Múltiples genes que codifican para proteínas que participan en el metabolismo primario son inducidos fuertemente por luz y reprimidos por azúcar, por ejemplo *Cab*, *PC*, y *RBCS* (Koch, 1996); o bien son inducidos por luz y azúcar, por ejemplo *GLN2* (Gln sintetasa 2), *NR* (nitrato reductasa), y *ASN2* (Asn sintetasa 2) (Koch *et al.*, 1996; Lam *et al.*, 1998; Oliveira y Coruzzi, 1999). De hecho se ha demostrado que la regulación de diversos genes del metabolismo del N (*GLN2*, *ASNI* y *ASN2*) y otros genes del metabolismo del C (*β -amilasa*, *SPS*, ciclo de calvin) y de la biosíntesis de antocianinas, está mediada en parte por la vía del fitocromo (Sharma y Schopfer, 1987; Sharkey *et al.*, 1991; Lam *et al.*, 1996; Mita *et al.*, 1997; Yanovsky *et al.*, 1998).

Actualmente se sabe que los azúcares modulan la señalización de luz mediada por fitocromo (Dijkwel *et al.*, 1997; Short, 1999). Entre las evidencias que apoyan esta postura esta la observación de que la Sac reprime tres respuestas inducidas por la luz roja lejana, la cual es específica de la señalización mediada por fitocromo A (PHYA): la apertura de los cotiledones, la inhibición de la elongación del hipocotilo y el bloqueo del enverdecimiento; lo que sugiere que la señalización de Sac podría antagonizar o bien, suprimir la vía de señalización mediada por PHYA (Barnes *et al.*, 1996). Esto se vio reforzado por el hecho de que algunas de las mutantes resistentes a azúcares *sun* (apartado I.6), además de presentar una represión reducida por Sac de la construcción *PC::LUC*, también afectan algunas de las respuestas inducidas por la luz roja lejana y la regulación por luz de genes como *CAB* y *RBCS* (Dijkwel *et al.*, 1997). Es decir, mutantes como *sun6/gin6/abi4* que no detectan adecuadamente los azúcares ya no son capaces de inhibir la señalización por PHYA por lo que ya no se bloquea el enverdecimiento. De esto se ha concluido que la Sac interfiere negativamente con la señalización activada por PHYA, protegiendo a la planta del daño inducido por la luz roja lejana. Adicionalmente, el análisis de dobles mutantes en FTs involucrados en la germinación como *LEC1* ("LEAFY COTYLEDON1"), *FUS3* (*FUSCA3*), *ABI3* (*ABA insensitive*), *ABI4* y *ABI5*, ha demostrado que estos loci median en diversos grados las respuestas a luz, azúcar e incluso a estrés osmótico (Brocard *et al.*, 2003).

Durante el proceso de senescencia se dismantela el aparato fotosintético; este proceso es acelerado por los azúcares y desacelerado por las citocininas y la luz. Los estudios de Wingler *et al.* (1998) sugieren que la acumulación de azúcares durante la senescencia (debida al desdoblamiento del almidón acumulado), bloquea el efecto de las citocininas; pero luz antagoniza el efecto de los azúcares durante este proceso. Por lo tanto la señalización de los azúcares antagoniza el efecto de las citocininas y de la luz durante la senescencia. También se ha observado que bajo condiciones de alta intensidad de luz hay mayor producción y provisión de azúcares, y como consecuencia las plantas crecen más rápido y senescen prematuramente. El sensor de hexosas HXK1 parece ser uno de los elementos que participan en la coordinación de la señal de alta intensidad de luz con la señal de alta Glc intracelular, regulando así la senescencia. Esto fue dilucidado en base a que la mutante en HXK1, *gin2*, presenta una senescencia retardada cuando es crecida en alta intensidad de luz, mientras que la sobreexpresión de este sensor produce el efecto contrario (Moore *et al.*, 2003).

La imagen actual de todas estas interacciones apunta a que dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta y del gen analizado, las señales de C pueden atenuar, potenciar o aumentar las respuestas a luz a intensidades y longitudes de onda específicas (Thum *et al.*, 2003). Estos efectos podrían ser en parte a nivel transcripcional (Thum *et al.*, 2004). Por lo tanto, la detección adecuada de

la cantidad y calidad de luz y de los productos de la fotosíntesis (azúcares) asegura una respuesta apropiada del metabolismo a situaciones específicas.

1.7.2 El estado redox y los azúcares.

Los cloroplastos son organelos semiautónomos que contienen su propio genoma, el cual contiene de 100-120 genes que codifican para proteínas cloroplásticas, RNAt y RNAr. Sin embargo, la gran mayoría de las proteínas cloroplásticas están codificadas en el núcleo y deben ser importadas después de su traducción en el citoplasma. Este arreglo requiere de un alto grado de coordinación entre las maquinarias de expresión génica del núcleo y de los plástidos, lo cual se logra mediante el intercambio de información permanente entre ambos compartimientos (León *et al.*, 1998). De hecho, la expresión de proteínas cloroplásticas está acoplada al estado funcional de estos organelos, y la fotosíntesis, que es una de las funciones más importantes del cloroplasto juega un papel crucial en este contexto.

Los cambios en el estado óxido/reducción (redox) de los componentes de la maquinaria fotosintética actúan como señales que regulan la expresión de proteínas cloroplásticas codificadas tanto en los cloroplastos como en el núcleo, ayudando así a coordinar la expresión en ambos compartimientos (Pfannschmidt, 2003). En la fotosíntesis, los dos fotosistemas convertidores de energía están conectados electroquímicamente en serie por acarreadores de electrones, mismos que son oxidados por el fotosistema I (PSI) y reducidos en el fotosistema II (PSII). Estudiando los efectos de los cambios en el transporte fotosintético de electrones en la expresión génica del cloroplasto en *Sinapis alba* L. (mostaza), Pfannschmidt *et al.* (1999) demostraron que el estado redox de uno de los acarreadores de electrones, la plastoquinona, controla la tasa de transcripción de genes cloroplásticos que codifican para proteínas del centro de reacción de los dos fotosistemas (*psaAB* y *psbA*). Las señales de redox originadas en el cloroplasto también participan en la expresión de varios genes nucleares del PS1 (Pfannschmidt, 2003).

Ya que la fotosíntesis produce azúcares solubles, es muy probable que el control redox sobre la expresión de genes fotosintéticos tenga impacto en la producción y señalización de azúcares. De hecho, hay evidencias de que existe interacción entre el estado redox del cloroplasto y la señalización de azúcares en la regulación de la expresión de genes fotosintéticos. En un cultivo de células de *Arabidopsis*, Oswald *et al.* (2001) observaron que cuando se bloquea el flujo de electrones fotosintéticos, se evita la inducción de los RNAs de *CAB* y *RBCS* que normalmente se observa en respuesta a la ausencia de azúcares. En cambio, la inducción de la *NR* por azúcar no se afecta por el

estado redox, sugiriendo que sólo los genes que se reprimen por azúcar están sujetos también a la señal de redox. Estas observaciones fueron confirmadas usando plantas transgénicas que llevan el gen reportero de la luciferasa bajo el control de los promotores de *PC* o de *CAB2*, donde se demostró que este tipo de control se lleva a cabo a nivel transcripcional. De esto se concluyó que una señal redox derivada del plástido (independiente de la PQ) puede sobrepasar o bloquear la señalización de azúcar sobre la expresión de estos genes fotosintéticos.

Estos y otros datos apoyan el modelo en donde el transporte fotosintético de electrones (TFE) genera una señal reguladora positiva (inductor) que es antagonizada por la represión generada por los azúcares. La ausencia de azúcar en presencia de luz quita la represión dependiente de azúcar permitiendo que la señal inductora derivada del cloroplasto, actúe a nivel de la transcripción del gen blanco. Resulta interesante que el promotor de *PC* que es sensible a la señal TFE y sensible a la represión por azúcar, se convierte en insensible a TFE e inducible a azúcar en la mutante resistente a azúcares *sun6/gin6/abi4* (Oswald *et al.*, 2001). Esta última evidencia apoya la existencia de una estrecha relación entre el estado redox del cloroplasto generado por el TFE y la señalización de azúcares.

Por otra parte, se ha visto que la síntesis de almidón en tubérculos de papa es regulada por una modificación postraduccional tipo redox de la ADP-Glc pyrofosforilasa (AGPasa). Esta enzima cataliza la conversión de Glc-1-P y ATP a ADP-Glc y pirofosfato (PPi), que constituye el primer paso comprometido a la vía de síntesis de almidón. En las plantas superiores, esta enzima es un heterotetrámero que consiste en dos subunidades regulatorias (AGPS) y dos catalíticas (AGPB); y es regulada por varios mecanismos. El primero es la regulación a nivel transcripcional, donde la presencia de azúcares aumenta su expresión, mientras que la presencia de nitrato y fosfato disminuye su expresión. El segundo mecanismo de regulación es de tipo alostérico, donde esta enzima es activada por glicerato-3-fosfato (GA3P) e inhibida por Pi. El tercer mecanismo es por el estado redox, en el cual se forma un puente disulfuro intermolecular entre las cisteínas de las dos subunidades catalíticas AGPB de la holoenzima. La dimerización (forma oxidada) conlleva a la inactivación de la enzima como resultado de una disminución dramática en la afinidad por el sustrato, y este proceso es revertido por la presencia del agente reductor DTT. Resulta interesante que la presencia de altos niveles de Sac también disminuye la dimerización, reactiva a la AGPasa y estimula la síntesis de almidón *in vivo*. La activación ocurre en respuesta a factores relacionados directa- o indirectamente a la disponibilidad de Sac.

Los componentes señalizadores que producen la modulación de la AGPasa por el estado redox aún se desconocen en gran medida. Sin embargo, se plantea que este proceso podría involucrar

sensores de azúcar o thio-redoxinas (Tiessen *et al.*, 2002), ya que se ha demostrado que el DTT puede ser substituido por thio-redoxina *m* y *f* (Ballicora *et al.*, 2000; Schuman y Jacquot, 2000). Recientemente se vio que la activación de la AGPasa (forma reducida) está mediada por al menos dos vías de señalización independientes: la señalización de hexosas mediada por HXK y la señalización de Sac mediada por SnRK1 y Ca^{2+} , las cuales actúan como componentes reguladores positivos (Tiessen *et al.*, 2003).

1.7.3 Estrés por hipoxia.

Algunas especies vegetales presentan tolerancia a estrés anaeróbico, esto implica una provisión alta de azúcar y tasas de glicólisis altas, así como fermentación etanólica para mantener el estatus energético de las células. Esto es especialmente importante dada la baja eficiencia energética de la fermentación (Hwang *et al.*, 1999). El arroz es el único cereal que puede germinar y crecer en condiciones anóxicas, debido al menos en parte a su habilidad de expresar genes que codifican para enzimas hidrolíticas para el desdoblamiento del almidón y usa estos productos como fuentes de energía para el desarrollo de la plántula en estas condiciones. En *Arabidopsis* (una planta intolerante a la anoxia), se ha demostrado que durante la deficiencia de O_2 , el contenido de azúcares es agotado después de 1 día de tratamiento (Déjardin *et al.*, 1999). Además se sabe que mientras la actividad de la Ivr se reduce durante la anoxia o hipoxia, aumenta la actividad de la SS; esto sugiere que la Ivr tiene un papel importante en la descarga del floema y en la provisión de sustratos para la glicólisis (Winter y Huber, 2000).

Dichos cambios en las enzimas de desdoblamiento de la Sac (Ivr y SS) en respuesta a bajos niveles de O_2 , pueden afectar la entrada de C en la respiración y la cantidad de hexosas señalizadoras producidas. Tales señales pueden variar dependiendo de la vía de desdoblamiento de Sac; la Ivr produce el doble de hexosas no fosforiladas (Glc + Frc) que la SS (Frc + UDP-Glc). Por ello la acción de la Ivr potencialmente puede ejercer mayor influencia en los genes de respuesta a hexosas. De hecho se ha visto en las coñas de la raíz de maíz que la expresión del gen de la Ivr y la relación Ivr/SS disminuye en forma abrupta en respuesta a bajas concentraciones de O_2 , lo cual podría tener impacto inmediato en la señalización de azúcares dependiente de hexosas bajo condiciones de hipoxia (Zeng *et al.*, 1999).

Se ha sugerido que las bajas concentraciones de O_2 alteran de forma importante la respiración y el flujo de C a través de las HXKs, las cuales median el primer paso en dos de las vías de transducción de señales de azúcar (apartados I.5.1.1. y I.5.1.2.); por lo que la hipoxia/anoxia podrían alterar dicho

sistema de señalización. En los tubérculos de papa, las HXKs están sujetas a la inhibición por ADP, lo que sugiere que las HXKs controlan el flujo glicolítico durante la hipoxia/anoxia (Renz y Stitt, 1993). Esto concuerda con el hecho de que la hipoxia claramente induce la tasa glicolítica y disminuye la razón ATP/ADP (Roscher *et al.*, 1998); y también estimula la actividad de la HXK (Fox *et al.*, 1998). Estudios hechos por Fox *et al.*, (1998) sugieren que la HXK (con un pH óptimo ácido inducido durante la anoxia) mantiene la entrada de carbohidratos en la glicólisis, en la biosíntesis de ácidos grasos y otras vías durante la anaerobiosis. Además, como la tasa de fosforilación es más importante que la concentración de las hexosas fosfato en la señalización de azúcar, los efectos combinados del aporte de azúcar, la concentración de ATP y el pH citoplásmico en la modulación de la actividad de la HXK permitiría que alguna isoenzima de HXK sirviera como un sensor del estado de aereación de la célula. Sin embargo aún falta por identificar cuál HXK específica sería la responsable de realizar estas funciones.

A nivel de la expresión génica también existen evidencias de las interacciones entre azúcares y el O₂, dado que algunos genes de respuesta a azúcar también responden a la disponibilidad de O₂, por ejemplo: *Sus1* y *Sh1* que codifican para la SS de maíz (Zeng *et al.*, 1998; Koch *et al.*, 2000), *Adh1* que codifica para la alcohol deshidrogenasa en maíz y *Arabidopsis* (este trabajo en Arenas *et al.*, 2000; Conley *et al.*, 1999), y la *Amy3* que codifica para la α -amilasa en arroz (Hwang *et al.*, 1999). En conjunto estos datos apoyan la interacción de los sistemas de señalización de azúcar y O₂ en las plantas; sin embargo, este es un tema casi virgen que apenas se empieza a ser abordado.

1.7.4 Estrés biótico.

Se sabe que tanto la Glc como diversos estímulos relacionados con la respuesta de defensa regulan de manera coordinada el metabolismo de los tejidos productores y demandantes, y activan la respuesta de defensa en cultivos fotoautotróficos de amaranto (*Chenopodium rubrum*). Los RNAs de la fenilalanina amonio liasa (PAL1), una enzima clave en las respuestas de defensa, así como los de la Ivr extracelular específica de tejidos demandantes CIN1, se inducen en forma importante en respuesta a Glc; mientras que los RNAs de la RBCS se reprimen (Ehness *et al.*, 1997). El uso de inhibidores de cinasas ha demostrado que la Glc y el estrés activan vías de señalización diferentes, que al final son integradas para regular las relaciones productor-consumidor en la planta y los mecanismos de defensa. Esto podría explicar porqué la expresión de enzimas hidrolíticas como las α -amilasas, las cuales hidrolizan almidón para proveer azúcares para la actividad metabólica, está acoplada con la expresión de proteínas de estrés (Ho *et al.*, 2001). Además se ha visto que la expresión de las α -amilasas se

induce también por estrés hídrico (Jacobsen *et al.*, 1986), por infección viral (Heitz *et al.*, 1991), y por herida (Koizuka *et al.*, 1995). Otras enzimas hidrolíticas como la β -fructosidasa (Ivr) es inducida por herida o infección por patógenos (Sturm y Chrispeels, 1990). Estos datos sugieren que las respuestas de defensa están íntimamente ligadas a la activación del metabolismo consumidor de la planta para satisfacer los requerimientos energéticos para la activación de la respuesta de defensa.

Las concentraciones altas de azúcares inducen una variedad muy amplia de genes asociados a la defensa tales como las proteínas PR (Roitisch, 1999; Herbers *et al.*, 1996b), y proteínas antifúngicas (Salzman, 1998). Resulta interesante que las MAPKs, las cuales son activadas por diversos tipos de estrés como elicitores, herida, frío, salinidad y sequía, también son activadas por análogos de disacáridos no metabolizables como la turanosa y la palatinosa, pero no por azúcares metabolizables como la Sac y la Glc (Sinha *et al.*, 2002). Esto ha llevado a sugerir que algunos disacáridos específicos usan diferentes vías de señalización y que los derivados de Sac que no están presentes en la naturaleza son detectados como señales de estrés (del tipo de los elicitores) en lugar de señales metabólicas. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que los fitopatógenos como *Wrwinia spp.* pueden transformar la Sac en palatinosa (Huang *et al.*, 1998), donde la Sac de la planta es convertida a una forma no disponible para la planta. Entonces, la presencia de esta forma inusual del azúcar podría señalar la presencia de un patógeno.

En resumen, cada vez son más las evidencias que apoyan a los azúcares como moléculas centrales que regulan las respuestas de desarrollo de las plantas, integrando la enorme cantidad de factores ambientales que determinan su crecimiento y supervivencia. El mecanismo responsable de dicha integración de información es la intercomunicación de las vías de señalización activadas, en lugar de la acción de vías lineales individuales.

II JUSTIFICACIÓN

La regulación del metabolismo de la Glc y su homeostásis es esencial para la supervivencia de todos los seres vivos; por ejemplo, defectos en la regulación de los niveles de Glc en la sangre, puede resultar en enfermedades graves en los humanos como algunos tipos de diabetes (Rustenbeck, 2002). La nutrición óptima de organismos heterótrofos como las bacterias, la levadura y los humanos, y la coordinación de la actividad de la fotosíntesis con la actividad almacenadora en organismos autótrofos como las plantas, son sólo algunos de los procesos que requieren una constante detección de los niveles de Glc y regulación del metabolismo de la misma. Por lo tanto, el conocimiento de las vías de señalización y de las proteínas que perciben la Glc y sus metabolitos es esencial para el entendimiento de esta homeostásis.

El aislamiento y la caracterización de mutantes en las vías de señalización de azúcares, ofrece la oportunidad de iniciar el entendimiento de algunos aspectos del control genético global por Glc en plantas superiores, así como de la interacción entre tejidos demandantes y productores, y las respuestas de la planta a estímulos internos y ambientales. Durante más de medio siglo (desde 1943), *Arabidopsis thaliana* ha sido utilizada como un sistema modelo vegetal. Esta planta dicotiledónea perteneciente a la familia Brassicaceae, presenta características fenotípicas y genéticas que hacen de ella un modelo amigable tanto para la genética experimental clásica, como para la biología molecular moderna. *Arabidopsis* tiene una talla pequeña (30 cm en estado adulto), un ciclo de vida corto (6 semanas) y produce una gran cantidad de semillas (hasta 10 000 por planta); además tiene el genoma vegetal más pequeño que se conoce (125 Mb) y pocas secuencias de DNA repetitivo respecto a otras plantas superiores. Actualmente existe una gran cantidad de información a nivel genético y molecular de esta planta, su genoma está totalmente secuenciado, y además se cuenta con colecciones extensas de mutantes que constituyen una herramienta muy poderosa para nuestro objetivo: "la disección genética de la señalización por azúcares en plantas superiores".

Tomando ventaja de que las plantas de *Arabidopsis* bloquean su desarrollo a concentraciones altas de Glc (300-400 mM) (Jang et al, 1997), mutaciones que afecten las funciones reguladoras dentro de las vías de señalización activadas por este azúcar, pueden ser aisladas mediante el tamizado de plantas que muestren fenotipos insensibles en dichas condiciones. La caracterización de estas mutantes es de gran valor para la identificación de genes esenciales en estos procesos, así como la asignación de sus funciones. En particular, es posible y potencialmente interesante aislar factores transcripcionales que coordinen la expresión de genes que determinen la capacidad fotosintética y el desarrollo de las plantas. Por tales motivos, este trabajo versó sobre la identificación de componentes de las vías de

transducción de señales activada por azúcares, mediante el aislamiento y caracterización fenotípica y molecular de mutantes de *A. thaliana* resistentes a altas concentraciones de Glc.

II OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificación y caracterización de componentes de las vías de transducción de señales activada por azúcares en Arabidopsis.

Objetivos particulares

- Formación de una colección de mutantes de *A. thaliana* afectadas en el proceso de detección de glucosa, capaces de resistir altas concentraciones de este azúcar.
- Caracterización fenotípica preliminar de dichas mutantes, para la selección de alguna de ellas que resulte de mayor interés.
- Análisis fenotípico, genético y molecular de la mutante elegida.
- Aislamiento y caracterización molecular del gen identificado.

IV RESULTADOS

IV.1 Formación de una colección de mutantes de *A. thaliana* afectadas en el proceso de detección de Glc, capaces de resistir altas concentraciones de este azúcar.

Hasta la década de los 80's, la gran mayoría de los experimentos en plantas se enfocaban a especies económicamente importantes, pero estas especies incluyendo a muchos de los cultivos principales, tienen genomas en general muy grandes y poliploides, que contienen DNA altamente repetitivo. La planta modelo que utilizamos es *Arabidopsis thaliana* (vulgarmente llamada mostacilla) dado que existe una gran cantidad de información a nivel genético y molecular de esta especie, además de la reciente secuenciación total de su genoma (Kaul *et al*; 2000). Esta planta dicotiledónea presenta características fenotípicas y genéticas que permiten su fácil manipulación, entre ellas están su talla pequeña (25-35 cm), un ciclo de vida corto (8 semanas en condiciones óptimas), la producción de una gran cantidad de semillas (hasta 10 000 por planta), capacidad de crecer en condiciones controladas ya sea en tierra o en un medio artificial definido, y la facilidad con la que se puede mantener una línea mutante por auto-fertilización, así como de ser cruzada. Así mismo, posee el genoma más pequeño que se conoce hasta ahora en las plantas (125 Mb, 0.14 pg de DNA por núcleo haploide) y pocas secuencias de DNA repetitivo respecto a otras plantas superiores, facilitando enormemente la realización de estudios moleculares y la clonación de genes basada en mapeo. Además, *Arabidopsis* es transformada fácilmente a través de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, lo cual es un requisito para muchos experimentos genético-moleculares.

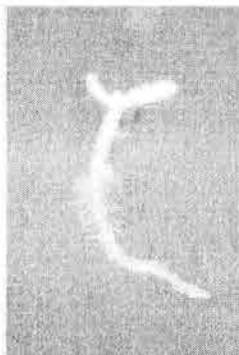
Las plantas de *Arabidopsis* bloquean su desarrollo en un estado muy temprano cuando se germinan en presencia de concentraciones de Glc de 300-400 mM en el medio de cultivo (Jang *et al.*, 1997; Smeekens y Rook, 1997). Por lo tanto, mutaciones que afecten las vías de señalización activadas por estos azúcares, pueden ser aisladas mediante el tamizado y selección de plantas capaces de continuar su desarrollo y por lo tanto muestren fenotipos insensibles en dichas condiciones. Con este criterio, realizamos la búsqueda de plantas mutantes incapaces de detectar adecuadamente la Glc en un banco de semillas de *Arabidopsis* (ecotipo *Wassilewskija*, *Ws*) mutagenizadas por la inserción de T-DNA (Feldmann, 1992) procedente de la estación experimental de Dupont. Esta colección contaba en ese momento con 7300 líneas transformantes independientes distribuidas en grupos de 100, ("1 pool"=100 líneas), y se ha calculado que el 30% de dichas transformantes tienen abanderado el gen mutado (según estimaciones hechas por Feldmann). Además, este banco no había sido utilizado para la

búsqueda de mutantes en detección de azúcares, lo que aumentaba la posibilidad de obtener nuevas mutantes en este proceso.

Como se mencionó anteriormente, las plantas silvestres crecidas *in vitro* en presencia de altas concentraciones de fuentes de carbono son capaces de germinar pero su desarrollo se interrumpe logrando solamente desplegar los cotiledones, los cuales presentan un color blanco (ausencia de pigmentos fotosintéticos) como consecuencia de la represión de la expresión de genes fotosintéticos y de la incapacidad de diferenciación de los cloroplastos; y además acumulan antocianinas (Fig. 3A). Las plantas incapaces de detectar adecuadamente los altos niveles de Glc presentan fenotipo verde, que es fácilmente detectable. Este método de selección fenotípica es rápida (7 a 12 días) y permite el análisis de una gran cantidad de semillas en un periodo de tiempo relativamente corto.

Con el fin de disminuir los eventos de escape (falsos positivos) durante el tamizado del banco, se establecieron las condiciones de siembra de las semillas, utilizando aproximadamente 600 semillas silvestres en 1 caja Petri de tamaño estándar, conteniendo medio de germinación MS suplementado con Glc al 7% peso/vol (388 mM). Las semillas fueron sembradas a una distancia constante debido a que cada planta puede y debe detectar gradientes muy sutiles de muchos factores ambientales tales como la luz y el agua, y los nutrientes (como las fuentes carbonadas y nitrogenadas), de tal manera que según la calidad y cantidad de luz reflejada por una planta vecina, así como la velocidad de cambio en los nutrientes del medio, puede conocer su posición precisa y competir por los mismos recursos. Bajo las condiciones utilizadas no se observaron escapes en las plantas silvestres, que en este caso pertenecen al ecotipo *Ws* (Fig. 3B).

A



B

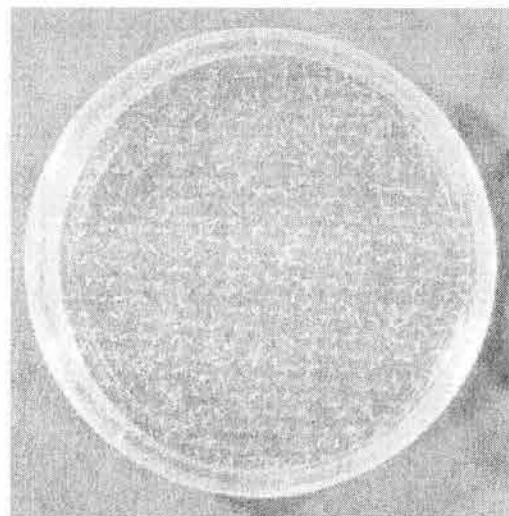


Figura 3. A. Fenotipo de una planta silvestre (*Ws*) germinada y crecida en condiciones de Glc al 7%. B. Estandarización de las condiciones de selección de plantas resistentes a alta concentración de Glc.

El tamizado del banco de semillas se realizó sembrando un total de 204,400 semillas, aproximadamente 28 semillas de cada línea transformante independiente, cantidad recomendada por Dupont para tener una probabilidad del 99% de aislar una mutación recesiva. De esta manera se seleccionaron 1003 plantas candidatas con fenotipo verde en presencia de Glc al 7% (Fig. 4A), las cuales fueron rescatadas y crecidas en maceta para la obtención de la siguiente generación de individuos. La resistencia a Glc de esta nueva generación fue analizada (Fig. 4B).

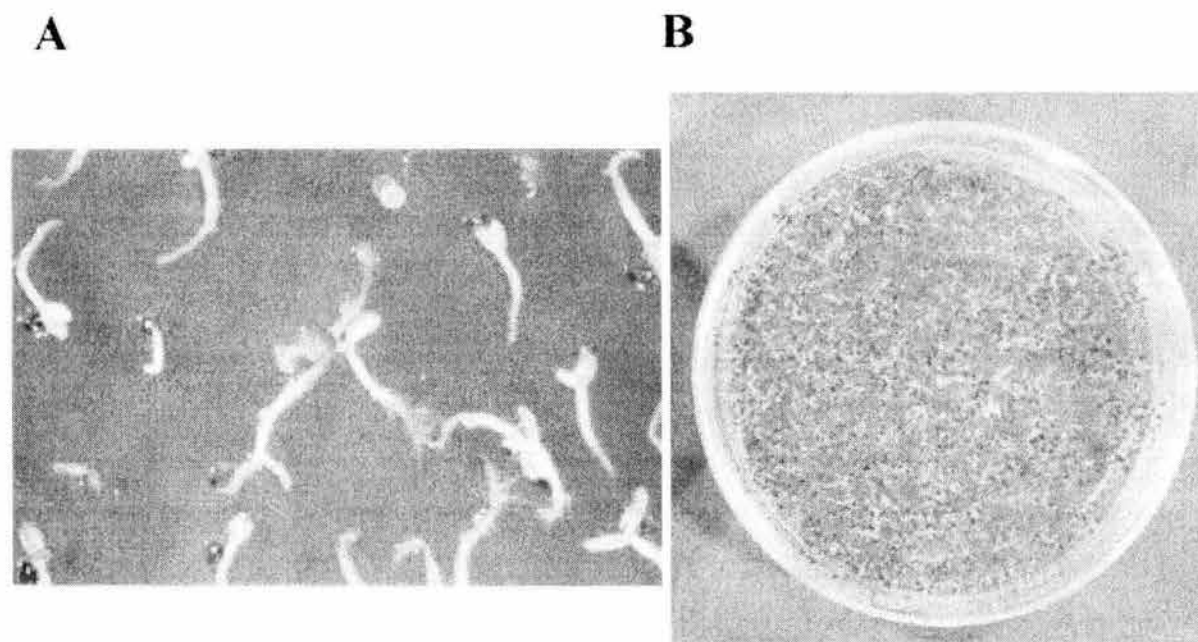


Figura 4. A. Selección de plantas resistentes a Glc al 7%. B. Fenotipo en condiciones de alta concentración de Glc de la progenie de una de las plantas seleccionadas.

Como resultado de esta segunda selección se obtuvo una colección de 163 plantas resistentes a altas concentraciones de Glc. En la siguiente tabla se resume el número de mutantes seleccionadas de cada “pool” de semillas del banco.

Tabla 9. Número de mutantes seleccionadas de cada “pool” de semillas del banco.

No. de “pool”	No. de mutantes	No. de “pool”	No. de mutantes	No. de “pool”	No. de mutantes
700	0	3400	0	5900	2
1000	0	3500	4	6000	2
1100	6	3600	0	6100	1
1200	0	3700	0	6200	2
1300	0	3800	0	6300	6
1400	0	3900	2	6400	0

Resultados

1500	0	4000	1	6500	0
1600	2	4100	0	6600	0
1700	0	4200	0	6700	2
1800	0	4300	0	6800	3
1900	14	4400	4	6900	1
2000	3	4500	0	7000	10
2100	0	4600	1	7100	8
2200	1	4700	0	7200	1
2300	0	4800	2	7300	0
2400	4	4900	2	7400	0
2500	2	5000	4	7500	0
2600	24	5100	9	7600	0
2700	1	5200	0	7700	2
2800	1	5300	0	7800	3
2900	1	5400	0	7900	0
3000	0	5500	1	8000	0
3100	0	5600	0	8100	2
3200	5	5700	24	Total de "pools"	Total plant. selec.
3300	0	5800	0	73	163

La obtención de 163 plantas resistentes a Glc puede ser un número muy alto en relación al número de líneas probadas (7300), considerando que se ha calculado que para saturar el genoma de Arabidopsis, se necesitan aproximadamente 100 000 mutantes (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997). Sin embargo, considerando que una cantidad considerable de mutantes provienen del mismo conjunto de semillas ("1 pool"= 100 líneas independientes), una parte de ellas pueden ser plantas hermanas. Además, es probable que otra parte de ellas correspondan a diferentes alelos de un mismo gen.

IV.2 Caracterización fenotípica preliminar de las mutantes resistentes a glucosa.

De la colección de mutantes generada, se seleccionaron inicialmente 7 plantas que conservaron una alta resistencia a Glc en 5 pruebas de corroboración independientes, y una segregación de ~100% de resistencia a kanamicina (Km 50 µg/ml) (Tabla 10), datos que sugerían que el gen mutado en cada una de estas plantas podría estar abanderado por el T-DNA. Estas plantas fueron nombradas preliminarmente como 20a, b y c; 24f e i, 26a y 51b, nombre que hace alusión al “pool” de donde fueron aisladas.

Tabla 10. Resistencia a Glc y Km de las 7 plantas seleccionadas (% verdes/germinadas).

Planta	Prueba 1 Glc 7%	Prueba 2 Glc 7%	Prueba 3 Glc 7%	Prueba 1 Km	Prueba 4 Glc 6.5 %	Prueba 5 Glc 7.5 %	Prueba 2 Km
20a	100	95	100	100	100	25	100
20b	97	98	100	100	100	21	100
20c	71	50	100	100	100	14	100
24f	70	97	98	100	100	23	100
24i	92	98	100	95	100	23	90
26a	100	100	100	100	100	100	100
51b	98	93	99	100	100	30	100

Las pruebas de corroboración de resistencia a Glc en concentraciones diferentes (6.5, 7 y 7.5 %) mostraron que las plantas seleccionadas no son totalmente insensibles al azúcar. De hecho al aumentar la concentración de Glc, la mayoría de ellas son menos resistentes al azúcar que en concentraciones menores de esta. En especial, la planta 26a tuvo una mayor resistencia a concentraciones tan altas como 7.5 % de Glc; en cambio, el resto no fueron tan resistentes en estas condiciones. Esto indica que las plantas seleccionadas tienen diferentes grados de resistencia a la Glc.

Con el propósito de hacer un análisis fenotípico preliminar de las mutantes seleccionadas, éstas fueron crecidas tanto *in vitro* (en caja) como en tierra. Dentro de este grupo de plantas, se observaron 4 fenotipos distinguibles con respecto a la planta silvestre, las cuales mostraron variaciones en la talla, la morfología de las raíces, la intensidad de pigmentos verdes y en el tiempo de floración y de senescencia (Tabla 11).

Tabla 11. Fenotipos de las plantas seleccionadas con respecto a la planta silvestre.

Planta	Talla	Raíz	Intensidad de pigmentos verdes	Tiempo de floración	Tiempo de senescencia
<i>In vitro</i>					
20a	Normal	Normal	Normal	Normal sin Glc Tardía con Glc	Tardía
20b	Normal	Normal	Normal	Normal sin Glc	Tardía

20c	Normal	Normal	Normal	Tardía con Glc Normal sin Glc Tardía con Glc	Tardía
24f	Normal	Raíces secundarias pequeñas y abundantes en Glc	Normal	Normal sin Glc Tardía con Glc	Tardía
24i	Normal	Raíces secundarias pequeñas y abundantes en Glc	Normal	Normal sin Glc Tardía con Glc	Tardía
26a	Normal	Normal	Normal Intensa con Glc	Temprana	Temprana
51b	Normal	Normal	Normal Intensa con Glc	Temprana	Temprana
En tierra					
20a	Normal	Normal	Normal	Tardía	Muy tardía
20b	Normal	Normal	Normal	Tardía	Muy tardía
20c	Normal	Normal	Normal	Tardía	Muy tardía
24f	Normal	Normal	Normal	Tardía	Muy tardía
24i	Normal	Normal	Normal	Tardía	Muy tardía
26a	Pequeña	Normal	Intensa	Tardía	Tardía
51b	Normal	Normal	Intensa	Tardía	Tardía

IV.2.1 Análisis del patrón de inserción del T-DNA en las mutantes seleccionadas.

Con la finalidad de tener un parámetro rápido de selección entre algunas de nuestras mutantes, y al mismo tiempo estimar si entre ellas habían plantas hermanas (dado que algunas provenían del mismo "pool" de líneas del banco), se analizó el patrón de inserción del T-DNA. Para ello, se hicieron experimentos de hibridación de DNA genómico tipo "Southern" de las mutantes seleccionadas, utilizando como sondas específicas los bordes del T-DNA (Fig. 5). Como resultado se obtuvieron 4 patrones de hibridación diferentes dentro de los cuales varias mutantes presentaron exactamente el mismo patrón de inserción. Un subgrupo con tres individuos: 20a, 20b y 20c (Fig. 4A, B, C) con una sola inserción, otro con dos individuos: 24f y 24i (Fig. 5A, B, C) con múltiples bandas de hibridación y dos grupos con un sólo individuo: 26a (Fig. 5D, E) y 51b (Fig. 5F, G) con una inserción, y en el caso de la plata 51b, un aparente rearrreglo del T-DNA en el borde derecho. Cabe mencionar que estos subgrupos correlacionan con los 4 fenotipos diferentes observados en el análisis fenotípico preliminar *in vitro* y en tierra; lo que sugiere que cada subgrupo podría representar una mutación diferente. De esta manera, los patrones de inserción del T-DNA de las diferentes mutantes indicaron que las plantas provenientes del mismo "pool", podrían ser plantas hermanas. Dos de las mutantes, la 24f y 24i presentaron un patrón complejo de hibridación de los bordes del T-DNA, lo que indica la presencia de más de un T-DNA insertado en su genoma. Estas inserciones podrían estar en tandem o en sitios diferentes del genoma. La caracterización fisiológica de una de estas plantas (26a), ahora denominada *gin5*, fue realizada por otro estudiante, constituyendo su proyecto de doctorado.

Patrón de hibridación de los bordes izquierdo y derecho del T-DNA de las plantas seleccionadas

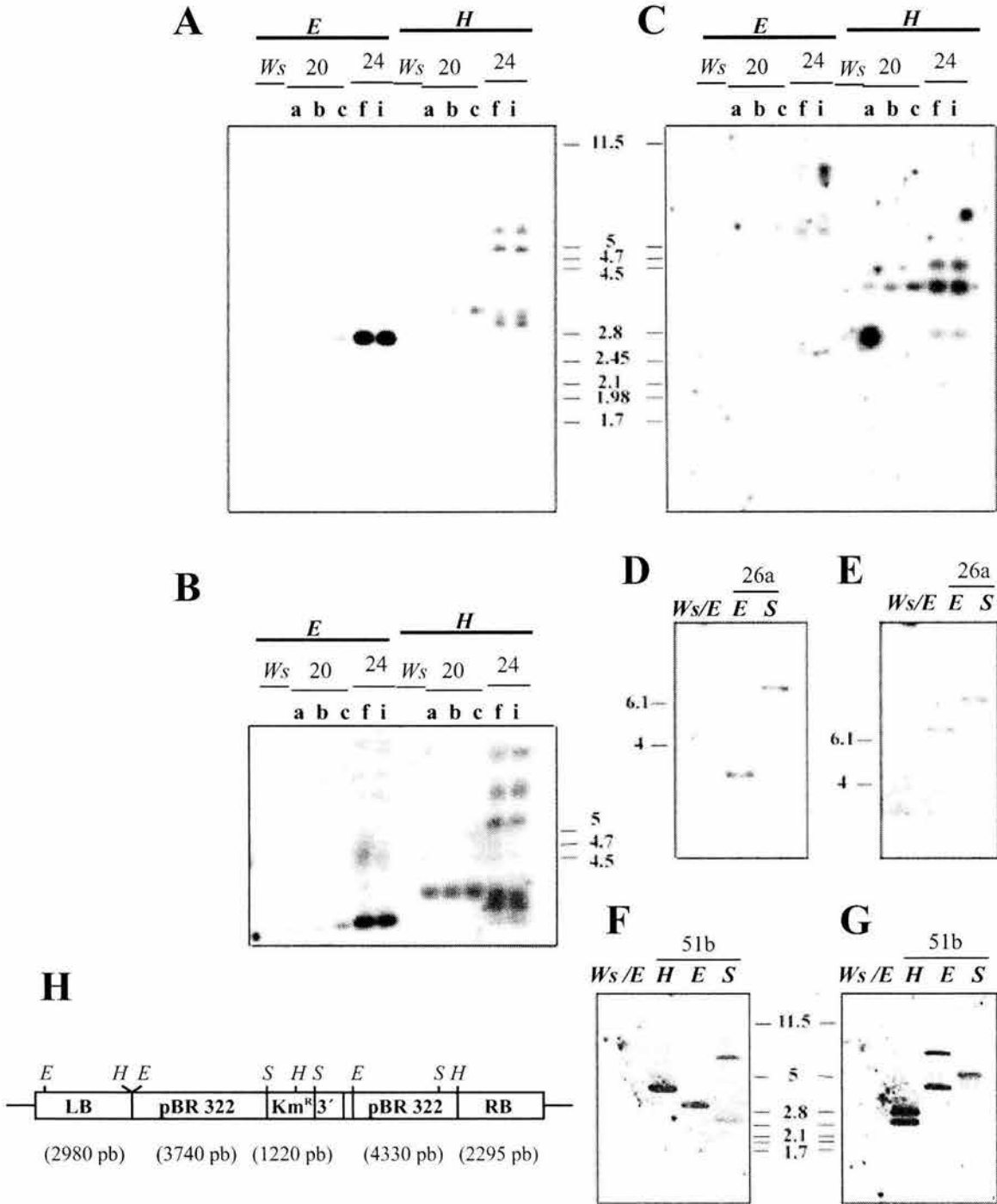


Figura 5. Análisis tipo "Southern" genómico de las plantas seleccionadas. "Southern" genómico de la planta silvestre *Ws* y las plantas resistentes a Glc 20a, 20b, 20c, 24f y 24i, hibridado con el borde izquierdo (LB) (A) y una sobre-exposición en (B), y con el borde derecho (RB) (C). "Southern" genómico de las plantas *Ws* y 26a hibridado con LB (D) y RB (E). "Southern" genómico de las plantas *Ws* y 51b hibridado con LB (F) y RB (G). Los DNAs genómicos fueron digeridos con las enzimas de restricción *Eco* RI (*E*), *Hind* III (*H*) y *Sal* I (*S*). Como referencia se muestra la estructura de T-DNA 3850:1003 utilizado para la mutagénesis del banco de semillas (H).

Con base en estos resultados se continuó la caracterización fenotípica de una planta representativa de los 3 subgrupos restantes de mutantes, las cuales fueron denominadas mutantes *gin* (“glucose *insensitive*”). A partir de este momento el nombre para cada planta representativa es *gin6* (20a), *gin7* (24f) y *gin8* (51b). Los aspectos más sobresalientes de dicha caracterización se describen a continuación.

Dado que se sabe que los azúcares regulan una variedad de procesos fisiológicos y de desarrollo, era importante saber si nuestras mutantes estaban afectadas en alguno de ellos. Para esto se evaluaron diversos aspectos de tales procesos en las plantas mutantes, que a continuación se describen.

IV.2.2 Capacidad de internalización de Glc en las mutantes *gin6*, *gin7*, *gin8*.

Con el objetivo de determinar si el fenotipo de insensibilidad a Glc en alguna de nuestras mutantes era debido a la incapacidad de internalizar/transportar este azúcar, se compararon las tasas de internalización de la Glc en *gin6*, *gin7*, *gin8* y plantas silvestres crecidas en medio con 2% de Glc por tres días y después incubadas en presencia de Glc marcada con C¹⁴ por diferentes tiempos. La radioactividad acumulada en plantas independientes fue determinada por conteo de centelleo en líquido de acuerdo al protocolo utilizado durante la caracterización de la primera mutante insensible a Glc reportada, *gin1* (Zhou *et al.*, 1998). Esta mutante fue incluida como control en nuestro ensayo. La tasa de incorporación de Glc marcada en las mutantes fue similar a la de la planta silvestre (Fig. 6), por lo que concluimos que era poco probable que la insensibilidad de estas mutantes se debiera a alguna deficiencia en el transporte de Glc. Sin embargo, de este tipo de ensayos no es posible saber el destino preciso de la Glc marcada (con C¹⁴) retenida en las plántulas de tal manera que es probable que la Glc no llegue a ser internalizada en las células, y sea retenida en los ejes vasculares o en el apoplasto.

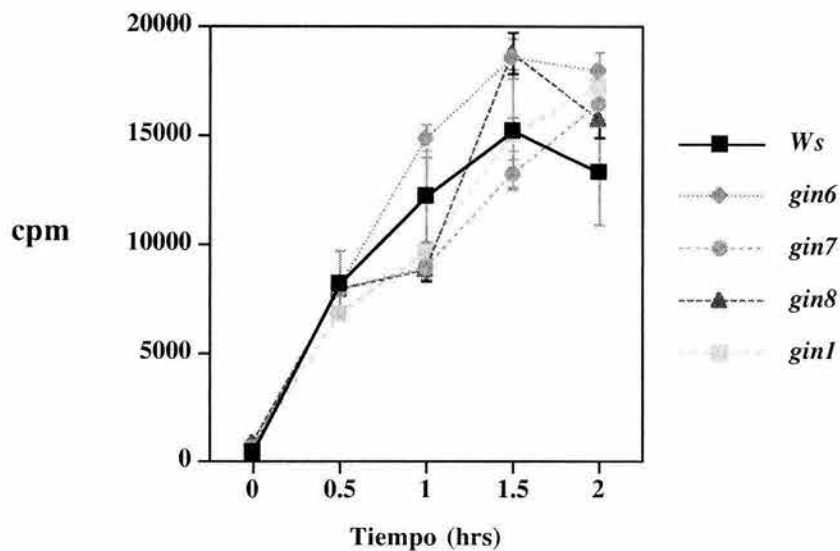
Las mutantes *gin6*, *gin7* y *gin8* no están afectadas en la internalización de Glc

Figura 6. Cuantificación de la incorporación de Glc en las mutantes *gin*. Las plantas fueron crecidas en medio líquido en presencia de Glc al 2% durante 3 d, posteriormente fueron enjuagadas e incubadas en Glc marcada con C^{14} por los tiempos indicados. Después de ello fueron lavadas varias veces con medio líquido sin Glc y se midió la emisión radioactiva en líquido de centelleo de cada uno de los individuos (10 para cada muestra). En la gráfica se muestra la media de los valores calibrados a H^3 . Como control se incluyó a la mutante *gin1*.

IV.2.3 Resistencia de las mutantes *gin* a diversas fuentes carbonadas.

Con el propósito de evaluar la resistencia de las mutantes a otras fuentes carbonadas además de la Glc (azúcar utilizada para la selección de las mutantes), se observó su fenotipo en respuesta a concentraciones altas de Frc y Sac en comparación con la Glc, incluyendo como control del efecto osmótico a un compuesto poco metabolizable, el manitol (Mtl). Los resultados de estos experimentos probaron por primera vez que además de la Glc, las altas concentraciones de Frc (6 %) también son capaces de bloquear el desarrollo de las plantas silvestres de *Arabidopsis* (Fig. 7A) aunque su efecto no es tan fuerte como el de la Glc. Concentraciones equivalentes de Sac (disacárido compuesto de Glc + Frc) no provocaron este fenotipo, por el contrario, se observó un mayor crecimiento y desarrollo de estas plantas en las condiciones y edades evaluadas (Fig. 7A). De hecho, se requieren concentraciones sumamente altas (~12%) de Sac para provocar un fenotipo de represión del desarrollo similar al obtenido con Glc y Frc (dato no mostrado). Estos datos apoyan el hecho de que las hexosas tienen un efecto más severo en el desarrollo y regulación de genes fotosintéticos (Sheen, 1994).

El crecimiento de las plantas silvestres en presencia de concentraciones de Mtl osmóticamente equivalentes, no provoca el fenotipo de ausencia de pigmentos verdes observado en presencia de la Glc, por lo que se puede concluir que este fenotipo es específico e independiente del efecto osmótico (Fig. 7A). Simultáneamente se probó si el análogo de la Glc, la 3-OmGlc que es pobremente fosforilado y metabolizado por las células, causaba un fenotipo similar a la Glc. Como se muestra en la Fig. 7A, la 3-OmGlc no tiene el mismo efecto que la Glc en la planta silvestre, por lo que se puede deducir que se requiere de la fosforilación y/o posterior metabolismo de este azúcar para producir el fenotipo observado con la Glc. Las mutantes *gin6*, *gin7* y *gin8* fueron resistentes a altas concentraciones de ambas hexosas, Glc y Frc (Fig. 6B, C y D); en cambio, en presencia de concentraciones isosmóticas de Mtl y del análogo de Glc, 3-OmGlc, no mostraron diferencias con la planta silvestre.

Fenotipo de las mutantes *gin* en diversas fuentes carbonadas

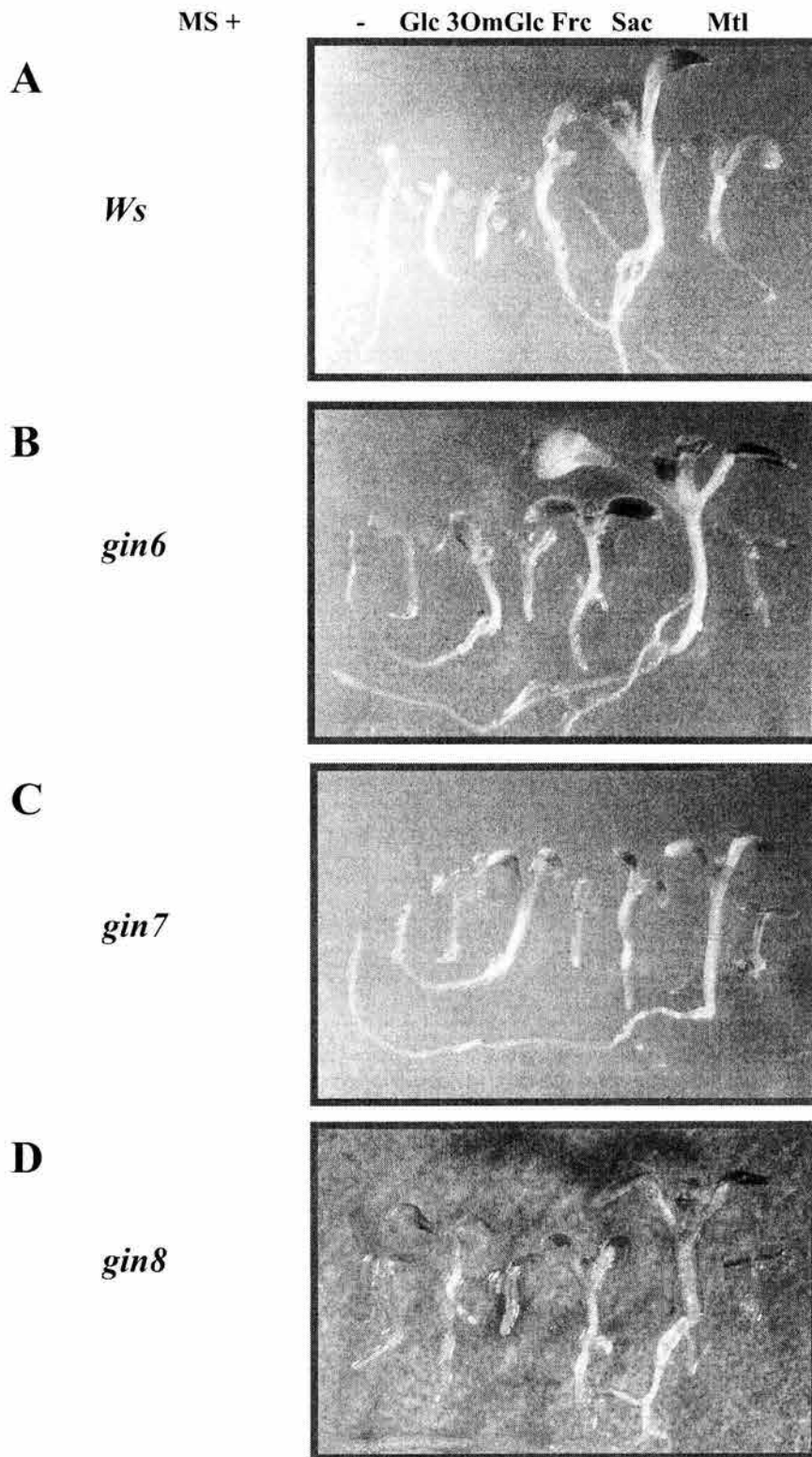


Figura 7. Fenotipo de las mutantes respecto a la planta silvestre crecidas en condiciones isosmóticas (6%) de diversas fuentes carbonadas. Las plantas fueron germinadas y crecidas en condiciones estándar por 8 d en los medios de cultivo indicados.

IV.2.4 Resistencia de las mutantes *gin* a diversas fuentes carbonadas durante la germinación.

Con el fin de determinar si la magnitud de la resistencia observada a nivel del fenotipo verde de las mutantes se reflejaba también a nivel de la velocidad de germinación, se compararon las cinéticas de germinación (considerando como germinación a la emergencia total de la radícula) de las mutantes y la planta silvestre en las mismas condiciones utilizadas para la evaluación de fenotipos. Lo que se observó fue que tanto las mutantes como las plantas silvestres retrasan su germinación de forma significativa en presencia de Glc y Frc con respecto al resto de las condiciones evaluadas (Fig. 8A). En los medios que contenían 3-OmGlc, Sac, Mtl o baja concentración de Glc, el porcentaje de germinación alcanzó prácticamente su totalidad entre el primer y tercer día, siendo poco significativas las diferencias de las cinéticas de germinación de cada planta entre estos medios (Fig. 8A). Sorprendentemente, las cinéticas de germinación de las mutantes en las condiciones probadas fueron similares a las de la planta silvestre. Es decir, la magnitud de las diferencias observadas en el desarrollo y presencia de pigmentos verdes entre la planta silvestre y las mutantes no son reproducidas de forma tan dramática durante el proceso de germinación de las semillas en presencia de alta concentración de Glc (Fig. 8B). Cabe resaltar que *gin6* germina mucho más rápido en presencia de fructosa (Fig. 8A y B), pero si se aumenta la concentración de esta hexosa, la germinación es similar a la observada en presencia de concentraciones equivalentes de Glc (datos no mostrados).

Esta serie de datos sugieren que el efecto de los azúcares durante la etapa post-germinativa y durante el proceso de germinación, se lleva a cabo de manera semi-independiente en las condiciones probadas (Glc y Frc al 6%). El hecho de que las mutantes mostraran cinéticas de germinación similares a las de la planta silvestre durante la germinación, indica que la insensibilidad a la alta concentración de Glc observada durante la etapa de desarrollo post-germinativo no es necesariamente reproducida en otras etapas de desarrollo.

Efecto de diferentes fuentes carbonadas durante la germinación

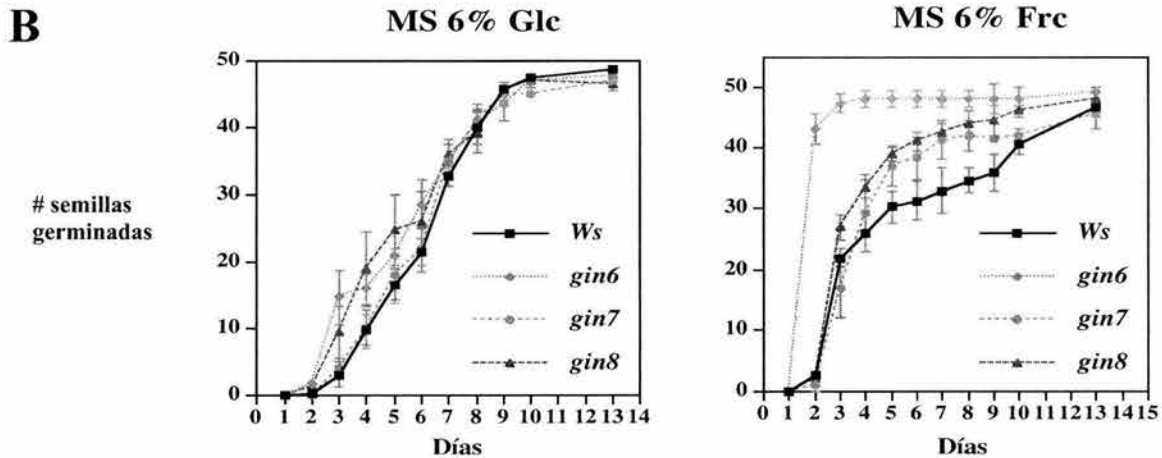
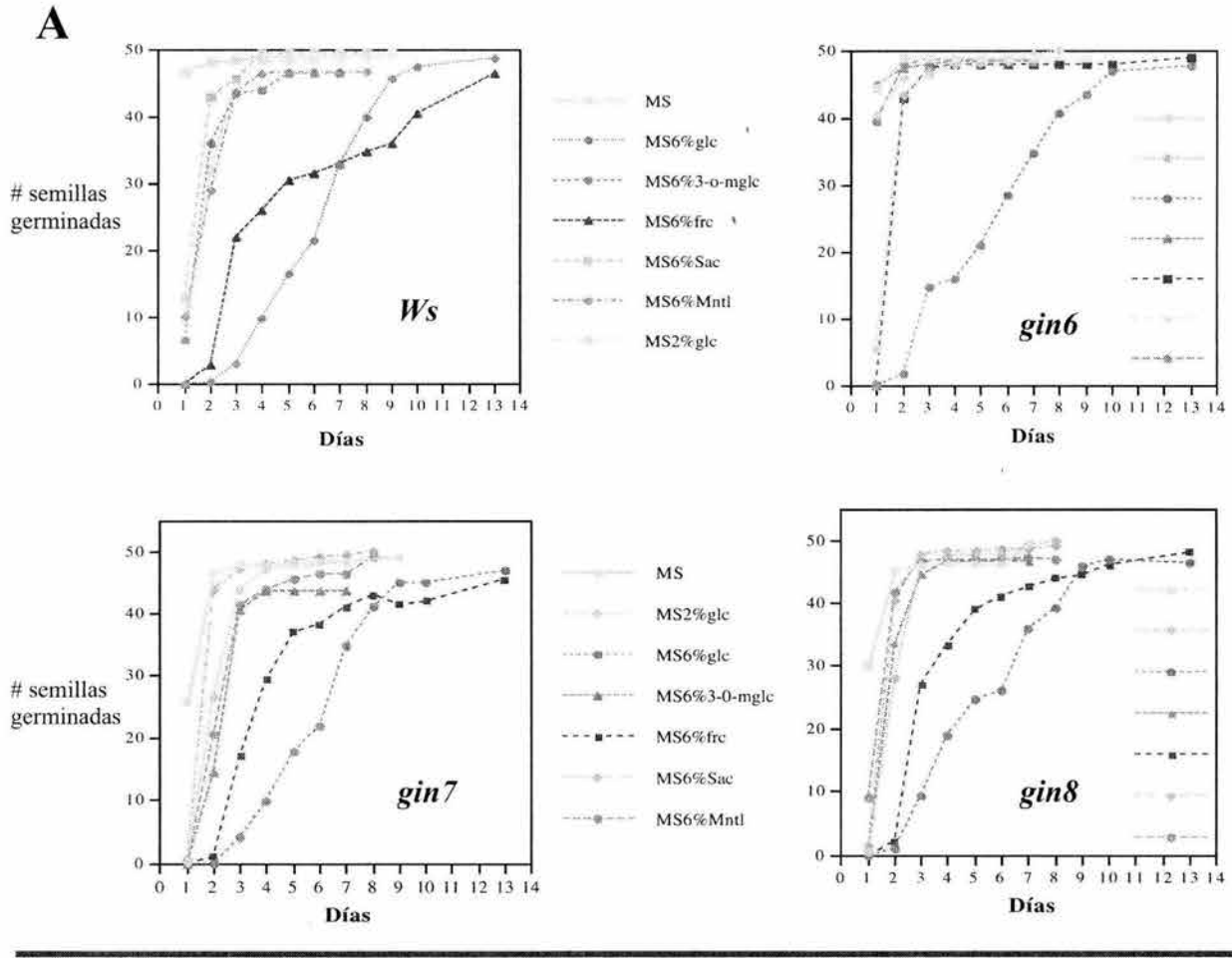


Figura 8. A. Cinéticas de germinación de la planta silvestre (*Ws*) y las mutantes en presencia de diferentes fuentes carbonadas. B. Comparación de las cinéticas de germinación en presencia de Glc y Frc. Las gráficas muestran la media de un experimento hecho por triplicado para cada uno de los medios de germinación indicados, utilizando 50 semillas en cada réplica. En A se eliminó el error estándar para disminuir la complejidad de la gráfica, pero se incluye en B.

IV.2.5 Efecto de la ausencia de la fuente nitrogenada en la respuesta fenotípica a Glc.

Las interacciones entre el metabolismo del C y N en las plantas han sido ampliamente reconocidas durante los últimos años. Siendo el C y el N elementos tan importantes, no es sorprendente que además de funcionar como metabolitos, también funcionen como señales capaces de activar una o más vías de señalización. Estos mecanismos permiten la regulación de una variedad de genes que conllevan a respuestas metabólicas y de desarrollo en la planta (Paul y Stitt, 1993). Por tales motivos se realizó un análisis preliminar en el que se evaluó si la ausencia de fuente nitrogenada en condiciones de baja concentración de Glc, afectaba la respuesta fenotípica a la Glc durante la etapa germinativa y post-germinativa en las plantas silvestres y en las mutantes. Esto se hizo evaluando su fenotipo verde y sus cinéticas de germinación en condiciones de Glc al 2% en presencia y ausencia de la fuente nitrogenada (contenida en las sales de MS).

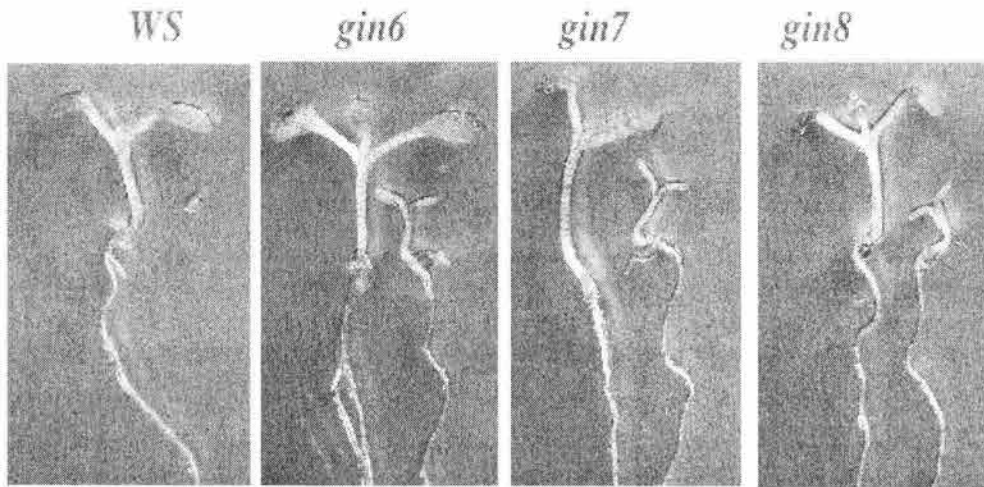
Como se observa en la Fig. 9A, al eliminar la fuente de nitrógeno, concentraciones bajas de Glc (2%) son capaces de detener el desarrollo de la planta silvestre en forma semejante a concentraciones altas de Glc (7%). En cambio, las mutantes afectadas en la detección de Glc *gin6*, *gin7* y *gin8* continuaron su desarrollo en estas condiciones (Fig. 9A). Cabe resaltar que bajo estas condiciones, las mutantes germinan mucho más rápido que la planta silvestre, haciendo mucho más evidente que las mutantes son más resistentes a la Glc aún en baja concentración (Fig. 9B y 8B). Esto sugiere que en ausencia de la fuente nitrogenada, se aumenta la sensibilidad a la Glc en la planta silvestre, y las mutantes son resistentes aún en esas condiciones.

Los resultados de estos experimentos sugieren fuertemente que la ausencia de la fuente nitrogenada es capaz de modificar y determinar la sensibilidad a Glc en las plantas tanto en la etapa de germinación (Fig. 9B), como en etapas post-germinativas (Fig. 9A). Así mismo, las plantas parecen ser capaces de responder de forma diferente a la concentración baja (2%) y alta (6%) de Glc “durante la germinación”, dado que las mutantes mostraron una mayor resistencia a la Glc en condiciones de 2% sin la fuente nitrogenada que en 6% de Glc en presencia de la fuente nitrogenada (apartado IV.2.4, Fig. 8B).

A

Crecimiento en ausencia de la fuente de nitrógeno

MS 2% Glc / 2% Glc



B

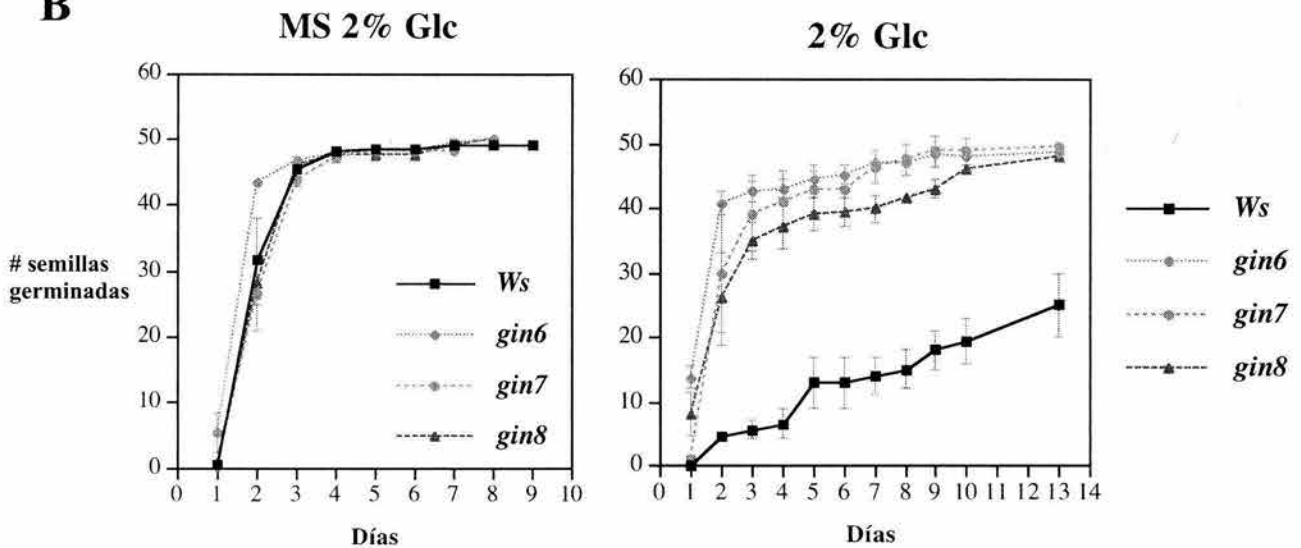


Figura 9. La ausencia de la fuente nitrogenada modifica la sensibilidad de las plantas a la Glc. A. Fenotipo de plantas silvestres (*Ws*) y mutantes crecidas en presencia de Glc al 2% con y sin la fuente de nitrógeno (sales de MS) por 10 d. **B.** Cinéticas de germinación en las mismas condiciones que en A. Las gráficas muestran la media de tres experimentos incluyendo el error estándar.

IV.2.6 Crecimiento foto/skotomorfogénico de las mutantes *gin*.

La luz es una señal determinante para la morfogénesis y desarrollo de las plantas, y esencial para el proceso fotosintético. La luz provee el poder reductor para la fijación del C, la asimilación del N, la biosíntesis de aminoácidos y otras vías metabólicas y señalizadoras. Cada vez son más las evidencias que indican la existencia de interacciones estrechas entre la señalización activada por la luz y los azúcares (Barnes et al., 1996; Dijkwel et al., 1997; Short, 1999; Thum et al., 2003; Thum et al., 2004).

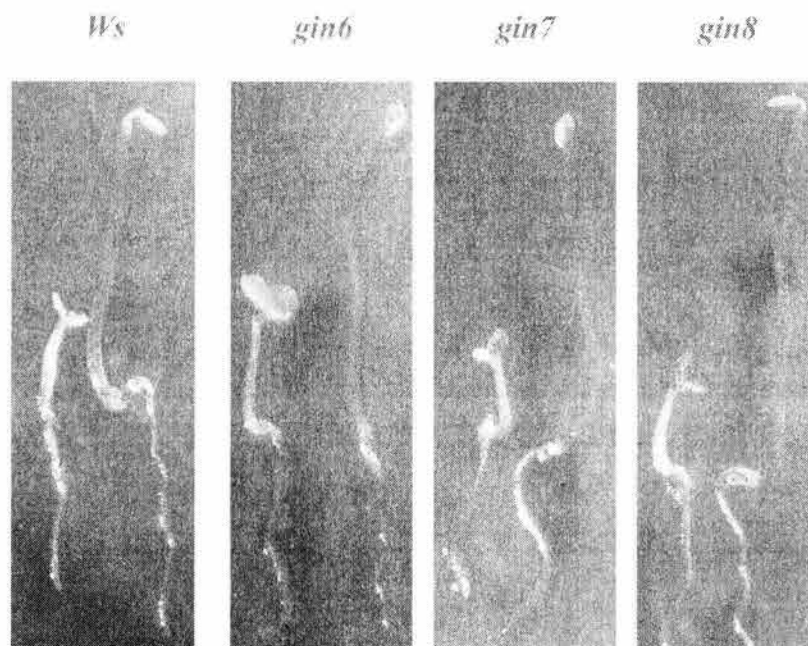
Como una forma indirecta de estimar si nuestras mutantes estaban afectadas en la señalización de la luz, se evaluó su desarrollo foto/skotomorfogénico. Esto se hizo evaluando su crecimiento en respuesta a luz y oscuridad. Las mutantes *gin6*, *gin7* y *gin8* no presentaron alteraciones en la respuesta foto/skotomorfogénica (Fig. 10A). Por lo tanto, dado que ninguna de las mutantes tiene afectada su capacidad de etiolación en la oscuridad, ni de-etiolación en la luz, se puede decir que no parecen tener afecciones visibles en la señalización por luz en las etapas de desarrollo evaluadas. Incluso, bajo condiciones de alta concentración de Glc (MS 6% Glc) en oscuridad total, las mutantes germinaron más rápido que la planta silvestre (Fig. 10B), indicando que la ausencia de luz no modifica la respuesta fenotípica a la Glc durante la germinación de la planta silvestre, y las mutantes siguieron siendo resistentes en estas condiciones (Fig. 10B).

Se sabe que plantas incapaces de etiolarse en condiciones de oscuridad total, afectan la biosíntesis y/o señalización de brasinoesteroides (Salchert *et al*, 1998). Dado que ninguna de las mutantes (*gin6*, *gin7* y *gin8*) tuvieron afectada la capacidad de etiolación, también se puede sugerir que la biosíntesis y/o señalización de los brasinoesteroides parece no estar afectada.

Bajo las mismas condiciones utilizadas para evaluar la capacidad de etiolación, también se puede evaluar el fenotipo de la triple respuesta constitutiva en estas plantas (elongación limitada del hipocotilo, engrosamiento del mismo y formación exagerada del gancho apical), la cual es característica de alteraciones en la vía de señalización activada por etileno. En este caso, ninguna de las mutantes presentó dicha respuesta cuando fueron crecidas en condiciones de oscuridad (Fig. 10A), lo que indica que el fenotipo de insensibilidad a Glc en estas plantas no se debe a alteraciones en la vía de señalización de etileno.

A

Las mutantes *gin6*, *gin7* y *gin8* no están afectadas en su crecimiento foto/skotomorfofónico



B

Ws gin6 gin7 gin8

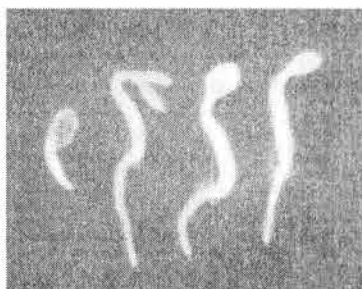


Figura 10. A. Evaluación del desarrollo foto/skotomorfofónico de las mutantes *gin6*, *gin7* y *gin8*. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio de germinación estándar en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de luz por 3 d antes de ser fotografiadas. **B. La ausencia de luz no altera la resistencia a la Glc de las mutantes *gin6*, *gin7* y *gin8* ni la respuesta de la planta silvestre.** Las plantas fueron germinadas en medio MS 6% Glc en oscuridad total por 3 d antes de ser fotografiadas.

IV.3 Análisis fenotípico, genético y molecular de la mutante *gin6*.

IV.3.1 Análisis genéticos.

Con el fin de determinar el tipo de mutación, el abanderamiento del gen y los grupos de complementación entre las diferentes mutantes seleccionadas, se hicieron cruzas de una línea representativa de cada uno de los subgrupos de mutantes con la variedad silvestre parental *Ws* así como entre ellas. Los productos de las retrocruzas fueron analizados respecto a su resistencia a Km, la cual está codificada en el T-DNA, para estimar si la mutación co-segrega con la inserción del T-DNA. Esta misma progenie también fue analizada respecto a su resistencia a Glc para determinar si la segregación del fenotipo correspondía a una la mutación de un sólo gen y si ver si era de tipo recesivo. Los productos de las cruzas de las pruebas de complementación fueron analizados respecto a su resistencia a Glc. Los resultados indicaron que las tres mutaciones son de tipo recesivo dado que presentaron una segregación mendeliana de 3:1 (~25%) en la generación filial F2. Dos de ellas, *gin6* y *gin8*, parecían estar abanderadas por el T-DNA dado que la segregación de la resistencia a Km fue de ~75%, correspondiente a la de un gen de tipo dominante como se espera para este marcador. Además entre ellas conformaron tres grupos de complementación denominados *gin6*, *gin7* y *gin8* (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de segregación mendeliana y pruebas de complementación.

Retrocruzas.

Cruza	No. individuos F1 Km ^R	F2 Glc ^R (%)	F2 Km ^R (%)	No. individuos F2
<i>Ws x gin6</i>	10	26.5	74.5	1000 en Glc, 1000 en Km
<i>Ws x gin7</i>	11	26	33.8	1100 en Glc, 1100 en Km
<i>Ws x gin8</i>	5	21	73	500 en Glc, 500 en Km

Pruebas de complementación.

Cruza	F1 Glc ^R (%)	F2 Glc ^R (%)	No. individuos F2	Conclusión
<i>gin6 x gin7</i>	0%			No alélicas
<i>gin6 x gin8</i>	No evaluada	30%	539	No alélicas
<i>gin7 x gin6</i>	No evaluada	42%	547	No alélicas
<i>gin7 x gin8</i>	No evaluada	58%	518	No alélicas
<i>gin8 x gin7</i>	0%			No alélicas

Adicionalmente, con el fin de determinar alelismos también se hicieron cruzas de *gin6* con las mutantes *gin5* y *gin1* (esta última previamente aislada por Zhou *et al.*, 1998). Los resultados indicaron que ninguna de estas mutantes son alélicas (Tabla 1 del artículo de la sección IV.3.3).

Dado que la mutante *gin6* parecía estar abanderada por el T-DNA, sin rearrreglos detectables por “Southern” genómico en ninguno de los bordes del T-DNA (apartado IV.2) y no era alélica ni a *gin5* ni a *gin1*, los esfuerzos fueron enfocados inicialmente a la identificación del gen mutado en esta planta.

IV.3.2 Análisis fenotípico y molecular de la mutante *gin6*.

Parte de los resultados más sobresalientes obtenidos con la primera mutante caracterizada, *gin6*; están incluidos en el artículo: **Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar**; en el cual funjo como primer autor con contribuciones iguales con Francisco Arenas. A continuación presento un condensado de los resultados descritos en este artículo, el cual está incluido en el apartado IV.3.3, y referiré a las figuras del mismo en esta sección.

La mutante *gin6* desarrolla cotiledones verdes y expandidos en presencia de concentraciones inhibitorias de Glc (7%), a diferencia de la planta silvestre la cual detiene su desarrollo y enverdecimiento en estas condiciones (Fig. 1A y C del artículo). Estas diferencias no se observaron cuando dichas plantas son crecidas en presencia de concentraciones isomolares de Mtl (7%), lo que indica que el fenotipo encontrado en la Glc no se debe únicamente a estrés osmótico (Fig. 1D y F). Cuando *gin6* es crecida en tierra, su fenotipo es muy similar al de la planta silvestre en cuanto a talla e intensidad de pigmentos verdes (Fig. 1G e I).

Como se mencionó anteriormente, los resultados genéticos indicaron que la mutante *gin6* parecía estar abanderada por el T-DNA. Con el objetivo de identificar el gen mutado, se aisló un fragmento de DNA genómico flanqueante al T-DNA de *gin6*, utilizando la técnica de TAIL-PCR (Liu *et al.*, 1995). Los resultados de clonación y secuenciación del fragmento flanqueante al T-DNA indicaron que la inserción se localizaba 2 Kb arriba del inicio de la traducción del gen *ABI4* (Fig. 2A). Los análisis de RT-PCR mostraron que el transcrito de *ABI4* se acumula en plantas silvestres en respuesta a altas concentraciones de Glc, mientras que la mutación *gin6* afecta dicha acumulación (Fig. 2B). El gen *ABI4* había sido previamente identificado en la mutante insensible a la hormona ácido abscísico (ABA), *abi4-1*. *ABI4* codifica para un factor transcripcional que presenta un dominio de unión a DNA denominado AP2, y se sabía que participaba durante la maduración de las semillas y en las respuestas a ABA durante la germinación (Finkelstein *et al.*, 1998). Las pruebas de sensibilidad a ABA corroboraron que la mutante *gin6* también es insensible a esta hormona, es decir, presenta un fenotipo *abi* (“*aba-insensitive*”) (Fig. 3E). Por lo tanto concluimos que la mutante *gin6* es alélica a la mutante *abi4-1*. Con base en estos resultados, probamos la sensibilidad a Glc de todas las mutantes insensibles a ABA reportadas

(Koornneef *et al.*, 1984; Finkelstein, 1994). Sorprendentemente, sólo *abi4-1* y *abi5-1* fueron insensibles a Glc, no así *abi1-1*, *abi2-1* y *abi3-1* (Fig. 2C). Este resultado sugiere que sólo algunos de los elementos de la vía señalizadora de ABA también participa en las respuestas a Glc, y muestra que *abi5* es una nueva mutante *gin* (Fig. 2C). La identidad molecular de *ABI5* fue reportada posteriormente y actualmente se sabe que codifica para un factor transcripcional tipo bZIP (con un cierre básico de leucina) que regula la expresión de genes de respuesta a ABA (Finkelstein y Lynch, 2000; López-Molina y Chua, 2000). Estos resultados sugieren que la vía de señalización de ABA y la vía de la señalización de Glc comparten al menos dos elementos señalizadores: ABI4 y ABI5.

Paralelamente, la caracterización de la mutante *gin5* por Francisco Arenas, reveló que esta planta es deficiente en ABA, y que la acumulación de ABA es esencial para las respuestas a Glc mediadas por la HXK. También se demostró que tres mutantes deficientes en ABA previamente aisladas (*aba1-1*, *aba2-1* y *aba3-2*) son insensibles a Glc, por lo se concluyó que se requiere de elevar los niveles de ABA para la respuesta a Glc. Más aún, la aplicación exógena de concentraciones nanomolares de ABA restablece la sensibilidad a Glc tanto en *gin5* como en las mutantes *aba*, pero no así en *gin6/abi4*, lo que concuerda con la naturaleza de esta mutante insensible a ABA (Fig. 4K y L). Dicho resultado a su vez sugiere que ABI4 podría actuar cerca del final de la señalización por Glc mediada por ABA.

Dada la participación de ABA en la señalización de la Glc, se analizó la expresión de genes regulados tanto por Glc como por ABA en la planta silvestre y en la mutante *gin6/abi4*. Este análisis mostró que dos genes fotosintéticos que se reprimen con Glc por la vía dependiente de HXK, *CAB1* y *PC* (Sheen *et al.*, 1999), están desregulados en la mutante *gin6/abi4*. En contraste el gen *PAL1*, que se induce en respuesta a Glc por una vía independiente de HXK (Ehness *et al.*, 1997), no parece estar afectado. Tales resultados sugieren que *gin6/abi4* podría afectar la regulación por Glc dependiente de HXK (Fig. 5A). Adicionalmente se analizó la expresión de genes inducibles por ABA y por estrés hídrico como *EM6*, *ADH* y *COR15A* (Gaubier *et al.*, 1993; Wilhelm y Thomashow, 1993; de Bruxelles *et al.*, 1996). Se observó que los niveles de transcrito de estos genes también se inducen por Glc al 7% en las plantas silvestres y *gin6* afecta la inducción de *EM6* y *ADH* pero no de *COR15A* (Fig. 5B). Estas observaciones indican que la expresión de los genes *EM6* y *ADH* depende de ABI4, pero no así la expresión de *COR15A*; es decir, aparentemente existe un subgrupo de genes inducibles por ABA que también son regulados por Glc de forma dependiente de ABI4.

En conjunto, estos resultados constituyeron la primera evidencia que demuestra la participación del ABA en las respuestas a Glc, mediante la regulación de los niveles de ABA a través de GIN5, y la señalización de ABA a través de GIN6/ABI4 y ABI5 (Fig. 7).

IV.3.3 Artículo:

Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar.

Analilia Arroyo, Francisco Arenas, Li Zhou, Jen Sheen and Patricia León.

Genes and Development. 14(16): 2085-2096, 2000.

Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar

Francisco Arenas-Huertero,^{1,3} Analilia Arroyo,^{1,3} Li Zhou,² Jen Sheen,² and Patricia León^{1,4}

¹Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México; ²Department of Genetics, Harvard Medical School, and Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114 USA

Sugars have signaling roles in a wide variety of developmental processes in plants. To elucidate the regulatory components that constitute the glucose signaling network governing plant growth and development, we have isolated and characterized two *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, based on a glucose-induced developmental arrest during early seedling morphogenesis. The T-DNA-tagged *gin6* mutant abrogates the glucose-induced expression of a putative transcription factor, ABI4, previously shown to be involved in seed-specific abscisic acid (ABA) responses. Thus, ABI4 might be a regulator involved in both glucose- and seed-specific ABA signaling. The characterization of the *gin5* mutant, on the other hand, reveals that glucose-specific accumulation of ABA is essential for hexokinase-mediated glucose responses. Consistent with this result, we show that three ABA-deficient mutants (*aba1-1*, *aba2-1*, and *aba3-2*) are also glucose insensitive. Exogenous ABA can restore normal glucose responses in *gin5* and *aba* mutants but not in *gin6* plants. Surprisingly, only *abi4* and *abi5-1* but not other ABA-insensitive signaling mutants (*abi1-1*, *abi2-1*, and *abi3-1*) exhibit glucose insensitivity, indicating the involvement of a distinct ABA signaling pathway in glucose responses. These results provide the first direct evidence to support a novel and central role of ABA in plant glucose responses mediated through glucose regulation of both ABA levels by GIN5 and ABA signaling by GIN6/ABI4.

[Key Words: Glucose insensitive; *Arabidopsis thaliana*; glucose regulation; ABA; *abi*; hexokinase]

Received February 18, 2000; revised version accepted June 27, 2000.

Sugars act as regulatory molecules that control many aspects of physiology and development in both prokaryotes and eukaryotes (Grupe et al. 1995; Saier et al. 1995; Koch 1996; Smeekens and Rook 1997; Gancedo 1998; Gibson and Graham 1999; Roitsch 1999; Sheen et al. 1999). In higher plants, sugar signals modulate many important processes such as germination, seedling development, leaf and root morphogenesis, flowering, embryogenesis, wounding and pathogen responses, and senescence, in addition to gene expression (Koch 1996; Moore and Sheen 1999; Sheen et al. 1999; Wobus and Weber 1999).

Although sucrose is the major carbon form translocated in plants and is likely to mediate sucrose-specific signaling pathways (Chiou and Bush 1998; Rook et al.

1998), hexoses seem to play a major role in plant sugar regulation (Sturm and Tang 1999). Different lines of evidence point to the involvement of hexokinase (HXK) as a critical component in one of the sugar sensing and signaling pathways in plants (Jang and Sheen 1997; Smeekens and Rook 1997; Pego et al. 1999; Sheen et al. 1999). Analysis of transgenic *Arabidopsis* plants with either increased or decreased HXK levels show a hyper- or hypersensitivity to high glucose concentrations during germination and seedling development (Jang et al. 1997). Overexpression of AtHXK1 in transgenic tomato also alters photosynthesis, growth, and senescence (Dai et al. 1999). Recent studies with an AtHXK1 null mutation indicate its predominant role in many glucose responses and the uncoupling of glucose signaling from glucose metabolism (Moore and Sheen 1999). This HXK-dependent sugar signaling pathway has been shown to be responsible for the regulation of genes including several photosynthetic genes, nitrate reductase, and others (Jang and

³These authors contributed equally to this work.

⁴Corresponding author.

E-MAIL patricia@ibt.unam.mx; FAX 52-(73)-172388 or 139988.

Sheen 1997; Sheen et al. 1999). In addition, through HXK-independent pathways, glucose also positively regulates the expression of another set of genes [Koch 1996; Smeeckens and Rook 1997; Roitsch 1999; Sheen et al. 1999]. The evidence thus far supports the existence of multiple glucose sensing and signal transduction pathways in higher plants [Smeeckens 1998; Roitsch 1999; Sheen et al. 1999].

With the use of biochemical and molecular approaches, putative components of various sugar signal transduction pathways have been identified. There is evidence for the participation of protein phosphatases, calcium-dependent protein kinases, mitogen-activated protein kinases, and SNF1-related protein kinases (SnRK) (for review, see Smeeckens and Rook 1997; Sheen 1999). However, the precise roles of most of these molecules in the sugar signal transduction pathways remain to be elucidated.

To dissect the multiple sugar signaling pathways, two general strategies have been employed to isolate sugar response mutants in *Arabidopsis*. In one, genetic screenings based on sugar-regulated gene repression or activation have yielded sucrose-uncoupled (*sun*), reduced sucrose responses (*rsr*), and low and high β -amylase (*lba*, *hba*) mutants [Dijkwel et al. 1997; Martin et al. 1997; Mita et al. 1997a,b]. The alternative strategy takes advantage of the striking developmental arrest imposed by high concentrations of hexoses or sucrose on early seedling development. Sugar response mutants selected by this method include glucose insensitive (*gin*), glucose oversensitive (*glo*), carbohydrate insensitive (*cai*), sucrose insensitive (*sis*), and mannose-insensitive germination (*mig*) [Smeeckens and Rook 1997; Zhou et al. 1998; Sheen et al. 1999]. The characterization of these mutants has started to provide important information about novel cross-talk between sugar and other signaling pathways mediated by phytohormones, nitrogen, and light signals [Sheen 1999]. For example, an *Arabidopsis* pleiotropic mutant, *prl1*, displays enhanced sensitivity to sucrose and affects the responses to several plant hormones [Németh et al. 1998]. The *PRL1* gene encodes a WD-protein that potentially interacts with multiple signaling components, including the *Arabidopsis* SNF1 homologs [Bhalerao et al. 1999]. The analysis of *gin1* [Zhou et al. 1998], on the other hand, revealed an interesting link between the HXK-dependent glucose and the ethylene signal transduction pathways.

To further reveal the complex signaling network that connects glucose and other signaling pathways in plants, we are characterizing new *gin* mutants in *Arabidopsis thaliana*. We report here the physiological, genetic, and molecular analyses of two recessive glucose-insensitive mutants, *gin5* and *gin6*. Both mutants demonstrate an essential role for ABA in the glucose signaling pathway controlling vegetative development. We have cloned the T-DNA-tagged *gin6*. Interestingly, this gene corresponds to *ABI4*, a putative transcription factor important for ABA signaling in seeds, carrying an APETALA2 (AP2) domain [Finkelstein et al. 1998]. The analysis of this new *abi4* allele showed that *ABI4* is required in the glucose-

mediated developmental arrest during vegetative morphogenesis. *ABI4* is positively regulated by glucose at the transcriptional level. The participation of *ABI* genes in the glucose signal transduction pathway is specific for *ABI4* and *ABI5* but not for other ABA signaling genes, *ABI1*, *ABI2*, and *ABI3*. The characterization of the *gin5* mutant, on the other hand, has revealed that a glucose-specific up-regulation of ABA levels is a prerequisite of glucose signaling during seedling development. Consistent with this result, we show that the ABA biosynthesis-deficient mutants *aba1-1*, *aba2-1*, and *aba3-2*, are also glucose insensitive. In addition, the altered glucose response of the *gin5* mutant can be reverted by the addition of exogenous ABA. Thus, *GIN5* is important for the regulation of ABA levels in response to glucose signals.

Although the participation of ABA during seed development, germination, and stress responses is well established, our data provide the first direct evidence to support a novel and central role of ABA in the plant glucose signal transduction pathway governing postembryonic development. Apparently, glucose regulates ABA levels through *GIN5* and involves ABA signaling through *GIN6/ABI4*. Both events are responsible for HXK-mediated responses and constitute part of the glucose signaling network in plants.

Results

Isolation and genetic analyses of the gin5 and gin6 mutants

A genetic screen based on developmental arrest in the presence of high glucose levels has resulted in the isolation of glucose insensitive (*gin*) mutants in *A. thaliana* [Zhou et al. 1998]. With the aim to obtain additional components of the glucose sensing and signaling pathways, an extensive screening for *gin* mutants was performed using a T-DNA-mutagenized *A. thaliana* collection provided by DuPont Co. A total of 204,400 seeds from 7300 initial independent transformants of this T-DNA collection were screened. Several new *gin* mutants were selected from this screen. Two of them, referred to as *gin5* and *gin6*, that displayed robust glucose insensitivity were chosen for further characterization.

In contrast to wild-type seedlings (Fig. 1A), the *gin5* and *gin6* mutants develop green and expanded cotyledons when grown in the presence of 7% glucose in the medium (Fig. 1B,C, respectively). This developmental difference between wild-type plants (Fig. 1D) was not observed when both mutants, *gin5* (Fig. 1E) and *gin6* (Fig. 1F), were grown in the presence of 7% mannitol. In contrast to glucose, mannitol is not efficiently metabolized by plants, causing a constant osmotic stress that might affect plant growth. However, the effect of mannitol is similar in wild-type and *gin* mutants suggesting that the developmental arrest is glucose-specific and not linked to osmotic stress as reported [Zhou et al. 1998]. We have also observed that *gin5* plants exhibit a significantly smaller size and darker green leaves (Fig. 1H) compared

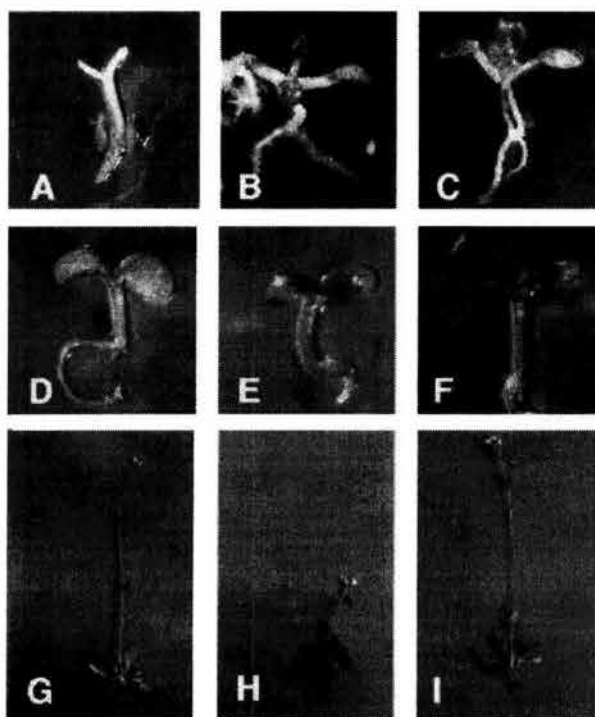


Figure 1. Phenotype of *gin5* and *gin6* mutants. Seedlings of WS wild-type (A,D), *gin5* (B,E), and *gin6* (C,F) grown for 10 days under 16:8 hr photoperiod in GM medium supplemented with 7% glucose (A-C) or 7% mannitol (D-E). Phenotype of 4-week-old WS wild-type (G), *gin5* (H), and *gin6* (I) plants grown in Metro Mix 200 in 15:9 photoperiod.

with wild-type plants (Fig. 1G). This phenotype cosegregated with *gin5* and was maintained throughout the life cycle of the plant. This characteristic is not observed in the *gin6* mutant (Fig. 1I), whose size and leaf color do not show any appreciable differences compared with wild-type plants.

Genetic analyses were conducted to define the Mendelian character of the *gin5* and *gin6* mutations. A backcross with the WS wild-type plants showed that the mutant phenotypes were absent in the F_1 plants and present in a 1:3 ratio in the F_2 families. These results indicate

that *gin5* and *gin6* behave as single recessive mutants (Table 1). Another glucose-insensitive mutant (*gin1-1*), that exhibits similar phenotypes has been reported previously (Zhou et al. 1998). Allelism tests between these three *gin* mutants show that they define three different complementation groups (Table 1).

In the case of the *gin6* mutant, the segregation analyses of F_3 families from 33 independent self-pollinated F_2 glucose-insensitive plants showed that the kanamycin-resistant phenotype was always linked to glucose insensitivity. This suggests that the mutant phenotype is likely due to a T-DNA insertion. Southern blot analysis confirmed the presence of one T-DNA insertion in the *gin6* mutant genome (data not shown). In contrast, the tagging status of the *gin5* mutant was uncertain, and thus genetic mapping was carried out to determine its chromosomal location. A mapping population was generated by crossing *gin5* homozygous mutant plants with the WT Ler ecotype. The chromosomal location of *gin5* was determined through the analysis of the mutant F_2 DNA, using simple sequence length polymorphism (SSLP) markers (Bell and Ecker 1994). The *GIN5* gene is located on chromosome 1. The results from the analysis of 280 chromosomes indicated that the *gin5* mutation mapped 20 cM centromeric from the SSLP marker nga59.

Molecular cloning of the GIN6 gene

To isolate sequences flanking the T-DNA insertion site in the *gin6* mutant plant, thermal asymmetric interlace (TAIL)-PCR was performed (Liu et al. 1995). A single PCR fragment of ~450 bp was isolated after four enrichment cycles as described in Materials and Methods. The PCR fragment was cloned and sequenced revealing the presence of 48 bp that perfectly matched the left border of the T-DNA and 373 bp of novel sequence. Genomic DNA blot analysis of *gin6* and wild-type plants confirm that the isolated PCR fragment was indeed interrupted in the *gin6* mutant plants by the T-DNA (data not shown). BLAST database searches revealed that this fragment shares 100% identity with a sequence from a cluster of ABA-regulated genes contained in the BACT07M07 (Wang et al. 1999). As shown in Figure 2A, the insertion site was located at position 44568 of the BAC sequence, in a postulated intragenic region 2 kb

Table 1. Genetic segregation and complementation tests

Cross	Family	Total	Observed number		χ^2 (3:1)
			mutant	wt	
<i>GIN5/GIN5</i> × <i>gin5/gin5</i>	F_1	87	—	87	
<i>GIN5/GIN5</i> × <i>gin5/gin5</i>	F_2	2925	773	2150	3.25*
<i>GIN6/GIN6</i> × <i>gin6/gin6</i>	F_1	11	—	11	
<i>GIN6/GIN6</i> × <i>gin6/gin6</i>	F_2	600	159	441	0.72*
<i>gin5/gin5</i> × <i>gin1-1/gin1-1</i>	F_1	57	—	57	
<i>gin6/gin6</i> × <i>gin1-1/gin1-1</i>	F_1	43	—	43	
<i>gin5/gin5</i> × <i>gin6/gin6</i>	F_1	16	—	16	

Mutant phenotypes were scored from seedlings grown in GM plates containing 7% glucose.

*Not significant at $P = 0.05$.

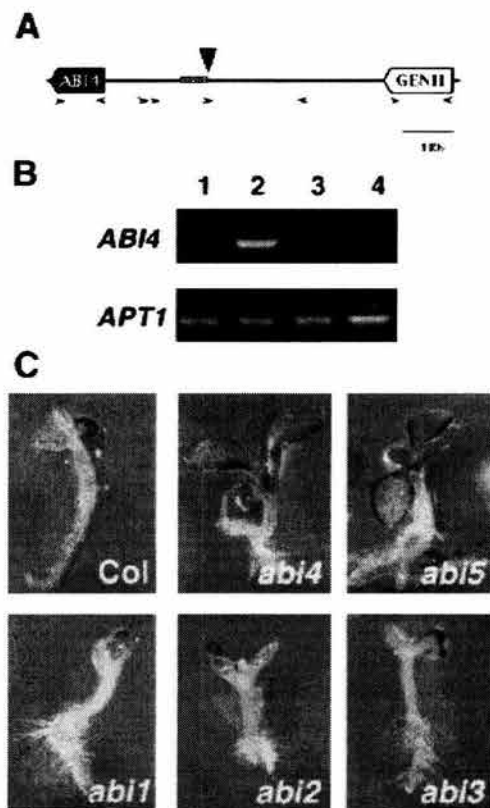


Figure 2. Molecular characterization of the *GIN6* gene and phenotypic analysis of *abi* mutants. (A) The *GIN6* locus. A region (shaded box) of the BAC T07M07 shows a 100% sequence identity with the genomic flanking sequence of the T-DNA insertion site (vertical arrow) of the *gin6* mutant. The horizontal arrows indicate the different primers used to determine the integrity of the sequences flanking the insertion site. The *ABI4* gene begins at position 42,623 and *gene 11* ends at position 48,323. (B) Glucose induction of the *ABI4* transcript is diminished in *gin6*. Ethidium bromide-stained RT-PCR product (974 bp) of *ABI4* from WS wild-type grown on 2% (lane 1) or 7% glucose (lane 2) and from the *gin6* mutant grown on 2% (lane 3) or 7% glucose (lane 4). The RT-PCR product of the *APT1* gene (478 bp) was used as a control. (C) Glucose insensitivity is detected in *abi4-1* and *abi5-1* but not in *abi1-1*, *abi2-1*, or *abi3-1*. Seedlings were grown on GM medium containing 7% [*abi5*] or 7.5% [others] glucose for one week under 16:8 hr light:dark photoperiod.

upstream of a previously reported gene, *ABI4*, and 3 kb downstream of a putative gene called gene 11. The sequence around the insertion site did not reveal any open reading frames that could be affected by this insertion. To establish the integrity of the sequences flanking the T-DNA insertion site and to exclude any possible rearrangements that might be the cause of the mutant phenotype, multiple primers were designed to perform PCR and sequencing analysis of a 4-kb region surrounding the T-DNA insertion site in mutant and wild-type plants (Fig. 2A). Based on the sizes of the PCR fragments amplified within this region, no appreciable differences

were observed between *gin6* and WS wild-type plants (data not shown). This demonstrates that no major rearrangements occur in the *gin6* mutant. To verify whether the T-DNA insertion affects the expression of the flanking genes, RT-PCR was carried out using specific primers for the coding region of *ABI4* and gene 11. As shown in Figure 2B, an increase was observed in the expression level of the *ABI4* gene transcript in wild-type plants when grown in the presence of 7% glucose. In contrast, the *APT1* gene that codes for the adenine phosphoribosyltransferase (Moffatt et al. 1994) used as a control is not regulated by glucose. More importantly, this glucose induction was strongly diminished in *gin6* plants. No expression of gene 11 was detected either in wild-type or mutant plants in any of the conditions tested so far. In conclusion, we have demonstrated that the *ABI4* gene responds positively to glucose and that in the *gin6* mutant the T-DNA insertion affects the expression levels of the *ABI4* gene in response to glucose.

Glucose signaling is mediated by specific ABI genes

Previous studies report that the *ABI4* gene might be a putative transcription factor that participates in a seed-specific ABA signaling network but does not seem to contribute to vegetative ABA responses, despite its expression in shoots and roots (Finkelstein 1994; Finkelstein et al. 1998). Our results indicate that *ABI4* participates in the glucose signaling pathway during vegetative growth. Hence, it was of interest to determine the effect of the original *abi4* mutation on glucose responsiveness. This original *abi4* allele consists of a frameshift mutation that causes an early translation termination (Finkelstein et al. 1998). Thus *Col-0* wild-type and *abi4* mutant plants were germinated in the presence of 7.5% glucose. As shown in Figure 2C, *abi4* plants were able to continue their development in spite of the presence of high glucose concentrations and they behaved like a glucose-insensitive mutant. We conclude that the *ABI4* gene, aside from its role in seed development and germination, participates in the glucose signal transduction pathway and that the *gin6* mutant represents a new allele of this gene, affected in its glucose-mediated regulation. In addition to *ABI4*, mutations in other genes [*ABI1*, *ABI2*, *ABI3*, and *ABI5*] involved in the ABA signal transduction pathway have been isolated (Koornneef et al. 1984; Finkelstein 1994; Nambara et al. 1995). The participation of these four genes in glucose signaling was also investigated based on each mutant's ability to develop in the presence of high glucose concentrations. Surprisingly, only *abi5-1* (Fig. 2C) was glucose insensitive; *abi1-1*, *abi2-1*, and *abi3-1* displayed a glucose-sensitive phenotype similar to their wild-type counterparts. *ABI5* has been recently cloned and demonstrated to encode a basic leucine zipper transcription factor that regulates the expression of several genes (Finkelstein and Lynch 2000). It appears that the ABA-mediated glucose signaling pathway belongs to a new branch in which only the *ABI4* and *ABI5* genes participate as signaling molecules.

gin5 is affected in ABA-mediated responses

The most striking characteristic of the *gin5* mutant in comparison to wild-type plants (Fig. 3A) is its enhanced drought sensitivity (Fig. 3B). Several mutants affected either in the biosynthesis or in the sensitivity to ABA have a wilted phenotype [MacRobbie 1991]. This wilted phenotype was never detected in the *gin6* mutant, but it was linked to the glucose insensitivity in *gin5* plants after several generations, suggesting that the same locus is responsible for both traits. Interestingly, as shown in Figure 3C, the addition of $3\mu\text{M}$ of ABA to *gin5* plants prevents the wilted phenotype observed under mild water stress conditions (Fig. 3B).

It has been established that ABA plays an important role in the promotion of seed dormancy [Koornneef and Karssen 1994]. As shown in Figure 3D, *gin5* seeds were less dormant than wild-type. The *gin5* seeds had 90% seed germination two days after imbibition without cold treatment. In contrast, only 12% germination was observed in wild-type seeds. Exposure to cold treatment prior to germination resulted in 100% germination in both the *gin5* mutant and wild-type plants because the treatment eliminates the endogenous ABA levels and breaks dormancy. In contrast, the *gin6* mutant did not show alterations in seed dormancy (data not shown).

We also examined the sensitivity of seeds to ABA during germination in both mutants. Although *gin5* seeds display a sensitivity to the ABA inhibition of germination similar to that of wild-type seeds (Fig. 3E), *gin6* mutant seeds can germinate in the presence of high ABA concentrations. These results suggest that *gin5* plants are able to sense and respond to the exogenous application of ABA, whereas *gin6* behaves as an ABA-insensitive mutant.

gin5 is insensitive to glucose regulation of ABA levels

Contrary to the *gin6* mutant, the drought sensitivity and decreased seed dormancy in the *gin5* mutant indicate that this plant may contain low endogenous ABA levels. To test this hypothesis, the endogenous levels of ABA were measured in 15-day-old seedlings of *gin5*, *gin6*, and wild-type grown in different conditions. As shown in Table 2, *gin5* mutant plants contain lower ABA levels (7 ng/gram fresh weight) than both *gin6* (19 ng/gram fresh weight) and wild-type (14 ng/gram fresh weight) seedlings when grown on GM medium. Interestingly, a dramatic increase (seven- to ninefold) in the ABA levels was observed in *gin6* and wild-type plants but not in *gin5* plants when grown with 7% glucose in the medium (10 ng/gram fresh weight). Thus, *gin6* mutant and wild-type plants respond to the presence of 7% glucose by increasing their endogenous ABA level and the *gin5* mutant does not seem to be able to promote such a response. This glucose induction of ABA levels is independent of the plant morphological status as both *gin6* mutant and wild-type plants respond similarly in spite of the fact that the wild-type plants are arrested at an early developmental stage. The ABA levels were also similarly enhanced by glucose at an early developmental stage (Table

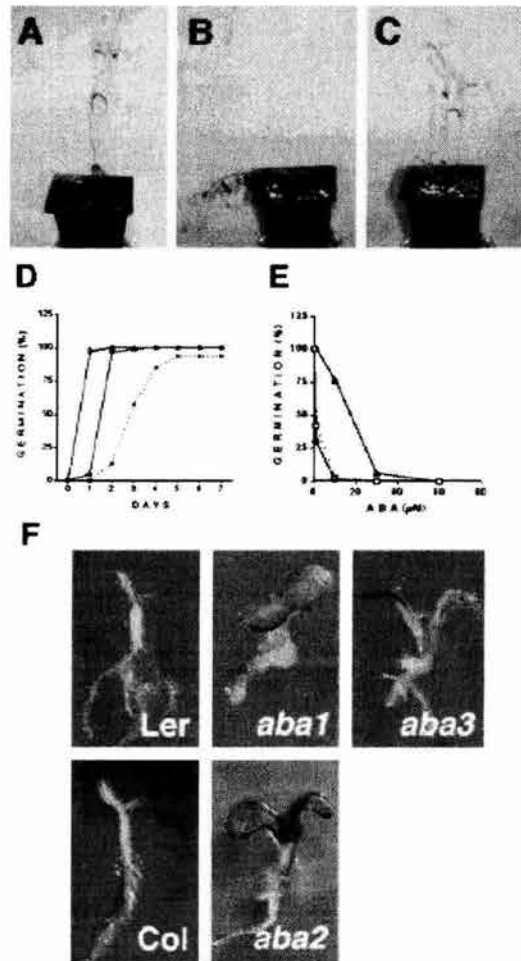


Figure 3. ABA-mediated responses in *gin5* and *gin6* mutants. *gin5* and wild-type plants were grown under well-watered conditions for 3 weeks and then subjected to drought stress by withholding water for 5 days. The plants were then sprayed with 10 ml of either water (A,B) or $3\mu\text{M}$ of ABA water solution (C) on days 3 and 5 of the stress treatment. (D) Dormancy analysis. Germination of seeds from WS wild-type (broken line) and the *gin5* mutant (solid line) were examined without cold treatment (crosses; \blacksquare) or with a 24-hr cold treatment (\circ , \blacktriangle). Germination was scored when the radicle tip had fully emerged from the seed coat. These data represent the average of three independent experiments evaluating 80 seeds. The standard error was smaller than the symbol size. (E) ABA dose response in germination. Wild-type (broken line), *gin5* (solid line, circles) and *gin6* (solid line, triangles) seeds were analyzed. The data correspond to the average of two different experiments each containing around 50 seeds per data point. The number of germinated seeds was expressed as the percentage of fully germinated seeds of the total seeds plated. (F) Phenotype of *aba* mutants in the presence of high glucose. *Ler* and *Col* wild-type seedlings, *aba1-1*, *aba3-2*, and *aba2-1* were grown in the presence of 7% glucose on the GM medium for 7 days. The two wild-type ecotypes were included as control for the corresponding *aba* mutants.

Table 2. Endogenous ABA levels in wild-type and *gin5* and *gin6* plants

Growth condition	WS	<i>gin5</i>	<i>gin6</i>
15-day-old			
GM	14 ± 1	7.2 ± 2	19 ± 2
GM 7% glucose	91 ± 10	10 ± 2	167 ± 10
Young seedlings			
GM	10 ± 3 ^a	11 ± 3 ^a	12 ± 4 ^a
GM 7% glucose	30 ± 1 ^b	12 ± 4 ^c	92 ± 3 ^c

The ABA concentration is expressed in ng ABA/g of fresh weight. The data were obtained from 15-day-old plants in the indicated media. For comparing young seedlings, plants were harvested at a similar developmental stage. Note that wild-type plants were developmentally arrested when grown on high glucose media. The time for each sample collection is as follows: (a) 48 hr, (b) 7 days, (c) 5 days.

2) in wild-type (threefold) and *gin6* mutant seedlings (eightfold) but not in *gin5* mutant plants.

An increase in ABA is required for sugar regulation in plants

To further support the importance of increased ABA levels in glucose responses, we performed the glucose-dependent developmental arrest assay with well-characterized ABA-deficient mutants, such as *aba1-1*, *aba2-1*, and *aba3-2* (Koornneef et al. 1982; Schwartz et al. 1997). The development of these *aba* mutants in the presence of high glucose was followed. In contrast to their wild-type counterparts, all of the *aba* mutants were able to grow in the presence of high glucose (Fig. 3C). This result strongly suggests that the reduced ABA levels present in these mutants decrease their glucose sensitivity.

To define whether an increase in ABA is sufficient to promote a normal sugar response in the *aba* and *gin5* mutants, their development in the presence of high glucose and exogenously applied ABA was followed. The ABA concentration used for these experiments was in the nanomolar range (100 nM). We first confirmed that this concentration by itself did not affect plant development in either wild-type or mutant plants (data not shown). As shown in Figure 4 both WS (Fig. 4A) and Ler (Fig. 4B) wild-type plants underwent developmental arrest in the presence of 6% and 6.5% glucose, respectively. When 100 nM ABA was exogenously applied to the medium both WS and Ler wild-type plants became hypersensitive to glucose. In this case ~70% of these plants became arrested at concentrations as low as 4% glucose (Fig. 4C,D). Using a similar set of conditions we explored the behavior of the *gin5* plant. In the presence of 100 nM ABA, 60% of this glucose-insensitive mutant seedlings became sensitive to 6% glucose (Fig. 4G). The glucose-insensitive phenotype of the *aba1-1* mutant (Fig. 4F) was also suppressed by the addition of ABA to the medium (Fig. 4H). Similar responses were observed for *aba2-1* and *aba3-2* mutants (data not shown). To exclude the possibility that this response was caused by an osmotic effect, the phenotype of *gin5* and *aba1* plants in

the presence of 100 nM ABA and mannitol was compared. As shown in Figure 4, I and J, no differences in the development of these plants were detected in the presence of ABA and mannitol.

The effect of 100 nM ABA on the mutant phenotypes of *gin6*, *abi4*, and *abi5-1* was also determined. Based on the endogenous ABA levels of the *gin6* mutant and the nature of the *ABI4* gene, we would not expect that its mutant phenotype would be reverted by the exogenous application of ABA. Indeed, 100% of the *gin6* plants (Fig. 4K) and *abi4* (data not shown) maintained the glucose-insensitive phenotype in the presence of 100 nM ABA

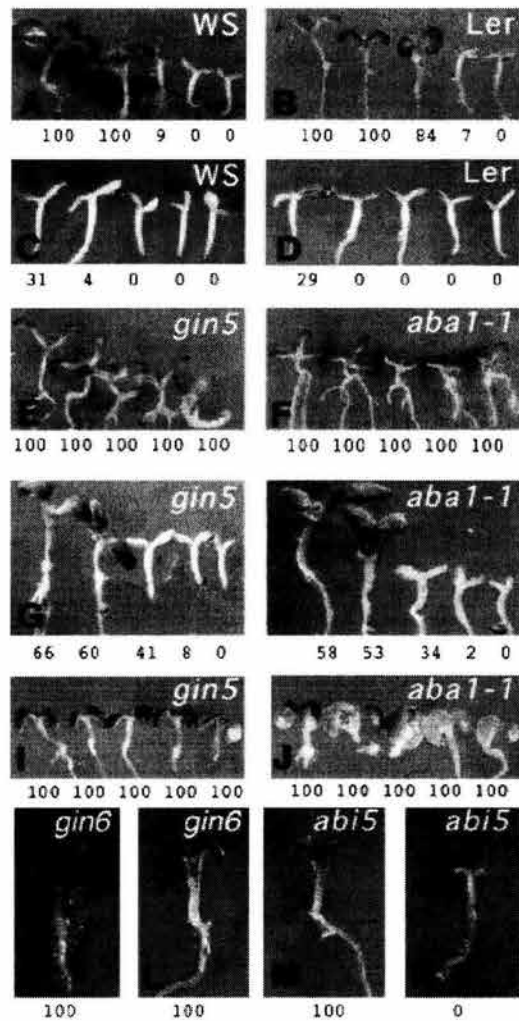


Figure 4. The effect of ABA and high glucose on the phenotype of *gin5* and *aba1-1* mutants. WS [A,C], *gin5* [E,G,I], Ler [B,D], and *aba1-1* [F,H,J] plants were grown on 4, 5, 6, 6.5, and 7% glucose [A–H] or 4, 5, 6, 6.5 and 7% mannitol [I,J], in the absence [A,B,E,F] or the presence of 100 nM ABA [C,D,G–J] for 10 days. *gin6* and *abi5-1* mutants were grown in the presence of 7% glucose without [K,M] or with [L,N] a 100 nM ABA. Representative plants are shown in each condition. The number below each plant indicates the percentage of plants displaying a green phenotype for each of the conditions used.

and 7% glucose (Fig. 4L). Surprisingly, the addition of ABA reverted the glucose-insensitive phenotype of the *abi5-1* mutant, in spite of having been isolated as an ABA-insensitive mutant (Fig. 4M,N). These results suggest that the *GIN6/ABI4* gene participates downstream of the induction of ABA in the glucose signaling pathway, whereas *ABI5* might have a role upstream of this pathway.

Transcription of glucose-regulated genes is altered in *gin5* and *gin6* mutants

It has been shown that both glucose and ABA regulate the transcription of a variety of genes (Koch 1996; Weatherwax et al. 1996; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 1997; Sheen 1998; Sheen et al. 1999). This study has shown that ABA participates in the glucose signaling pathway controlling vegetative development. Thus, it was important to analyze the expression pattern of genes previously reported to be regulated either by glucose or ABA in *gin5* and *gin6* mutants. For this purpose total RNA from wild-type WS, *gin5*, and *gin6* seedlings, grown in the presence of 2% and 7% glucose, was extracted and analyzed by RNA blot hybridization and RT-PCR. As shown in Figure 5A, lanes 1 and 2, transcript levels of two photosynthetic genes regulated by the HXK-dependent pathway, chlorophyll a/b binding protein (*CAB1*) and plastocyanin (*PC*) (Sheen et al. 1999), were strongly repressed in the presence of 7% glucose in wild-type WS plants. This glucose repression pattern was not observed in *gin5* or *gin6* mutants grown under the same conditions (Fig. 5A, lanes 3–6), indicating that glucose regulation of these photosynthetic genes is altered in both mu-

tants. It has been shown that phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) transcript is induced by glucose, probably by an HXK-independent pathway (Ehness et al. 1997). We followed the expression pattern of the *PAL1* gene in wild-type (Fig. 5A, lanes 1 and 2) and mutant plants (Fig. 5A, lanes 3–6). In contrast to the two photosynthetic genes, the glucose inducibility of *PAL1* is observed in the *gin5* and *gin6* mutants.

To further elucidate the function of *ABI4* in glucose and ABA signaling during seedling development, we analyzed the expression profile of ABA- and stress-inducible genes in the *gin6* mutant by RT-PCR analysis. As shown in Figure 5B, the *COR15a* gene transcript, which encodes a chloroplast-targeted protein and is induced by ABA, cold, and drought (Wilhelm and Thomashow 1993), is present at similar levels in *gin6* and wild-type plants grown in 2% or 7% glucose (Fig. 4B, lanes 1 and 2). This suggests that the regulation of this gene is independent of *ABI4* function. In contrast, the expression of *AtEm6*, an ABA-inducible gene encoding a late embryogenesis-abundant protein (Gaubier et al. 1993), is strongly induced by 7% glucose in wild-type plants (Fig. 4B, lane 2). The glucose induction of *AtEm6* in the *gin6* mutant is much reduced, suggesting that its expression is *ABI4* dependent. This result is consistent with the altered expression of this gene in the original *abi4* mutant (Finkelstein 1994), which further supports our finding that *gin6* is a new allele of *ABI4*. We also looked at the expression of the ABA- and stress-inducible alcohol dehydrogenase gene (*ADH*) (de Bruxelles et al. 1996). We observed that wild-type plants grown in 7% glucose have increased *ADH* transcript levels, whereas there is only a minor increase in *gin6* plants (Fig. 4B). Thus in the *gin6* mutant the induction of the *ADH* gene is diminished but not abolished. These results suggest that a subset of ABA-inducible genes are also regulated by glucose in an *ABI4*-dependent fashion during vegetative growth. Finally, because we have observed an increase in the endogenous levels of ABA in response to high glucose, we were interested in analyzing the transcript levels of genes involved in the synthesis of this hormone under high glucose conditions. The expression of the *ZEP1* gene (zeaxanthin epoxidase) (Cutler and Krochko 1999) showed no difference in the transcript levels in the wild-type and *gin6* plants in a high glucose condition (Fig. 4B).

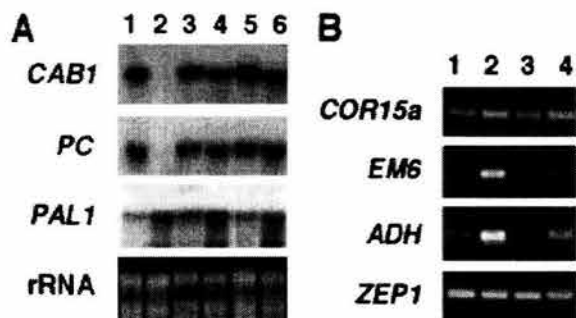


Figure 5. Expression of glucose- and ABA-modulated genes in *gin5* and *gin6* mutants. [A] RNA blot analysis. Total RNA (10 μ g) of WS wild-type [lanes 1,2], *gin5* (lanes 3,4), and *gin6* (lanes 5,6) from 19-day-old seedlings grown in the presence of 2% [lanes 1,3,5] or 7% [lanes 2,4,6] glucose was used for RNA blots. Glucose repression of *CAB1* and *PC* and activation of *PAL* were examined. Ethidium bromide-stained ribosomal RNA was used as a loading control. [B] RT-PCR analysis. Total RNA (5 μ g) from WS wild-type (lanes 1,2) or *gin6* (lanes 3,4) seedlings grown in 2% [lanes 1,3] or 7% [lanes 2,4] glucose was used to synthesize cDNA. A portion (1/80) of the synthesized cDNA was used to amplify and quantitate *COR15a* (accession no. U01377), *EM6* (accession no. Z11923 S61761), *ADH* (accession no. M12196), and *ZEP1* (accession no. T45502) gene transcripts. The sizes of PCR products are 210 bp, 302 bp, 398 bp, and 261 bp, respectively.

gin5 affects the HXK-mediated glucose signaling pathway

The altered regulation of *CAB1* and *PC* genes in the *gin5* and *gin6* mutants suggested that these mutations affect the HXK-mediated signal transduction pathway but do not affect genes regulated by the HXK-independent pathway, such as *PAL1*. To further substantiate this conclusion, a genetic approach was used to generate a double mutant carrying the *gin5* mutation for glucose insensitivity and a dominant *AtHXK1* gene (Jang et al. 1997) conferring glucose hypersensitivity (Fig. 6A). Plants from the F_2 generation were grown on high glucose medium, and it was observed that 24% of these plants (363 out of

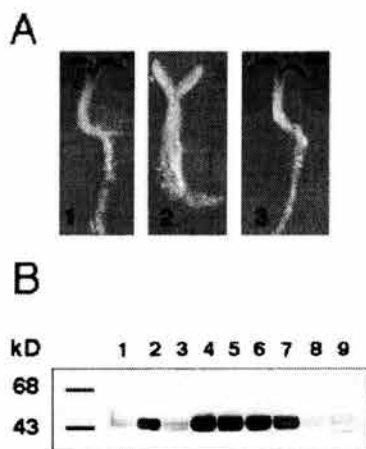


Figure 6. *gin5* acts downstream of the AtHXK gene in the glucose signaling pathway. (A) Analysis of the glucose response. Seedlings of *gin5* (panel 1), 35S-AtHXK (panel 2), and 35S-AtHXK *gin5* (panel 3) were grown in the presence of 7% glucose for 8 days. (B) Immunoblot analysis. The HXK protein levels of the wild-type (lane 1), 35S-AtHXK transgenic plant (lane 2), the *gin5* mutant (lane 3) and independent F₂ individuals displaying glucose insensitivity from the 35S-AtHXK *gin5* cross (lanes 4–9) are shown. Protein was extracted from 15-day-old seedlings grown on GM medium with 7% glucose.

1500 seedlings) were insensitive to 7% glucose (Fig. 6A, panel 3). To determine the levels of HXK protein in those glucose-resistant plants, total proteins from six individual plants were extracted and subjected to Western blot analysis. As shown in Figure 6B, four out of six glucose insensitive plants contained higher HXK protein levels (Fig. 6, lanes 4–7) as compared to either wild-type (Fig. 6B, lane 1) or *gin5* (Fig. 6B, lane 3) plants. The HXK protein levels of these plants are comparable to the 35S-AtHXK1-overexpressing line (Fig. 6B, lane 2). In contrast, the other two plants from this analysis display comparable HXK levels to wild-type plants (Fig. 6B, lanes 8 and 9). This result demonstrates that plants carrying the 35S-AtHXK1 and the *gin5* mutation display a glucose-insensitive phenotype like the *gin5* parental plant, suggesting that *gin5* participates in the HXK-mediated pathway.

Discussion

ABA plays a central role in the glucose signaling network controlling postembryonic development

Unlike most animals that follow a predetermined developmental program for growth, postembryonic growth and development in plants displays a remarkable plasticity, which resides in the plant's capacity to integrate and respond to developmental, metabolic, and environmental signals. The most striking example is the regulation by light of photomorphogenesis. Because plant survival relies on light-driven photosynthesis, the dual function of light as a developmental switch and an energy-source makes evolutionary sense. It has been suggested that plant hormones such as auxin, brassinosteroids, cytoki-

nin, gibberellins (GA), ABA, and ethylene play important roles in promoting or antagonizing photomorphogenesis (Fankhauser and Chory 1997; Deng and Quail 1999). Interestingly, light signals regulating plant morphogenesis can be overridden by metabolic signals such as the availability of glucose released from photosynthetic end products or carbon storage sources. For example, in *Arabidopsis* the availability of abundant glucose can be sensed during germination and can exert a profound influence, resulting in seedling developmental arrest (Jang and Sheen 1997). Although the underlying mechanisms of this glucose-inducible developmental arrest are mostly unknown, a previous analysis of the *gin1* mutant has revealed an antagonistic role of the volatile hormone ethylene (Zhou et al. 1998). Thus, glucose responses in multicellular plants are much more complex than in unicellular bacteria and yeast (Saier et al. 1995; Johnston 1999).

In this work, based on the genetic, physiological, and molecular characterization of two *Arabidopsis* glucose-insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, it was discovered that the plant hormone ABA participates in the HXK-mediated glucose response in plants (Fig. 7). Through the studies of wild-type and *gin5* plants, we propose that an increase of ABA levels is involved in the glucose signaling pathway that leads to decrease in gene expression and developmental arrest (Fig. 7). The inability to increase ABA levels results in a glucose-insensitive phenotype manifested in the *gin5* mutant. We have substantiated this conclusion further by demonstrating that three ABA biosynthetic-deficient mutants (*aba*) are also insensitive to high glucose concentrations and that this phenotype can be reverted by the addition of very low levels of exogenous ABA (100 nM). Thus, the intracellular ABA levels seem to determine the glucose sensitivity in all of these mutants. However, it is important to emphasize that an ABA increase is not the only factor mediating the

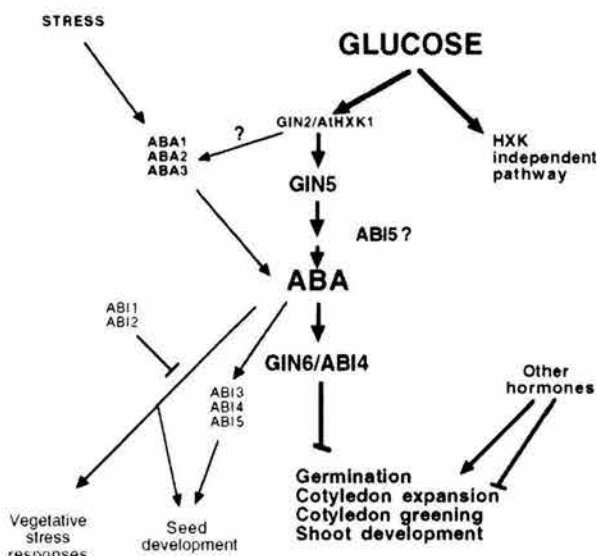


Figure 7. A model for the role of ABA in the HXK-dependent glucose signaling network.

developmental arrest when plants are grown in high glucose conditions. Indeed, during osmotic stress, a substantial increase of ABA levels is detected but seedling development is not arrested. Thus, we hypothesize that at least one other independent component is required in addition to ABA to promote glucose-dependent developmental arrest. Putative candidates are other hormones such as ethylene, which has already been demonstrated to interact with the HXK-mediated glucose signaling pathway (Zhou et al. 1998). It is also possible that the cellular or subcellular distribution of ABA and/or the ABA-responsive cells are different in response to glucose or mannitol signals.

The increase in ABA levels detected in wild-type plants could be the result of de novo synthesis, release from glucose conjugates, and/or reduced degradation (Cutler and Krochko 1999). Each of these processes is a potential target for the modulation of ABA levels in response to glucose. We have explored the possible glucose regulation on the expression of *ZEP1*, encoding an enzyme required for ABA biosynthesis (Newman et al. 1994; Cutler and Krochko 1999). This study did not reveal any differential expression of *ZEP1* under high glucose conditions. Unfortunately, *ZEP1* is currently the only gene identified for the final steps of the ABA biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. This aspect could be better addressed in the future when more ABA biosynthetic and regulatory genes become available. For instance, *GIN5* could encode one of the potential molecules involved in the signaling transduction between glucose and ABA. It is likely that the wilty and reduced dormancy phenotypes in *gin5* represent pleiotropic effects on other ABA-related processes during seed and vegetative development, in addition to glucose responses. Another *gin* mutant (*gin1*), isolated through the use of a similar screening procedure, has been characterized previously (Zhou et al. 1998). Analysis of this mutant revealed an interplay between the ethylene signaling pathway and glucose regulation. Nonallelic *gin5* shares very similar traits with *gin1* including small size, dark green leaves, fast germination, and wilty phenotype. Both *GIN5* and *GIN1* have been demonstrated to participate in the HXK-mediated pathway. As HXK has been postulated to initiate the glucose signal (Jang et al. 1997), we proposed that both genes act downstream of this putative sensor. The interaction between *gin1* and *gin5* and their relationship to the ethylene and ABA signaling pathways will be clarified in the future by analysis of double mutants. In an attempt to integrate all of these data, we propose that the glucose response requires an increase of ABA and a decrease of ethylene. Other plant hormones that interact with ethylene and ABA, such as auxin, cytokinin, and GA, could also be involved in this glucose response (Fig. 7) (Sheen et al. 1999).

ABI4 as a putative transcription factor for glucose signaling

ABA participates in a wide variety of physiological responses that depend on external and internal signals

(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 1997; Leung and Giraudat 1998). However, the mechanisms by which these signals are discriminated or integrated inside the cell are mostly unknown. The characterization of the *gin6* mutant resulted in the identification of *ABI4* as a candidate for the transduction of the glucose-specific signal. We found that the *ABI4* transcript is induced in wild-type plants in response to high glucose and this induction was diminished in the *gin6* mutant. The reduced transcript levels in the *gin6* mutant are likely the result of the T-DNA insertion in the promoter region, as no other changes were found in this mutant's *ABI4* gene in comparison to the reported amino acid sequence (Finkelstein et al. 1998). We have found that this insertion also affects the function of the *ABI4* gene during seed germination, as the *gin6* mutant displays an ABA germination-insensitive phenotype. These results suggest that important *cis*-acting sequences required for the regulation of the *ABI4* gene lie at least 2 kb upstream of the start codon. This observation contrasts the data published by Finkelstein et al. (1998), in which the seed-specific phenotype of the *abi4* mutant is complemented by a genomic clone containing a promoter region of only 1.3 kb upstream of the start codon but not by a clone containing 1.7 kb upstream. Our results support the idea proposed by Finkelstein et al. (1998) that sequences further upstream of 1.7 kb of the start codon are required for the proper expression of the *ABI4* gene. Another possibility is that the T-DNA insertion in the *gin6* plant might disrupt the *ABI4* gene regulation downstream of the insertion site. Further analysis will be required to clarify these possibilities. We confirmed that the original *abi4* allele is also glucose insensitive. The *ABI4* gene was identified as a putative transcription factor (Finkelstein et al. 1998), and it shows homology to a family of plant transcription factors with *AP2* domains that seem to control a variety of processes (Okamoto et al. 1997). The fact that the glucose-insensitive phenotype is maintained independently of the addition of ABA in *gin6* and *abi4* mutants suggests that this transcription factor could be acting near the end of the ABA-mediated glucose signaling cascade (Fig. 7). Efforts are currently being directed to find out whether *ABI4* can bind directly to *CAB1* and *PC* promoters in high glucose conditions. In addition, the predicted amino acid sequence of *ABI4* contains a serine/threonine-rich domain, which is a possible target for protein kinases such as those of the SnRK family. Our gene expression analysis has shown the participation of the *ABI4* gene in the expression of both sugar- and stress-responsive genes. The analysis of different alleles or site-directed mutagenesis can be used to further dissect the function of *ABI4* in stress and glucose signaling, both in seeds and vegetative tissues.

The glucose responses mediated through ABA involve specific signaling molecules

In addition to *ABI4*, other ABA signaling components have been characterized. For example, *ABI1* and *ABI2*

belong to the protein phosphatase 2C (PP2C) family and have pleiotropic and overlapping roles affecting ABA signaling in both seeds and vegetative tissues. In contrast, ABI3 and ABI5, as well as ABI4, were initially reported to affect various aspects of seed maturation and seed gene expression (Finkelstein 1994; Bonetta and McCourt 1998). Our results have shown that neither *abi1*, *abi2*, or *abi3* mutants are resistant to high glucose. The *abi1* and *abi2* mutants are dominant gain-of-function alleles with virtually abolished PP2C activity (Leung and Giraudat 1998; Sheen 1998). It is unlikely that these two molecules play any major role in the ABA induction in response to high glucose (Fig. 7). However, our studies demonstrate that in addition to ABI4, ABI5 also has a role in the glucose response. Thus, in spite of the seed-specific roles that have been proposed for ABI4 and ABI5, both molecules have an important role in this newly identified ABA-mediated response in vegetative tissues. In fact, the recent isolation of a salt-tolerant mutant, *sañ5* (Quesada et al. 2000), which corresponds to a new *abi4* allele, indicates that the participation of ABI4 in vegetative ABA responses might be a more general phenomenon. We have shown that the *abi5-1* mutant has a glucose-insensitive phenotype, but surprisingly this phenotype is reverted in the presence of ABA (100 nM). This suggests that this recently cloned transcription factor (Finkelstein and Lynch 2000) might participate in regulating the expression of genes required for transmitting signals from HXK that lead to the ABA increase while GIN6/ABI4 acts downstream of ABA (Fig. 7). Because of the fact that these genes are active in both seed-specific and glucose-mediated signaling pathways, it is possible that each stimulus can trigger multiple signaling pathways that possess complex interconnections. Further analysis will be required to have a better understanding of other convergent points between the glucose and ABA signaling pathways.

In conclusion, we have revealed a fundamental aspect of the glucose signal transduction pathway in plants based on the analysis of two glucose-insensitive mutants. The participation of ABA as part of the glucose signal transduction pathway constitutes an unexpected finding and uncovers the inherent complexity of signaling networks in higher plants.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis plants used were routinely grown on Metro-Mix 200 (Grace Sierra, Milpitas, CA) soil in controlled growth chambers (24°C, 16:8 hr light:dark photoperiod). Seeds under sterile conditions were surface-sterilized and plated on germination medium (GM) containing 1× Murashige and Skoog basal salt mixture supplemented with B5 vitamins, 0.05% MES, 1% sucrose as carbon source (unless otherwise indicated), and 0.7% of phytoagar. Seeds were incubated at 4°C for 4 days to break dormancy prior to germination. ABA (Sigma, Inc., St. Louis, MO) was prepared as a 10 mM stock in NaOH and diluted into appropriate concentrations for each experiment.

Glucose-insensitive mutants were isolated in 7% glucose GM

medium from T4 pools of 7300 independent T-DNA tagged lines in Wassilewskija (WS) ecotype, kindly donated by DUPONT Co. The different *aba*, *abi* mutant and wild-type plants, WS, Landsberg erecta (Ler), and Columbia (Col-0) used in this work were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). The *aba1-1*, *aba3-2*, *abi1-1*, *abi2-1*, and *abi3-1* mutants are in the Ler ecotype, whereas *aba2-1* and *abi4-1* are in Col-0, and *abi5-1* in WS.

Genetic analyses

Backcrosses were performed using mutant plants as the pollen donors and WS-0 wild-type as female plants. F₁ plants were allowed to self-pollinate and the glucose-insensitive phenotype was scored in the F₁ and F₂ population at the seedling stage. Complementation groups between *gin1-1*, *gin5* and *gin6* were determined by crossing homozygous plants in reciprocal orientation.

The mapping population was obtained by crossing homozygous *gin5* mutant plants to wild-type Ler plants. Homozygous *gin5* mutant plants from the F₂ progeny were grown on 7% glucose medium and plants displaying green and fully expanded cotyledons were selected. Genomic DNA was prepared from these homozygous *gin5* individual plants. The map position was determined by testing the linkage to simple sequence length polymorphism (SSLP) markers (Bell and Ecker 1994).

Phenotypic analyses

The glucose-resistant phenotype was scored by growing plants in GM in the presence of 7% glucose, or 7.5% in the case of Col-0 and Ler because of the higher level of resistance to glucose of these ecotypes. The analysis of seed dormancy was performed using seeds that were never exposed to cold treatment. The wilted phenotype in *gin5* mutant plants was observed in 4-week-old plants subjected to mild stress conditions by withholding water for 5 days. To examine drought responsiveness in the presence of ABA, *gin5* plants were sprayed with 10 ml of 3 μM ABA on days 3 and 5, following the instructions provided by the ABRC for the maintenance of the *aba1* mutant. ABA sensitivity tests were done following the protocol reported by Quesada et al. (2000), using agar medium supplemented with ABA (1–60 μM) and scored 5 days after sowing.

Molecular cloning of GIN6

For specific amplification of the *gin6* genomic sequence flanking the T-DNA insertion, a TAIL-PCR procedure was followed as described (Liu et al. 1995). The specific primers from the left border and the degenerate primer used are: LB1, 5'-CGATCT-GAGGATGAGATGTCATT-3'; LB2, 5'-GACGATATAGAGC-AAGATGGAAA-3'; LB3, 5'-CACATCATCTCATTGATGCT-TGG-3'; LB4, 5'-AACGTCGCAATGTGTATTA-3'. We used the reported AD2 degenerate primer (Liu et al. 1995). PCR amplifications were performed using high-quality genomic DNA isolated from the *gin6* mutant in a Peltier-Effect Cycling PTC-100 (7.0). Cycle settings used were as recommended (Liu et al. 1995), but with a fourth enrichment super-cycle using the following PCR conditions: (94°C for 30 sec, 54°C for 1.5 min, 72°C for 2.5 min, 94°C for 30 sec, 54°C for 1.5 min, 72°C for 2.5 min, 94°C for 30 sec, 45°C for 1.5 min, 72°C for 2.5 min) for 15 cycles and 72°C for 10 min. DNA fragments were cloned into the pMOS vector and sequenced.

Expression analysis techniques

RNA was isolated using standard protocols (Ausubel et al. 1987) from 19-day-old seedlings grown on plates containing GM

supplemented with 2% and 7% glucose. Hybridizations were done at high-stringency conditions with fragments from the *CAB1* gene (GenBank accession no. J04098), the *PC* gene (GenBank accession no. M20937), and the *PAL1* gene (GenBank accession no. L33677). cDNA was synthesized using 5 µg of total RNA by oligo(dT)-primed reverse transcription, using Super Script II reverse transcriptase (GIBCO BRL). A fraction (1/80) of the first strand cDNA was used as a template for PCR. Linearity for each amplification was corroborated. The primers used and the corresponding size products and accession numbers are as follows: *ABI4* [5'-ATGGACCCTTTAGCTTCCCA-3', 5'-AAGATGGGATCAATAAAATC-3'; 974 pb; accession no. AF040959]; *APT1* [5'-TCCAGAAATCGCTAAGATTGCC-3', 5'-CCTTTCCCTTAAGCTCTG-3'; 478 pb; accession no. Y07681]; *ADH* [5'-GCCAGGAGATCATGTGTTGC-3', 5'-GCACCAGCGATTCTAGACC-3'; 398 pb; accession no. M12196]; *COR15a* [5'-GTGACGGATAAAACAAAAGAGG-3', 5'-GACCCTACTTTGTGGCATCCTT-3'; 210 pb; accession no. U01377]; *AtEm6* [5'-AAACCATGGCGTCTCAACAAG-3', 5'-GCGGTCGACATCCGTGTGGGGAAGT-3'; 302 pb; accession no. Z11923]; *ZEP1* [5'-GCGAACACGGAACC-TAT-3', 5'-CTCAAATTATCTGCAAAACCG-3'; 261 pb; accession no. T45502].

Western blot analysis

Crosses between *gin5-1* and 35S-*AtHXK1* were performed and the F₂ generation was obtained. The glucose-resistant phenotype was scored from a total of 1550 plants selected on 7% glucose during 8 days. Total protein extracts were obtained from individual plants. Immunodetection was done using a polyclonal antibody, produced against the HXK following the protocol by Zhou et al. (1998). An anti-rabbit immunoglobulin alkaline phosphatase-conjugate was used as a secondary antibody (Zymed Laboratories, Inc.) and was detected using the BCIP/NBT substrate kit (Zymed Laboratories, Inc.).

ABA determination

To quantify the ABA content of *gin5*, *gin6*, and wild-type plants, 15 to 20 mg for the 15-day-old seedlings or 5 to 7 mg for the young seedling stage of fresh tissue was homogenized in 1 ml of ABA-extraction buffer (10 mM HCL, 1% PVPP in methanol). Extraction was done overnight with constant shaking at 4°C. The supernatant was collected and neutralized with 15 µl of 1M NaOH as described (Peña-Cortés et al. 1989). ABA was quantified with a Phytodetek-ABA-kit (AGDIA Inc., IN) using the protocol provided but with the addition of TBS and 0.1% gelatin in all of the samples.

Acknowledgments

We thank A. Covarrubias, M. Treviño, and S. Reichler for their critical comments on the manuscript; J. Penney for editing the manuscript; A. Cantero and V. Hernández for their expert technical help; S. Smeeckens for sharing unpublished information and providing the PC plasmid pPC8.130; and F. Campos for generous supply of *AtEm6* primers. Thanks go to the ABRC for providing mutant seeds stocks and the DUPONT Co. for supplying the T-DNA seed pools. A.A. and F.A. were fellows from CONACyT. This research was supported by the CONACyT (31791-N) and DGAPA (IN205697) grants to P.L. and by NSF (IBN-9723610) to J.S.

The publication costs of this article were defrayed in part by payment of page charges. This article must therefore be hereby

marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734 solely to indicate this fact.

References

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Bell, C.J. and Ecker, J.R. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**: 137-144.
- Bhalerao, R.P., Salchert, K., Bakó, L., Ökrész, L., Szabados, L., Muranaka, T., Machida, Y., Schell, J., and Koncz, C. 1999. Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 5322-5327.
- Bonetta, D. and McCourt, P. 1998. Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends Plant Sci.* **3**: 231-235.
- Chiou, T.J. and Bush, D.R. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 4784-4788.
- Cutler, A.J. and Krochko, J.E. 1999. Formation and brake down of ABA. *Trends Plant Sci.* **4**: 472-478.
- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., Levine, A., and Granot, D. 1999. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* **11**: 1253-1266.
- de Bruxelles, G.L., Peacock, W.J., Dennis, E.S., and Dolferus, R. 1996. Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **111**: 381-391.
- Deng, X.W. and Quail, P.H. 1999. Signalling in light-controlled development. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **10**: 121-129.
- Dijkwel, P.P., Huijser, C., Weisbeek, P., Chua, N.-M., and Smeeckens, S.C.M. 1997. Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**: 583-595.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D.E., and 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.
- Fankhauser, C. and Chory, J. 1997. Light control of plant development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **13**: 203-229.
- Finkelstein, R.R. 1994. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J.* **5**: 765-771.
- Finkelstein, R.R. and Lynch, T.J. 2000. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12**: 599-609.
- Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S., and Goodman, H.M. 1998. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* **10**: 1043-1054.
- Gancedo, J.M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334-361.
- Gaubier, P., Raynal, M., Hull, G., Huestis, G.M., Grellet, F., Arenas, C., Pages, M., and Delseny, M. 1993. Two different *Em*-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 409-418.
- Gibson, S.I. and Graham, I.A. 1999. Another player joins the complex field of sugar-regulated gene expression in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 4746-4748.
- Grupe, A., Hultgren, B., Ryan, A., Ma, Y.H., Bauer, M., and Stewart, T.A. 1995. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic β cell glucokinase in maintaining

- glucose homeostasis. *Cell* **83**: 68–78.
- Jang, J.C. and Sheen, J. 1997. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.* **115**: 208–213.
- Jang, J.C., León, P., Zhou, L., and Sheen, J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**: 5–19.
- Johnston, M. 1999. Feasting, fasting and fermenting glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.* **15**: 29–33.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 509–540.
- Koornneef, M. and Karssen, C.M. 1994. *Seed dormancy and germination*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C., and Karssen, C.M. 1982. The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* **61**: 385–393.
- Koornneef, M., Reuling, G., and Karssen, C.M. 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **61**: 377–383.
- Leung, J. and Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 199–222.
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., and Whittier, R.F. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* **8**: 457–463.
- MacRobbie, E.A.C. 1991. Effect of ABA on ion transport and stomatal regulation. In *Abscisic acid, physiology and biochemistry* (ed. W.J. Davies and H.G. Jones), pp. 153–158. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Martin, T., Hellmann, H., Schmidt, R., Willmitzer, L., and Frommer, W.B. 1997. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant J.* **11**: 53–62.
- Mita, S., Hirano, H., and Nakamura, K. 1997a. Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in *Arabidopsis thaliana*. A recessive mutation causing enhanced expression of a gene for β -amylase. *Plant Physiol.* **114**: 575–582.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M., and Nakamura, K. 1997b. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J.* **11**: 841–851.
- Moffatt, B.A., McWhinnie, E.A., Agarwal, S.K., and Schaff, D.A. 1994. The adenine phosphoribosyltransferase-encoding gene of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **143**: 211–216.
- Moore, B. and Sheen, J. 1999. Plant sugar sensing and signaling—a complex reality. *Trends Plant Sci.* **4**: 250.
- Nambara, E., Keith, K., McCourt, P., and Naito, S. 1995. A regulatory role for the *ABI3* gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**: 629–636.
- Németh, K., Salchert, K., Putnok, P., Bhalerao, R., Konecz-Kálmán, Z., Stankovic-Stangeland, B., Bakó, L., Mathur, J., Ókrész, L., Stabel, S., et al. 1998. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* **12**: 3059–3073.
- Newman, T., de Bruijn, F.J., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlrogge, J., Raikhel, N., Somerville, S., Thomashow, M., et al. 1994. Genes galore: A summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* **106**: 1241–1255.
- Okamoto, J.K., Caster, B., Villarroel, R., Montagu, V.M., and Jofuku, K.D. 1997. The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 7076–7081.
- Pego, J.V., Weisbeek, P.J., and Smeekens, S.C.M. 1999. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiol.* **119**: 1017–1023.
- Peña-Cortés, H., Sanchez-Serrano, J., Martens, R., Willmitzer, L., and Pratt, S. 1989. Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 9851–9855.
- Quesada, V., Ponce, M.R., and Micol, J.L. 2000. Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **154**: 421–436.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 198–206.
- Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeek, P., and Smeekens, S. 1998. Sucrose-specific signaling represses translation of the *Arabidopsis ATB2 bZIP* transcription factor gene. *Plant J.* **15**: 253–263.
- Saier, M.H., Chauvaux, S., Deutscher, J., Reizer, J., and Ye, J.J. 1995. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biol. Sci.* **20**: 267–271.
- Schwartz, S.H., Léon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., and Zevaart, J.A.D. 1997. Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**: 161–166.
- Sheen, J. 1998. Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 975–980.
- . 1999. C4 gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 187–217.
- Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J.C. 1999. Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 410–418.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* **115**: 327–334.
- Smeekens, S. 1998. Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 230–234.
- Smeekens, S. and Rook, F. 1997. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol.* **115**: 7–13.
- Sturm, A. and Tang, G.Q. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* **4**: 401–407.
- Wang, M.L., Belmonte, S., Kim, U., Dolan, M., Morris, J.W., and Goodman, H.M. 1999. A cluster of ABA-regulated genes on *Arabidopsis thaliana* BAC T07M07. *Genome Res.* **9**: 325–333.
- Weatherwax, S.C., Ong, M.S., Degenhardt, J., Bray, E.A., and Tobin, E.M. 1996. The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiol.* **111**: 363–370.
- Wilhelm, K.S. and Thomashow, M.F. 1993. *Arabidopsis thaliana cor15b*, an apparent homolog of *cor15a*, is strongly responsive to cold and ABA, but not to drought. *Plant Mol. Biol.* **23**: 1073–1077.
- Wobus, U. and Weber, H. 1999. Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* **380**: 937–944.
- Zhou, L., Jang, J.C., Jones, T.L., and Sheen, J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 10294–10299.

IV.4 Aislamiento y caracterización molecular del gen *GIN6*.

IV.4.1 Aislamiento del gen afectado en la mutante *gin6* y *gin5*.

La identificación del gen mutado en *gin6* fue descrita en la sección anterior, y fue detallada en el artículo del apartado IV.3.3.

Por otra parte, los resultados de los análisis genéticos sugerían que la mutante *gin5* también parecía estar abanderada por el T-DNA, por lo que también se aisló un fragmento de DNA genómico flanqueante al T-DNA presente en esta mutante utilizando nuevamente la técnica de TAIL-PCR (Fig. 11A). La secuencia del fragmento aislado de *gin5* correspondió a una región localizada en el cromosoma 1 (Fig. 11B). Esta localización fue confirmada también por mapeo. Análisis genéticos posteriores indicaron que *gin5* es alélica a la mutante deficiente en ABA *aba3*. Durante este periodo el gen *ABA3* fue clonado por otros grupos de investigación (Xiong *et al.*, 2001; Bittner *et al.*, 2001) y su localización demostró que *gin5* no estaba abanderada por el T-DNA a pesar de que la inserción está relativamente cerca del gen *ABA3* (Fig. 11B); este hecho explicaba el por qué nuestros análisis de segregación genética sugerían el abanderamiento del gen mutado.

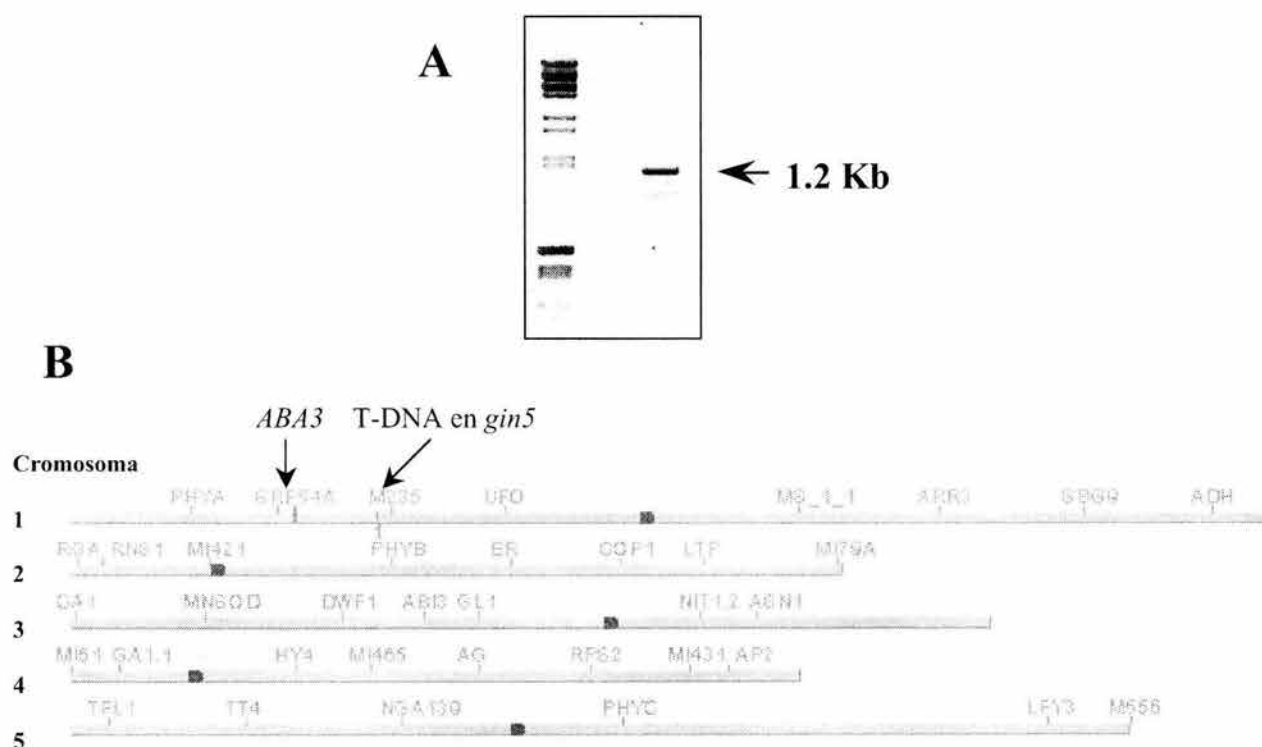


Figura 11. Aislamiento de la región genómica flanqueante al T-DNA de la mutante *gin5*. **A.** Fragmento de DNA genómico aislado por TAIL-PCR de la mutante *gin5* usando un oligonucleótido específico del borde derecho del T-DNA y un oligonucleótido degenerado. **B.** Localización del T-DNA respecto al gen *ABA3*, responsable del fenotipo de *gin5*.

IV.4.2 Análisis de la expresión de los genes *GIN6/ABI4*, *ABI5* y *CTR1*.

Como se describió anteriormente, el análisis de expresión del gen *ABI4* (apartado IV.3), mostró que su transcrito se acumula en plantas silvestres crecidas en presencia de alta concentración de Glc, y dicha acumulación está afectada en la mutante *gin6*. Estos datos sugerían que *ABI4* responde positivamente a Glc, por lo que decidimos hacer un análisis más detallado de la expresión de este gen, así como de dos genes adicionales que participan en la señalización de Glc: *ABI5* (*ABA INSENSITIVE 5*) y *CTR1* (*CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1*) (este trabajo en Arenas *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1998). Cabe mencionar que la mutante *ctr1* fue aislada inicialmente como una mutante en la señalización de la hormona etileno (Kieber *et al.*, 1993). Se sabe que *CTR1* es un regulador negativo de la señalización de etileno y su mutación (*ctr1*) provoca que esta vía esté prendida de forma constitutiva. Cuando esta mutante es crecida en presencia de Glc al 7% presenta fenotipo *gin*, lo que indica que la señalización del etileno es antagonista de la señalización de la Glc (Zhou *et al.*, 1998). Es importante aclarar que para este momento del trabajo, éstos eran los únicos 3 genes clonados que se sabía que participaban en la vía que nos ocupa.

Los resultados más sobresalientes obtenidos de esta parte del trabajo se incluyen en el artículo: **Three genes that affect sugar sensing: *ABA INSENSITIVE 4*, *ABA INSENSITIVE 5* and *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1*, are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis thaliana***, el cual está incluido en el apartado IV.4.3. A continuación presento un condensado de los resultados descritos en dicho artículo y referiré a las figuras del mismo en esta sección.

La caracterización de mutantes demostró que los genes *ABI4*, *ABI5* y *CTR1* juegan un papel importante en la señalización de azúcares en *Arabidopsis*. En esta sección se muestra que los transcritos de estos tres genes son modulados por Glc, independientemente del bloqueo del desarrollo causado por la presencia continua de altas concentraciones de Glc. Esto fue demostrado realizando inducciones en Glc de plántulas jóvenes las cuales fueron germinadas y crecidas en condiciones normales, y sometidas posteriormente a un tratamiento de alta concentración de Glc por diferentes tiempos. Este método tiene la ventaja de desacoplar el efecto del desarrollo del efecto específico de la Glc. Los resultados mostraron que los transcritos de *ABI4* y *ABI5* se acumulan en respuesta a Glc, mientras que el transcrito de *CTR1* se reduce transitoriamente, seguido de una recuperación rápida de sus niveles (Fig. 2).

Con la finalidad de determinar si la regulación de los genes *GIN6/ABI4*, *ABI5* y *CTR1* se debe a la señal de azúcar o bien al efecto osmótico causado por las altas concentraciones de Glc usadas en los tratamientos, se analizó su expresión en respuesta a condiciones isosmóticas de Mtl. Los resultados

mostraron que los niveles de transcrito de estos genes también responden al estrés osmótico. En específico, *ABI4* y *ABI5* responden positivamente, mientras que *CTR1* es regulado negativamente (Fig. 4A). La respuesta de este último es opuesta a la observada en Glc. Adicionalmente, sabiendo que la señalización de Glc está mediada por ABA, se evaluó la respuesta de estos genes ante dicha señal hormonal. El comportamiento de los genes en respuesta a ABA correlaciona significativamente con la respuesta observada en Mtl (Fig. 4B, D-F). Esta serie de resultados indican que los genes *ABI4*, *ABI5* y *CTR1* se regulan por múltiples señales incluyendo la Glc, el estrés osmótico y el ABA. Sin embargo, tanto los patrones como los niveles de expresión en cada tratamiento son diferentes, lo que sugiere que se podrían utilizar vías de señalización distintas para cada señal. Además, dado que los niveles y el patrón de expresión de los tres genes en respuesta a ABA correlaciona con los observados en Mtl, se puede sugerir que la respuesta de *ABI4*, *ABI5* y *CTR1* a estrés osmótico podría ser dependiente de ABA.

Con el objetivo de determinar si la regulación por Glc de *ABI4* y *ABI5* requiere la fosforilación de hexosas, se realizaron inducciones con el análogo de Glc, 2DG. Este azúcar es capaz de ser fosforilado por la HXK pero es escasamente metabolizado. Por otro lado, se utilizan concentraciones muy bajas (0.5 mM) comparadas con la usada para los tratamientos con Glc (388 mM, correspondiente a 7%), lo cual elimina el efecto osmótico. Con este tratamiento se observó que tanto *ABI4* como *ABI5* responden positivamente a la 2DG (Fig. 4C). Esta observación apoya que ambos genes son regulados por una señal específica derivada de la Glc y sugiere que esta respuesta está mediada al menos en parte por la vía dependiente de HXK. Al mismo tiempo, tales resultados apoyan el efecto diferencial entre la Glc vs. el estrés osmótico.

Adicionalmente, se observó que el gen *ABI4* responde a Glc, 2DG y ABA solamente dentro de una ventana de tiempo durante el desarrollo temprano de Arabidopsis (Fig. 5). Este hecho correlaciona con el periodo de susceptibilidad de la planta de detener su desarrollo en respuesta a altas concentraciones de Glc, pues cuando este azúcar se adiciona en etapas más tardías (después de 3 días), las plantas ya no detienen su desarrollo (Gibson *et al*, 2001). En el caso de *CTR1*, el patrón de respuesta a Glc cambia durante el desarrollo de la planta (Fig. 2 y 5A). Con base en estas observaciones se concluyó que la regulación por Glc de los transcritos de *ABI4* y *CTR1* es dependiente de la etapa de desarrollo de la planta, a diferencia de *ABI5* el cual mantiene la capacidad inducción aún en etapas más tardías (Fig. 5).

La regulación por Glc de los genes *ABI4* y *ABI5* está afectada en mutantes insensibles a Glc, tales como las mutantes *gin*, *aba*, *abi4*, *abi5* y *ctr1*, pero no en *abi1*, *abi2* y *abi3* (las cuales no tienen fenotipo insensible a Glc) (Fig. 6). Estos datos refuerzan la participación de ABA y etileno en las respuestas a

azúcar. Con base en estos resultados, ahora sabemos que la Glc es capaz de modular el nivel de transcrito de genes que participan en su propia vía de señalización. Esto podría permitir la amplificación de la señal de Glc así como retroalimentar positivamente su propia vía de señalización. La capacidad de factores transcripcionales, tales como los analizados en este trabajo, de ser regulados por una variedad de señales, puede contribuir a la habilidad de las plantas de responder de manera flexible e integral a los cambios continuos en su ambiente interno y externo.

IV.4.3 Artículo:

Three genes that affect sugar sensing: *ABA INSENSITIVE 4*, *ABA INSENSITIVE 5* and *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1*, are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis thaliana*.

Analilia Arroyo, Flavia Bossi, Ruth R. Finkelstein and Patricia León.

Plant Physiology 133: 231-242, 2003.

Three Genes That Affect Sugar Sensing (*Abscisic Acid Insensitive 4*, *Abscisic Acid Insensitive 5*, and *Constitutive Triple Response 1*) Are Differentially Regulated by Glucose in *Arabidopsis*¹

Analilia Arroyo, Flavia Bossi, Ruth R. Finkelstein, and Patricia León*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001 Chamilpa. Apartado Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos 62271 (A.A., F.B., P.L.); and Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, University of California, Santa Barbara, California 93106 (R.R.F.)

Mutant characterization has demonstrated that *ABI4* (*Abscisic Acid [ABA] Insensitive 4*), *ABI5* (*ABA Insensitive 5*), and *CTR1* (*Constitutive Triple Response 1*) genes play an important role in the sugar signaling response in plants. The present study shows that the transcripts of these three genes are modulated by glucose (Glc) independently of the developmental arrest caused by high Glc concentrations. *ABI4* and *ABI5* transcripts accumulate in response to sugars, whereas the *CTR1* transcript is transiently reduced followed by a rapid recovery. The results of our kinetic studies on gene expression indicate that *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* are regulated by multiple signals including Glc, osmotic stress, and ABA. However, the differential expression profiles caused by these treatments suggest that distinct signaling pathways are used for each signal. *ABI4* and *ABI5* response to the Glc analog 2-deoxy-Glc supports this conclusion. Glc regulation of *ABI4* and *CTR1* transcripts is dependent on the developmental stage. Finally, the Glc-mediated regulation of *ABI4* and *ABI5* is affected in mutants displaying Glc-insensitive phenotypes such as *gins*, *abas*, *abi4*, *abi5*, and *ctr1* but not in *abi1-1*, *abi2-1*, and *abi3-1*, which do not show a Glc-insensitive phenotype. The capacity of transcription factors, like the ones analyzed in this work, to be regulated by a variety of signals might contribute to the ability of plants to respond in a flexible and integral way to continuous changes in the internal and external environment.

Sugars play a central role as signaling molecules that modulate the metabolism, development, and physiology of plants (Koch, 1996; Sheen et al., 1999; Smeekens, 2000; Coruzzi and Zhou, 2001; Rolland et al., 2002). Despite their central function, the molecular mechanisms underlying sugar signaling are still poorly understood. Evidence based on the use of sugar analogs such as 6-deoxy-Glc, 2-deoxy-Glc (2DG), and 3-O-methyl-Glc, shows that sugar-mediated regulation occurs through distinct signaling pathways (Sheen et al., 1999; Smeekens, 2000). One of these pathways responds exclusively to Suc (Chiou and Bush, 1998; Loreti et al., 2000); others respond to hexoses, such as Glc and Fru. Some signaling systems rely only on hexose sensing without any catabolism (hexokinase [HXK] independent), whereas others require hexose phosphorylation or even further hexose metabolism (Sheen et al., 1999;

Fujiki et al., 2000; Smeekens, 2000; Xiao et al., 2000; Rolland et al., 2002).

At present, few components of the sugar signaling network are known. Evidence exists that, similar to yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), the plant enzyme involved in hexose phosphorylation, HXK, functions as a primary sugar sensor (Jang and Sheen, 1997; Rolland et al., 2002; Moore et al., 2003). Protein phosphorylation and dephosphorylation also have been implicated in sugar regulation (Takeda et al., 1994; Ehness et al., 1997; Halford and Hardie, 1998; Fujiki et al., 2000; Smeekens, 2000; Halford et al., 2003).

Genetic approaches also have been used to identify components of the plant sugar signaling cascade (Smeekens, 2000; Rolland et al., 2002). Sugar response mutants have been isolated based on the effects caused by high or low sugar levels during germination or early seedling development. Others have been selected by screening transgenic plants with altered expression of sugar-regulated promoters. Interestingly, several sugar-insensitive mutants affect known genes involved in hormone biosynthesis or signaling (Coruzzi and Zhou, 2001; Gazzarrini and McCourt, 2001; Finkelstein and Gibson, 2002; Leon and Sheen, 2003). Mutants such as *gin1* and *gin5* (Glc-insensitive), *isi4* (impaired Suc induction), and *sis4* (Suc insensitive) affect genes involved in the biosyn-

¹ This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant no. 31791-N and fellowship to A.A.), by the Dirección General de Asuntos para el Personal Académico (grant no. IN210200), by Howard Hughes (grants), and by DGEF (fellowship to A.A.).

* Corresponding author; e-mail patricia@ibt.unam.mx; fax 52-73-139988.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.103.021089>.

thesis of abscisic acid (ABA; Zhou et al., 1998; Arenas-Huertero et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001; Cheng et al., 2002). *GIN1/ISI4/SIS4* correspond to the *ABA2* (*ABA-deficient 2*) gene (Laby et al., 2000; Rook et al., 2001; Cheng et al., 2002; Seo and Koshiba, 2002) and the *GIN5* to the *ABA3* gene (Arroyo et al., 2001).

An additional set of sugar-insensitive mutants revealed that components of ABA signaling also participate in sugar responses during early seedling development. Four independent sugar-insensitive mutants (*gin6*, *sun6*, *sis5*, and *isi3*) are allelic to the ABA-insensitive mutant *abi4* (Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001), which exhibits altered ABA sensitivity in seeds and seedlings (Finkelstein, 1994; Söderman et al., 2000). *ABI4* belongs to the family of *AP2* (*APETALA 2*) transcription factors (Finkelstein et al., 1998; Riechmann and Meyerowitz, 1998). Like *abi4*, the mutant *abi5* displays a sugar-insensitive phenotype (Arenas-Huertero et al., 2000; Laby et al., 2000; Brocard et al., 2002), which shows that this factor also plays a role during sugar signaling. The product of the *ABI5* gene corresponds to the basic Leu zipper class of transcriptional regulators (Finkelstein and Lynch, 2000; Lopez-Molina and Chua, 2000; Jakoby et al., 2002). *ABI5* expression is subject to complex regulation by different factors including ABA, drought, salt, and Glc, which are positive regulators (Lopez-Molina et al., 2001; Brocard et al., 2002). However, the *ABI5* protein in vegetative tissues appears to be present only during a narrow developmental window, shortly after seed germination, and is proposed to be a key player in monitoring environmental conditions during early seedling growth (Lopez-Molina et al., 2001).

In addition to strengthening the connection between ABA and sugar signaling, the analysis of the *gin1* mutant revealed an antagonistic relation between sugar and ethylene signaling pathways (Zhou et al., 1998). This is supported by the finding that two sugar-insensitive mutants, *gin4* and *sis1*, are alleles of the constitutive ethylene response mutant, *ctr1* (Gibson et al., 2001; Cheng et al., 2002). Also, it has been demonstrated that the *etr1* (*ethylene resistant 1*) and ethylene-insensitive mutants (*ein2*, *ein3*, and *ein6*) display sugar oversensitive phenotypes (Zhou et al., 1998; Cheng et al., 2002).

The emerging picture supports the notion that sugar signaling during early seedling development involves extensive interactions with the hormones ABA and ethylene (Leon and Sheen, 2003). Nevertheless, to understand in detail the molecular roles that ABA and ethylene play in sugar signaling, the function and regulation that known factors play in these signaling cascades must be addressed. In the present work, we performed a detailed analysis of the regulation of the *ABI4* gene by Glc. We found that the *ABI4* transcript accumulates shortly after Glc expo-

sure and that this response depends on sequences located in the 5'-upstream region. We also have extended our analyses to two other genes, *ABI5* and *CTR1*, mutations in these loci(s) result in Glc-insensitive phenotypes. We found that the *ABI5* and *CTR1* transcript levels are also affected by Glc. Interestingly, the *ABI4* transcript response to Glc is only observed in a short developmental window that correlates with the susceptibility of seedlings to arrest development by sugars. Although transcript levels of these genes are also affected by osmotic stress and ABA, specific regulation by Glc is supported by the transcript accumulation pattern profile and by the use of the Glc analog 2DG. We also show that *ABI4* and *ABI5* Glc regulation is affected in *gin*, *aba*, *abi*, and *ctr1* mutants, supporting the participation of ABA and ethylene in sugar responses.

RESULTS

Regulation of *ABI4* by Glc

It has been shown previously that the *ABI4* transcript accumulates in wild-type seedlings grown in the presence of Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc but not in those grown on Murashige and Skoog 2% (w/v) Glc (Arenas-Huertero et al., 2000; Cheng et al., 2002). Because the expression of *ABI4* gene is high in dry seeds (Söderman et al., 2000), and seedling growth is arrested by high Glc (Arenas-Huertero et al., 2000), it was important to determine if *ABI4* transcript accumulation in Glc-treated seedlings was residual from the seed. The accumulation of the *ABI4* transcript was followed in seedlings germinated on standard medium and then exposed to Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc media for different incubation periods. We used Murashige and Skoog 1% (w/v) Suc as standard media because it has identical effects on *ABI4* expression as 2% (w/v) Glc; also, Suc is the preferred carbon source used by plants. As shown in Figure 1A, in 2-d-old seedlings, the *ABI4* transcript accumulates at higher levels shortly after Glc treatment (6 h), and this accumulation is maintained for at least 12 h. These results support the idea that the *ABI4* transcript accumulates de novo in response to Glc.

To determine the spatial, temporal, and developmental expression pattern of *ABI4* Glc-mediated accumulation, we used transgenic plants expressing the *GUS* reporter under the control of the 3-kb region upstream of the start codon of the *ABI4* gene. This construct was described previously and was shown to confer high *GUS* expression during seed development, as expected for the *ABI4* gene (Söderman et al., 2000). Because the *GUS* protein is very stable (Jefferson et al., 1987), the experiments performed with these transgenic lines were done under continuous growth on either standard or Glc media. Using fluorometric analysis performed in the linear range of product accumulation, the specific activity of *GUS*

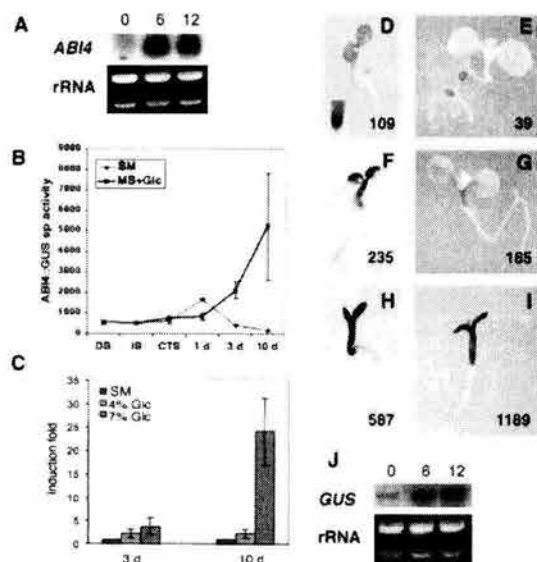


Figure 1. Glc induction of the *ABI4* transcript and spatial expression pattern. **A**, Glc regulation of the *ABI4* gene. Northern blot from Columbia-0 (*Col-0*) plants grown for 2 d on standard liquid media and exposed to Murashige and Skoog (MS) 7% (w/v) Glc for 0, 6, and 12 h. Each lane contains 8 μ g of total RNA. The complete *ABI4* cDNA was used as a probe. **B**, β -Glucuronidase (GUS)-specific activity was measured in dry seeds (DS), 1-h-imbibed seeds (IS), 3-d cold-treated seeds (CTS), or germinating seedlings in standard media (SM) or Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc for 1, 3, and 10 d. Each point represents the mean of four independent lines and four biologically independent experiments, expressed as nanomoles of methyl-umbelliferone per microgram of total protein per minute. **C**, GUS activity of Glc-treated seedlings relative to the GUS level of their corresponding standard media grown plants, normalized to 1 in each case. Bars = SD (sometimes smaller than the scale). GUS staining of *ABI4::GUS* seedlings grown on standard media for 3 (D) or 10 (E) d. GUS staining of *ABI4::GUS* seedlings grown on MS 4% (w/v) Glc for 3 (F) or 10 (G) d. GUS staining of *ABI4::GUS* seedlings grown on MS 7% (w/v) Glc for 3 (H) or 10 (I) d. The value of a representative experiment of the GUS-specific activity of transgenic lines grown in each condition is shown. **J**, Glc regulation of the GUS transcript level. Transgenic plants carrying the *ABI4::GUS* expression cassette were grown in standard liquid media for 2 d followed by the exposure to Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc. Samples were taken at 0, 6, and 12 h. Five micrograms of total RNA from each sample were loaded in each lane and hybridized with a 600-bp fragment of the GUS gene.

was measured in standard media grown seeds and seedlings and compared with those grown in the presence of Glc. A considerable level of GUS expression is detected in dry, 1-h-imbibed, and 3-d cold-treated seeds; however, no difference was observed between standard media and Glc media (Fig. 1B). Although GUS-specific activity increased transiently in seedlings grown on standard media, 3-d-old seedlings grown in either 4% or 7% (w/v) Glc had 2- to 4-fold higher GUS activity than those grown on standard media (Fig. 1, B and C). This difference is even higher in the 10-d-old seedlings grown in 4% or 7%

(w/v) Glc, as the result of the lower levels found in standard media, and clearly reflects an induction above the levels found in dry seeds (Fig. 1, B and C). Similar results were obtained with four independent transgenic lines, which demonstrate that the *ABI4* 5' regulatory region used in these constructs includes at least part of the cis-acting elements involved in the response to Glc.

The expression pattern of the *ABI4* transcript upon Glc treatment was determined by GUS histochemical analysis. As shown in Figure 1D in 3-d-old seedlings grown on standard media, GUS staining is mostly confined to the cotyledons and hypocotyl region and is not observed in roots, with the exception of the root cap and the quiescent center. Interestingly, detectable GUS staining in older seedlings is lost (Fig. 1E), which is consistent with the *ABI4* mRNA analysis (see below) and with previously reported data (Söderman et al., 2000). This expression pattern was reproducible in independent lines showing that *ABI4* is clearly regulated by a developmental program (compare Fig. 1, D with E). When plants were germinated in the presence of 4% or 7% (w/v) Glc, the levels of GUS staining increased with Glc concentration. In the presence of Glc, GUS activity was detected not only in 3-d-old seedlings (Fig. 1, D versus F and H) but also in 10-d-old plants (Fig. 1, E versus G and I). The GUS expression patterns in Glc and standard media were qualitatively similar, except in the root of 3-d-old seedlings, where the presence to either 4% or 7% (w/v) Glc expanded the domain of GUS expression (Fig. 1, D versus F and H). These results suggest that the presence of Glc might not only increase the levels of the *ABI4* transcript but also could modify its expression pattern.

Because most of our analysis has been carried out in arrested seedlings, we explored whether Glc also induced the *ABI4* transcript in a nonarrested developmental condition. Although 10-d-old seedlings grown on standard media had no detectable GUS activity (Fig. 1E), those grown in the presence of 4% (w/v) Glc exhibited GUS activity even though these seedlings were not arrested (Fig. 1G). The GUS staining pattern of these plants, which is restricted to the hypocotyl and cotyledons, resembles that of the 3-d-old seedlings grown on standard media (Fig. 1D). Interestingly, no staining was ever detected in the first pair of true leaves. We corroborated by northern-blot analysis that the increase in GUS activity represents an induction of GUS mRNA accumulation in response to Glc in 2-d-old seedlings (Fig. 1J), which correlates with the endogenous *ABI4* mRNA accumulation shown in Figure 1A.

Glc Affects the *ABI5* and *CTR1* Transcript Levels

The results described above indicate that Glc induces the expression of the *ABI4* transcript, a factor required for proper sugar response during post-

germination development. Similar results were recently found for genes involved in sugar signaling, such as *ABA2* and other ABA biosynthetic genes, whose transcript levels are regulated by Glc (Cheng et al., 2002). Thus, Glc appears to modulate the transcript level of genes involved in its own signaling pathway. In addition to *ABI4* and the *ABA* genes, the molecular characterization of other sugar-insensitive mutants has permitted the identification of additional factors required for a normal sugar response. The *abi5* mutant also displays resistance to high sugar concentrations (Arenas-Huertero et al., 2000; Laby et al., 2000), whereas overexpression of *ABI5* results in hypersensitivity to sugar (Brocard et al., 2002; Finkelshtein et al., 2002). However, the participation of *ABI5* during sugar seedling response is still under debate because the resistance of the *abi5* mutant seems not to be as strong as the *abi4* mutant (Gazzarrini and McCourt, 2001). In addition, two other independent sugar mutants (*sis1* and *gin4*) have been found to affect the ethylene signaling *CTR1* gene (Gibson et al., 2001; Cheng et al., 2002).

To determine whether or not, or under what conditions, the *ABI5* and *CTR1* genes are regulated by Glc, we followed the transcript accumulation pattern of *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* genes in 3-d-old wild-type seedlings after transfer to 7% (w/v) Glc media. In this case, semiquantitative reverse transcriptase (RT)-PCR analysis was used at different times after transfer to Glc treatment. As shown in Figure 2, a strong accumulation of *ABI4* transcript is detected 6 h after transfer, in comparison with the undetectable levels found at the beginning of the treatment (Fig. 2). This result is in accordance with our northern data (Fig. 1A) that corroborate that this is a reliable method to analyze the other genes. Interestingly, we found that

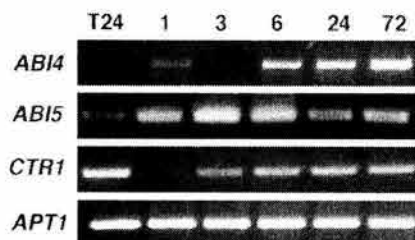


Figure 2. *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* transcript accumulation is regulated by Glc. RT-PCR analysis of total RNA from 3-d-old wild-type (*Wassilewskija* [Ws]) seedlings grown in standard media and transferred to Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc for 1, 3, 6, 24, and 72 h. The PCR product of *APT1* was used as a cDNA loading control. Specific primers were used to amplify *ABI4*, *ABI5*, *CTR1*, and *APT1* gene transcripts. The lengths of the PCR products are 974, 183, 353, and 478 bp for *ABI4*, *ABI5*, *CTR1*, and *APT1*, respectively. The linear phase of the exponential PCR reaction was corroborated for each gene (data not shown). A representative experiment from three biologically independent experiments is shown, including only the 24-h transference (T24) control for simplification. The means \pm SE of all three experiments and their corresponding transfer controls are included in Figure 4, D to F.

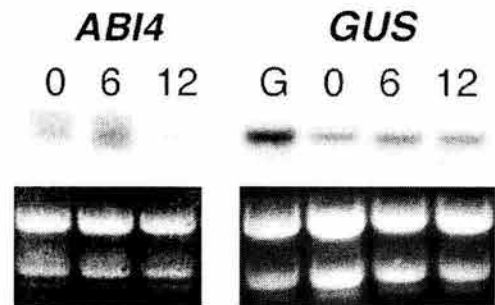


Figure 3. *ABI4* response to osmotic stress. Northern blots from wild-type (Col-0) and *ABI4::GUS* transgenic 2-d-old seedlings grown on standard liquid media and exposed to Murashige and Skoog 7% (w/v) mannitol for 0, 6, and 12 h or Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc for 12 h (G). Each lane contains 8 μ g of total RNA. The complete *ABI4* cDNA and a 600-bp *GUS* fragment were used as probes. rRNAs were used as loading control.

the levels of the *ABI5* and *CTR1* transcripts are also affected by Glc. *ABI5* accumulates in response to Glc even faster than *ABI4* because it is detected shortly (1 h) after transfer to Glc. The *CTR1* expression pattern is more complex because a decrease of the transcript level is observed reproducibly 1 h after transfer to Glc, but its level subsequently recovers. The Glc response of these genes is not due to a stress caused by transferring the plant as it was corroborated by biologically independent transfer experiments to standard media (see following sections). We observed that the expression of the *ABI5* gene in response to Glc is not maintained at the same levels between 24 and 72 h of the Glc treatment. As important developmental changes occur in this period, it is possible that this fluctuation maybe related to the intrinsic plant development.

To discriminate whether the response of *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* gene transcripts corresponds to a Glc signal or to an osmotic effect caused by the Glc concentration used in the experiments, we analyzed gene expression in response to isosmotic concentrations of mannitol. Initially, we followed the *ABI4* response to 7% (w/v) mannitol by northern-blot analysis in wild-type and *ABI4::GUS* transgenic seedlings, using the same conditions described in Figure 1, A and J. As shown in Figure 3, the levels of *ABI4* and *ABI4::GUS* gene transcripts slightly increase in the presence of mannitol but do not show the substantial sustained increases observed in the presence of Glc (Figs. 1A versus 3). Meanwhile, the *ABI4* transcript level is maintained high in Glc over the period analyzed (12 h), it is reduced in the mannitol treatment (Fig. 3). In the case of the *ABI4::GUS* gene transcript, we did not observe a decrease in the transcript level at 12 h, and this may be due to the intrinsic stability of the *GUS* mRNA compared with the *ABI4* transcript. Thus, these results led us to conclude that the *ABI4* transcript accumulation observed in the Glc treatment is not entirely due to an osmotic response.

To fully analyze the osmotic response during shorter and longer treatment periods for *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* genes, RT-PCR experiments were performed. Interestingly, the *ABI5* and *CTR1* genes are also responsive to osmoticum. The *ABI4* and *ABI5* transcripts are positively regulated by mannitol, whereas *CTR1* transcript level is reduced (Fig. 4A). A specific accumulation of *ABI4* transcript in response to Glc begins at 6 h (Figs. 2 and 4D). In response to osmotic stress, *ABI4* transcript accumulation is observed earlier, but the levels are notably lower than in response to Glc (Fig. 4D), in agreement with the data from the northern blot (Figs. 1A and 3). Once again, no detectable levels of *ABI4* transcript were found at 0 h of treatment (Fig. 4D). Under our conditions, the *ABI5* expression pattern is similar in both Glc and mannitol treatments (Figs. 2 and 4, A and E). Thus, with these data, it is still not possible to discriminate whether Glc directly regulates *ABI5* gene expression. In the case of the *CTR1* transcript, mannitol treatment results in a permanent repression in contrast to Glc, where a transient repression is followed by a recovery (Fig. 4F). Thus, we suggested that Glc is capable of overriding the osmotic signal generated in these conditions, which led us to conclude that Glc regulates *CTR1* transcript levels.

We have demonstrated previously that seedlings grown on Glc contain higher levels of ABA, required for normal Glc signaling, and the participation of

ABA in osmotic responses is also very well established (Zeevaart and Creelman, 1988; Arenas-Huertero et al., 2000). In addition, it has been reported that the *ABI5* gene is induced in young seedlings by ABA, salt, Glc, and drought treatments (Lopez-Molina et al., 2001; Brocard et al., 2002). Therefore, it was important to determine if ABA also regulates the *ABI4* and *CTR1* transcripts. We tested the accumulation of *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* genes in response to the addition of 100 μ M ABA (Fig. 4B). The *rd29A* gene was used as control because it is known to be ABA and osmotic responsive (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994). The levels of the three transcripts were modulated in response to ABA (Fig. 4B). In general terms, the transcript accumulation profile for all three regulatory genes after ABA treatment correlates with their responses to mannitol (Fig. 4, D–F), suggesting that at least part of the observed osmotic response might be ABA dependent, similar to the *rd29A* control gene (Fig. 4, A and B). As in the case of the mannitol treatment, *ABI4* accumulation in response to ABA is notably lower than that observed in response to Glc, when compared with the *APT1* internal control gene (Fig. 4D).

To further investigate the specificity of Glc regulation over the *ABI5* gene, inductions were performed using the phosphorylable Glc analog 2DG. 2DG has been shown to act as a potent sugar signal for the regulation of a variety of Glc-regulated genes in yeast

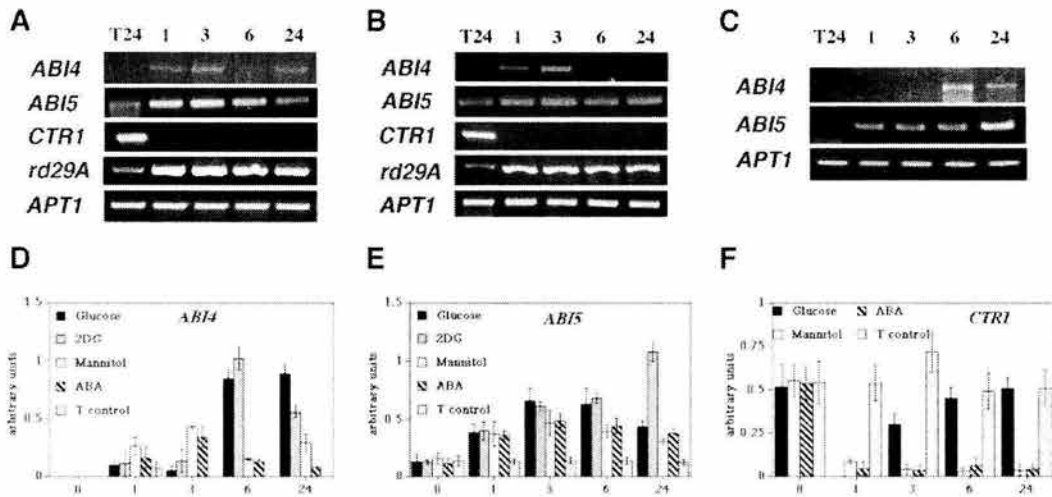


Figure 4. Glc regulation of *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* genes is not due to the osmotic effect of Glc. Three-day-old WT (Ws) seedlings grown in standard media were transferred to standard media plus either 7% (w/v) mannitol (A), 100 μ M ABA (B), or 0.5 mM 2DG (C) for 1, 3, 6, and 24 h. For simplification, only the 24-h transfer (T24) control was included. RT-PCR was performed as described in Figure 2. The *rd29A* gene was used as control of ABA and osmotic treatments. Comparative histograms of the densitometric quantification of the PCR products from biologically independent experiments are shown for *ABI4* (D), *ABI5* (E), and *CTR1* (F) in response to 7% (w/v) Glc, 0.5 mM 2DG, 7% (w/v) mannitol, and 100 μ M ABA and including the transfer controls (T control) for each time point. In the case of *ABI4*, where no detectable transcript levels were found, such as 0 h and most of the T control times, no bar is observed (D). The *APT1* RT-PCR product was used as internal control in each reaction, and the value of each condition and the relative units of the amplification signals obtained by the densitometric analysis of each gene are normalized to the amplification signal of the control *APT1* gene (arbitrary units). The data on the graphic correspond to the mean \pm SE of three separate experiments.

and plants. Glc-mediated gene regulation by 2DG has been detected when used at much lower concentrations (0.5–2 mM) than Glc (Graham et al., 1994; Jang and Sheen, 1994), which avoid an osmotic effect. 2DG is known to be very toxic to plant cells; thus, the initial experiments were performed with increasing concentrations of this analog to establish the lowest effective concentration (data not shown). It was observed that a concentration of 0.5 mM 2DG gave detectable responses of the Glc-regulated *ABI4* gene without affecting the levels of the *APT1* gene used as internal control (Fig. 4C). Similar to *ABI4*, the *ABI5* gene is responsive to 2DG (Fig. 4C), supporting a direct regulation by Glc independent of the osmotic responses. Based on the present analysis, we conclude that Glc has a direct and specific regulatory role over the transcript accumulation levels of *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1*, which can be differentiated from their osmotic regulation. In summary, our data point to a complex regulation of the transcript accumulation of *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* genes by multiple factors.

Glc Regulation of *ABI4* and *CTR1* Transcript Accumulation Is Affected by Developmental Signals

It has been shown that the susceptibility of young seedlings to developmental arrest in response to sugars is restricted to a short period of time after germination (Gibson et al., 2001). We examined whether the regulation of the *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* genes by sugar observed in cotyledon stage seedlings was also limited to a developmental period. The accumulation of *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* transcripts in response to Glc (Fig. 5A) was examined in 6-d-old seedlings containing the first pair of true leaves. Interestingly, the response to Glc of *ABI4* and *CTR1* is different from that observed in younger plants. Unlike in 3-d-old seedlings, *ABI4* induction by Glc was undetectable in 6-d-old plants (Fig. 5A); similar results were observed in *ABI4::GUS* transgenic lines by GUS protein activity (data not shown). The capacity of these plants to respond is lost not only for the Glc signal but also for ABA and even for the potent sugar analog 2DG (Fig. 5). We occasionally observed a very slight band after a 1-h transfer to 2DG treatment; however, this fluctuation was not reproducible in all experiments. Hence, this variation was considered to be within the experimental fluctuation and not a 2DG-specific effect. In the case of *CTR1* gene, the transient repression observed in the first hour of Glc treatment in 3-d-old seedlings (presumably due to osmotic stress) is lost at this older stage. However, the level of this gene is induced after 24 to 72 h of Glc treatment. Thus, it appears that *CTR1* is still responsive to Glc but with a different expression pattern than the one observed early in development (Fig. 4A). It is interesting that 2DG did not reproduce the Glc induction (Fig. 4B),

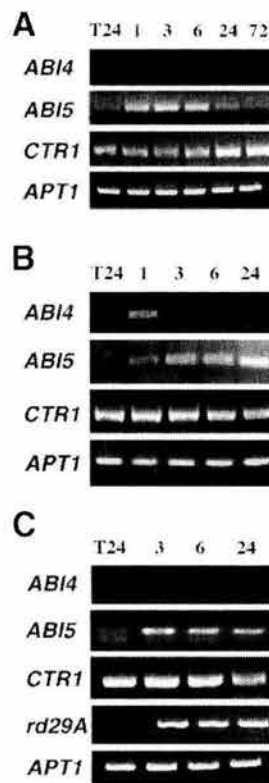


Figure 5. Glc regulation of *ABI4* and *CTR1* transcript accumulation is affected by developmental signals. Six-day-old WT (Ws) seedlings grown in standard media and transferred to Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc (A), standard media plus 0.5 mM 2DG (B), or 100 μM ABA (C) for the indicated times. For simplification, the 24-h transfer (T24) control is included, but similar levels to this control were observed in the rest of the control times (data not shown). The PCR product of *APT1* was used as a cDNA loading control. Samples were collected and used for RT-PCR analysis as described. This picture is representative of three biologically independent experiments.

suggesting that either a signal derived from the further metabolism of Glc (Xiao et al., 2000) or from additional developmental signals might be responsible for this response. Finally, a different *CTR1* response is also observed with a direct ABA treatment (Fig. 5C).

Surprisingly, in 6-d-old seedlings, the *ABI5* transcript is regulated by Glc (Fig. 5A), 2DG (Fig. 5B), and ABA (Fig. 5C), with a similar pattern to the one found at 3 d. These results are consistent to those recently reported by Brocard et al. (2002) but contrast with the report that the *ABI5* protein induction in response to ABA is restricted to a narrow developmental window (Lopez-Molina et al., 2001). We also confirmed that none of the responses was a result of the physical transfer of the plants (data not shown).

ABI4 and *ABI5* Glc Regulation Is Affected in Mutants Displaying Altered Glc Responses

With the aim to further analyze the Glc-mediated regulation of *ABI4* and *ABI5* genes, we explored the levels of their transcripts in different mutant backgrounds that display a Glc-insensitive phenotype. Because the *CTR1* Glc response is complex, this analysis was carried out only with *ABI4* and *ABI5* genes. Thus, the ABA-deficient (*aba3-6/gin5*, *aba1-1*, *gin1-1/aba2*, and *aba3-2*), the ABA-insensitive (*abi4-6/gin6* and *abi5-1*), and ethylene signaling *ctr1-1* mutants were chosen for this study. Initially, the abundance of *ABI4* and *ABI5* transcripts was determined in the *abi4-6/gin6*, *abi5-1* and *gin1-1/aba2* mutants grown for 3 d in standard media and transferred to 7% (w/v) Glc media for 6 h. Figure 6A shows that *ABI4* and *ABI5* transcript accumulation in response to Glc is dramatically reduced in these three mutants. A very similar response was observed when these mutants were grown continuously in the presence of Glc (Fig. 6, B and D). Given that these three mutants showed no difference when grown continuously in Glc, the rest of the mutants were also analyzed under these conditions. Figure 6B shows that the induction of *ABI4* transcript in response to Glc is dramatically reduced in the *gin* mutants analyzed. Also, an important reduction of the Glc-mediated transcript accumulation for the *ABI5* gene is observed for this set of mutants with the exception of *abi4-6/gin6*, in which a slight induction is still observed. It is possible that the level of the *ABI4* factor in this mutant, which affects the promoter region of the *ABI4* gene (Arenas-Huertero et al., 2000), is sufficient to preserve some regulation that it is detectable under the continuous Glc growth condition. *ABI4* and *ABI5* transcript accumulation in response to Glc in *aba* mutants was also compared with their corresponding wild-type ecotype (Fig. 6C). Similar to the *gin* mutants, *ABI4* transcript induction by Glc is basically eliminated in the *aba* mutants. The *ABI5* expression pattern is also affected in this set of mutants, although to a lesser extent than in *aba2-1* (Fig. 5C). Our previous report demonstrated that the addition of nanomolar concentrations of ABA restores Glc sensitivity in *aba* mutants (Arenas-Huertero et al., 2000). In accordance with this finding, the addition of 100 nM ABA to the Glc media restores transcript accumulation in the *aba1-1* plant of *ABI4* and also in *ABI5*, where the observed induction is not as high as *ABI4*, probably due to the existing basal levels of this gene (Fig. 6C).

Finally, we followed *ABI4* and *ABI5* transcript response to Glc in ethylene and ABA signaling mutants. The response of these two transcripts was affected in the *ctr1-1* mutant (Fig. 6C). We have shown previously that only two of the reported ABA-insensitive mutants (*abi4-1* and *abi5-1*) display altered Glc sensitivity, whereas the remainder (*abi1-1*, *abi2-1*, and *abi3-1*) show a wild-type response (Arenas-Huertero et al., 2000). As shown in Figure 6D, tran-

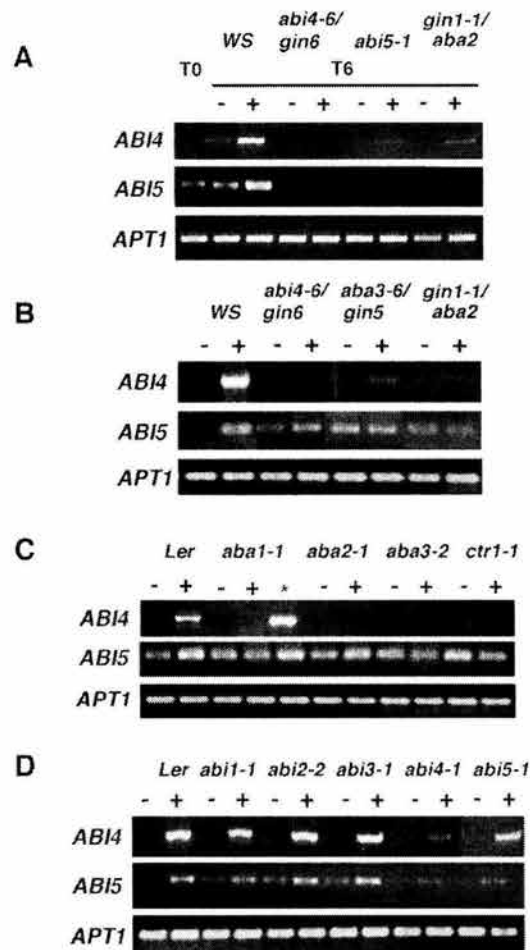


Figure 6. *ABI4* and *ABI5* Glc regulation is affected in ABA-deficient, -insensitive, and ethylene signaling mutants. A, Indicated genotypes were grown in standard media for 3 d (T0) and transferred to the same media (–) or Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc (+) for 6 h (T6). *gin* (B), *aba* and *ctr1* (C), and *abi* (D) plants were grown on standard media (–), Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc (+), or Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc plus 100 nM ABA (*) during 18 d. Col-0 ecotype (*aba2-1* and *ctr1-1* genetic background) has exactly the same response as the Landsberg *erecta* (Ler) ecotype under these conditions. For simplification, the Col-0 ecotype PCR is omitted in this figure. Samples were harvested and used for RT-PCR analysis as described. The PCR product of *APT1* was used as a cDNA loading control. A representative experiment from three biologically independent experiments is shown.

script accumulation of *ABI4* and *ABI5* in response to Glc is altered only in *abi4-1* and *abi5-1* plants but not in *abi* mutants with normal Glc sensitivity (*abi1*, *abi2-1*, and *abi3-1*).

DISCUSSION

The increasing number and diversity of genes regulated by sugars reflects the importance of sugar signaling (Koch, 1996; Rolland et al., 2002). Such

regulation has profound effects on plant growth, development, and stress response (Koch, 1996; Smeekens, 1998). The mechanisms by which sugars modulate gene expression are variable. It has been shown that the transcription of several genes is induced or repressed by sugars, but other levels of regulation have also been reported (Koch, 1996; Chan and Yu, 1998; Rook et al., 1998; Cheng et al., 1999; Cotelle et al., 2000; Toyofuku et al., 2000). Very little is known about the effects that sugars have on the expression of genes that participate in the sugar signaling cascade. It has been reported that a putative sugar signaling component (AtSR2) that belongs to the SNF1-related protein family is induced by Suc, Glc, and Fru (Chikano et al., 2001). Recently, it has been found that the expression level of several genes involved in ABA biosynthesis and in the Glc post-germination response is also modulated by Glc (Cheng et al., 2002). During the characterization of the *gin6* mutant, we observed that the *ABI4* transcript accumulated when plants were grown in the presence of Glc, suggesting a possible regulation of this gene by sugars (Arenas-Huertero et al., 2000). In this work, it is shown that the transcript levels of *ABI4* and two additional factors that affect sugar signaling, *ABI5* and *CTR1*, are modulated upon Glc addition. The induction strategy used in this work permitted to demonstrate that the modulation of transcript levels by Glc is independent of the developmental arrest produced by the continuous presence of sugars.

Loci Implicated in Sugar Response Are Regulated by Glc, Osmotic Stress, and ABA

ABI4 mutant alleles have been isolated in sugar mutant screens on multiple occasions, using different approaches and different mutant collections (Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001). This finding may be indicative of the central role that *ABI4* plays in Glc responses during early seedling development and prompted us to analyze several aspects of its regulation in further detail. The *ABI4* transcription factor, in addition to its role in sugar signaling, is well known to be required in seed development and salt responses (Finkelstein et al., 1998, 2002; Quesada et al., 2000). *ABI4* is expressed in seeds, and its highest levels are found at seed maturity, but very low levels of this transcript (that disappear shortly after germination) have been reported in vegetative tissues (Söderman et al., 2000). In agreement with this report, under our standard growth conditions, we found that after germination (3 d), the *ABI4* transcript declines to levels undetectable by RT-PCR. The very low levels of GUS activity detected in 10-d-old *ABI4::GUS* plants probably reflect the intrinsic stability of the GUS protein. However, Glc has the capacity to increase *ABI4* transcript levels. This is true not only in the developmentally arrested seedlings but

also under conditions that do not result in developmental arrest. Although transcriptional regulation by sugars is the most studied process (Smeekens, 2000), posttranscriptional sugar regulatory events might also be responsible for such transcript accumulation. In either case, because the accumulation is also observed in *ABI4::GUS* transgenic plants, at least part of the region involved in this sugar-mediated regulation seems to be located within the 3-kb upstream of the initiation codon of the *ABI4* gene.

Based on the GUS expression pattern of different independent transgenic lines grown in 4% and 7% (w/v) Glc, the tissues where the *ABI4* transcript is detected are similar to those of younger seedlings when grown in low sugar (standard media). A notable exception is the primary root, where the detectable expression in 3-d-old standard media-grown seedlings was confined to the root tip, whereas in those grown in Glc, the GUS reporter is detected in most of the root tissues. Thus, it is possible that Glc not only increases the transcript levels of the *ABI4* gene but also changes its expression pattern. It is interesting that in *abi4*, *abi5*, and three ABA biosynthetic mutants, an altered lateral root formation in response to nitrate is observed (Signora et al., 2001). These findings suggest that ABA, *ABI4*, and *ABI5* might have a role in the lateral root development, regulated by the antagonism between N and C (Zhang et al., 2000). Thus, the expression of the *ABI4* gene along the root under high Glc concentrations might be related to such interaction. Similarly, *ABI5::GUS* expression was reported recently to be localized to both primary and lateral root tips under unstressed conditions, with expression increased and expanded throughout 3-d-old seedling roots in response to ABA, Glc, and other stresses (Brocard et al., 2002). The mechanism of *ABI4* and *ABI5* action in this interaction remains to be explored in the future.

In addition to *ABI4*, two additional sugar signaling factors, *ABI5* and *CTR1*, have been shown to affect Glc responses in plants. Mutations of these two genes cause Glc-insensitive phenotypes (Arenas-Huertero et al., 2000; Laby et al., 2000; Gibson et al., 2001; Cheng et al., 2002) in addition to their respective reported roles in ABA and ethylene signaling (Finkelstein, 1994; Stepanova and Ecker, 2000). Previous results had already shown that ABA, salt, and drought triggers the accumulation of the *ABI5* protein (Lopez-Molina et al., 2001). We observed that the *ABI5* and *CTR1* transcript levels are modulated by Glc. Similar to *ABI4*, the *ABI5* transcript accumulates in wild-type seedlings transferred to Glc. During the time that this analysis was performed, it was reported that GUS-specific activity in *ABI5::GUS* transgenic plants increases in response to several stresses, including a Glc treatment for 2 d (Brocard et al., 2002). In this work, we further demonstrate that *ABI5* transcript accumulation is detectable 1 h after Glc addition. This response is even faster than the one

observed for the *ABI4* transcript (6 h), which might suggest a different time frame requirement for these two factors during Glc response and/or a different mechanism of induction.

Distinct Glc and Osmotic Regulation of Sugar Response Loci

Several lines of evidence allow us to suggest that the observed Glc regulation of the *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1* genes is specific and not a pure osmotic response. First, even though *ABI4* responds to osmoticum and ABA, the transcript accumulation kinetics for both signals are different from Glc induction, and the levels are considerably lower than in Glc-treated seedlings by northern and RT-PCR detection methods. Also, the *CTR1* osmotic and ABA responses are completely opposite to the one observed in Glc. Second, *ABI4* and *ABI5* genes are responsive to 0.5 mM 2DG and, when compared with the 388 mM Glc corresponding to 7% (w/v), exert a negligible osmotic stress. Third, Glc-regulation of *ABI4* and *ABI5* is altered in mutants that affect Glc signaling but not in ABA response mutants that have a normal sugar response (*abi1*, *abi2*, and *abi3*). Thus, our results strongly support the idea that even though these three genes respond to multiple factors including osmoticum and ABA, they do have a specific Glc response. The regulation of the transcript levels by Glc might represent a positive feedback loop, important to ensure a more sustain Glc response. Also, the induction of these factors by Glc could result in the modulation of other signaling pathways in which these factors play a role.

Based on the Glc-resistant phenotype of *abi4-6/gin6* and *abi5* mutants, it is clear that both transcription factors are required for Glc responses in seedlings. This requirement could be accomplished by a direct induction of the transcript level by Glc. In fact, the present analysis demonstrates that the levels of both transcripts do increase upon Glc treatment. The fact that the *ctr1* mutation cause Glc insensitivity indicates that the presence of *CTR1* is also necessary for Glc signaling (Zhou et al., 1998; Gibson et al., 2001; Cheng et al., 2002). Surprisingly, the *CTR1* transcript in the presence of 7% (w/v) Glc is rapidly and transiently reduced probably as an osmotic response, but it subsequently recovers. This recovery is specific for Glc and overrides the permanent repression caused by osmoticum or ABA treatments observed at early seedling development. Because *CTR1* acts as a negative regulator responsible for blocking the ethylene cascade, its presence should allow the increase in ABA level required during Glc response (Arenas-Huertero et al., 2000; Cheng et al., 2002) that again could result in a positive feedback loop of the Glc signaling. Such observations are in agreement with the proposed opposite roles of ABA and ethylene in regulating Arabidopsis growth (Beaudoin et al., 2000;

Ghassemian et al., 2000; Gazzarrini and McCourt, 2001; Finkelstein and Gibson, 2002).

It is noteworthy that the osmotic response for all three genes is similar to the pattern in ABA, suggesting that this response might be at least in part ABA dependent (Leung and Giraudat, 1998). The regulation of these genes by mannitol is not surprising, considering that the *ABI5* protein is induced by drought and that alleles of the *abi4* and *abi5* mutants (*san5* and *nem1*, respectively) result in resistance to salt and osmotic stress inhibition of germination (Quesada et al., 2000; Lopez-Molina et al., 2001; Carles et al., 2002). Moreover, all mutants with a Glc-insensitive phenotype, including *abi*, *aba*, and *ctr1*, are also more resistant to the inhibition of growth observed in wild type by mannitol (400 mM), sorbitol (400 mM), and NaCl (150 mM; Laby et al., 2000; A. Arroyo and P. León, unpublished data). Thus, these data further reinforce the participation of *ABI4* and *ABI5* during various aspects of the vegetative growth such as stress and developmental responses. However, Glc-sensitive *abi* mutants (*abi1*, *abi2*, and *abi3*) also show some resistance to salt and osmotic stress at germination (Werner and Finkelstein, 1995; R.R. Finkelstein, unpublished data), supporting the notion that responses to Glc and osmotic stress involve overlapping but different mechanisms.

The essential role of ABA during sugar regulation is further reinforced because all mutants with low ABA levels are affected in the transcript regulation of the *ABI4* and *ABI5* transcription factors, but the exogenous addition of low concentrations of ABA restores Glc regulation. It is clear that the Glc effect does not depend on ABA alone because the ABA treatment does not reproduce the response on the transcript levels observed by the sugar signal. This correlates with our previous results in which mutants such as *gin6/abi4* displayed a Glc-insensitive phenotype despite that ABA levels are induced by the presence of Glc (Arenas-Huertero et al., 2000).

It has been shown that *gin1-1/aba2* and *gin5/aba3-6* mutants genetically interact with HXK, leading to the proposal that these genes participate in the HXK-mediated pathway (Zhou et al., 1998; Arenas-Huertero et al., 2000). It was observed that Glc-mediated regulation of *ABI4* and *ABI5* genes is altered in these mutants, suggesting that such regulation might be, at least in part, dependent on hexose phosphorylation. This possibility is further supported by the finding that *ABI4* and *ABI5* are positively regulated by 2DG, which has been used widely to dissect the HXK dependence in the Glc signal transduction mechanism of a variety of genes (Roland et al., 2002). Thus, these results together suggest that HXK might play a direct role on at least part of the regulation of *ABI4* and *ABI5* transcript levels reported in this work, although direct proof is still required.

Developmental Controls of Glc Responsiveness

We observed that the transcript levels of these three genes in response to Glc, 2DG, and ABA are affected by developmental signals. For the conditions analyzed, *ABI4* is responsive during a very restricted developmental window of early seedling development (before 6 d), whereas different *CTR1* responses occur at distinct developmental stages. A different story was found for the *ABI5* transcript, which was still responsive in the 6-d-old seedlings. This finding agrees with that recently obtained by Brocard et al. (2002), but contrasts with another report where it was found that the ABA-dependent accumulation of the *ABI5* protein is restricted to the first 2 d of seedling development (Lopez-Molina et al., 2001). Thus, despite the accumulation of the transcript in response to ABA in these developmental stages, a posttranscriptional regulation is critical for the accumulation of *ABI5* factor (Lopez-Molina et al., 2003). It would be very interesting to see whether a similar mechanism operates in response to Glc. Lopez-Molina et al. (2001) proposed that *ABI5* might be a key player for a checkpoint period when the environment is monitored. This developmental period might be the same as the sugar-mediated arrest, where *ABI4* and *ABI5* seem to play key functions. So far, no physical interactions between these two factors have been detected (Nakamura et al., 2001), which opens the possibility that these two transcriptional factors modulate the expression of a different set of genes. In response to Glc, this might also be true because a different time frame of expression patterns is observed between the two factors as has been mentioned already. It has been suggested that *ABI5* and some of its homologous basic Leu zippers might function with some redundancy in ABA, sugar, and other stress responses (Kang et al., 2002; Leon and Sheen, 2003). However, *ABI4* could play a more critical role in monitoring sugar status, at least during early developmental stages, because no apparent homologs are found, at least in the Arabidopsis genome. In conclusion, these results indicate that these genes are finely regulated during plant development by a variety of signals, and different sugar signaling molecules possibly are acting simultaneously at different tissues and stages of plant development. These results also raise questions about the molecules involved in Glc responses in later developmental stages. For example, undetectable levels of *ABI4* transcript were found both by northern and RT-PCR analysis in 6-d-old seedlings, and similar results have been reported (Söderman et al., 2000). Thus, the requirement of this factor in later developmental stages is a subject that is presently analyzed by our group.

In summary, this work provides direct evidence that the transcript abundance of three factors, *ABI4*, *ABI5*, and *CTR1*, is specifically regulated by Glc. These factors participate in a variety of plant responses to environmental conditions, hormonal sig-

nal, and sugar regulation during early seedling development. Thus, these molecules should be integrating a set of external signals and metabolic signals through the interaction with specific components. The regulation of these three factors by Glc might provide an important regulatory loop that allows a sustained Glc response. In addition, this regulation might integrate the fluctuations of the endogenous sugar concentrations with other signaling pathways in which these factors have a role, such as ABA and ethylene signaling. Glc regulation over these genes is accomplished at least in part on their transcript levels that either modulate transcription or affect its mRNA stability. However, further analysis is needed to determine whether the changes observed in this work are also reflected at the protein level.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis plants were routinely grown under sterile conditions in controlled growth chambers (24°C, 16-h-light/8-h-dark photoperiod). Seeds were surface sterilized and plated on media containing 1× Murashige and Skoog basal salt mixture (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) supplemented with B5 vitamins, 0.05% (w/v) MES, and 0.7% (w/v) phytoagar. All media contained either 1% (w/v) Suc (standard media: Murashige and Skoog 1% [w/v] Suc) or Glc at the indicated concentrations as carbon sources. For induction experiments in liquid, plants were grown on Murashige and Skoog 1% (w/v) Suc media, then replaced with Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc or 7% (w/v) mannitol. For inductions in solid media, plants were grown over nylon filters on standard media, and the filter was then transferred to Murashige and Skoog 7% (w/v) Glc or Murashige and Skoog 1% (w/v) Suc media plus 2DG (0.5 mM) or 7% (w/v) mannitol or 100 μM ABA of (±) *cis-trans*-isomer (Sigma, St. Louis). With this procedure, we avoided touching the seedling during transfer. In all experiments, seeds were incubated at 4°C for 4 d to break dormancy.

The *aba*, *abi*, and *ctr1-1* mutants and wild-type plants *Ws*, *Ler*, and *Col-0* were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center. The *gin1-1* mutant was kindly provided by Dr. Jen Sheen (Department of Genetics, Harvard Medical School, and Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA). The *aba1-1*, *aba3-2*, *abi1-1*, *abi2-1*, and *abi3-1* mutants are in the *Ler* ecotype, whereas *aba2-1*, *abi4-1*, and *ctr1-1* are in *Col-0*, and *abi5-1* and *gin1-1* are in *Ws*. The *ABI4::GUS* transgenic plants (*Col-0* background) were reported previously (Söderman et al., 2000). Homozygous plants from four independent *ABI4::GUS* transgenic lines were used to perform the GUS analysis in this work.

Expression Analysis

Total RNA was isolated using standard protocols (Ausubel et al., 1989) from seedlings grown as indicated. For northern blots, total RNA was fractionated by electrophoresis in 1.2% (w/v) agarose gels and transferred onto Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham Corporation, Arlington Heights, IL). Hybridizations and washes were performed at high-stringency conditions according to standard procedures, using ³²P-radiolabeled probes (Church and Gilbert, 1984).

For RT-PCR analysis, cDNA was synthesized with Super Script II RT (GIBCO-BRL) using 5 μg of total RNA by oligo(dT)-primed reverse transcription. A fraction (1/80) of the first strand cDNA was used as a template for the PCR. Linearity phase of the exponential PCR reaction was corroborated for each gene by comparisons of the PCR product at different cycles (18, 25, 28, 30, 33, 35, and 40). The selected cycles for each gene used in the experiments were as follows: 40 cycles for *ABI4*, 33 for *ABI5*, 30 for *CTR1*, and 30 for *APT1*. Each set of RT-PCR data reported in this work were repeated in at least three biologically independent experiments. The graphic representation of densitometric quantification of the RT-PCR experiments was done using the National Institutes of Health Image 1.61 program

(National Institutes of Health, Bethesda, MD) and normalized in each case by the *APT1* control gene. The sequence of the primers used, the corresponding size products, and Gene Bank accession numbers are as follows: *ABI4*, 5'-ATGGACCCCTTAGCTCCCA-3' and 5'-AAGATGGGATCAATA-AAATC-3', 974 bp, AF040959; *ABI5*, 5'-GCA-TAT-ACA-GTG-GAA-TTG-GA-3' and 5'-CGG-GTT-CCT-CAT-CAA-TGT-CC-3', 183 bp, AC006921.5; *CTR1*, 5'-GGT-CTC-TCG-CGA-TTG-AAG-GC-3' and 5'-GAG-CGG-TTG-GGC-GGA-GGA-AC-3', 353 bp, L08790; *rd29A*, 5'-CGG-CGA-GAA-GTG-ATG-ATG-TG-3' and 5'-CIT-CTC-CAC-TTC-CTT-TGT-CG-3', 518 bp, D13044; and *APT1*, 5'-TCCCAGAATCGCTAAGATTGCC-3' and 5'-CCTTCCCTTAAGCTCTG-3', 478 bp, BT000370.

ABI4 Histochemical and Fluorometric Analyses

GUS histochemical analysis was performed in homozygous plants as described previously (Jefferson, 1987). The plant tissue was incubated with the GUS substrate at 37°C overnight (12 h). Clearing was accomplished by 30-min incubations with an acetone:methanol (3:1 [v/v]) solution. Plants were observed under bright-field microscopy (Nikon Type 104, Nikon, Tokyo). Fluorometric assays of GUS activity were performed according to Jefferson (1987). Seeds or seedlings were collected and ground in 2 volumes of GUS extraction buffer. Total protein extracts were centrifuged at 14,000 rpm twice for 20 min at 4°C, and protein content was quantified using Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For each assay, 4.5 µg of total protein was incubated with 4-methylumbelliferyl-D-Glucuronide (Sigma) at 37°C, and samples were taken at different time points to corroborate linearity. GUS activity was determined using a DyNAQuant 200 fluorometer (Hoefer, San Francisco, CA) and reported as GUS-specific activity expressed as nanomoles of methyl-umbelliferone per microgram of total protein per minute. The fold induction is calculated as the ratio of the GUS-specific activity from seedlings grown in Glc media divided by the GUS-specific activity from plants grown in standard media.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Araceli Cantero, Martha Trujillo, and Carolina San Roman for technical support; Alma Lidia Martínez for computer support; and Paul Gaytan and Eugenio López for oligo production. We thank Drs. Jen Sheen, Crisanto Gutierrez, Elena Ramirez Parra, Arturo Guevara, and Miguel A. Villalobos for discussion and helpful comments. Furthermore, we thank Drs. Kenneth Luehrsen, Rosalia De Necochea, Stewart Gillmor, and Stuart Reichler for critical reading of the manuscript. We also thank the Arabidopsis Biological Resource Center for providing different seed stocks.

Received January 28, 2003; returned for revision March 28, 2003; accepted June 3, 2003.

LITERATURE CITED

Arenas-Huerta F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* 14: 2085–2096

Arroyo A, Arenas F, Jiménez A, Cantero A, León P (2001) The participation of ABA in the glucose-mediated regulation in Arabidopsis. Presented at 11th International Conference on Arabidopsis Research, June 23–27, 2001, Madison, WI

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Siedman JG, Smith JA, Struhl K (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York

Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103–1115

Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2002) Regulation and role of the Arabidopsis *ABA-insensitive 5* gene in ABA, sugar and stress response. *Plant Physiol* 129: 1533–1543

Carles C, Bies-Eiheve N, Aspart L, León-Kloosterziel KM, Koornneef M, Echeverría M, Delseny D (2002) Regulation of *Arabidopsis thaliana* *Em* genes: role of *ABI5*. *Plant J* 30: 373–383

Chan MT, Yu SM (1998) The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6543–6547

Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen H-C, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo S et al. (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* abscisic acid biosynthesis and glucose signaling. *Plant Cell* 14: 2723–2743

Cheng WH, Taliere EW, Chourey PS (1999) Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10512–10517

Chikano H, Ogawa M, Ikeda Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H (2001) Two novel genes encoding SNF-1 related protein kinases from *Arabidopsis thaliana*: differential accumulation of *AtSR1* and *AtSR2* transcripts in response to cytokinins and sugars, and phosphorylation of sucrose synthase by *AtSR2*. *Mol Gen Genet* 264: 674–681

Chiou TJ, Bush DR (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4784–4788

Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991–1995

Coruzzi GM, Zhou L (2001) Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging "matrix effects." *Curr Opin Plant Biol* 4: 247–253

Cotelle V, Meek SE, Provan F, Milne FC, Morrice N, MacKintosh C (2000) 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells. *EMBO J* 19: 2869–2876

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

Finkelstein RR (1994) Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J* 5: 765–771

Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15–S45

Finkelstein RR, Gibson SI (2002) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr Opin Plant Biol* 5: 26–32

Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599–609

Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* 10: 1043–1054

Fujiki Y, Ito M, Nishida I, Watanabe A (2000) Multiple signaling pathways in gene expression during sugar starvation: pharmacological analysis of *din* gene expression in suspension-cultured cells of Arabidopsis. *Plant Physiol* 124: 1139–1148

Gazzarrini S, McCourt P (2001) Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 4: 387–391

Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1117–1126

Gibson SI, Laby RJ, Kim D (2001) The *sugar-insensitive1* (*sis1*) mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctr1*. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 196–203

Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ (1994) Carbon catabolite repression regulates glyoxylate gene expression in cucumber cycle. *Plant Cell* 6: 761–772

Halford NG, Hardie DG (1998) SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol* 37: 735–748

Halford NG, Hey S, Jhureea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang Y (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot* 54: 467–475

Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeekens S (2000) The Arabidopsis *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J* 23: 577–585

Jakoby M, Weisshaar B, Drüge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 7: 106–111

Jang J-C, Sheen J (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665–1679

Jang J-C, Sheen J (1997) Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci* 2: 208–214

- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387–405
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 13: 3901–3907
- Kang J, Choi H, Im M, Kim SY (2002) Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 14: 343–357
- Koch KE (1996) Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509–540
- Laby RJ, Kincaid MS, Kim D, Gibson SI (2000) The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J* 23: 587–596
- Leon P, Sheen J (2003) Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci* 8: 110–116
- Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 199–222
- Lopez-Molina L, Chua NH (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41: 541–547
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Chua NH (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4782–4787
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua NH (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev* 17: 410–418
- Loreti E, Alpi A, Perata P (2000) Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. *Plant Physiol* 123: 939–948
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W, Liu Y, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300: 332–336
- Nakamura S, Lynch TJ, Finkelstein RR (2001) Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *Plant J* 26: 627–635
- Quesada V, Ponce M, Micol J (2000) Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 154: 421–436
- Riechmann JL, Meyerowitz M (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem* 379: 633–646
- Rolland F, Moore B, Sheen J (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: S185–S205
- Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C, Bevan MW (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J* 26: 421–433
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, Kampen Mv, Borrias M, Weisbeek P (1998) Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* *ATB2* bZIP transcription factor gene. *Plant J* 15: 253–263
- Seo M, Koshiba T (2002) The complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 7: 41–48
- Sheen J, Zhou L, Jang JC (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2: 410–418
- Signora L, De Smet I, Foyer CH, Zhang H (2001) ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant J* 24: 655–662
- Smeeckens S (1998) Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 230–234
- Smeeckens S (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 49–81
- Söderman EM, Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2000) Regulation and function of the *Arabidopsis* *ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol* 124: 1752–1765
- Stepanova AN, Ecker JR (2000) Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Curr Opin Plant Biol* 3: 353–360
- Takeda S, Mano S, Ohto M, Nakamura N (1994) Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiol* 106: 567–574
- Toyofuku K, Loreti E, Vernieri P, Alpi A, Perata P, Yamaguchi J (2000) Glucose modulates the abscisic acid-inducible *Rab16A* gene in cereal embryos. *Plant Mol Biol* 42: 451–460
- Werner JE, Finkelstein RR (1995) *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol Plant* 93: 659–666
- Xiao W, Sheen J, Jang JC (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biol* 44: 451–461
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251–264
- Zeevaert JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 439–473
- Zhang H, Jennings AJ, Forde BG (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J Exp Bot* 51: 51–59
- Zhou L, Jang J-C, Jones TL, Sheen J (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10294–10299

IV.5 Resultados y conclusiones adicionales.

IV.5.1 ABI4 es un trans-activador en el sistema de un híbrido de levadura.

Con la inquietud de identificar componentes adicionales de la señalización por Glc mediada por ABI4, nos dimos a la tarea de aislar proteínas de interacción con esta proteína. Para abordar este objetivo decidimos usar el sistema de 2-híbridos en levadura utilizando a ABI4 como anzuelo. Para ello se utilizó una versión truncada de la proteína ABI4 conteniendo de los aminoácidos 1-184 (de un total de 328), dada su capacidad intrínseca de trans-activación en el sistema de levadura (Söderman *et al*, 2000). La versión truncada (aa. 1-184) fue clonada en el plásmido de levadura pGBT8 (que contiene el dominio de unión a DNA de la proteína GAL4) y transformada en células de levadura, después de lo cual dichas células serían co-transformadas con una biblioteca de cDNA de Arabidopsis clonada en el vector ACT2 (que contiene el dominio de activación de GAL4). Esta versión truncada excluye todos los dominios “teóricos” de activación de ABI4 (localizados en el extremo C-terminal) y fue utilizada en una prueba de trans-activación en ausencia del dominio de activación de GAL4. Sorprendentemente, resultó que la versión truncada de ABI4 (aa 1-184), aún tuvo una fuerte actividad de trans-activación del gen reportero *HIS3* de la levadura, aún en presencia de concentraciones muy altas del inhibidor competitivo de la proteína HIS3p (Fig. 12).

La versión truncada de la proteína ABI4 trans-activa el gen reportero *HIS3* de la levadura

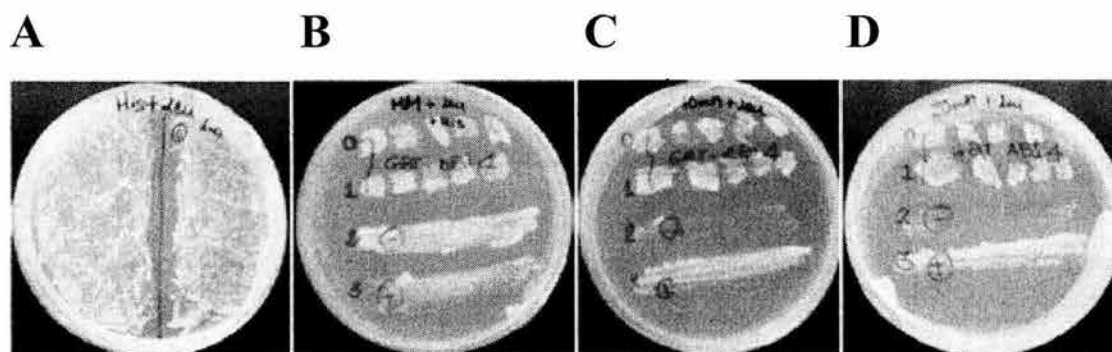


Figura 12. Prueba de trans-activación de la versión truncada de la proteína ABI4 expresada en levadura. La proteína ABI4 truncada (amino ácidos 1-184) fue clonada en el plásmido de levadura pGBT8 y transformada en células de levadura HF7c. **A.** Transformación de 2 clonas independientes de la construcción (0 y 1) en células de levadura. **B.** Selección de 5 colonias de levadura de cada una de las 2 clonas transformadas, crecidas en medio mínimo sin Triptofano (codificado en el plásmido pGBT8) suplementadas con Leucina (codificada en el vector auyente ACT2) e Histidina, como control positivo de crecimiento y de transformación. Se incluyeron controles positivos (+) y negativos (-) de la presencia del plásmido pGBT8. **C y D.** Réplica de las células crecidas en B, incluyendo en el medio 3AT (3-amino-1,2,4-triazol, un inhibidor potente de las biosíntesis residual de Histidina) 10 mM (C) y 20 mM (D).

Estos resultados indican por una parte que los dominios de activación de la transcripción de esta proteína aún requieren de un cuidadoso mapeo, y por otra parte que ABI4 es un activador transcripcional muy fuerte en el sistema de levadura. Como consecuencia, esta versión truncada no pudo ser usada para la búsqueda de proteínas de interacción siguiendo esta estrategia. Versiones más pequeñas de la proteína no son recomendables para nuestro propósito, pues ya eliminamos casi la mitad de la proteína que de por sí es pequeña (35.7 kDa), y la probabilidad de eliminar los dominios de interacción con otras proteínas es muy alta. Actualmente estamos en proceso de clonación de ABI4 en el vector que incluye el dominio de activación de GAL4, para utilizarlo junto con una biblioteca de cDNA clonada en el vector que incluye el dominio de unión a DNA de GAL4, y/o con algunas proteínas específicas candidatas que sabemos participan en la señalización de azúcares en Arabidopsis.

IV.5.2 *gin1*, una mutante deficiente en ABA.

La mutante *gin1* fue aislada por otro grupo de investigación en un "screening" de mutantes insensibles a glucosa. El análisis fenotípico de esta mutante sugirió la existencia de una interacción entre la vía de señalización de Glc y la fitohormona etileno. Análisis adicionales con una serie de mutantes sobreproductoras y señalizadoras de etileno revelaron que la señalización de etileno es antagonista de la señalización de Glc de forma dependiente de HXK1 (Zhou *et al.*, 1998).

Dada la similitud en el fenotipo de insensibilidad a glucosa de esta mutante con las mutantes aisladas en el presente trabajo, se estableció una colaboración con el grupo que la aisló para determinar si dicha mutante era alélica a alguna de las mutantes caracterizadas en este trabajo. Los análisis de las cruza genéticas de todas las mutantes indicó que *gin5*, *gin6*, *gin7* y *gin8* no son alélicas a *gin1* (Tabla 1 del artículo de la sección IV.3.3, y datos no mostrados).

Durante el análisis fenotípico comparativo de nuestras mutantes incluyendo a la mutante *gin1*, reveló que esta mutante presenta similitud con los fenotipos de las mutantes deficientes en la biosíntesis de ABA (mutantes *aba*), la cuales como se mencionó anteriormente son insensibles a Glc (Arenas *et al.*, 2000). Dichas mutantes se caracterizan por la pérdida de agua de forma acelerada cuando se suspende el riego, a lo que se le llama fenotipo "wilty". De hecho *gin1* al igual que otras mutantes deficientes en ABA, pierde turgencia fácilmente, presentando fenotipo "wilty". Así mismo se encontró que la adición de concentraciones nanomolares de ABA (100 nM) revierte el fenotipo silvestre, es decir, *gin1* recupera la sensibilidad a Glc en presencia de ABA, sugiriendo fuertemente que *gin1* es una mutante deficiente en ABA. Adicionalmente, *gin1* así como otras mutantes deficientes en ABA (*aba1*, *aba2* y *aba3*), afecta la expresión de 2 de los genes señalizadores de Glc, *ABI4* y *ABI5* (Cheng *et al.*, 2002; Arroyo *et al.*, 2003). El hecho de que la mutante *gin1* mapea muy cerca del locus ABA2 (en el cromosoma 1), sugirió fuertemente que esta mutante era un alelo de este gen. Esto fue confirmado posteriormente (Cheng *et al.*, 2002). Los resultados detallados del análisis fenotípico y de la expresión génica de *gin1* constituyeron parte de una colaboración con el grupo de la Dra. Jen Sheen, y fueron incluidos en una publicación donde participo como co-autor (Cheng *et al.*, 2002) y que a continuación incluyo.

IV.5.2.1 Artículo:

A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and Abscisic acid biosynthesis and functions.

Wan-Hsing Cheng, Akira Endo, Li Zhou, Jessica Penney, Huei-Chi Chen, Analilia Arroyo, Patricia León, Eiji Nambara, Tadao Asami, Mitsunori Seo, Tomokazu Koshiba, and Jen Sheen.

The Plant Cell 14: 2723-2743, 2002.

A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in Arabidopsis Glucose Signaling and Abscisic Acid Biosynthesis and Functions

Wan-Hsing Cheng,^{a,b,1} Akira Endo,^{c,1} Li Zhou,^a Jessica Penney,^a Huei-Chi Chen,^a Analilia Arroyo,^d Patricia Leon,^d Eiji Nambara,^e Tadao Asami,^f Mitsunori Seo,^{c,e} Tomokazu Koshiba,^c and Jen Sheen^{a,2}

^a Department of Genetics, Harvard Medical School, and Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114

^b Institute of Botany, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, Republic of China

^c Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, Hachioji-shi, Tokyo 192-0397, Japan

^d Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México

^e Plant Science Center, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), Wako, Saitama 351-0198, Japan

^f Plant Functions Laboratory, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), Wako, Saitama 351-0198, Japan

Glc has hormone-like functions and controls many vital processes through mostly unknown mechanisms in plants. We report here on the molecular cloning of *GLUCOSE INSENSITIVE1 (GIN1)* and *ABSCISIC ACID DEFICIENT2 (ABA2)* which encodes a unique Arabidopsis short-chain dehydrogenase/reductase (SDR1) that functions as a molecular link between nutrient signaling and plant hormone biosynthesis. SDR1 is related to SDR superfamily members involved in retinoid and steroid hormone biosynthesis in mammals and sex determination in maize. Glc antagonizes ethylene signaling by activating *ABA2/GIN1* and other abscisic acid (ABA) biosynthesis and signaling genes, which requires Glc and ABA synergistically. Analyses of *aba2/gin1* null mutants define dual functions of endogenous ABA in inhibiting the post-germination developmental switch modulated by distinct Glc and osmotic signals and in promoting organ and body size and fertility in the absence of severe stress. SDR1 is sufficient for the multistep conversion of plastid- and carotenoid-derived xanthoxin to abscisic aldehyde in the cytosol. The surprisingly restricted spatial and temporal expression of *SDR1* suggests the dynamic mobilization of ABA precursors and/or ABA.

INTRODUCTION

Plant growth and development is governed by signaling networks that connect inputs from environmental cues, hormone signals, and nutrient status. Recent studies have suggested a pivotal role of sugars as signaling molecules in plants that integrate external environmental conditions and other nutrients with intrinsic developmental programs modulated by multiple plant hormones (Smeekens, 2000; Coruzzi and Zhou, 2001; Finkelstein et al., 2002; Rolland et al., 2002). How sugar signals influence vital processes from germination, seedling development, root and leaf differentiation, and senescence to stress tolerance remains mostly unknown. Cellular and transgenic studies have indicated the

involvement of hexokinase (HXK) as a sugar sensor with both signaling and metabolic functions in plants (Jang et al., 1997; Smeekens, 2000; Rolland et al., 2002). To further elucidate the molecular mechanisms underlying the plant sugar signaling network, a genetic approach was used to isolate sugar response mutants in Arabidopsis. Based on a bioassay in which a high level of Glc blocks the switch to postgermination development in Arabidopsis, both Glc-insensitive (*gin*) and Glc-oversensitive (*glo*) mutants were isolated. Phenotypic, genetic, and molecular characterization of these mutants has provided new insights into the regulatory mechanisms that link nutrient status to plant hormone synthesis and signaling (Zhou et al., 1998; Arenas-Huertero et al., 2000; Rolland et al., 2002).

Phenotypic analysis of the *gin1* mutant has suggested an interaction between the signaling pathways mediated by Glc and the plant stress hormone ethylene. Further characterization of the ethylene overproduction mutant *eto1*, the constitutive ethylene signaling mutant *ctr1*, and the ethylene-insensitive mutant *etr1* has led to the discovery that the Glc

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed. E-mail sheen@molbio.mgh.harvard.edu; fax 617-726-6893.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.006494.

and ethylene signaling pathways antagonize each other and that GIN1 acts downstream of the Glc sensor HXK1 and the ethylene receptor ETR1 (Zhou et al., 1998). Studies of the *gin1* (allelic to *aba2*, *sañ3*, *sis4*, *isi4*, and *sre1*), *gin5* (allelic to *aba3* and *los5*), and *gin6* (allelic to *abi4*, *sun6*, *sañ5*, *sis5*, and *isi3*) mutants have also revealed that another plant stress hormone, abscisic acid (ABA), is important for Glc responses (Leon-Kloosterziel et al., 1996; Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000; Quesada et al., 2000; Rook et al., 2001; González-Guzmán et al., 2002). Interestingly, recent genetic and phenotypic analyses have revealed complex interactions between ABA and ethylene based on seedling assays (Beaudoin et al., 2000; Ghassemian et al., 2000). Both ABA and ethylene are well-known plant stress hormones with growth-inhibiting activities. How they exhibit opposite roles in Glc responses, and the molecular mechanisms underlying the Glc regulation of ethylene signaling and ABA biosynthesis, remain mostly unclear (Zhou et al., 1998; Arenas-Huertero et al., 2000; Finkelstein and Gibson, 2001; Gazzarrini and McCourt, 2001).

To elucidate the molecular mechanisms underlying the Glc regulation of ABA biosynthesis and ethylene signaling, molecular cloning of *ABA2/GIN1* was performed. *ABA2/GIN1* encodes the first described member of a large (56-member) short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) gene family in Arabidopsis and plays a unique and specific role in the ABA biosynthesis pathway. We show that Glc activates *ABA2/GIN1* expression, which is required for antagonizing ethylene signaling. This result also prompted us to examine Glc regulation of the other ABA biosynthesis and signaling genes. These studies provide direct molecular evidence for extensive Glc control of the genes involved in ABA biosynthesis and signaling. Gene expression analyses in the *aba2/gin1* mutant also reveal that Glc acts synergistically with endogenous ABA and that Glc regulation is distinct from regulation by osmotic stress.

In addition to a role in Glc signaling, ABA has long been known as a plant hormone important for drought tolerance, by mediating guard cell signaling and stomatal closure to prevent extensive water loss, and for seed maturation, desiccation, dormancy, and germination (Zeevaart and Creelman, 1988; Finkelstein and Zeevaart, 1994; Leung and Giraudat, 1998; Koornneef et al., 2001; Schroeder et al., 2001; Finkelstein et al., 2002). In general, ABA is considered a stress hormone and a growth inhibitor. However, based on examination of the phenotypes of multiple null mutations in *ABA2/GIN1* specific to the ABA biosynthesis pathway and transgenic plants complemented with *ABA2/GIN1*, it is clear that endogenous ABA also plays crucial roles as a growth-promoting hormone in controlling fertility and vegetative growth and determining organ and body size. Thus, ABA possesses dual functions as a growth inhibitor and a growth promoter in the presence and absence of stresses, respectively.

Despite extensive analyses of ABA signaling at target sites, such as guard cells, mesophyll cells, maturing seeds, and germinating seedlings, the precise locations of ABA

biosynthesis remain elusive. The SDR-related activities in ABA biosynthesis have been presumed to be constitutive and ubiquitous (Sindhu and Walton, 1987; Schwartz et al., 1997a). Examination of the spatial and temporal expression patterns of an *ABA2/GIN1* reporter gene has revealed surprising evidence for its highly restricted localization in specific vascular tissues. These results indicate interorgan and intercellular mobilization of ABA precursors and/or ABA into the target sites. Cellular and biochemical analyses demonstrate conclusively that the multistep conversion of the plastid-derived xanthoxin to abscisic aldehyde (ABAld) is catalyzed by the sole cytosolic SDR1 and is essential for the major and physiological pathway in plant ABA biosynthesis.

RESULTS

Interplays of Glc, ABA, and Ethylene Signaling

Genetic and phenotypic analyses of the Arabidopsis Glc, ethylene, and ABA mutants have suggested a connection between these signaling pathways based on a Glc bioassay in which a high level of Glc (6%) blocks the switch to post-germination development (Zhou et al., 1998; Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001). Because three *gin1* mutants have a wilted phenotype and the mutations are mapped closely to the ABA-deficient locus *aba2* that also displays Glc insensitivity (Figure 1A), reciprocal crosses were performed between *gin1-3* and *aba2-1*. The progeny of both crosses showed Glc insensitivity (Figure 1B), establishing that *gin1* and *aba2* are allelic. To determine whether ABA deficiency is the cause of the *gin1* phenotype in the Glc-dependent bioassay, a noninhibitory level of ABA (100 nM) was added to the Glc medium. At 4% Glc, the addition of ABA restored the Glc sensitivity of *gin1* and another ABA-deficient mutant, *gin5*, but not that of the ABA-insensitive mutant *abi4*, which is allelic to *gin6* (Figure 1C). Although 4% mannitol reduced seedling development in the presence of ABA, the effects of Glc and mannitol were distinguishable (Figures 1C and 1D).

We have shown previously that the constitutive ethylene signaling mutant *ctr1* displays a Glc-insensitive phenotype similar to that of *gin1* (Zhou et al., 1998). However, after prolonged Glc treatment, *ctr1* remained smaller, with epinasty and light green leaves, conspicuous mid vein, and short roots (Figures 1A and 1E), suggesting a partial overlap of the *gin* and *ctr* phenotypes. To determine whether any other *gin* mutants are allelic to *ctr1*, we examined *gin2*, *gin3*, *gin4*, and *gin5* mutants on 6% Glc. Only *gin4-1* and *gin4-2* mutants resembled *ctr1* (Figure 1E); these were crossed to *ctr1* and analyzed for the constitutive triple response in etiolated seedlings grown in the dark (Stepanova and Ecker, 2000). The results showed that *gin4* is allelic to *ctr1* (Figure 1F), confirming an antagonistic interaction between the Glc and ethylene signaling pathways (Zhou et al., 1998). Consis-

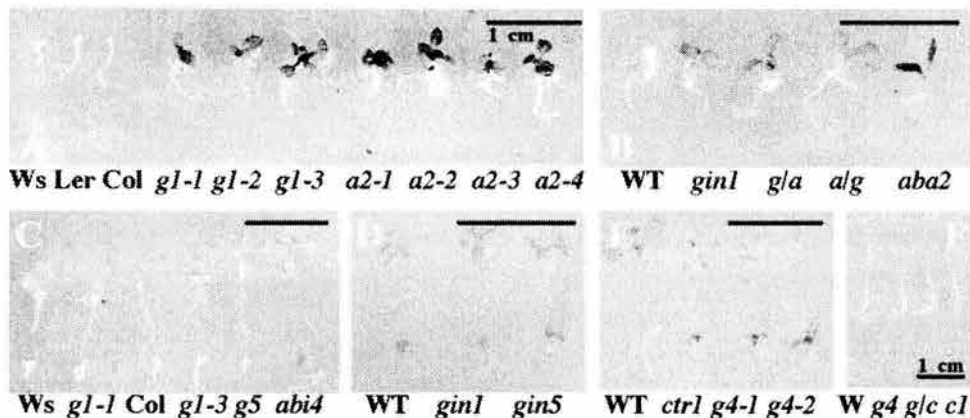


Figure 1. Genetic and Phenotypic Analyses of Arabidopsis *gin1* and *gin4* Mutants.

(A) Glc-insensitive mutants. Three wild-type (Col, Ler, and Ws), three *gin1* (*gin1-1*, *gin1-2*, and *gin1-3*), and four *aba2* (*aba2-1*, *aba2-2*, *aba2-3*, and *aba2-4*) seedlings were grown on 6% Glc Murashige and Skoog (1962) (MS) plates under light for 10 days. All experiments were repeated twice with consistent results.

(B) *gin1-3* and *aba2-1* are allelic. Reciprocal crosses between *gin1-3* and *aba2-1* (*g/a* and *a/g*) were performed. Wild-type (WT) and F1 seedlings were grown on 6% Glc MS plates.

(C) ABA restores the Glc-sensitive phenotype. *gin1-1* (*g1-1*), *gin1-3* (*g1-3*), *gin5* (*g5*), and *abi4* seedlings were grown on 4% Glc MS plates without (top row) or with (bottom row) 100 nM ABA.

(D) Mannitol and Glc are distinct signals. Wild-type, *gin1-3* (*gin1*), and *gin5* seedlings were grown on 4% mannitol MS plates without (top row) or with (bottom row) 100 nM ABA.

(E) The phenotype of *gin4* resembles that of *ctr1*. Wild-type, *gin4-1* (*g4-1*), *gin4-2* (*g4-2*), and *ctr1* seedlings were grown on 2% (top row) and 6% Glc (bottom row) MS plates.

(F) *gin4* and *ctr1* are allelic. Wild-type (W), *gin4-1* (*g4*), F1 *gin4-1/ctr1-1* (*g/c*), and *ctr1-1* (*c1*) seedlings were grown on 2% Glc MS plates for 5 days in the dark. The scale bars in **(B)** to **(F)** = 1 cm.

tently, another sugar mutant screen also isolated a new *ctr1* allele as *sis1* (Gibson et al., 2001).

Map-Based Cloning of *ABA2/GIN1*

To understand the molecular basis and regulation of the *ABA2/GIN1* gene, a map-based cloning approach was used. We used PCR and available simple sequence length polymorphism (SSLP) markers (Bell and Ecker, 1994) to localize *GIN1* on chromosome 1 near the SSLP markers nga128 and nga280 (Zhou et al., 1998). For fine mapping, we generated 10 new SSLP markers for ecotypes Wassilewskija (Ws), Columbia (Col), and Landsberg *erecta* (Ler) spanning >1700 kb covered by BAC clones (Figure 2A). After PCR analysis of 5627 DNA samples, the *GIN1* gene was localized to a region between BAC clones F11M15 and F6D8 (Figure 2A). One of the genes in the F19K6 BAC clone encodes a putative SDR (SDR1) that might perform the final oxidation steps in converting xanthoxin to ABA (Sindhu and Walton, 1987; Schwartz et al., 1997a) and was the best candidate for *ABA2/GIN1*. To determine whether there was any molecular defect in the candidate gene transcript in the *gin1* mutants, reverse tran-

scriptase PCR (RT-PCR) was performed using primers in the predicted coding sequence of exon 2. Neither *gin1-1* nor *gin1-3* yielded the expected 762-bp RT-PCR product observed in the wild-type Ws and Col controls, whereas a similar RT-PCR product of the Suc synthase gene (*SUS*) encoded by the same BAC sequence was detected in both the wild type and the *gin1* mutants (Figure 2B). Map-based cloning using the *aba2-2* mutant allele also identified the same *SDR1* candidate gene (data not shown).

The full-length cDNA sequence (1179 bp) of *ABA2/GIN1* was obtained by 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (Figures 2C and 2D) and confirmed by RNA gel blot analysis (see Figure 6A). The deduced polypeptide is predicted to be 285 amino acids in length without an overt transmembrane domain (Figures 2D and 2E). To further validate the notion that *ABA2/GIN1* encodes the putative SDR1, the molecular bases of seven *aba2/gin1* alleles (*aba2-1*, *aba2-2*, *aba2-3*, *aba2-4*, *gin1-1*, *gin1-2*, and *gin1-3*) were analyzed and summarized (Figure 2E). At least three alleles, *gin1-1*, *gin1-3*, and *aba2-2*, appeared to be null mutations producing defective or no transcript (Figures 2B, 2E, and 6A). The *gin1-3* allele has a 53-bp deletion in exon 2, causing a frameshift after 22 amino acids and an early translation stop after 32 amino acids (Figure 2E). We observed no protein production

with a *gin1-3* and green fluorescent protein (GFP) fusion (data not shown). Both *gin1-1* and *aba2-2* have variable intron mutations that gave no RT-PCR product for *gin1-1* (Figures 2B and 2E) and no *aba2-2* transcript (see Figure 6A) when analyzed with 5'-end exon 2 sequences. Five additional *aba2* alleles also have been analyzed independently by other groups (Figure 2E) (Laby et al., 2000; Rook et al., 2001; González-Guzmán et al., 2002).

ABA2/GIN1 Encodes a Unique Member of the SDR Superfamily

Based on a BLASTP search, *ABA2/GIN1* is a member of a large SDR gene family. All 56 of the putative Arabidopsis SDR members range between 250 and 300 amino acids in length and have a NAD/NADH binding motif (TGXXGXG) and a catalytic site (YXXS/T/AK) that are characteristic of and conserved in SDR superfamily members in *Escherichia coli*, yeast, flies, worms, mice, humans, and plants (Figure 3) (Jörnvall et al., 1999; Oppermann et al., 2001). The *ABA2/GIN1* gene encoding Arabidopsis SDR1 is likely to have a unique function, because the most closely related member, SDR2 (with 62% similarity to SDR1), is a homolog of the maize TASSELSEED2 (ZmTS2, with 73% similarity to AtSDR2) that is important for sex determination (Figure 3) (DeLong et al., 1993). Judging from the severe phenotypes displayed in the null alleles of *aba2/gin1* mutants and the homology of AtSDR2 with ZmTS2, Arabidopsis SDR1 has nonredundant functions.

ABA2/GIN1 as a Link between Glc and Ethylene Signaling

To determine the link between ethylene and ABA pathways in Glc responses, a double mutant of the strongest ethylene-insensitive mutant, *ein2* (Alonso et al., 1999), displaying Glc oversensitivity (Figure 4A), and the Glc-insensitive mutant *gin1* was generated. Because the Glc-oversensitive phenotype of *ein2* on 4% Glc was blocked in the *ein2 gin1* double mutant (Figure 4A), ethylene could contribute to the Glc-dependent phenotypes by antagonizing ABA biosynthe-

sis, as suggested previously (Ghassemian et al., 2000). To determine whether ethylene signaling is antagonized by Glc through ABA, the expression of an ethylene-regulated gene, *PDF1.2* (Alonso et al., 1999), was examined. The presence of 2 and 6% Glc repressed *PDF1.2* expression that requires endogenous ethylene in the wild type but not in *aba2/gin1* (Figure 4B). Unlike 2% Glc, 2% mannitol as an osmotic control did not repress *PDF1.2* expression in either the wild type or *aba2/gin1*. Unlike 6% mannitol, 6% Glc strongly repressed *PDF1.2* expression in the wild type but activated its expression in *aba2/gin1* (Figure 4B). These results support the model that the antagonistic relationship between Glc and ethylene signaling is mediated in part through *ABA2/GIN1* involvement in ABA biosynthesis. Although there is an ABA-dependent osmotic effect at 6% mannitol, the Glc and mannitol signals are distinguishable.

ABA as a Growth-Promoting Regulator

Although ABA has long been considered a stress hormone that accumulates under stress conditions and a growth inhibitor when applied exogenously, the ABA-deficient mutant *aba2/gin1* exhibited severe growth retardation in cotyledons, rosettes, stems, roots, and siliques in the absence of exogenous sugars and stress conditions (Figures 4C and 4D). Thus, endogenous ABA also could be critical for the promotion of plant growth. This dual function of ABA is similar to that of Glc in promoting growth at low concentrations but inhibiting growth at high concentrations (Xiao et al., 2000). Examined with a dissecting microscope, it appeared that the smaller cotyledons were attributable to a lack of cell expansion and the smaller rosettes were attributable to a reduction in both cell number and size (data not shown). The root system of *aba2/gin1* was shorter, with fewer lateral roots (Figures 4C and 4D). A similar growth defect was found when *aba2/gin1* plants were grown under high humidity (Figure 4D). To further test the idea that the growth defect of *aba2/gin1* is not caused by chronic water stress, wild-type and *aba2/gin1* plants were grown in a container with nearly 100% RH. As shown in Figure 4E, the rosettes and root system of *aba2/gin1* remained significantly smaller, even though the leaf expansion of the wild type also was limited under this condition. The *aba2/gin1* mutant showed

Figure 2. (continued).

(C) Scheme of the genomic and cDNA structure of *ABA2/GIN1*. The deduced polypeptide is predicted to be 285 amino acids in length with a molecular mass of 30.2 kD, a pI of 5.85, and an α - β structure. Comparison of the cDNA and genomic DNA sequences (in the F19K6 BAC clone; 41428 to 43279 bp) indicated that *ABA2/GIN1* contains two exons of 168 and 808 bp and one intron of 672 bp. The black box represents the coding region.

(D) Genomic and cDNA sequences of *GIN1/ABA2*. The 5' and 3' ends of the cDNA (uppercase letters) were determined by rapid amplification of cDNA ends and sequencing.

(E) Molecular basis of *aba2/gin1* mutants. TGXXGXG is the conserved NAD binding site, and YXXSK is the catalytic site. The mutation sites of 11 *aba2/gin1* alleles are shown. Names of the same alleles are shown in parentheses. a.a., amino acids.

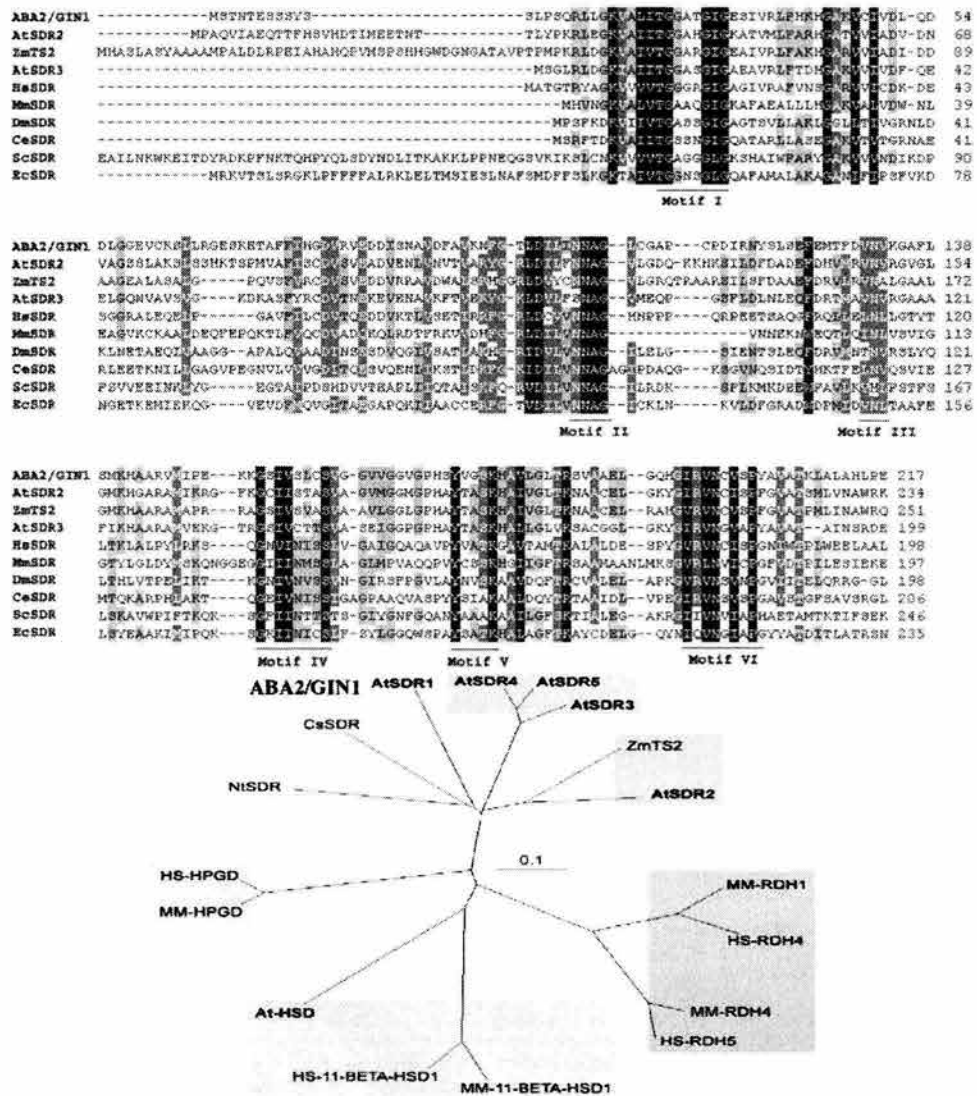


Figure 3. Arabidopsis *ABA2/GIN1* Encodes a Unique Member of the SDR Superfamily.

The *ABA2/GIN1* coding sequence (217 of 285 residues) covering the six conserved motifs was aligned with sequences of putative SDRs from seven other model organisms using the Clustal alignment program. Arabidopsis *ABA2/GIN1* (*AtSDR1*) is grouped with tobacco (*NtSDR*) and cucumber (*CsSDR*) homologs in the phylogenetic tree at bottom. *AtSDR2* is closely related to maize *ZmTS2* and different from *AtSDR3*, *AtSDR4*, and *AtSDR5*. *AtHSD* (11- β -hydroxysteroid dehydrogenase) is closely related to the human (*HS*) and mouse (*MM*) HSDs. The human and mouse HPGDs (15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase) and human and mouse RDHs (retinoid dehydrogenase) also are shown. The scale value of 0.1 indicates 0.1 amino acid substitutions per site.

a wilted phenotype within 5 min of exposure to lower humidity (Figure 4E), supporting the importance of basal ABA levels in the guard cell response to water stress. It has been suggested that the growth defect in tomato ABA-deficient mutants is the result of an inhibitory effect of ethylene (Sharp et al., 2000). By comparing the phenotypes of *aba2/gin1*, *ein2*, and *gin1 ein2* plants, it was obvious that the growth retardation of *aba2/gin1* shoots could be attributed to ABA defi-

ciency even in the completely ethylene-insensitive *ein2* background (Alonso et al., 1999), regardless of the humidity (Figure 4F) (data not shown). However, the root phenotype of the *gin1 ein2* double mutant resembled that of *ein2* but not that of *aba2/gin1* (Figure 4F). These results support the antagonistic roles of ABA and ethylene in root development and a surprising uncoupling of the shoot and root phenotypes modulated by endogenous ABA.

Complementation

To ensure that *ABA2/GIN1* encodes SDR1 and that the *aba2/gin1* phenotypes are the consequence of a single gene mutation, complementation was performed by transforming the null *gin1-3* mutant with a 7.7-kb *ABA2/GIN1* genomic clone that includes the 3-kb promoter or with the full-length cDNA under the control of a constitutive 35S promoter (35S::*GIN1*) in a miniature binary vector (pCB302) through *Agrobacterium tumefaciens* (Xiang et al., 1999). Ten independent lines with clear complementation in the greenhouse were brought to homozygous T3 generation before detailed characterization. The *ABA2/GIN1* genomic clone and 35S::*GIN1* restored the Glc sensitivity of *gin1* (Figure 5A and data not shown). The growth defects in cotyledons and rosettes

(Figure 5B), lateral roots (Figure 5C), stems (Figure 5D), siliques (Figure 5E), and embryos (Figure 5F), as well as the wilty (Figure 5G) and lack of seed dormancy (Figure 5H) phenotypes of *gin1*, also were complemented. These results are consistent with the dual function of endogenous ABA as a growth-promoting regulator in addition to its roles in Glc signaling, stress tolerance, and seed dormancy.

Tissue, Stress, and ABA Regulation of ABA Biosynthesis Gene Expression

To determine the tissue-specific expression patterns of *ABA2/GIN1*, RNA gel blot analysis was performed. Surprisingly, *ABA2/GIN1* was expressed predominantly in roots

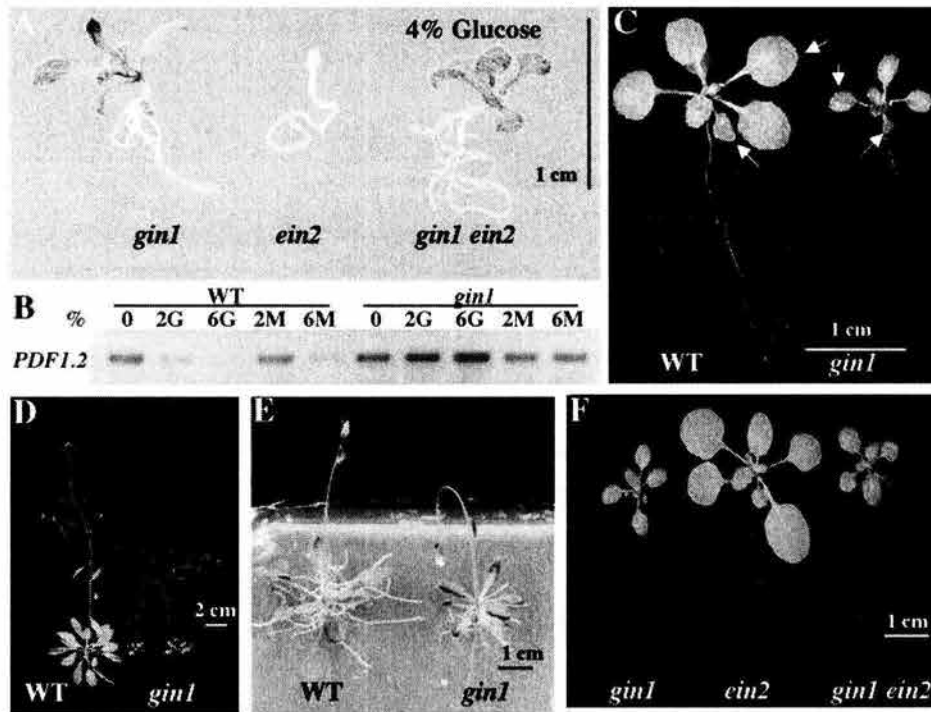


Figure 4. Interplay of Glc, ABA, and Ethylene Signaling Pathways.

(A) *gin1* is epistatic to *ein2*. Single-mutant (*gin1* and *ein2*) and double-mutant (*gin1 ein2*) seedlings were grown on 4% Glc MS plates under light for 12 days. All experiments were repeated twice with consistent results.

(B) Glc repression of *PDF1.2* expression requires ABA. Plants were grown on MS plates without (0) and with 2 and 6% Glc (2G and 6G) or 2 and 6% mannitol (2M and 6M) for 14 days. RT-PCR was repeated twice with consistent results. WT, wild type.

(C) Growth defects in *gin1*. Wild-type and *gin1* plants were grown on soil under a 12/12-h light/dark photoperiod for 14 days. The two top arrows point to cotyledons with different cell sizes. The two bottom arrows indicate developing true leaves with similar cell sizes but different cell numbers.

(D) Growth defects in *gin1*. Wild-type and *gin1* plants were grown on soil under a 12/12-h light/dark photoperiod for 50 days with 40% (*gin1*; middle plant) or 85% (*gin1*; right plant) RH.

(E) Wilty phenotype in *gin1*. Wild-type and *gin1* plants were grown on 2% Glc MS medium under a 16/8-h light/dark photoperiod and 100% RH for 24 days. The plastic cover was removed for 5 min.

(F) Uncoupling of shoot and root growth regulation in *gin1*. Single-mutant (*gin1* and *ein2*) and double-mutant (*gin1 ein2*) plants were grown on soil under a 12/12-h light/dark photoperiod for 16 days.

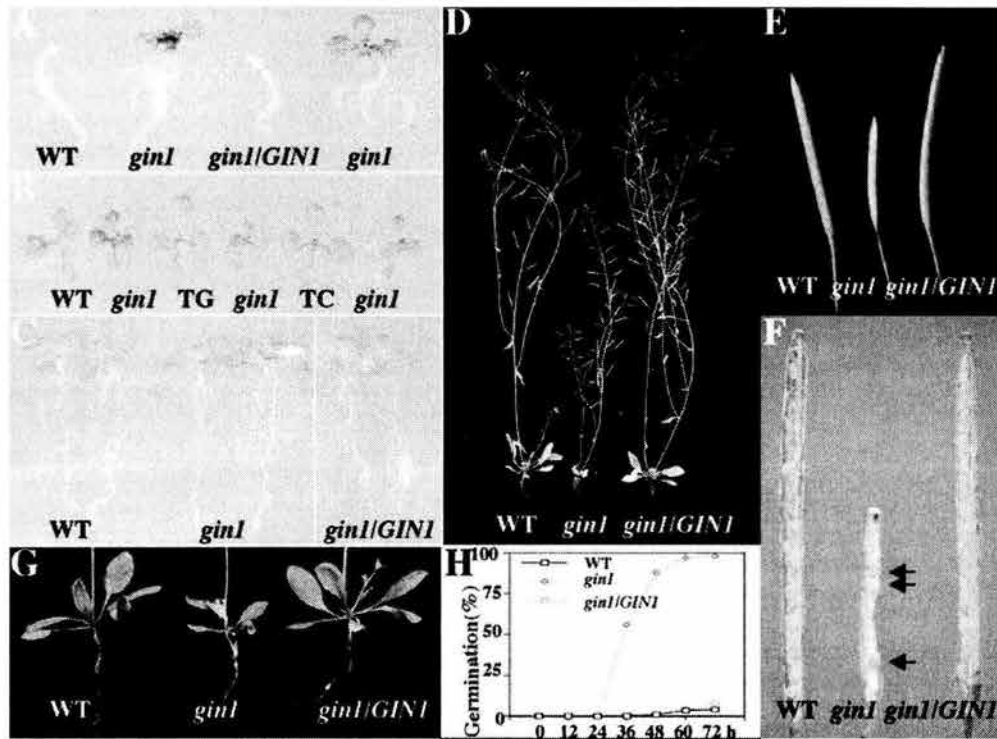


Figure 5. Complementation.

- (A) A genomic *ABA2/GIN1* clone restores Glc sensitivity. The T2 segregation of *gin1/GIN1* and *gin1* is shown. Plants were grown on 6% MS plates under light for 10 days. WT, wild type.
- (B) Genomic and cDNA clones restore cotyledon and leaf growth defects. The T2 segregation of TG (transgenic with the genomic *ABA2/GIN1* clone), TC (transgenic with the 35S::*GIN1* cDNA clone), and *gin1* plants is shown. Plants were grown on 2% Glc MS plates under light for 14 days.
- (C) A genomic *ABA2/GIN1* clone restores the *gin1* lateral root defects.
- (D) A genomic *ABA2/GIN1* clone restores the *gin1* defects in leaves, stems, and siliques. Plants were grown under constant light and watering for 37 days.
- (E) A genomic *ABA2/GIN1* clone restores the *gin1* defect in silique size.
- (F) A genomic *ABA2/GIN1* clone restores the *gin1* defects in embryos and fertility. Arrows indicate three normal sized seeds in the *gin1* silique.
- (G) A genomic *ABA2/GIN1* clone eliminates the wilted phenotype of *gin1* (28 days).
- (H) A genomic *ABA2/GIN1* clone restores seed dormancy in *gin1*. Dry seeds (50 to 80) were allowed to imbibe in water for 12 h and then germinated on water-saturated filter paper (7 cm in diameter) under constant light. The values shown (percent germination) are averages from three independent experiments.

and stems but at much lower levels in rosettes and seeds, the established ABA target sites (xA). Analyses of the petiole and blade RNA samples isolated from "rosettes" further supported the preferential expression of *ABA2/GIN1* outside of the presumed ABA target sites, mesophyll, and guard cells. Unless the *ABA2/GIN1* protein is mobile, interorgan and intercellular transport of ABA precursors and/or ABA likely occurs to coordinate ABA biosynthesis and response, because genes that encode other ABA biosynthesis enzymes, such as zeaxanthin epoxidase (ZEP), 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED3), and Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3), are expressed differentially (Seo et al., 2000a; Xiong et al., 2002; M. Seo and T. Koshiba, un-

published data). Interestingly, *Commelina* stomatal closure is induced by xanthoxin when it is added through the transpiration stream but not by direct application on epidermal strips (Raschke et al., 1975).

It has been shown that genes important for ABA biosynthesis, such as Arabidopsis *ZEP* (*ABA1/LOS6*), *NCED3*, *AAO3*, and *ABA3* (*LOS5*), are induced by water stress (Qin and Zeevaart, 1999; Seo et al., 2000a; Iuchi et al., 2001; Xiong et al., 2001, 2002), although the enzymes that convert xanthoxin to ABAld and ABA are detected constitutively in leaves (Sindhu and Walton, 1987). In contrast to the *NCED3* transcript that was induced rapidly by dehydration and absent in water, the *ABA2/GIN1* transcript did not increase

during dehydration treatment (Figure 6B). Thus, *ABA2/GIN1* is important for the basal level of ABA but is not the rate-limiting factor for the stress-inducible accumulation of ABA (Qin and Zeevaart, 1999; Iuchi et al., 2000). The expression of *ZEP* (*ABA1/LOS6*), *NCED3*, and *AAO3* also was induced by ABA in shoots and roots, but the expression of *ABA2/GIN1* was not (Figure 6C). It appears that the expression of *ABA2/GIN1* is not coordinated with that of other ABA biosynthesis genes by stress and ABA.

Glc Regulation of ABA Biosynthesis and Signaling Gene Expression

To determine how Glc controls ABA accumulation, the expression of *ABA2/GIN1* was examined with or without exogenous Glc in wild-type and *aba2/gin1* seedlings. As shown in Figure 7, the *ABA2/GIN1* transcript was induced significantly by 2 and 6% Glc only in wild-type but not in *aba2/gin1* seedlings. Because *ABA2/GIN1* is not induced by ABA (Figure 6C) but ABA deficiency in *aba2/gin1* prevented its Glc induction, it is likely that both Glc and ABA are required synergistically for *ABA2/GIN1* regulation. Mannitol at 2 and 6% also induced *ABA2/GIN1* expression approximately

twofold in an ABA-dependent manner (Figure 7). To investigate the extent of Glc regulation, we also examined other genes involved in ABA biosynthesis and ABA signaling by RT-PCR. The results showed that other ABA biosynthesis genes, such as *ABA1*, *AAO3*, and *ABA3*, were upregulated by 2 and 6% Glc, similar to the effect found for *ABA2/GIN1* (Figure 7). Glc activation was abolished in the *gin1-3* null mutant, suggesting a critical role of endogenous ABA in the Glc induction of ABA biosynthesis genes (Figure 7). Interestingly, unlike 6% Glc, which activated gene expression, 6% mannitol repressed these genes in both the wild type and *aba2/gin1* (Figure 7). The expression of *NCED3* was extremely low and not activated by Glc, distinguishing Glc signals from stress signals that activated *NCED3* (Figures 6B and 6C). Interestingly, *ABI3*, *ABI4*, and *ABI5* but not *ABI1* and *ABI2* transcripts showed dramatic induction by 6% Glc but not by 6% mannitol. The induction was eliminated completely in *aba2/gin1* (Figure 7). These results are consistent with the Glc-insensitive phenotypes shown in the *aba1*, *aba2*, *aba3*, *abi4*, and *abi5* mutants (Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000). As controls, the expression of a Glc sensor encoded by *AtHXK1* and a ubiquitin gene (*UBQ5*) was not influenced by Glc or mannitol (Figure 7) (Jang et al., 1997).

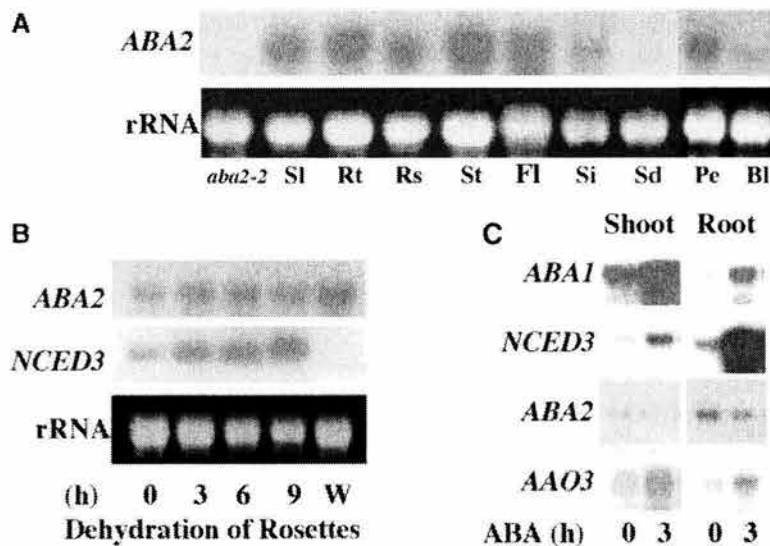


Figure 6. Tissue, Stress, and ABA Regulation of Gene Expression.

(A) Tissue expression pattern. *ABA2/GIN1* expression was examined in the *aba2-2* null mutant and in wild-type (Col) seedlings (SI) and adult roots (Rt), rosettes (Rs), stems (St), flowers (Fl), siliques (Si), and dry seeds (Sd). The rosettes were separated further to petioles (Pe) and blades (Bl). Seedlings were grown on MS agar plates for 14 days, and adult plants were grown in pots for ~40 days. Each lane contained 10 μ g of total RNA. A 366-bp fragment of *ABA2/GIN1* cDNA digested with *AluI* was used as a probe for hybridization. rRNA was used as a loading control. The experiment was repeated twice with consistent results.

(B) Gene expression under dehydration. The expression of *ABA2* and *NCED3* was determined at various time points after dehydration in rosettes of 40-day-old soil-grown plants. Samples with water (W) were used as a control. The experiment was repeated twice with consistent results.

(C) ABA regulation of ABA biosynthesis genes in shoots and roots. Wild-type plants (*Ler*) grown on agar plates for 14 days were transferred to filter paper soaked with 100 μ M ABA and incubated for 0 and 3 h. The experiment was repeated twice with consistent results.

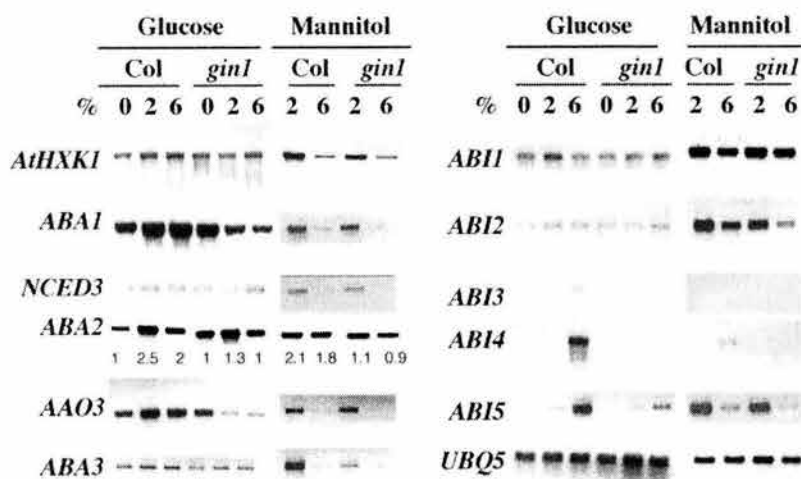


Figure 7. Glc Regulation of Gene Expression.

Glc regulation of ABA biosynthesis and signaling genes. Plants were grown on MS plates without (0) and with 2 and 6% Glc or 2 and 6% mannitol for 14 days under a 16/8-h photoperiod. Mannitol treatment was included as an osmotic control. RT-PCR analyses were performed four times with consistent results. The numbers below the *ABA2* gels indicate the band intensity (quantified with 1D Gel Analysis Software; Phoretix, Durham, NC) relative to the loading control, *UBQ5*, and are normalized to the "0" sample. The PCR product of *ABA2* in *gin1-3* is 53 bp shorter than that in the wild type as a result of a deletion in the mutant.

Restricted Spatial and Temporal Expression of *ABA2/GIN1*

To determine the spatial and temporal expression patterns of *ABA2/GIN1* more precisely, the *ABA2/GIN1* promoter (2906 bp upstream of the ATG start codon) was fused to a reporter gene encoding β -glucuronidase (*GUS*) to generate *GIN1::GUS*. *GUS* was chosen for its high sensitivity because *ABA2/GIN1* is not highly expressed. The promoter was used successfully for complementation in the 8-kb genomic clone. The *GIN1::GUS* fusion was introduced into the wild type and the *gin1-3* null mutant through *Agrobacterium*-mediated transformation (Jang et al., 2000). In general, *GIN1::GUS* had similar expression patterns in multiple independent transgenic lines of both the wild-type and *gin1* backgrounds under normal growth conditions, based on staining with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid. However, *GUS* staining usually was stronger in *aba2/gin1* than in the wild type, suggesting negative feedback control by ABA in the absence of high exogenous Glc (see below). *GUS* staining was readily visible in vascular bundles of hypocotyls (Figures 8A and 8B) and the branching points of lateral and primary roots (Figure 8C) of wild-type and *aba2/gin1* transgenic seedlings grown on soil for 10 days after germination. *GUS* staining in hypocotyls became weak and started to appear in petioles of cotyledons and true leaves at 20 days (Figures 8D and 8E). The staining signal in petioles of cotyledons and the first pair of true leaves became more pronounced at 30 days, especially in the *aba2/gin1*

background (Figure 8F). The staining at branching points of primary and lateral roots remained visible at maturity.

In adult plants (after 30 days), pollen showed strong *GUS* staining in opening and opened flowers but not in flower buds and unopened flowers (Figure 8G). There was strong *GUS* staining at the junctions of pedicels and young developing siliques (Figure 8H) but not before petal, anther, and sepal abscission (Figure 8G), suggesting a role of ABA in early embryogenesis. At a later stage (57 days), *GUS* staining appeared in the vascular bundles of petioles and the mid veins of aged rosette leaves, stems, and the junctions of pedicels and siliques (data not shown). *GUS* staining was strong in septa and funiculi inside maturing siliques but was faint in seeds (Figure 8I) and developing embryos (data not shown). These *GUS* staining results are consistent with RNA gel blot analyses of *ABA2/GIN1* expression in specific tissues (Figure 6A). It appears that *ABA2/GIN1* has restricted expression patterns in hypocotyls, petioles, leaf veins, stems, flowers, pedicels, septa, funiculi, and roots but is not abundant in the ABA target sites, such as mesophyll cells, guard cells, and seeds.

Distinct Glc Regulation of the *ABA2/GIN1* Promoter

Although the expression of *ABA2/GIN1* does not seem to be affected significantly by drought or ABA, based on RNA gel blot analysis in the wild type, we examined *GUS* staining to determine whether the expression pattern changes as a result of salt stress (250 mM NaCl for 6 h) and cold stress (4°C

for 6 h) in the wild type and *aba2/gin1*. For salt or cold treatment of 10-day-old seedlings, GUS staining showed no detectable changes in the wild type (Figures 8A, 8B, 8J, and 8L). However, GUS staining showed a significant increase in vascular bundles of cotyledons in *aba2/gin1* (Figures 8K and 8M). Because *ABA2/GIN1* showed a slight downregulation by ABA in RNA gel blot analysis (Figure 6C), the enhanced GUS staining may reflect the lack of this negative ABA feedback control in *aba2/gin1*.

Because *ABA2/GIN1* expression was enhanced by Glc (Figure 7), we examined the GUS expression patterns in both the wild type and *aba2/gin1* in the presence of 2 and 6% Glc. Consistent with the results of RNA gel blot analysis (Figure 7), the presence of 2% Glc or mannitol enhanced GUS expression significantly, which is restricted to the vascular bundles of cotyledons in addition to hypocotyls and roots (Figures 8N, 8O, 8Q, and 8R). Although the *aba2/gin1* mutant transcript was not enhanced by 2% Glc (Figure 7), the *ABA2/GIN1* promoter still was activated by Glc in *gin1* (Figure 8O). This result suggests a direct regulation of the *ABA2/GIN1* promoter by Glc independent of ABA. The stability of the *ABA2/GIN1* transcript may be ABA dependent. Importantly, 6% Glc activated the *ABA2/GIN1* promoter more dramatically and caused developmental arrest in the wild type (Figure 8P). Both Glc and ABA were required for the effect of 6% Glc, because the intense GUS staining and developmental arrest were not observed in *aba2/gin1* (Figure 8P). Treatment with 6% mannitol to induce osmotic stress did not mimic the effect of 6% Glc in the wild type and *aba2/gin1*. However, 6% mannitol did result in more intense and broader GUS staining in the whole seedlings, including the root tips (Figures 8S and 8T). These results are consistent with the idea that Glc and mannitol exert distinguishable regulatory mechanisms in ABA biosynthesis and seedling development. A quantitative GUS assay further supported the distinct responses of the *ABA2/GIN1* promoter to 6% Glc and 6% mannitol (Figure 9). There appear to be multiple mechanisms for the regulation of the *ABA2/GIN1* promoter and *ABA2/GIN1* transcripts (Figures 6 to 9). The dynamic regulation of *ABA2/GIN1* and the distinct 6% Glc regulation of other ABA biosynthesis and signaling genes (Figure 7) seem to be important for the Glc-dependent developmental arrest (Figure 8P).

Subcellular Localization and Biochemical Analyses of *ABA2/GIN1*

It has been suggested that the complete ABA biosynthesis pathway could exist inside chloroplasts (Milborrow, 2001). However, biochemical analyses of ABA biosynthetic enzymes have indicated that the last steps of ABA biosynthesis may occur in the cytosol (Sindhu and Walton, 1987). To determine the subcellular localization of the *ABA2/GIN1* protein in Arabidopsis, a GFP fusion protein, *GIN1*-GFP, was generated. Using the Arabidopsis protoplast transient

expression assay and confocal microscopy, we showed that *GIN1*-GFP was localized exclusively in the cytosol, similar to a cytosolic GFP marker used as a control (Figure 10A) (Hwang and Sheen, 2001).

To determine whether the Glc-insensitive phenotype of *aba2/gin1* is attributable to a deficiency in the Glc induction of ABA accumulation, the endogenous levels of ABA were measured in wild-type, *aba2/gin1*, and transgenic seedlings complemented with the *ABA2/GIN1* genomic clone. As shown in Figure 10B, *aba2/gin1* seedlings had a low basal ABA level that was not induced by Glc, as in the wild type. The *ABA2/GIN1* genomic clone complemented the basal and Glc-induced levels of ABA in transgenic plants (Figure 10B), supporting a critical role of *ABA2/GIN1* in endogenous ABA biosynthesis and in Glc responses. The growth-promoting and growth-inhibiting dual functions of ABA may have different threshold levels.

Although it has been suggested that xanthoxin is converted to ABAld by SDR1 and then to ABA by AAO3 (Sindhu and Walton, 1987; Zeevaart and Creelman, 1988; Schwartz et al., 1997a; Seo et al., 2000a, 2000b), the possibility remained that xanthoxic acid but not xanthoxin is the substrate for SDR1 (Cowan, 2000; Seo and Koshiba, 2002). Moreover, because three chemical reactions are required to convert xanthoxin to ABAld, it is unclear whether enzymes other than SDR1 might be required (Cowan, 2000; González-Guzmán et al., 2002; Seo and Koshiba, 2002). To determine the SDR1 substrate specificity and whether SDR1 alone can catalyze multiple chemical reactions, recombinant SDR1 was expressed in the yeast *Pichia pastoris* for in vitro enzymatic analyses (Koiwai et al., 2000). His-tagged SDR1 was purified to homogeneity using ammonium sulfate fractionation, Ni²⁺ column chromatography, and DEAE column chromatography and analyzed by SDS-PAGE, as shown in Figure 10C. The purified recombinant SDR1 catalyzed xanthoxin (K_m of 20.2 μ M) but not xanthoxic acid as a substrate and generated a product with the same retention time as that of ABAld, as detected by HPLC and gas chromatography-mass spectrometry with a mother fragment with a mass-to-charge ratio of 246 (Figure 10D). The reaction absolutely required a coenzyme NAD (data not shown). Consistent with these results, AAO3 did not use xanthoxin as a substrate, as determined by HPLC (data not shown). Thus, our data provide conclusive evidence that the final steps of the major endogenous ABA biosynthesis pathway involve two enzymes, SDR1 and AAO3, which convert xanthoxin to ABAld and then convert ABAld to ABA, respectively.

DISCUSSION

ABA in Glc Signaling

Genetic and phenotypic analyses of the Arabidopsis mutants displaying *gin* and *glo* phenotypes have revealed

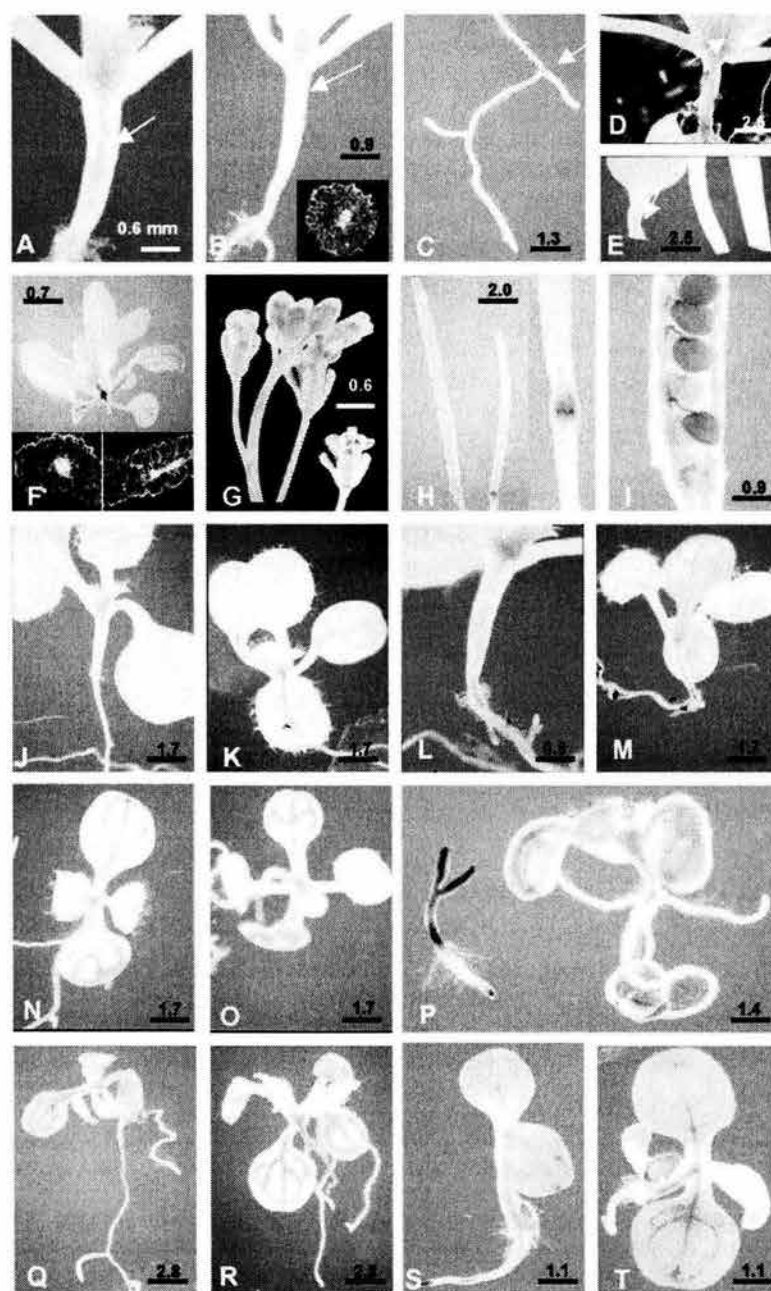


Figure 8. Spatial and Temporal Expression Patterns of *ABA2/GIN1*.

(A) GUS staining in the hypocotyl of a wild-type plant grown on soil for 10 days. Three independent transgenic lines displayed similar patterns. The experiment was repeated twice with consistent results.

(B) GUS staining in the hypocotyl of a *gin1* plant grown on soil for 10 days. A cross-section of a hypocotyl showing GUS staining in the vascular bundle is shown in the inset. The experiment was repeated twice with consistent results.

(C) GUS staining in a wild-type root showing strong signals at the branching point.

(D) GUS staining in a wild-type plant grown on soil for 20 days.

(E) GUS staining in the cotyledon and first and second true leaves (left to right) excised from the plant shown in (D).

(F) GUS staining in a *gin1* plant grown on soil for 30 days. The cross-sections of a petiole (left inset) and a leaf vein (right inset) showing GUS staining in the vascular tissues are shown. Wild-type plants displayed similar GUS staining patterns.

(G) GUS staining in the pollen of opened flowers in wild-type plants. Young flowers and flower buds did not show GUS staining.

(H) GUS staining at the junctions of pedicels and young siliques in wild-type plants.

extensive interactions between the metabolic and hormonal signaling pathways (Zhou et al., 1998; Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000; Gibson et al., 2001; Rook et al., 2001). Our studies provide molecular evidence for direct and extensive Glc control of the genes important for ABA biosynthesis and signaling. Interestingly, in the case of *ABA2/GIN1*, *ABI3*, and *ABI4*, Glc and ABA act synergistically. These genes are not activated by ABA alone, but their Glc activation requires endogenous ABA and is abolished in the *aba2/gin1* mutant (Figures 6 and 7) (Arenas-Huertero et al., 2000; Söderman et al., 2000). In most cases, plants display different responses to Glc and mannitol signals. Thus, our studies show that Glc signaling is mediated partly by the activation of ABA biosynthesis and signaling genes through two mechanisms—a synergistic effect of Glc and ABA, and an ABA positive feedback control loop—because *ABA1/ZEP*, *AAO3*, *ABA3*, and *ABI5* also are activated by ABA (Figures 6 and 7) (Leung et al., 1997; Lopez-Molina et al., 2001; Xiong et al., 2001, 2002). The synergistic interaction between Glc and ABA also controls seedling development. Increased ABA accumulation stimulated by a high level of Glc (Figure 10B) is required to block the post-germination developmental switch, demonstrating ABA's function as a growth inhibitor. However, this Glc induction of ABA levels and ABA biosynthesis gene expression is not the result of differences in developmental stage and morphology in seedlings. As shown previously, Glc induction of ABA levels occurs in *gin6/abi4* without a developmental arrest phenotype (Arenas-Huertero et al., 2000).

Our studies also reveal that Glc antagonizes the responses of endogenous ethylene through ABA. For example, the Glc hypersensitive phenotypes of *ein2* and the Glc repression of an ethylene maker gene, *PDF1.2*, are eliminated in the *aba2/gin1* mutant. In this condition, ethylene acts as a growth-promoting regulator (Zhou et al., 1998), as has been shown in hypocotyl elongation under light (Smalle et al., 1997; Alonso et al., 1999). In the absence of a high level of Glc and at basal ABA levels, the physiological roles of endogenous ABA and ethylene are reversed. In addition,

GUS (nmol MU/min/mg protein)

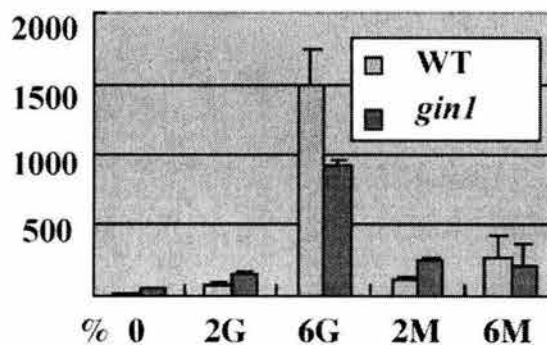


Figure 9. Glc Regulation of *ABA2/GIN1* Promoter Activity.

GUS activity was measured in 16-day-old wild-type and *gin1* mutant plants carrying *GIN1::GUS* and grown on MS plates without (0) or with 2 and 6% Glc (2G and 6G) or 2 and 6% mannitol (2M and 6M). Results from duplicate samples in two independent experiments are shown with error bars. MU, methylumbelliferone; WT, wild type.

ethylene also may repress ABA biosynthesis, as observed in the *ein2* mutant (Ghassemian et al., 2000), or ABA signaling (Beaudoin et al., 2000). Thus, Glc signals can profoundly influence plant hormone biosynthesis and actions and plant growth and development (Figure 11).

Distinct Glc and Osmotic Signaling

The expression of *NCED* is highly activated by stress conditions and encodes a rate-limiting enzyme for the stress-inducible accumulation of ABA in many plant species (Tan et al., 1997; Qin and Zeevaart, 1999; Iuchi et al., 2000, 2001). Here, we show that Glc does not activate *NCED3* significantly in *Arabidopsis*. This finding suggests that stress- and Glc-induced ABA accumulation is mediated by distinct

Figure 8. (continued).

- (I) GUS staining in a mature wild-type silique at 57 days after germination.
- (J) GUS staining in a wild-type seedling (grown on soil for 10 days) after cold treatment (4°C) for 6 h.
- (K) GUS staining in a *gin1* seedling (grown on soil for 10 days) after cold treatment (4°C) for 6 h.
- (L) GUS staining in a wild-type seedling (grown on soil for 10 days) after NaCl treatment (250 mM) for 6 h.
- (M) GUS staining in a *gin1* seedling (grown on soil for 10 days) after NaCl treatment (250 mM) for 6 h.
- (N) GUS staining in a wild-type seedling grown on 2% Glc MS medium for 10 days.
- (O) GUS staining in a *gin1* seedling grown on 2% Glc MS medium for 10 days.
- (P) GUS staining in wild-type (left) and *gin1* (right) plants grown on 6% Glc MS medium for 14 days.
- (Q) GUS staining in a wild-type seedling grown on 2% mannitol MS medium for 10 days.
- (R) GUS staining in a *gin1* seedling grown on 2% mannitol MS medium for 10 days.
- (S) GUS staining in a wild-type seedling grown on 6% mannitol MS medium for 10 days.
- (T) GUS staining in a *gin1* seedling grown on 6% mannitol MS medium for 10 days.

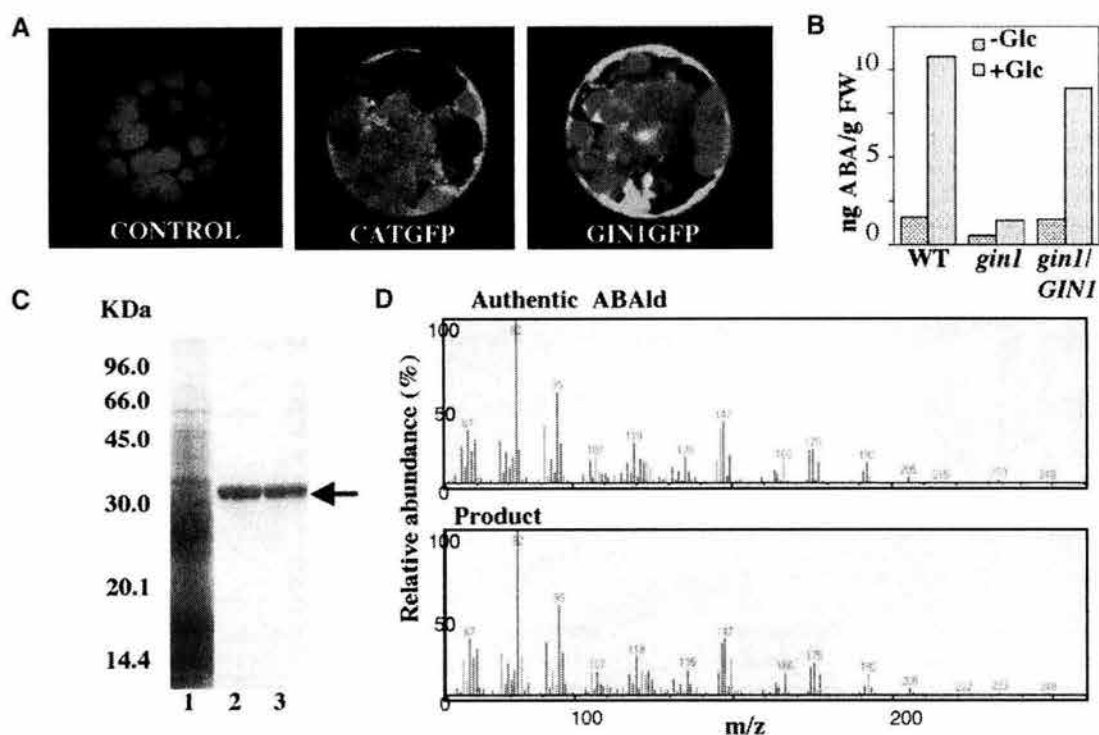


Figure 10. ABA2/GIN1 Subcellular Localization and Biochemical Activities.

(A) GIN1-GFP localization. Arabidopsis mesophyll protoplasts expressing a cytosolic GFP marker (CATGFP) or GIN1-GFP were examined by confocal microscopy. Chloroplasts show red autofluorescence. These mesophyll protoplasts have large vacuoles.

(B) Glc induces ABA accumulation. Wild-type (WT), *gin1*, and complemented (*gin1/GIN1*) seedlings were grown without (-Glc) or with (+Glc) 6% Glc for 10 days. Glc-induced ABA accumulation was abolished in *gin1*. Results shown are averages of two experiments. FW, fresh weight.

(C) Purification of the recombinant ABA2/GIN1/SDR1 protein. His-tagged ABA2/GIN1/SDR1 protein expressed in *P. pastoris* was purified by ammonium sulfate fractionation (0 to 45% saturation) (lane 1), Ni²⁺ column (stepwise) chromatography (lane 2), and DEAE column chromatography (lane 3). Protein fractions from each step were subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The arrow indicates the ABA2/GIN1/SDR1 protein.

(D) Mass spectra of authentic ABAld and the product from xanthoxin catalyzed by ABA2/GIN1/SDR1. GC-MS fragment patterns of ABAld (top spectrum) and the reaction product (relative abundance) of xanthoxin by ABA2/GIN1/SDR1 (bottom spectrum) are shown.

mechanisms. This notion is consistent with the differences in seedling morphology and *GIN1::GUS* expression patterns after 6% Glc and 6% mannitol treatments. *aba2/gin1* mutant alleles have been obtained from a variety of other screens for Suc mutants (*sis* and *isi*) (Laby et al., 2000; Rook et al., 2001) and salt resistance mutants (*sañ* and *sre*) (Quesada et al., 2000; González-Guzmán et al., 2002). The common feature of these mutations is the important role of ABA in sugar and salt/osmotic signaling, although Glc and stress signaling are distinct in their ABA regulation.

For the Glc bioassay under which *gin* and *glo* mutants were screened, the imbibition phase and the radicle protrusion of Arabidopsis seeds (Bewley, 1997; Koornneef et al., 2001) are not blocked by Glc (Jang et al., 1997; Zhou et al., 1998). However, excess Glc signals block the switch to postgermination development, including cotyledon greening and expansion, as well as apical shoot meristem and root

differentiation (Jang et al., 1997; Zhou et al., 1998). This developmental arrest imposed by Glc presumably signals a feedback regulation in the source tissues, the seeds that provide carbon nutrients for seedling growth. Under natural conditions, an inappropriate environment could limit early seedling growth and sugar consumption after germination, resulting in Glc accumulation and developmental arrest. This safeguard process for early seedling development involves newly synthesized and increased ABA (Figure 10B) and transcription factors ABI3, ABI4, and ABI5 controlled by Glc (Figure 7). Glc regulation differs from osmotic, salt, and drought stress controls (Leon-Kloosterziel et al., 1996; Quesada et al., 2000; González-Guzmán et al., 2002) by modulating additional signaling processes of other plant hormones, including ethylene, auxin, and cytokinin (Zhou et al., 1998; Sheen et al., 1999; Rolland et al., 2002; L. Zhou and J. Sheen, unpublished data). Feedback control by Glc is well documented in other types of

source tissues, such as photosynthetic leaves, that provide carbon nutrients for the development of sink tissues, including young leaves, roots, stems, flowers, and seeds (Sheen, 1994; Koch, 1996; Stitt and Krapp, 1999; Wobus and Weber, 1999; Smeekens, 2000; Rolland et al., 2002). We propose that endogenous Glc signals could be indicators of the plant growth environment and are monitored in different cell types and organs to adjust source (carbon export) and sink (carbon import) interactions through the regulation of genes involved in plant hormone synthesis and actions and in metabolism, thus coordinating plant growth and development with the environment.

ABA in Growth Promotion

ABA has long been defined as a stress hormone and growth inhibitor because of its roles in stress responses and its inhibitory growth effects when applied exogenously. However, the growth retardation phenotypes of ABA-deficient mutants have implicated an essential function of endogenous ABA in the promotion of leaf and stem development (Koornneef, 1986; Zeevaart and Creelman, 1988; Rock and Zeevaart, 1991; Finkelstein and Zeevaart, 1994; Nambara et al., 1998; Zhou et al., 1998; Sharp et al., 2000). It has been suggested that the pleiotropic phenotypes of ABA-deficient mutants are the result of auxin and ethylene production and/or an indirect effect of photoprotection or water relations (Koornneef, 1986; Sharp et al., 2000). The Arabidopsis ABA-insensitive mutants *abi1*, *abi2*, *abi3*, *abi4*, and *abi5* do not display overt morphological abnormality, probably as a result of tissue or pathway specificity and/or functional redundancy (Finkelstein and Zeevaart, 1994; Rock and Quatrano, 1995; Leung and Giraudat, 1998; Söderman et al., 2000). Analyses of Arabidopsis mutants in the ABA biosynthesis pathway, such as *aba1*, *aba3*, *ao3*, and the *NCED3* knockout mutant, have not offered a solution because the *ABA1* and *ABA3* gene products have functions other than ABA biosynthesis (Koornneef, 1986; Leon-Kloosterziel et al., 1996; Schwartz et al., 1997a), whereas the *ao3* mutant and a *NCED3* knockout mutant lack severe morphological phenotypes, presumably as a result of functional redundancy provided by other members of the multigene families (Seo et al., 2000a; Iuchi et al., 2001; Seo and Koshiba, 2002). Molecular cloning and BLAST searches have revealed that *ABA2/GIN1* encodes a unique SDR1 specific to the ABA biosynthesis pathway. At present, the *aba2* mutants are available only in Arabidopsis (Seo and Koshiba, 2002). Thus, analyses of the Arabidopsis *aba2/gin1* null mutants and complementation by *ABA2/GIN1* in transgenic plants provide an opportunity to reevaluate the physiological functions of ABA in growth promotion. It is clear that endogenous ABA is important for cotyledon, leaf, root, stem, and silique development and fertility (Figures 4, 5, and 12). Blocking ethylene signaling partially restores root growth and development in *aba2/gin1*, but other phenotypes are independent of ethylene, even when grown under high-humidity conditions.

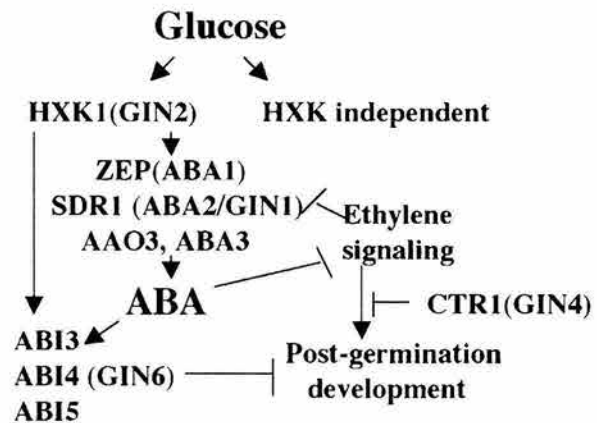


Figure 11. Model of the Interplay of the Glc, ABA, and Ethylene Signaling Pathways.

This model is based on postgermination development phenotypes of Arabidopsis seedlings.

The size and morphology of flowers and mature seeds in *aba2/gin1* are similar to those in the wild type (data not shown). However, the smaller *aba2/gin1* siliques have many unfertilized ovaries and/or aborted embryos at early stages and produce many fewer mature seeds than do wild-type siliques (Figures 5E and 5F). ABA may play a role in the early embryo differentiation found during the study of somatic embryogenesis (Zimmerman, 1993; Rock and Quatrano, 1995). The striking expression of *GIN1::GUS* at the junction of the pedicel and the young silique is consistent with such a role (Figure 8H). The precise stage and mechanisms of ABA function during early embryogenesis require further investigation. The expression of *GIN1::GUS* also is prominent in the septa and funiculi of mature siliques (Figure 8I), suggesting a maternal supply of ABA for seed maturation, dormancy, and/or desiccation (Figure 12), as shown by genetic analysis in Arabidopsis (Raz et al., 2001).

Analysis of the *aba2/gin1* mutants also supports the idea that preexisting ABA is critical to rapid guard cell signaling (within minutes) in response to water stress (Figure 12). Stress-induced ABA accumulation requires de novo transcription and translation of *NCED* as a rate-limiting enzyme and takes hours to occur (Qin and Zeevaart, 1999; Iuchi et al., 2000). Overexpression of *NCED3* in transgenic plants enhances drought tolerance over that of the wild type (Iuchi et al., 2001; Qin and Zeevaart, 2002), indicating that high ABA levels may be important for long-term survival under severe growth conditions. Although not inducible under stress conditions, *ABA2/GIN1* plays a key role in the support of many physiological functions of ABA that do not require induction by stress. There could be a physiological connection between Glc and ABA at lower endogenous levels that promotes rather than inhibits plant growth.

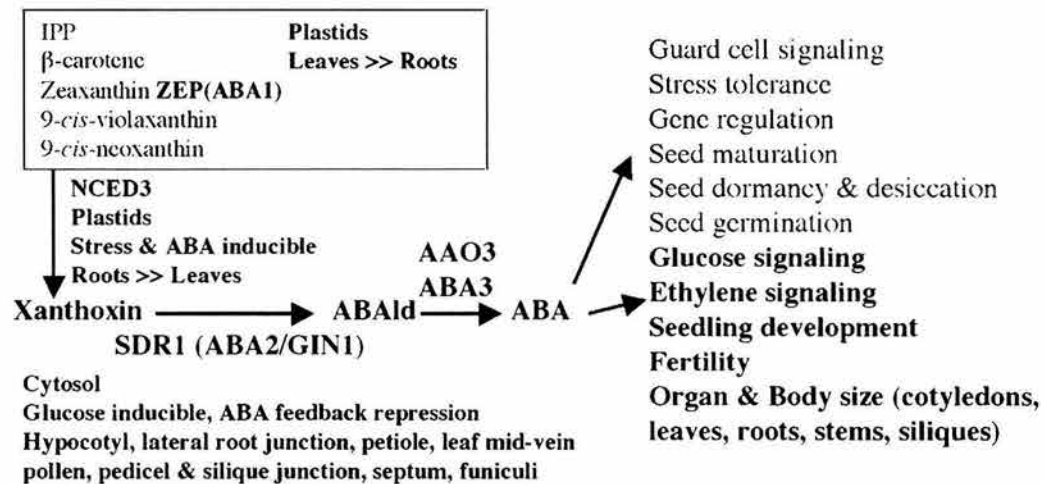


Figure 12. Proposed ABA Biosynthesis Pathway and Functions.

The ABA biosynthesis steps that are expressed preferentially in leaves are highlighted in the box. It is likely that early ABA precursors have distinct functions in photosynthesis and light stress protection. It is not clear whether these ABA precursors are transported from leaves to petioles, stems, and roots. The expression of NCED3 and SDR1 is regulated differently. Xanthoxin needs to be exported from plastids to be converted to ABAld by SDR1 in the cytosol. The active sites of the *GIN1* promoter are listed. New ABA functions presented in this study are listed in boldface.

ABA Biosynthesis Pathway and Regulation

ABA is a sesquiterpenoid (C_{15}) and is produced from an indirect pathway from the cleavage products of carotenoids (C_{40}) in the plastids (Figure 12) (Zeevaart and Creelman, 1988; Seo and Koshiba, 2002). The cloning and biochemical analysis of the first ABA pathway-specific enzyme, NCED, encoded by maize *VP14*, provided conclusive evidence that the ABA precursor xanthoxin is generated from the cleavage of 9-cis-epoxycarotenoids by NCED (Schwartz et al., 1997b; Tan et al., 1997). Cellular expression and chloroplast import studies show that NCED is localized in the chloroplasts (Figure 12) (Qin and Zeevaart, 1999; Iuchi et al., 2000; Tan et al., 2001). Recent genetic and biochemical characterizations of the *Arabidopsis aba2*, *ao3*, and *aba3* mutants and the tomato *sitiens* and *flacca* mutants have supported the conversion of xanthoxin to ABAld and ABA as the final steps (Figure 12) (Leon-Kloosterziel et al., 1996; Schwartz et al., 1997a; Sagi et al., 1999; Seo et al., 2000a, 2000b; Seo and Koshiba, 2002). However, the location at which, and the chemical reactions by which, xanthoxin is converted to ABA remain controversial. For example, the final steps of ABA biosynthesis have been observed to occur in both chloroplasts and cytosol (Sindhu and Walton, 1987; Milborrow, 2001). Abscisic alcohol and xanthoxic acid, instead of ABAld, have been proposed to be metabolic intermediates (Cutler and Krochko, 1999; Cowan, 2000; Milborrow, 2001; Seo and Koshiba, 2002). Our cellular analysis of GIN1-GFP localization and biochemical analyses of the purified enzyme support the conversion of xanthoxin to ABAld by SDR1 in

the cytosol in plants (Figure 12). This physiological function of SDR1 is further confirmed by the fact that SDR1 cannot use xanthoxic acid as a substrate and AAO3 can use only ABAld but not xanthoxin as a substrate. However, other minor ABA biosynthesis pathways may exist in *aba2/gin1* null mutants, and these require further investigation (Cowan, 2000; Seo and Koshiba, 2002).

Many genes involved in the biosynthesis of plant growth hormones, such as gibberellins, brassinosteroids, and sterols, are expressed in actively growing cells and in the target sites (Silverstone et al., 1997; Jang et al., 2000; Bishop and Yokota, 2001). The enzymes that catalyze the conversion of xanthoxin to ABA were thought previously to be ubiquitous and expressed constitutively (Sindhu and Walton, 1987; Schwartz et al., 1997a; Sagi et al., 1999; Seo et al., 2000a). Unexpectedly, the spatial and temporal expression patterns of *ABA2/GIN1* are restricted to specific areas of vascular tissues and are distinct from the tissue expression patterns of other genes, such as *ZEP*, *NCED3*, *AAO3*, and *ABA3*, that are important for ABA biosynthesis (Audran et al., 1998; Qin and Zeevaart, 1999; Iuchi et al., 2000, 2001; Thompson et al., 2000; Xiong et al., 2001, 2002; M. Seo and T. Koshiba, unpublished data). These results indicate that interorgan, intercellular, and interorganelle transport of ABA precursors and/or ABA may be required for the completion of ABA synthesis and to reach target sites (Figure 12). Additional cellular analyses of promoter fusions and immunolocalization of the ABA biosynthesis enzymes and ABA will be required to understand the physical location and regulation of the ABA biosynthesis pathway.

Physiological Functions of the SDR Superfamily in Eukaryotes

The SDR superfamily represents a very large family of enzymes, most of which are known to be NAD- or NADP-dependent oxidoreductases from *E. coli* to humans. Because the first characterized member of this family was the novel alcohol dehydrogenase in *Drosophila*, this family used to be called "insect-type" or "short-chain" alcohol dehydrogenase. The discovery of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase as the first mammalian SDR brought general interest to SDR functions (Jörnvall, 1999). The first cloned plant SDR gene was maize *TS2*, which is involved in sex determination by controlling cell death through unknown mechanisms (DeLong et al., 1993). It was suggested, based on its sequence homology with hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in prokaryotes, that *ZmTS2* might control plant steroid metabolism (DeLong et al., 1993). However, sequence alignment revealed that the putative Arabidopsis HSD is evolutionarily distant from ABA2/GIN1/SDR1, SDR2, and *ZmTS2* (Figure 3). Although many plant genes involved in brassinosteroid and sterol biosynthesis have been isolated using mutants in Arabidopsis, none encodes SDR (Bishop and Yokota, 2001). The molecular cloning of ABA2/GIN1 reveals the functional significance of plant SDR in ABA biosynthesis: it is critical for growth and development, stress responses, and Glc signaling (Figure 12). The tobacco and cucumber SDR genes are closely related to ABA2/GIN1 and may be involved in ABA biosynthesis (Figure 3). It remains to be determined whether other distinct SDR genes may provide a low level of activity for ABA biosynthesis with different expression patterns. The Arabidopsis *TS2* homolog (SDR2) is related more closely to SDR1 than to HSDs of 56 SDR members in the Arabidopsis genome. It will be interesting to determine the functions of Arabidopsis SDR2 and HSD genes by isolating and characterizing knockout mutants and performing enzymatic assays. In mammals, SDRs play diverse and important roles, as in the metabolism of steroid and retinoid hormones and the interaction with amyloid B-peptide in human Alzheimer's disease (Oppermann et al., 1999, 2001). Functional analyses of plant SDRs may provide useful clues to SDR functions in hormone biosynthesis and the metabolic signaling that controls embryogenesis and postnatal growth and development in mammals.

METHODS

Mutant Isolation and Genetic Analyses

Three *gin1* mutants, *gin1-1* (Wassilewskija [Ws] ecotype), *gin1-2* (Landsberg *erecta* [Ler]), and *gin1-3* (Columbia [Col] ecotype), and two *gin4* mutants, *gin4-1* (Col) and *gin4-2* (Col), were selected on 7% Glc Murashige and Skoog (1962) plates as described by Zhou et al.

(1998). Allelism tests showed that none of the *gin1* or *gin4* mutants complemented each other in the Glc bioassay or in the greenhouse. Although selected from T-DNA-tagged pools, none was tagged by T-DNA. The null mutant *gin1-1* was used for cloning, and the null mutant *gin1-3* was used for all other studies except for those shown in Figure 6A, for which null *aba2-2* was used. All mutants were recessive and backcrossed to the wild type to ensure the cosegregation of phenotypes before extensive fine mapping was performed. For the analysis of *gin1-1* and *gin1-3* reverse transcriptase (RT) PCR products, the following exon 2 primers were used: 5'-AGTGGCATTGACTACTGGAG-3' and 5'-GTGAATCCTCATCAATCATC-3'. Note that the 5' primer sequence was deleted in the *gin1-3* mutant except for the initial AGT.

Map-Based Cloning of GIN1

The mapping population was generated by crossing *gin1-1* (Ws) to the Col or Ler wild type. F₂ populations of *gin1-1* mutants (5627) were isolated on 7% Glc Murashige and Skoog (1962) plates. Genomic cDNA was extracted to perform PCR using simple sequence length polymorphism (SSLP) markers to identify recombinants as described previously (Bell and Ecker, 1994). Fine mapping was performed by designing new SSLP markers. The primers were synthesized based on BAC DNA sequences and tested by PCR using DNA isolated from three ecotypes. New SSLP primer sequences and PCR fragment sizes (Col/Ler/Ws, in bp) for fine mapping are listed below: F6D8-33-A3, 5'-ACATGGCTAGAAGGTGGAGAC-3', and F6D8-33-B3, 5'-ATATTATGCTCCAGTATTTAGG-3' (183/194/183); F6D8-3-A1, 5'-TCTACATCTAGACGGGAAGG-3', and F6D8-3-B1, 5'-CGC-CATTGCTTCTCGACTTG-3' (1140/900/1140); F5F19-19-A3, 5'-ACG-TGTTCCACAGCAACATCAAG-3', and F5F19-19-B3, 5'-GTATTTTCAGACTAAGCTTTTGCC-3' (96/93/90); F5F19-12-A1, 5'-CCA-GTTGCTATCCATATCTATTG-3', and F5F19-12-B1, 5'-ATTCCTCATATGAGATCCGAGG-3' (180/194/178); F5F19-1-3A, 5'-CTGTGG-TTAGACTGACAAGTG-3', and F5F19-1-3B, 5'-ACCAAAGAG-CCCTGAAGAC-3' (105/105/96); F11M15-24-2A, 5'-AATGGTTAG-ATTCATTAGGATG-3', and F11M15-24-2B, 5'-TTCTCTGTTTGT-GAAGCCAGC-3' (123/156/123); F11M15-1-A2, 5'-TGGAGTTGC-TGAACCTAGCC-3', and F11M15-1-B2, 5'-ATGGATCGAAAATAT-GAGTATC-3' (129/129/120); and F13F21-15-A3, 5'-GTTGAACGG-TTTAGATTGAAGG-3', and F13F21-15-B3, 5'-TACGGAGATGCT-TAGCCGAGC-3' (282/275/211). The full-length cDNA was isolated using 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends based on the manufacturer's protocol (SMART RACE cDNA Amplification Kit; Clontech, Palo Alto, CA). The primers were located at 42451 to 42473 and 42783 to 42802 bp in the F19K6 BAC clone, with a 351-bp overlap.

Constructs and Transgenic Arabidopsis thaliana

The ABA2/GIN1 genomic clone (7.7 kb), covering 3 and 2 kb of the 5' and 3' flanking regions, respectively, was amplified by PCR, confirmed by sequencing, and cloned into a miniature binary vector (Xiang et al., 1999). The ABA2/GIN1 full-length cDNA was amplified by PCR from a cDNA library (Jang et al., 1997), confirmed by sequencing, and cloned into a binary vector (pSMAB704) under the control of the constitutive 35S promoter to generate 35S::GIN1. The GIN1:: β -glucuronidase (*GUS*) fusion gene was generated by fusing

the 3-kb 5' promoter of *GIN1* to *GUS* at the ATG site. The promoter was obtained by PCR from the genomic clone using the following primers with underlined HindIII and SmaI sites, respectively: 5'-ATCTCACTACGGAAGCTTCTGG-3' and 5'-GTGACCCCGGAATA-GCTTTAGCTCCTTAGATCTTC-3', starting at nucleotides 38638 and 41545, respectively, in the F19K6 BAC clone. The promoter sequence was confirmed by DNA sequencing and cloned into binary vector pSMAB704. The binary vectors were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 by electroporation. The null *gin1-3* mutant and wild-type plants were transformed by *Agrobacterium* using the floral-dip method (Hwang and Sheen, 2001). T1 transgenic plants showing herbicide resistance were confirmed further by PCR and DNA gel blot analyses. More than 100 transgenic plants were obtained for all constructs. Ten independent transgenic lines for each of the cDNA and genomic clones were analyzed further. GUS expression pattern analyses were performed with three randomly chosen transgenic lines in the wild type and *gin1-3*. T2 and homozygous T3 plants were used to perform complementation tests and GUS expression pattern analyses as described (Jang et al., 2000).

Subcellular Localization of the GIN1-Green Fluorescent Protein Fusion

The GIN1 coding region was amplified by RT-PCR and fused to green fluorescent protein (GFP) in a plant expression vector for protoplast transient expression analyses, as described previously (Hwang and Sheen, 2001). The following primers with a BamHI site at the 5' end and a *StuI* site at the 3' end (underlined) were used: 5'-AAG-AAGATCTAAGGATCCAAAGC-3' and 5'-ATGCAAGGCCTTCTGAAG-ACTTTAAAGGAGTGG-3'. RT-PCR amplification of mutant coding regions (*gin1-2*, *gin1-3*, and *aba2-1*) was performed to make GFP fusions. The expression of the *gin1-3*-GFP fusion was not observed in protoplasts, suggesting a null mutation (data not shown).

Protein Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Construction

Arabidopsis short-chain dehydrogenase/reductase (SDR)-related sequences (46% identity and 60% similarity) were obtained using the BLAST program from the TAIR World Wide Web site (<http://www.arabidopsis.org/Blast>), and SDR, 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD), retenoid dehydrogenase, and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase sequences (30% identity and 50% similarity) from other model systems were obtained using the National Center for Biotechnology Information PSI-BLAST program based on the ABA2/GIN1 sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The phylogenetic tree was generated using SDR sequences containing motifs I to VI, without the divergent N and C termini, with Clustal X 1.81 (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX>) and was displayed with Treeview 1.6.5 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). The scale of 0.1 in the unrooted tree (Figure 3) indicates 0.1 amino acid substitutions per site. Arabidopsis SDR2 (62%), SDR3 (62%), SDR4 (61%), and SDR5 (60%) share the highest sequence similarity to SDR1. Based on the Clustal alignment program, Arabidopsis ABA2/GIN1 (*AtSDR1*) is grouped with tobacco (*NtSDR*) and cucumber (*CsSDR*) homologs in the phylogenetic tree. *AtSDR2* is closely related to maize *ZmTS2* and is different from *AtSDR3*, *AtSDR4*, and *AtSDR5*. Arabidopsis 11- β -hydroxysteroid dehydrogenases is closely related to human and mouse 11- β -hydroxysteroid dehydro-

genases. The human and mouse 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenases and human and mouse retenoid dehydrogenases also are shown in Figure 3.

Expression and Purification of SDR1

For SDR1 expression in *Pichia pastoris*, *ABA2/GIN1* cDNA was cloned into the pPICZC vector to produce a fusion protein with the MYC epitope and polyhistidine tags with an ACC sequence before the initiation ATG codon, according to the manufacturer's instructions (Easy Select *Pichia* Expression Kit; Invitrogen, Carlsbad, CA). Transformation and expression of recombinant protein were performed as described (Koiwai et al., 2000). The cells were harvested after methanol induction for 48 h. The crude enzyme extract was fractionated with ammonium sulfate (0 to 45% saturation) and dialyzed against 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 2.5 mM EDTA and 5 μ M leupeptin. Ammonium sulfate-fractionated enzyme samples were purified with the ProBound protein purification kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, except that the elution was performed with 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 30 mM EDTA. The eluate was dialyzed against 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 2.5 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, and 10% glycerol and applied to a DEAE column (DEAE-5PW; 7.5 mm i.d. \times 75 mm; TOSOH, Tokyo, Japan). The adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of KCl from 50 mM to 0.5 M in 20 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, containing 2.5 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, and 10% glycerol. SDR1 activity was recovered in the fraction that eluted at \sim 0.3 M KCl. The purity of recombinant SDR1 was examined by SDS-PAGE and protein staining (Figure 10C).

SDR1 Enzymatic Assay

The enzyme sample used for the activity assay was the fraction purified on the Ni²⁺ column. To determine the K_m value, reaction mixtures (100 μ L) containing 5 μ L of enzyme solution (\sim 5 μ g of protein), 0.01 to 0.1 mM xanthoxin, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, and 5 mM NAD were incubated at 30°C for 5 to 20 min. After incubation, the reaction was stopped by adding 10 μ L of 1 N HCl and 30 μ L of 100% methanol, successively. After centrifugation, the supernatant (100 μ L) was subjected to HPLC. Activity was assayed by determining the amount of abscisic aldehyde product, as described previously (Koshiha et al., 1996). The coenzyme dependence of the reaction was determined using 5 mM NAD, NADH, NADP, or NADPH. To determine the reaction product, the reaction was performed with 1 mL of reaction mixture using enzyme solutions purified on the DEAE column. The reaction product was partially purified by ether fractionation and HPLC and subjected to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Abscisic Acid Determination

Seedlings (0.5 to 1 g) were homogenized in 80% (v/v) acetone containing 0.1 mg/mL 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol. After adding ¹³C-abscisic acid (ABA) (Asami et al., 1999) as an internal standard, the homogenate was shaken for 1 h on ice in darkness and then centrifuged (1200g for 10 min) at 4°C. The precipitate was reextracted, and the combined supernatant was evaporated to remove acetone.

ABA was partially purified from the residual aqueous solution by partitioning using hexane and ether and then by HPLC. ABA was methylated with diazomethane and analyzed by GC–selected ion monitoring–MS by monitoring 192 (from ^{13}C -ABA) and 190 (from endogenous ABA) fragments.

GC-MS Analysis

GC-MS analysis was performed with a mass spectrometer (GCMS-QP5050; Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to a gas chromatograph (GC-17A; Shimadzu) with a DB-1 capillary column (0.25 mm i.d. \times 30 m, film thickness of 0.25 μm ; J&W Scientific, Folsom, CA). The injection temperature was set at 250°C, and the inlet pressure was 70 kPa. After injection, the oven temperature was maintained at 80°C for 1 min, increased to 290°C at a rate of 20°C/min, and then kept at 290°C for 5 min. Mass spectra were obtained under the following conditions: electron energy of 1.5 kV, ion source temperature of 250°C, capillary interface temperature of 250°C, and ion range of 50 to 450 (mass-to-charge ratio).

Preparation of Xanthoxic Acid

A *cis* and *trans* mixture of 4'-benzoyl xanthoxic acid ethyl ester was synthesized according to the method described previously (Yamamoto and Oritani, 1996). Treatment of this diester with 2.5 equivalent KOH in dry ethanol under reflux conditions gave a potassium salt of the acid. The usual workup gave a *cis* and *trans* mixture of xanthoxic acid in high yield. Each isomer was separated by HPLC to give xanthoxic acid.

Upon request, all novel materials described in this article will be made available in a timely manner for noncommercial research purposes. No restrictions or conditions will be placed on the use of any materials described in this article that would limit their use for noncommercial research purposes.

Accession Numbers

The accession number for *ABA2/GIN1* is At1g52340, and that for the F19K6 BAC clone is AC037424. Accession numbers for other sequences mentioned in this article are as follows: *ZmTSS2*, L20621; *HsSDR*, NM_016246; *MmSDR*, NM_008278; *DmSDR*, AAF51984; *CeSDR*, Z72508; *ScSDR*, NC_001143; *EcSDR*, NC_000913; *AtSDR1*, AC037424; *NtSDR*, NTAJ3177; *CsSDR*, AF286651; *AtSDR2* (AL132968, At3g51680); *AtSDR3* (AC004411, At2g47130); *AtSDR4* (AB026657, At3g29250); *AtSDR5* (AB026657, At3g29260); *AtHSD*, NM_124448; human HSD, NM_005525; mouse HSD, S75207; human HPGD, NM_000860; mouse HPGD, NM_008278; human RDH, NM_003708, XM_006732; and mouse RDH, AY028928, AF013288.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Rodriguez and M. Bevan for sharing unpublished results, M. Koornneef for advice, J. Ecker for *ein2* seeds, and the

ABRC (Columbus, OH) for all other ABA and ethylene mutant seeds. H. Ichikawa is thanked for the binary vector pSMAB704, C. Xiang for the miniature binary vector pCB302, and M.R. Willmann for help with the transgenic plants. We also thank Q. Hall for silique pictures, A. Schaeffner for protocols, D. Bongard for BAC DNA sequence annotation, P.-C. Lin for GUS assays, and B. Moore and S.-H. Cheng for help with the confocal microscope. I. Hwang provided a database search. R. Patharkar, G. Tena, and J. Plotnikova are thanked for harvesting and testing transgenic seeds, T. Oritani for kindly providing xanthoxin, and F. Rolland for critical reading of the manuscript. J.S. was supported by grants from the National Science Foundation (IBN-9723610) and the National Institutes of Health (GM60493). T.K. was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (13490024) from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan. M.S. was supported by a research fellowship from the Japan Society for the Promotion of Science for Young Scientists. P.L. was supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (31791) and by the Howard Hughes Medical Institute.

Received July 18, 2002; accepted August 6, 2002.

REFERENCES

- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., and Ecker, J.R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* **284**, 2148–2152.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., and Leon, P. (2000). Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev.* **14**, 2085–2096.
- Asami, T., Sekimata, K., Wang, J.M., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., and Yoshida, S. (1999). Preparation of (\pm)-[1,2- $^{13}\text{C}_2$]abscisic acid for use as a stable and pure internal standard. *J. Chem. Res. (Synop.)* **11**, 658–659.
- Audran, C., Borel, C., Frey, A., Sotta, B., Meyer, C., Simonneau, T., and Marion-Poll, A. (1998). Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* **118**, 1021–1028.
- Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., and Giraudat, J. (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**, 1103–1115.
- Bell, C.J., and Ecker, J.R. (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis. *Genomics* **19**, 137–144.
- Bewley, J.D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055–1066.
- Bishop, G.J., and Yokota, T. (2001). Plants steroid hormones, brassinosteroids: Current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant Cell Physiol.* **42**, 114–120.
- Coruzzi, G.M., and Zhou, L. (2001). Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: Emerging 'matrix effects.' *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 247–253.
- Cowan, A.K. (2000). Is abscisic aldehyde really the immediate precursor to stress-induced ABA? *Trends Plant Sci.* **5**, 191–192.
- Cutler, A.J., and Krochko, J.E. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* **4**, 472–478.
- DeLong, A., Calderon-Urrea, A., and Dellaporta, S.L. (1993). Sex

- determination gene *TASSELSEED2* of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell* **74**, 757–768.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., and Rock, C.D.** (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14** (suppl.), S15–S45.
- Finkelstein, R.R., and Gibson, S.I.** (2001). ABA and sugar interactions regulating development: Cross-talk or voices in a crowd. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 26–32.
- Finkelstein, R.R., and Zeevaert, J.A.** (1994). Gibberellin and abscisic acid biosynthesis and response. In *The Arabidopsis Book*, C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, eds (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Gazzarrini, S., and McCourt, P.** (2001). Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 387–391.
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., and McCourt, P.** (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1117–1126.
- Gibson, S.I., Laby, R.J., and Kim, D.** (2001). The *sugar-insensitive1* (*sis1*) mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctr1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 196–203.
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Belles, J.M., Barrero, J.M., Piqueras, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., Serrano, R., and Rodríguez, P.L.** (2002). The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin into abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14**, 1833–1846.
- Huijser, C., Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E., and Smeekens, S.** (2000). The *Arabidopsis* *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: Involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J.* **23**, 577–585.
- Hwang, I., and Sheen, J.** (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383–389.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **27**, 325–333.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2000). A stress-inducible gene for 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol.* **123**, 553–562.
- Jang, J.C., Fujioka, S., Tasaka, M., Seto, H., Takatsuto, S., Ishii, A., Aida, M., Yoshida, S., and Sheen, J.** (2000). A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the *fakcel* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **14**, 1485–1497.
- Jang, J.C., Leon, P., Zhou, L., and Sheen, J.** (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**, 5–19.
- Jörnvall, H.** (1999). Multiplicity and complexity of SDR and MDR enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 359–364.
- Jörnvall, H., Höög, J.O., and Persson, B.** (1999). SDR and MDR: Completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett.* **445**, 261–264.
- Koch, K.E.** (1996). Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 509–540.
- Koiwai, H., Akaba, S., Seo, M., Komano, T., and Koshiba, T.** (2000). Functional expression of two *Arabidopsis* aldehyde oxidases in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biochem.* **127**, 659–664.
- Koornneef, M.** (1986). Genetic aspects of abscisic acid. In *A Genetic Approach to Plant Biochemistry*, A.D. Blonstein and P.J. King, eds (Vienna: Springer Verlag), pp. 35–54.
- Koornneef, M., Bentsink, L., and Hilhorst, H.** (2001). Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 33–36.
- Koshiba, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N., and Sato, M.** (1996). Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiol.* **110**, 781–789.
- Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D., and Gibson, S.I.** (2000). The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J.* **23**, 587–596.
- Leon-Kloosterziel, K.M., Gil, M.A., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaert, J.A., and Koornneef, M.** (1996). Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J.* **10**, 655–661.
- Leung, J., and Giraudat, J.** (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 199–222.
- Leung, J., Merlot, S., and Giraudat, J.** (1997). The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* **9**, 759–771.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., and Chua, N.H.** (2001). A post-germination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4782–4787.
- Milborrow, B.V.** (2001). The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: A review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J. Exp. Bot.* **52**, 1145–1164.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.
- Nambara, E., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Naito, S.** (1998). Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. *Plant Cell Physiol.* **39**, 853–858.
- Oppermann, U., Salim, S., Hult, M., Eissner, G., and Jörnvall, H.** (1999). Regulatory factors and motifs in SDR enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 365–371.
- Oppermann, U.C., Filling, C., and Jörnvall, H.** (2001). Forms and functions of human SDR enzymes. *Chem. Biol. Interact.* **130–132**, 699–705.
- Qin, X., and Zeevaert, J.A.** (1999). The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 15354–15361.
- Qin, X., and Zeevaert, J.A.** (2002). Overexpression of a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol.* **128**, 544–551.
- Quesada, V., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2000). Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **154**, 421–436.
- Raschke, K., Firm, R.D., and Pierce, M.** (1975). Stomatal closure in response to xanthoxin and abscisic acid. *Planta* **125**, 149–160.
- Raz, V., Bergervoet, J.H., and Koornneef, M.** (2001). Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* **128**, 243–252.
- Rock, C.D., and Quatrano, R.** (1995). The role of hormones during seed development. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, P.J. Davies, ed (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 671–697.

- Rock, C.D., and Zeevaart, J.A. (1991). The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7496–7499.
- Rolland, F., Moore, B., and Sheen, J. (2002). Plant sugar sensing and signaling. *Plant Cell* **14** (suppl.), S185–S205.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C., and Bevan, M.W. (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J.* **26**, 421–433.
- Sagi, M., Fluhr, R., and Lips, S.H. (1999). Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a *flacca* tomato mutant with deficient abscisic acid and wilted phenotype. *Plant Physiol.* **120**, 571–578.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., and Allen, G.J. (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* **410**, 327–330.
- Schwartz, S.H., Leon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., and Zeevaart, J.A. (1997a). Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 161–166.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A., and McCarty, D.R. (1997b). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**, 1872–1874.
- Seo, M., Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y., and Koshiba, T. (2000a). Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **23**, 481–488.
- Seo, M., and Koshiba, T. (2002). The complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 41–48.
- Seo, M., Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A., Koornneef, M., Kamiya, Y., and Koshiba, T. (2000b). The *Arabidopsis aldehyde oxidase 3* (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12908–12913.
- Sharp, R.E., LeNoble, M.E., Else, M.A., Thorne, E.T., and Gherardi, F. (2000). Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: Evidence for an interaction with ethylene. *J. Exp. Bot.* **51**, 1575–1584.
- Sheen, J. (1994). Feedback control of gene expression. *Photosynth. Res.* **39**, 427–438.
- Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J.C. (1999). Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 410–418.
- Silverstone, A.L., Chang, C., Krol, E., and Sun, T.P. (1997). Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene *GA1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**, 9–19.
- Sindhu, R.K., and Walton, D.C. (1987). Conversion of xanthoxin to ABA by cell-free preparations from bean leaves. *Plant Physiol.* **85**, 916–921.
- Smalle, J., Haegman, M., Kurepa, J., Van Montagu, M., and Straeten, D.V. (1997). Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2756–2761.
- Smeeckens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 49–81.
- Söderman, E.M., Brocard, I.M., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R. (2000). Regulation and function of the *Arabidopsis ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol.* **124**, 1752–1765.
- Stepanova, A.N., and Ecker, J.R. (2000). Ethylene signaling: From mutants to molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 353–360.
- Stitt, M., and Krapp, A. (1999). The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* **22**, 583–621.
- Tan, B.C., Cline, K., and McCarty, D.R. (2001). Localization and targeting of the VP14 epoxy-carotenoid dioxygenase to chloroplast membranes. *Plant J.* **27**, 373–382.
- Tan, B.C., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A., and McCarty, D.R. (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12235–12240.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Parker, R.A., Morpeth, D.R., Burbidge, A., and Taylor, I.B. (2000). Abscisic acid biosynthesis in tomato: Regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* **42**, 833–845.
- Wobus, U., and Weber, H. (1999). Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* **380**, 937–944.
- Xiang, C., Han, P., Lutziger, I., Wang, K., and Oliver, D.J. (1999). A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **40**, 711–717.
- Xiao, W., Sheen, J., and Jang, J.C. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol. Biol.* **44**, 451–461.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., and Zhu, J.K. (2001). The *Arabidopsis LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **13**, 2063–2083.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., and Zhu, J.K. (2002). Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *Los6/ABA1* locus in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 8588–8596.
- Yamamoto, H., and Oritani, T. (1996). Stereoselectivity in the biosynthetic conversion of xanthoxin into abscisic acid. *Planta* **200**, 319–325.
- Zeevaart, J.A., and Creelman, R.A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 439–473.
- Zhou, L., Jang, J.C., Jones, T.L., and Sheen, J. (1998). Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10294–10299.
- Zimmerman, J.L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* **5**, 1411–1423.

IV.5.3 *gin8*, la primera mutante en el gen involucrado en la biosíntesis de ABA: *NCED3?*.

Una de las mutantes aisladas en este trabajo se denominó *gin8* y a continuación presento un resumen de la caracterización genética, fenotípica y molecular de esta mutante.

IV.5.3.1 Caracterización genética.

Los análisis de retrocruzas y cruza de *gin8* con otras mutantes mostraron que el fenotipo *gin* es causado por una sola mutación de tipo recesivo (Tabla 10), y que no es alélica a las mutantes *gin1* (*aba2*), *gin5* (*aba3*), *gin6* (*abi4*) ni *gin7* (Tabla 10). Análisis genéticos adicionales mostraron que esta mutante a pesar de tener una sola inserción de T-DNA, la mutación no parecía estar abanderada por el T-DNA, por lo que se realizó un mapeo preliminar en el laboratorio por Marcela Treviño. Los datos del mapeo indicaron que la mutación se localiza en el cromosoma 3, muy cerca del marcador genético *nga* 162 (ver más adelante).

Tabla 13. Análisis de segregación mendeliana y pruebas de complementación de la mutante *gin8*.

Retrocruzas.

Cruza	No. individuos F1 Km ^R	F2 Glc ^R (%)	F2 Km ^R (%)	No. individuos F2
<i>Ws x gin8</i>	5	21	73	500 en Glc, 500 en Km

Pruebas de complementación.

Cruza	F1 Glc ^R (%)	F2 Glc ^R (%)	No. individuos F2	Conclusión
<i>gin5 x gin8</i>	0%			No alélicas
<i>gin6 x gin8</i>	No evaluada	30%	539	No alélicas
<i>gin7 x gin8</i>	No evaluada	58%	518	No alélicas
<i>gin8 x gin7</i>	0%			No alélicas
<i>gin8 x gin1</i>	0%			No alélicas

IV.5.3.2 Caracterización fenotípica.

Dada la clara participación de la hormona ABA en la respuesta a Glc, se realizaron bioensayos para determinar si esta hormona también estaba implicada en el fenotipo *gin* de la mutante *gin8*. Como se mencionó anteriormente, las mutantes insensibles a Glc que son deficientes en la biosíntesis de ABA presentan fenotipo "wilty" (Arenas *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002). Para determinar si la insensibilidad a Glc de *gin8* era debida a deficiencias en la biosíntesis de ABA, se evaluó si *gin8* tenía fenotipo "wilty" como una prueba indirecta de alteraciones en los niveles de ABA. Los resultados indicaron que *gin8* pierde turgencia fácilmente, por lo que presenta fenotipo "wilty" (Fig. 13). Este resultado aunado al hecho de que esta mutante recupera la sensibilidad a Glc en presencia de ABA (Fig. 14), sugiere que *gin8* es deficiente en ABA.

***gin8* tiene fenotipo “wilty”**



Figura 13. Fenotipo de plantas silvestres y de la mutante *gin8* crecidas y regadas con agua durante 4 semanas, seguidas de 2 semanas sin riego.

La aplicación exógena de ABA restablece las sensibilidad de *gin8* a la Glc

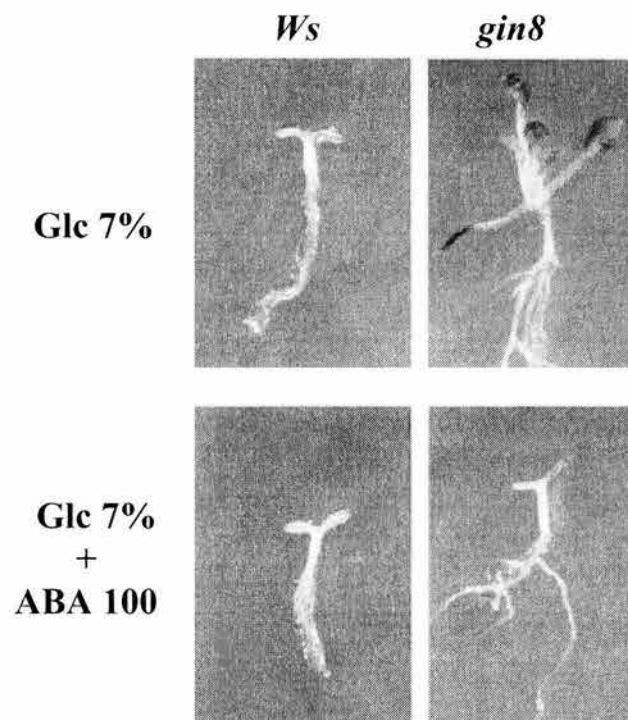


Figura 14. Fenotipo de plantas silvestres y de la mutante *gin8* germinadas y crecidas por 15 d en presencia de Glc al 7% y paralelamente en Glc al 7% incluyendo ABA 100 nM.

Para confirmar esta hipótesis, se midieron los niveles de ABA endógeno de *gin8* tanto en respuesta a Glc como en condiciones normales. Los resultados indicaron que *gin8* tiene niveles de ABA menores que la planta silvestre en condiciones de crecimiento estándar, y esta diferencia se hace mucho más notoria en respuesta a Glc (Fig. 15).

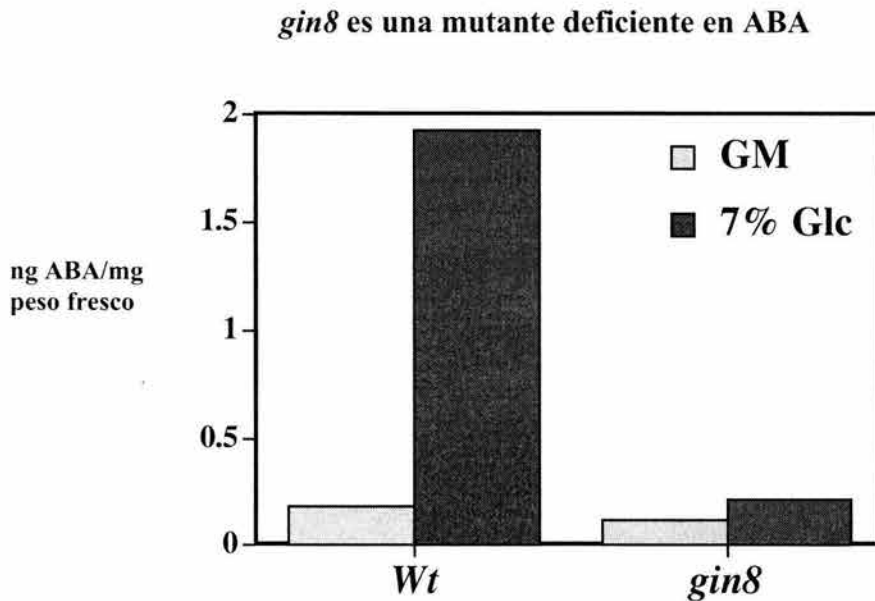


Figura 15. Cuantificación de los niveles de ABA en la mutante *gin8*. Las plantas fueron crecidas en medio de germinación estándar (GM) y paralelamente en presencia de Glc al 7% durante 17 d previamente a la medición de los niveles de ABA.

Se sabe que las mutantes deficientes en ABA se comportan como osmotolerantes y resistentes a condiciones salinas cuando se someten a estas condiciones durante la germinación (Werner y Finkelstein, 1995; León-Kloosterziel *et al.*, 1996). De hecho, alelos de las mutantes *aba* han sido aislados en “screenings” de mutantes resistentes a dichas condiciones (Quesada *et al.*, 2000; González-Guzmán *et al.*, 2002). En concordancia, la mutante *gin8* también es osmotolerante y resistente a estrés salino durante la germinación (Fig. 16).

***gin8* y otras mutantes *gin* son osmotolerantes y resistentes a estrés salino durante la germinación y el desarrollo temprano**

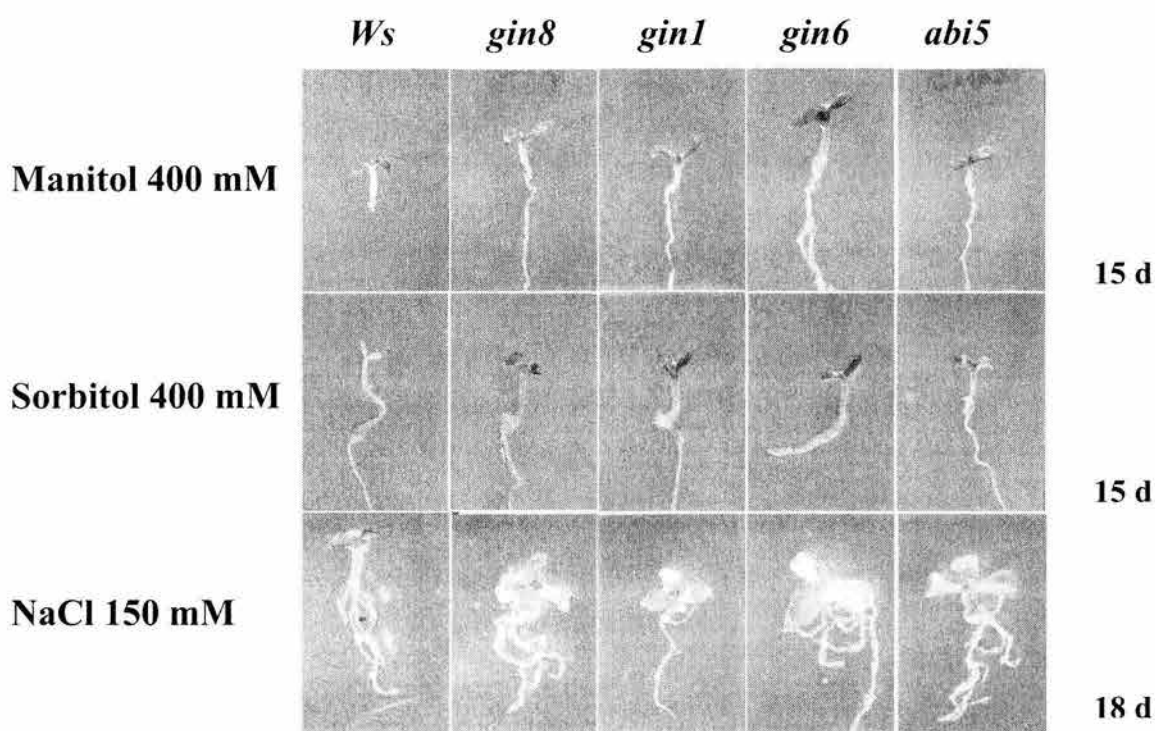


Figura 16. Pruebas de resistencia a estrés osmótico y salino en las mutantes *gin*. Las plantas silvestres y mutantes fueron germinadas y crecidas en medio de germinación estándar (GM) incluyendo el agente estresante indicado.

Resulta intrigante que las mutantes deficientes en ABA tengan este tipo de fenotipos, dado que se sabe que parte de las respuestas a estrés requieren de ABA. Sin embargo parte de estos fenotipos podrían ser el reflejo de la dormancia reducida en estas mutantes, dado que se requiere de la disminución de los niveles de ABA para activar el proceso de germinación. En adición a esto, las mutantes deficientes en ABA también presentan alteraciones en la capacidad de detectar y/o responder a los azúcares, los cuales se podrían acumular en niveles altos y dar como resultado un efecto osmoprotector para la planta. Esto explicaría que otras mutantes insensibles a Glc como *gin1/aba2*, *gin6/abi4* y *abi5* sean también resistentes a tales condiciones (Fig. 16).

De todos estos resultados, podemos concluir que el fenotipo de insensibilidad a Glc de la mutante *gin8* se debe a que esta mutante es deficiente en ABA. Cabe resaltar que *gin8* constituye una nueva mutante deficiente en ABA, dado que todas las reportadas hasta el momento mapean en diferentes cromosomas: *aba1* mapea en el cromosoma 5, *aba2* y *aba3* en el cromosoma 1, *aa3* en el cromosoma 2 y nuestra mutante *gin8* mapea en el cromosoma 3 (ver más adelante).

Como se ha mencionado con anterioridad, los azúcares en alta concentración afectan varios aspectos del desarrollo y morfológicos, entre los que se incluye la germinación, la elongación del hipocotilo en la obscuridad, la expansión y enverdecimiento de los cotiledones en la luz, la transición floral y la senescencia (Jang *et al.*, 1997; Rolland *et al.*, 2002). Uno de los procesos de desarrollo inhibidos por azúcar en altas concentraciones, es el proceso de transición floral (Eimert *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998; Ohto *et al.*, 2001). Este efecto se sabe que es totalmente independiente del efecto osmótico causado por los azúcares (Ohto *et al.*, 2001). Con la finalidad de determinar si este proceso está afectado en *gin8* tal como sucede con la mutante deficiente en ABA *gin1* (Zhou *et al.*, 1998), se determinó su tiempo de floración en presencia de alta Glc. La aparición de la inflorescencia se evaluó en plantas germinadas en condiciones estándar por 4 días *in vitro* que luego fueron transferidas a un medio con baja (2%) o alta (6%) Glc en condiciones de luz continua. Los resultados indicaron que la Glc en alta concentración prolonga el tiempo de floración en las plantas silvestres, y la mutante *gin8* así como *gin1/aba2* están afectadas en dicha respuesta ya que florecen más rápido que la planta silvestre (Fig. 17) Esta diferencia sólo se observa en respuesta a concentraciones altas de Glc, pues en bajas concentraciones (2%) no existen diferencias entre las mutantes y la planta silvestre. Estos resultados indican que se requiere ABA durante el proceso de florecimiento en presencia de concentraciones altas de Glc.

Las mutantes deficientes en ABA *gin8* y *gin1* florecen más rápido que la planta silvestre en alta Glc

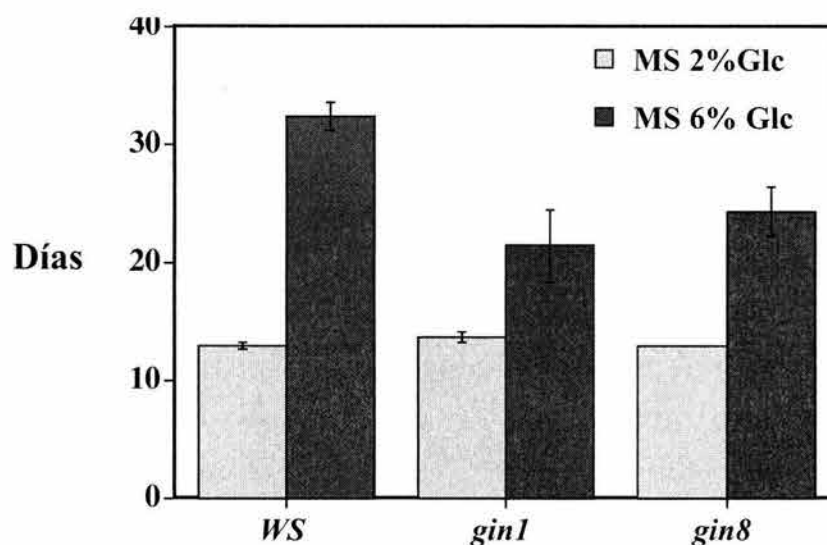


Figura 17. Evaluación del tiempo de floración de las mutantes *gin1* y *gin8*. Se determinó la aparición de la inflorescencia en plantas previamente germinadas en condiciones estándar por 4 d y posteriormente sometidas a un tratamiento de baja (2%) y alta Glc (6%). $n=10$

Simultáneamente a todos estos ensayos corroboramos que *gin8* no está afectada en la señalización de etileno (no presenta la triple respuesta constitutiva), y tampoco es insensible a ABA (datos no mostrados), pues era importante descartar que su fenotipo se debiera a su vez a alteraciones en la señalización de estas dos hormonas que, como ya se ha mencionado en secciones anteriores, participan en la señalización de Glc en *Arabidopsis*. Sin embargo, se observó que *gin8* así como otras mutantes deficientes en ABA presentan una mayor sensibilidad a ABA, es decir, se comportan como hipersensibles a esta hormona (Fig. 18). Dicho comportamiento puede interpretarse como una respuesta compensatoria de la planta ante la deficiencia de ABA, resultando en un aumento de la sensibilidad a esta hormona que se encuentra a niveles menores en este tipo de mutantes. En concordancia con esta hipótesis, se ha visto que las mutantes *los6* y *los5* (alélicas a *aba1* y *aba3* respectivamente) tienen mayores niveles de expresión de genes que responden a estrés cuando son sometidas a un tratamiento con ABA, sugiriendo que cuando esta hormona es deficiente, las células se vuelven más sensibles para mitigar esta deficiencia (Xiong *et al.*, 2002). Esta respuesta podría también participar durante la germinación en condiciones de estrés, donde vimos que las mutantes deficientes en ABA son osmotolerantes durante dicha etapa (Fig. 16).

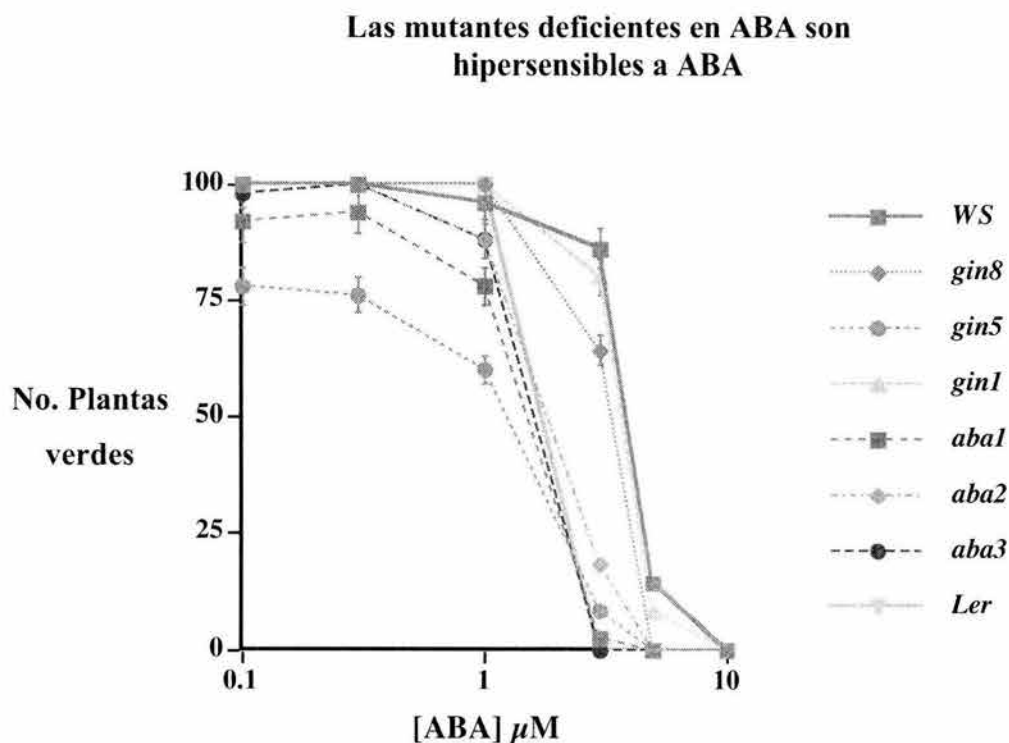


Figura 18. Prueba de sensibilidad a ABA de las mutantes deficientes en esta hormona. Se determinó la aparición del fenotipo verde de los cotiledones de plántulas germinadas y crecidas por 9 d en presencia de 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 5 y 10 μM de ABA. Las mutantes *gin1*, *gin5* y *gin8* están en el fondo genético silvestre *Ws* y las mutantes *aba1*, *aba2* y *aba3* en el fondo genético *Landsberg erecta* (*Ler*).

IV.5.3.3 Análisis de expresión génica.

Se han reportado una gran variedad de genes regulados positiva- y negativamente por azúcares en diversas plantas (Koch, 1996), y la lista crece a pasos agigantados. En esta sección se analizó la expresión de algunos genes que responden a azúcares como *CABI* (codifica para la proteína unidora de clorofila a y b), *PC* (plastocianina) y *PAL1* (fenilalanina amonio liasa) en la mutante *gin8*. Lo que se observó fue que la regulación por Glc de estos genes está alterada en dicha mutante aunque no pierde totalmente la capacidad de regulación, dado que tanto *CABI* como *PC* mantienen cierto grado de represión, y *PAL1* parece inducirse en cierta medida (Fig. 19A). Estos resultados indican que la regulación por Glc de algunos genes de respuesta a azúcar está afectada en *gin8*, incluyendo genes de respuesta tanto positiva como negativa.

La mutación *gin8* afecta la expresión de genes regulados por Glc, por estrés hídrico y genes señalizadores de Glc y ABA

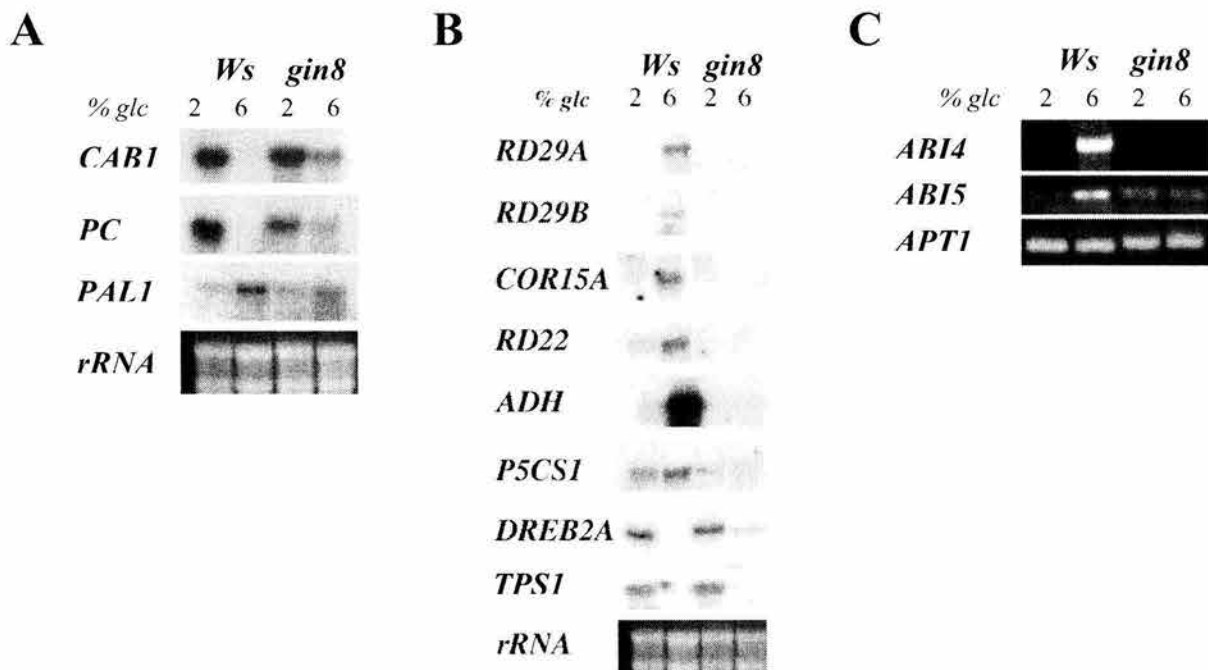


Figura 19. Análisis de expresión génica de la mutante *gin8*. A. Expresión de genes regulados por azúcar. B. Expresión de genes de respuesta a estrés. C. Expresión de genes señalizadores de Glc y ABA. Experimentos tipo "Northern blot" de plantas germinadas y crecidas en presencia de baja (2%) y alta (6%) Glc durante 19 d.

Sabiendo que las concentraciones de azúcar usadas causan simultáneamente un efecto osmótico, también analizamos la expresión de algunos genes que responden a este estímulo así como a otros tipos de estrés hídrico (Tabla 14).

Tabla 14. Genes de respuesta a estrés hídrico usados para el análisis de expresión génica.

Gen	Comentarios	Referencia
<i>RD29A/COR78</i>	proteína de respuesta a ABA, frío y deshidratación	Yamaguchi-Shinosaki y Shinosaki, 1994.
<i>RD29B/LTI65</i>	proteína de respuesta a ABA, frío y deshidratación	Yamaguchi-Shinosaki y Shinosaki, 1994.
<i>COR15A</i>	proteína de respuesta a frío y ABA	Wilhelm y Thomashow, 1993.
<i>RD22</i>	proteína de respuesta a ABA y deshidratación	Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993.
<i>ADH</i>	alcohol deshidrogenasa, responde a ABA	de Bruxelles <i>et al.</i> , 1996.
<i>P5CS1</i>	pirrolin-5-carboxilato sintasa, responde a estrés	Strizhov <i>et al.</i> , 1997.
<i>TPS1</i>	trehalosa fosfato sintasa, responde a estrés	Goddijn y van Dun, 1999.
<i>DREB2A</i>	FT de respuesta a sequía independiente de ABA	Liu <i>et al.</i> , 1998.

Los resultados de este análisis mostraron que el grupo de genes de respuesta a estrés utilizados son inducidos en presencia de 6% de Glc en la planta silvestre, a excepción de *TPS1* y *DREB2A* los cuales se reprimen bajo estas mismas condiciones (Fig. 19B). La respuesta de inducción por Glc está claramente afectada en la mutante *gin8* (Fig. 19B). Estas observaciones sugieren que la alta concentración de Glc utilizada provoca un estrés osmótico en la planta silvestre, por lo que se inducen una serie de genes de respuesta a estrés. Sin embargo, sabemos que los niveles de ABA aumentan en respuesta tanto a la señal de Glc como a la señal de estrés osmótico (Arenas *et al.*, 2000; Zeevaert y Creelman, 1988), y los genes que se indujeron en nuestras condiciones también se sabe que se inducen por ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; de Bruxelles *et al.*, 1996). De esta manera, la respuesta de inducción de esta serie de genes también puede deberse al aumento en los niveles de ABA en condiciones de alta Glc, respuesta que esta afectada en la mutante *gin8*. Por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad de que estos genes también respondan a una señal específica derivada de la Glc de forma paralela al estrés osmótico.

Resulta interesante que los genes *TPS1* y *DREB2* que se sabe que se inducen en respuesta a estrés por sequía (un tipo de estrés osmótico) (Goddijn y van Dun, 1999; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000), se reprimen en respuesta a Glc (Fig. 19B). El hecho de que esta represión no está afectada de forma importante en la mutante *gin8*, sugiere que no se requiere de ABA para la represión por Glc de estos dos genes, y que además responden a una señal específica derivada de la Glc que es independiente del estrés.

Cabe resaltar que la regulación de la expresión del gen *TPSI* es prácticamente desconocida. La función de la proteína correspondiente se ha asociado con la maduración de los embriones en *Arabidopsis*, y con un papel regulador del metabolismo de los azúcares, modificando el contenido y distribución de los mismos en la planta (Eastmond y Graham, 2003). En este sentido, resulta congruente que la presencia de concentraciones altas de Glc (substratos de la TPS), tengan un efecto inhibitorio de su transcrito. Dicho efecto no parece depender de ABA dado que no se afecta tal respuesta en la mutante *gin8*. Sería interesante saber que pasa en otras mutantes *gin* que no afecten los niveles de ABA para discernir si la represión por Glc del gen *TPSI* está mediada o no por la señalización de este azúcar (ver siguiente apartado).

También se analizó la expresión de dos genes que sabemos forman parte de la cascada de señalización de Glc: *ABI4* y *ABI5*. La figura 19C muestra que la expresión de ambos genes en respuesta a Glc está alterada en *gin8*. De esta serie de resultados se puede concluir la expresión de varios genes regulados por azúcar y estrés osmótico está afectada en la mutante *gin8*, y también la expresión de genes de las vías de señalización de azúcar y ABA está alterada.

IV.5.3.4 Identidad de *GIN8*: ¿*gin8*, la primera mutante en el gen involucrado en la biosíntesis de ABA *NCED3*?

Como se mencionó anteriormente, los datos de mapeo indicaron que la mutación *gin8* se localiza en el cromosoma 3, cerca del marcador genético nga 162. El marcador nga 162 se localiza muy cerca de un gen que participa en la biosíntesis de ABA denominado *NCED3* (Fig. 21A). Este gen codifica para la enzima que lleva a cabo el segundo paso enzimático de la biosíntesis de ABA, la 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (*NCED3*), para la cual no existe ninguna mutante aislada de *Arabidopsis* (Fig. 20) (Schwartz *et al.*, 2003). Los precursores utilizados para la biosíntesis del ABA son los carotenoides. Estos compuestos de tipo isoprenoide son sintetizados a partir del precursor isopentenil difosfato (IPP). El IPP es sintetizado por la vía mevalónica en el citoplasma y por la vía del metileritritol fosfato (MEP) en los plástidos (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). Los carotenoides son sintetizados por la vía plastídica, donde la *NCED3* lleva a cabo su reacción estando unida a la membrana tilacoidea que ve hacia el estroma (Schwartz *et al.*, 2003).

Biosíntesis de ABA en plantas

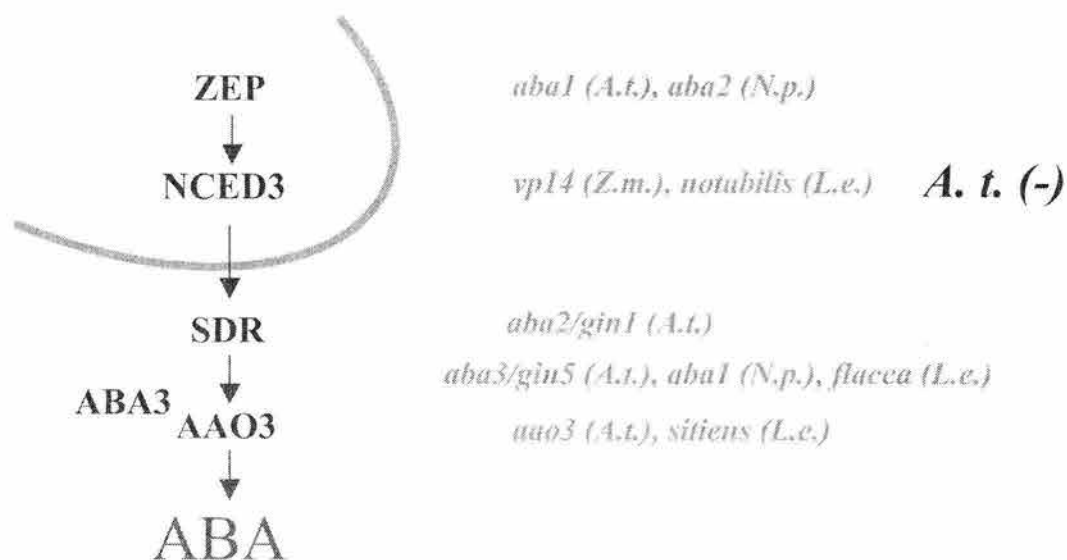


Figura 20. Vía de biosíntesis de ABA en plantas y mutantes aisladas hasta el momento. El ABA se deriva de los carotenoides (C_{40}) usando como precursores a la zeaxantina y anteraxantina, las cuales son epoxidadas por la zeaxantina epoxidasa (ZEP) en los plástidos. Todas las violaxantinas y neoxantinas formadas son entonces cortadas por una reacción oxidativa catalizada por la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED3). La xantoxina (C_{15}) formada es exportada del plástido al citoplasma, donde es convertida a ABA-aldehído por la acción de la deshidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR). Finalmente el ABA-aldehído es oxidado por la ABA-aldehído oxidasa (AAO3) la cual requiere de la actividad de la sulfurasa del cofactor de molibdeno (ABA3) para producir la forma activa del cofactor de molibdeno (MoCo) usado por la AAO.

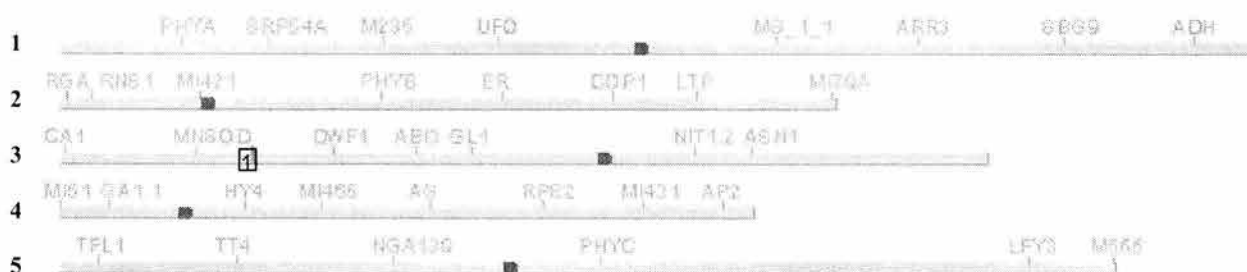
Recientemente fue reportado el aislamiento de un cDNA de *Arabidopsis* que codifica para esta enzima, y se vió que este gen pertenece a una familia génica de 7 miembros (Iuchi *et al.*, 2001). Sin embargo, sólo *NCED3* es inducido en respuesta a estrés por sequía y sal. Además esta enzima parece tener un papel limitante en la biosíntesis *de novo* de ABA al menos en las hojas (Iuchi *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2002). Cabe resaltar que la expresión de dicho gen no responde a estrés por frío ni a ABA exógeno (Xiong *et al.*, 2002). Nosotros encontramos que tampoco responde a Glc (7%), Manitol (7%), luz, ni ciclo circadiano; además de ser indetectable en condiciones estándar de crecimiento (datos no mostrados). Se ha planteado que el hecho de que *NCED3* no responda a una señal directa como lo es el ABA (producto final de la vía), apoya a esta enzima como la enzima limitante de la vía (Xiong y Zhu, 2003). Como consecuencia, la regulación de los genes *NCED* podría tener mayor impacto en la biosíntesis de ABA global. En concordancia con esta predicción, la sobreexpresión de este gen en varias plantas ha resultado en un aumento en la biosíntesis de ABA (resumido en Xiong y Zhu, 2003).

Dados los fenotipos de *gin8* y la cercanía genética de la mutación respecto al gen *AtNCED3*, este gen resulta un buen candidato a estar afectado en esta mutante. Bajo este contexto se evaluó si la expresión de *AtNCED3* está afectada en *gin8*, para lo cual se analizó su expresión en condiciones de estrés salino (NaCl 300 mM, por 6 hrs). Lo que se observó, fue que la mutante claramente afecta la expresión de este gen (Fig. 21B).

gin8*, una posible mutante en el gen *AtNCED3

A

Cromosoma



B

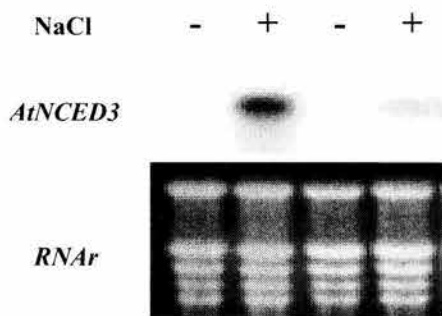


Figura 21. A. Localización de la mutación en *gin8*. **B.** *gin8* afecta la expresión del gen *AtNCED3*. “Northern blot” de plantas de 7 d de edad sometidas a un tratamiento de NaCl 300 mM por 6 hr.

Actualmente, para confirmar si la mutación de *gin8* está localizada en dicho gen, estamos realizando la secuenciación del gen *NCED3* en la mutante, así como la complementación de la mutante con el gen silvestre. La caracterización de la mutante *gin8* apoya una vez más que se requiere de la biosíntesis de ABA para la señalización de Glc en Arabidopsis.

IV.5.4 *gin7*, una mutación que no afecta la biosíntesis ni la señalización de ABA.

Otra de las mutantes aisladas en el presente trabajo se denominó *gin7*, de la cual presento un resumen de la caracterización genética, fenotípica y molecular en esta sección.

IV.5.4.1 Caracterización genética.

El análisis de retrocruzas de *gin7* mostró que su fenotipo *gin* es causado por una sola mutación de tipo recesivo (Tabla 15). Dicha mutación no se encuentra abanderada por ninguna de las inserciones de T-DNA presentes en esta mutante (Fig. 5 del apartado IV.2), dado que en la progenie de cada uno de los individuos de la retrocruza analizados, hubo algunas familias que perdieron totalmente la resistencia a la Km (en la tabla se muestra el porcentaje promedio de individuos Km^R de todas las familias en conjunto). Por lo tanto, la identificación del gen requiere del mapeo de la mutación por métodos genéticos. Los análisis de cruzas con otras mutantes *gin* mostraron que *gin7* no es alélica ni a *gin1* (*aba2*), *gin5* (*aba3*), *gin6* (*abi4*) ni *gin8* (Tabla 12).

Tabla 15. Análisis de segregación mendeliana y pruebas de complementación de la mutante *gin7*.

Retrocruzas.

Cruza	No. individuos F1 Km ^R	F2 Glc ^R (%)	F2 Km ^R (%)	No. individuos F2
<i>Ws x gin7</i>	11	26	33.8	1100 en Glc, 1100 en Km

Pruebas de complementación.

Cruza	F1 Glc ^R (%)	F2 Glc ^R (%)	No. individuos F2	Conclusión
<i>gin7 x gin1</i>	0%			No alélicas
<i>gin7 x gin5</i>	0%			No alélicas
<i>gin7 x gin6</i>	No evaluada	42%	547	No alélicas
<i>gin7 x gin8</i>	No evaluada	58%	518	No alélicas
<i>gin6 x gin7</i>	0%			No alélicas
<i>gin8 x gin7</i>	0%			No alélicas

IV.5.4.2 Caracterización fenotípica.

Bajo condiciones estándar de crecimiento en tierra, *gin7* no presenta diferencias morfológicas notables con respecto a la planta silvestre (Fig. 22), a excepción de un crecimiento ligeramente retardado que al final de la fase reproductiva se iguala con su contraparte silvestre.

La mutante *gin7* al igual que *gin6* y *gin8*, es claramente resistente a Glc y a Frc con respecto a la planta silvestre (Fig. 22). Esta resistencia parece ser independiente del estrés osmótico causado por las altas concentraciones de azúcar utilizadas en estos ensayos, como lo demuestra el fenotipo observado en presencia de condiciones isosmóticas de Mtl (Fig. 22). Incluso, utilizando concentraciones bajas de Glc

(2%) en ausencia de sales nitrogenadas (condición en que se aumenta la sensibilidad a Glc en la planta silvestre), la mutante *gin7*, así como otras mutantes *gin*, es claramente resistente (Fig. 23).

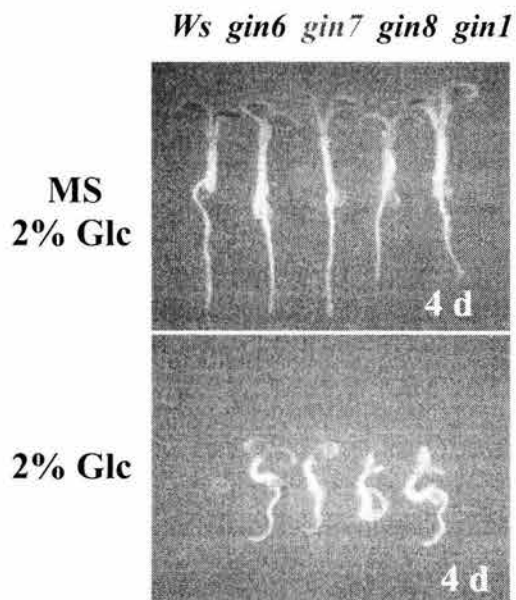
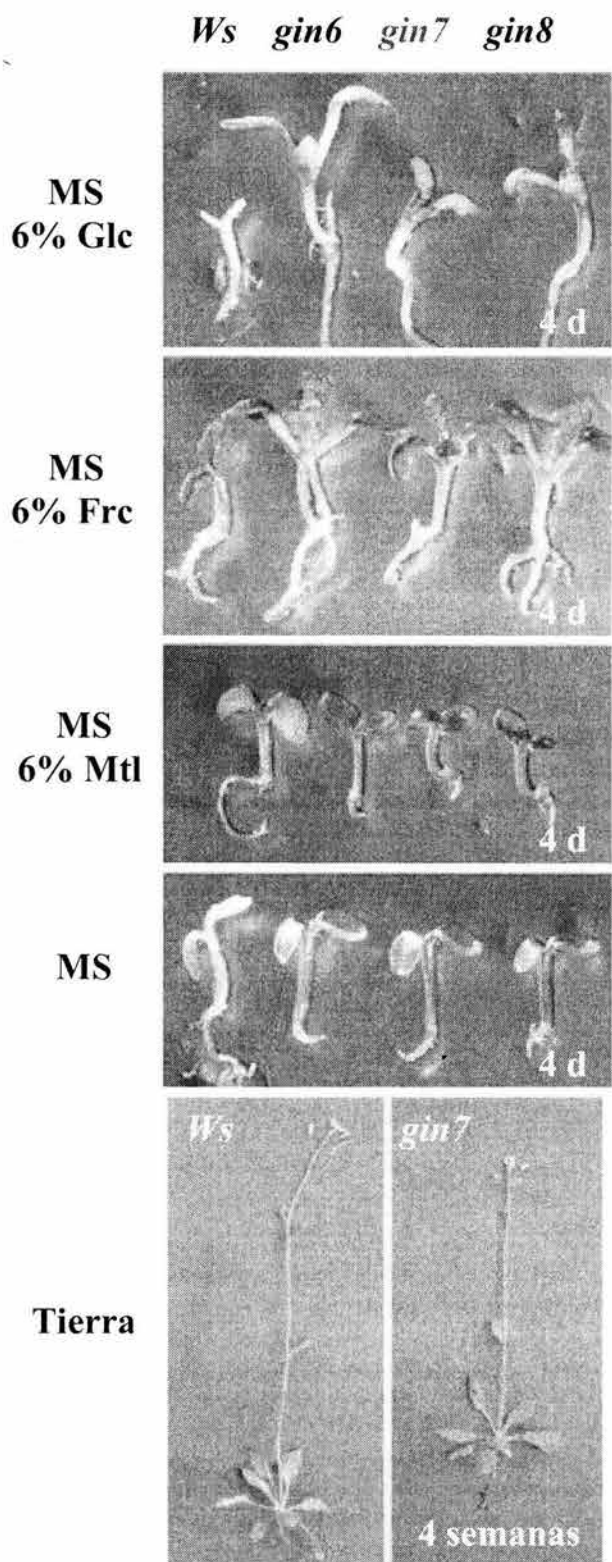


Figura 23. Fenotipos de la mutante *gin7* y otras mutantes *gin* crecidas *in vitro* en presencia de Glc al 2% con y sin la fuente de nitrógeno (sales de MS). Las plantas fueron germinadas y crecidas en condiciones normales de fotoperiodo en los medios de cultivo

Figura 22. Fenotipos de la mutante *gin7* crecida en tierra e *in vitro* en condiciones isomóticas (6%) de diversas fuentes carbonadas. Las plantas fueron germinadas y crecidas en condiciones normales de fotoperiodo en los medios de cultivo indicados.

Algunos de los primeros bioensayos que se realizaron en esta mutante fueron encaminados a determinar si la biosíntesis o la señalización de la hormona ABA estaba implicada en su fenotipo de resistencia a Glc, dada la clara participación de esta hormona en la respuesta a Glc. Primeramente, para estimar si la insensibilidad a Glc de *gin7* era debida a deficiencias en la biosíntesis de ABA, se evaluó si presentaba fenotipo "wilty" al suspender el riego como sucede con *gin8*. Los resultados de este bioensayo indicaron que *gin7* no pierde turgencia fácilmente, por lo que se concluyó que no tiene fenotipo "wilty" (datos no mostrados). Simultáneamente se realizaron pruebas de sensibilidad a ABA durante la germinación, con el fin de determinar si la señalización de la hormona está afectada como en el caso de *gin6*. De los resultados de estas pruebas se concluyó que *gin7* no es insensible a ABA, indicando que la señalización de tal hormona no está afectada en la mutante (datos no mostrados). Sin embargo, a pesar de que el fenotipo de insensibilidad a Glc de *gin7* no parece deberse a alteraciones en la biosíntesis ni la señalización de ABA, sí recupera la sensibilidad a Glc en presencia de concentraciones muy bajas de esta hormona (Fig. 24), lo que apunta a que ABA sigue involucrado en la vía afectada en esta mutante.

La aplicación exógena de ABA restablece las sensibilidad de *gin7* a la Glc

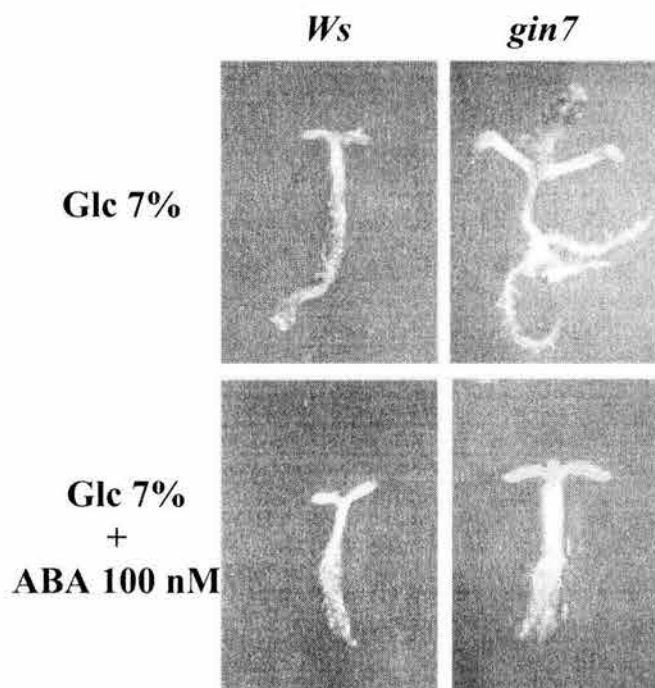


Figura 24. Fenotipo de las plantas silvestres y de la mutante *gin7* germinadas y crecidas por 15 d en presencia de Glc al 7% y paralelamente en Glc al 7% incluyendo ABA 100 nM.

Como se ha mencionado con anterioridad, los azúcares en alta concentración afectan varios aspectos del desarrollo y morfológicos, entre los que se incluye la germinación, la elongación del hipocotilo en la obscuridad, la expansión y enverdecimiento de los cotiledones en la luz, la transición floral y la senescencia (Jang et al., 1997; Rolland et al., 2002). Uno de los cambios más notorios de las plantas crecidas en presencia de una alta disponibilidad de fuentes carbonadas, es el aumento de tamaño y arquitectura de tejidos de almacenamiento/reserva como la raíz (Koch, 1996).

Se ha visto que la exposición a concentraciones altas de Sac promueve tanto la elongación como la ramificación de las raíces (Freixes et al., 2002). Como resultado de los análisis preliminares de la mutante *gin7*, sabemos que esta mutante es resistente a altas concentraciones de azúcares durante procesos como la germinación, la elongación del hipocotilo en la obscuridad y la expansión y enverdecimiento de los cotiledones (apartado IV.2). Con el fin de determinar si también la arquitectura de las raíces en respuesta a concentraciones altas de Sac estaba afectada en *gin7*, se evaluó su capacidad de responder a la inducción de raíces laterales. Lo que se observó, fue que *gin7* también está afectada en su capacidad de inducir la formación de raíces laterales bajo condiciones de Sac al 6% como sucede con la planta silvestre (Fig. 25). Sorprendentemente, la mutante *gin6/abi4* sí es capaz de inducir la formación de raíces secundarias bajo estas condiciones (Fig. 25), así como *gin8* (dato no mostrado).

***gin7* es insensible a la ramificación de la raíz inducida por alta concentración de Sac**

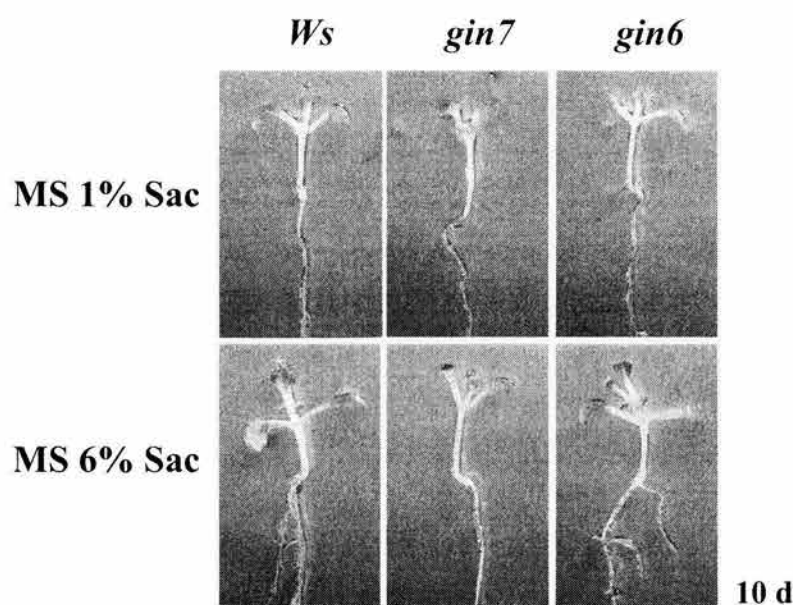


Figura 25. Prueba de inducción de la ramificación de la raíz por alta concentración de Sac en *gin7* y *gin6*. Las plantas fueron germinadas y crecidas por 10 d en presencia de Sac al 1% y 6% antes de ser fotografiadas.

Estos resultados indican que *gin7* es insensible a Sac en el proceso de ramificación de la raíz y que las mutantes *gin6* y *gin8* presentan una sensibilidad a la Sac semejante a la planta silvestre en este proceso. Dado que la mutante *gin6* afecta la señalización de ABA y *gin8* es deficiente en ABA, se puede decir, que la formación de raíces secundarias inducida por Sac parece no depender de ABA, al menos en las condiciones utilizadas en nuestro ensayo. La evaluación de esta respuesta potencialmente podría ser una forma de selección en la búsqueda de mutantes insensibles a azúcar que no estén relacionadas con ABA.

Otro de los procesos de desarrollo inhibidos por azúcar en altas concentraciones, como se mencionó anteriormente, es la transición floral (Eimert et al, 1995; Zhou et al., 1998; Ohto et al., 2001). Se sabe que este efecto es totalmente independiente del efecto osmótico causado por los azúcares (Ohto et al., 2001). Con la finalidad de determinar si este proceso está afectado en *gin7* tal como sucede con *gin1* y *gin8* (apartado IV.5.3.), se evaluó el tiempo de floración en presencia de alta Glc. Para ello, se determinó la aparición de la inflorescencia en plantas germinadas en condiciones estándar por 4 días *in vitro*, y posteriormente transferidas a un medio con baja (2%) o alta (6%) Glc en condiciones de luz continua. Los resultados indicaron en bajas concentraciones (2%) no existen diferencias entre las mutantes y la planta silvestre (Fig. 26). En cambio, la Glc en alta concentración prolonga el tiempo de floración en las mutantes *gin7* y *gin6* aún más que en las plantas silvestres, es decir, se comportan como hipersensibles a Glc durante el proceso de transición floral (Fig. 26). Esta respuesta es contraria a la observada en las mutantes deficientes en ABA como *gin8* y *gin1/aba2*, las cuales son menos sensibles a Glc durante la transición floral (Fig. 26).

Las mutantes *gin7* y *gin6* son hipersensibles a Glc durante el proceso de transición floral

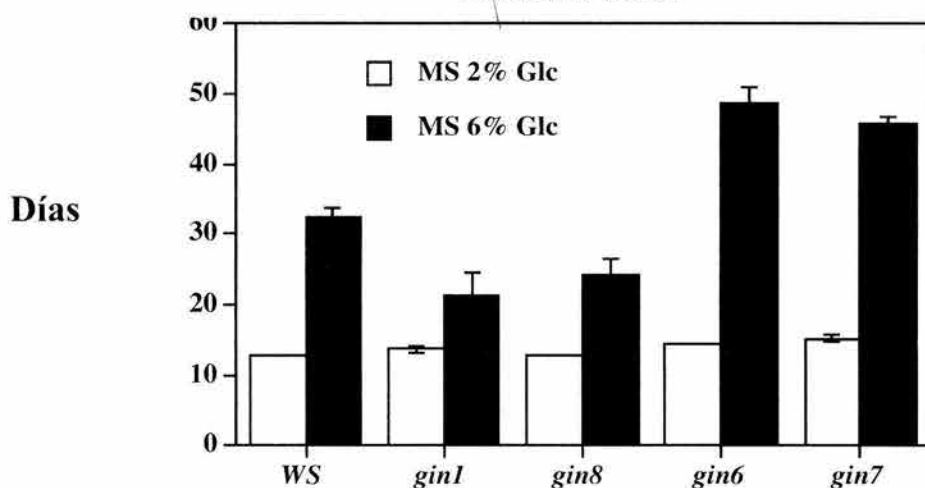


Figura 26. Evaluación del tiempo de floración de las mutantes *gin7* y *gin6* en comparación con *gin1* y *gin8*. Se determinó la aparición de la inflorescencia en plantas previamente germinadas en condiciones estándar por 4 d y posteriormente sometidas a un tratamiento de baja (2%) y alta Glc (6%). $n=10$

Durante la caracterización de la mutante *gin8*, habíamos visto que dicha mutante al igual que *gin1*, florecen más rápido que la planta silvestre en alta Glc, lo que sugiere que los niveles endógenos de ABA son importantes durante el proceso de floración en respuesta a concentraciones altas de Glc. Bajo este supuesto, si la deficiencia en la biosíntesis de ABA provoca una transición floral más rápida en condiciones de alta Glc, entonces se podría hipotetizar que niveles altos de ABA retrasaran el tiempo de floración. Cabe recordar que la mutante *gin6/abi4* acumula mayores niveles de ABA que la planta silvestre (apartado IV.3), lo cual podría explicar el mayor retraso del tiempo de floración de esta mutante. De igual forma, si la mutante *gin7* acumulara mayores niveles de ABA, se podría explicar que también retrase la transición floral. Para apoyar esta hipótesis, resulta importante determinar los niveles endógenos de ABA en *gin7*, así como evaluar el efecto de la aplicación exógena de ABA en las plantas silvestres durante la transición floral en condiciones de concentración alta de Glc.

El hecho de que las mutantes *gin1*, *gin5*, *gin6*, *gin7* y *gin8*, que fueron aisladas como insensibles a Glc durante el desarrollo temprano, no se comporten siempre como insensibles durante otros procesos de desarrollo regulados por Glc, sugiere que la sensibilidad a azúcares es diferente dependiendo de los procesos de desarrollo evaluados, o bien que estos procesos responden a una vía diferente de señalización. Así podemos decir que *gin6* y *gin8* son sensibles a la inducción de la formación de raíces secundarias activada por Sac, y que *gin6* y *gin7* son hipersensibles a Glc durante el proceso de transición floral.

Durante la caracterización fenotípica de las mutantes *gin6* y *gin8*, se observó que ambas se comportan como osmotolerantes y resistentes a condiciones de alta salinidad durante la etapa germinativa y post-germinativa. Esta respuesta se presenta tanto en las mutantes insensibles a ABA *gin6/abi4* y *abi5*, como en las deficientes en esta hormona *gin8* y *gin1*. Este fenotipo ha sido también encontrado por otros grupos, ya que se han aislado alelos de las mutantes *aba* y *abi4* en “screenings” de mutantes resistentes a dichas condiciones (Werner y Finkelstein, 1995; León-Kloosterziel et al., 1996; Quesada et al., 2000; González-Guzmán et al., 2002). Resultaba interesante saber si una mutante que es insensible a Glc pero que no tiene afectada ni la señalización ni la biosíntesis de ABA, es también resistente a condiciones de estrés osmótico y salino. Para ello se germinaron y crecieron a las plantas de la mutante *gin7* en presencia de concentraciones altas de Mtl, sorbitol o sal, y lo que se observó fue que también *gin7* es resistente a estas condiciones con respecto a la planta silvestre (Fig. 27).

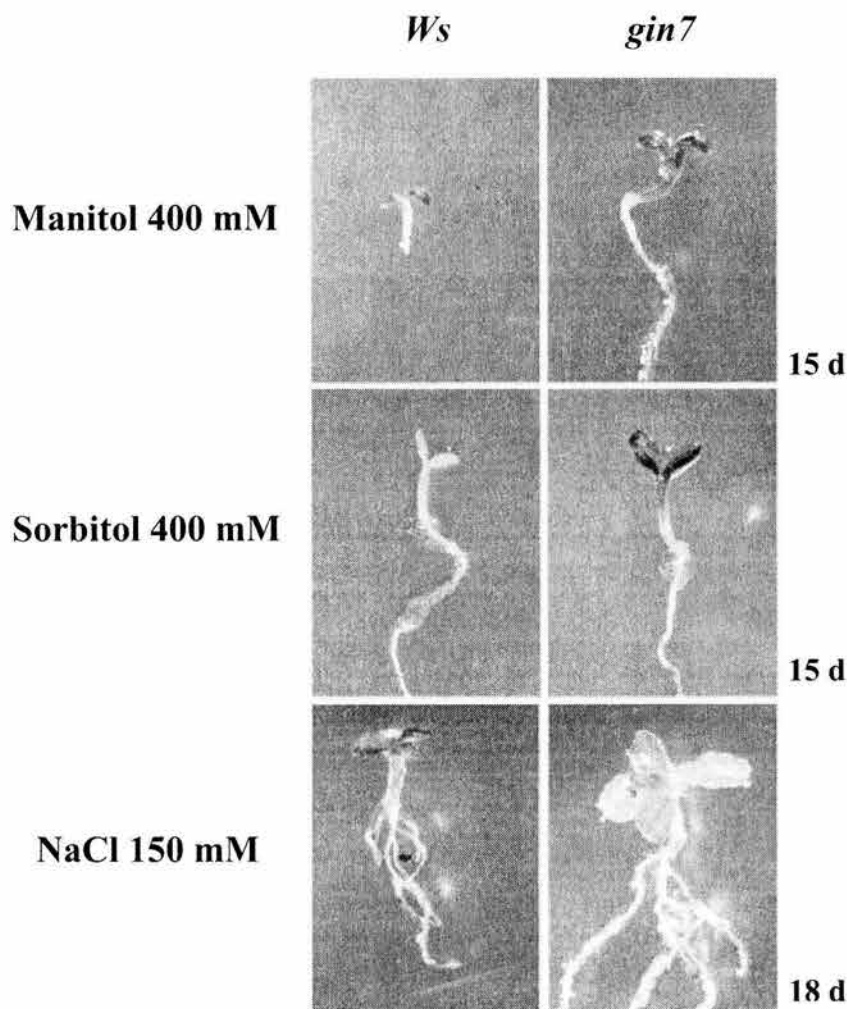
***gin7* es osmotolerante y resistente a estrés salino durante su desarrollo temprano**

Figura 27. Pruebas de resistencia a estrés osmótico y salino en la mutante *gin7*. Las plantas silvestres y mutantes fueron germinadas y crecidas en medio de germinación estándar (GM) incluyendo el agente estresante indicado.

El hecho de que todas las mutantes *gin* que hemos analizado han resultado osmotolerantes y resistentes a estrés salino desde la etapa de germinación, invita a sugerir la existencia de una intercomunicación entre la señalización de azúcares y la señalización de estrés osmótico y salino, en el cual comparten algunos de sus componentes. Una explicación alternativa es que estas plantas al tener reducida su sensibilidad a los azúcares, podrían acumular mayores niveles de estos, mismos que a su vez actuarían como agentes osmoprotectores para la planta. A este respecto, vale la pena medir la cantidad de azúcares acumulados tanto en *gin7* como en otras mutantes *gin* para corroborar esta hipótesis.

IV.5.4.3 Análisis de expresión génica.

Con base en las diferencias fenotípicas existentes entre *gin7* y las mutantes *gin6* y *gin8*, era interesante analizar la expresión génica de esta planta comparándola con lo observado en las otras dos mutantes. Primeramente, se analizó la expresión de algunos genes que responden a azúcares como *CAB1*, *PC* y *PAL1*. Se observó que estos genes están claramente desregulados en respuesta a Glc en la mutante *gin7*, respecto a la planta silvestre (Fig. 28A). Es particularmente notorio que la inducción por Glc de *PAL1* está abatida en *gin7* a diferencia de *gin6* y *gin8*, las cuales aún son capaces de inducir este gen en respuesta a Glc (apartados IV.3 y IV.5.3.3). Estos resultados indican que la regulación por Glc de genes de respuesta a azúcar está afectada en esta mutante. Cabe mencionar que cada una de las tres mutantes (*gin6*, *gin7* y *gin8*) afectan de forma diferente la regulación por Glc de este grupo de genes.

La mutación *gin7* afecta la expresión de genes regulados por Glc, por estrés hídrico y genes señalizadores de Glc y ABA

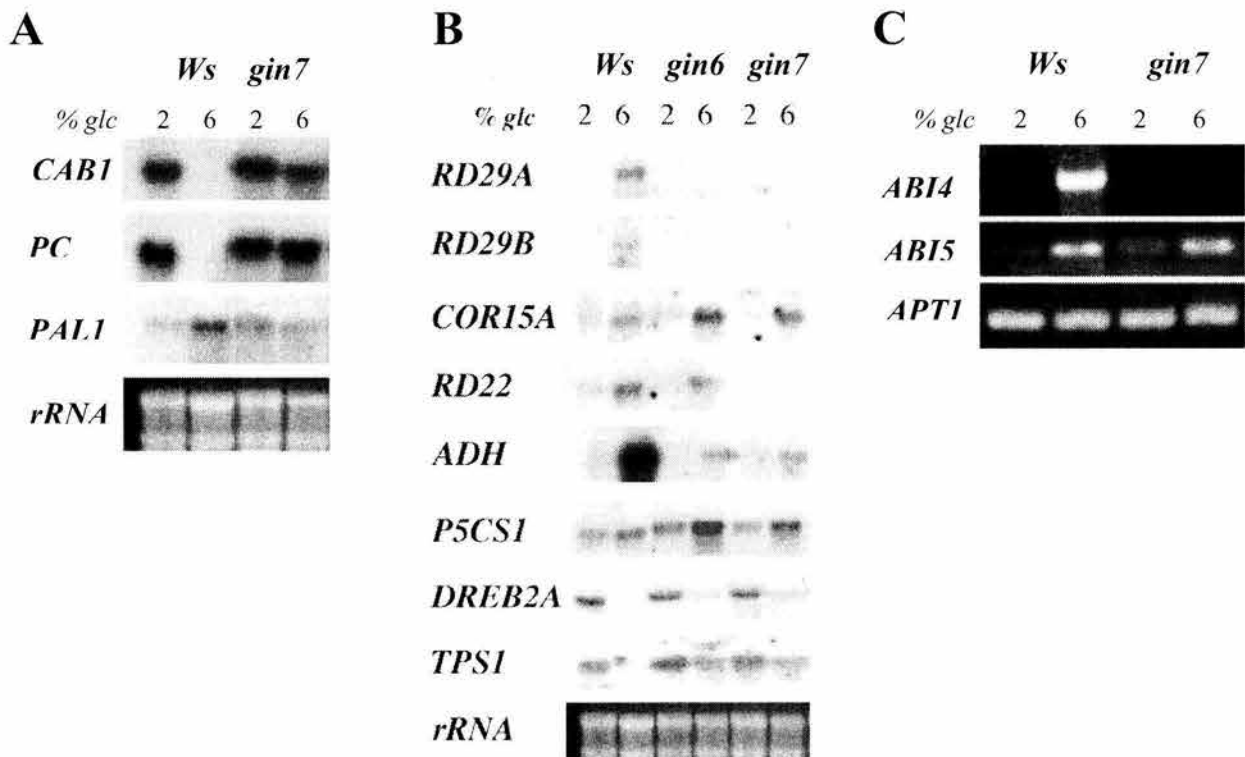


Figura 28. Análisis de expresión génica de la mutante *gin7*. A. Expresión de genes regulados por azúcar. B. Expresión de genes de respuesta a estrés. C. Expresión de genes señalizadores de Glc y ABA. Experimentos tipo "Northern blot" de plantas germinadas y crecidas en presencia de baja (2%) y alta (6%) Glc durante 19 d.

Durante la caracterización de la mutante *gin8* (deficiente en ABA), se observó que además de presentar fenotipo osmotolerante, también es incapaz de inducir genes de respuesta a estrés osmótico dependiente de ABA, pero no la represión de genes de respuesta a estrés osmótico independiente de ABA (apartado IV.5.3.3). Atendiendo a que *gin7* también presentó resistencia a estrés osmótico y salino, pero que no parece ser deficiente en ABA, se analizó la expresión de algunos genes que responden a estos estímulos (Tabla 14, apartado IV.5.3.3). Los resultados de este análisis corroboraron que bajo las condiciones de baja (2%) y alta Glc (6%), el grupo de genes de respuesta a estrés responden positivamente a alta Glc en la planta silvestre, a excepción de los genes *TPS1* y *DREB2* los cuales se reprimieron en las mismas condiciones (Fig. 28B). A diferencia de la mutante *gin8*, la respuesta de inducción por Glc en *gin7* está claramente disminuida sólo para un subgrupo de estos genes: *RD29A*, *RD29B*, *RD22* y *ADH* (Fig. 28B). En cambio, los genes *COR15A* y *P5CS1* se inducen de aún más fuerte que en la planta silvestre (Fig. 28B). Resulta interesante que este mismo patrón también se observó en la mutante *gin6* (Fig. 28B).

Por otra parte, los genes inducibles por sequía (un tipo de estrés osmótico) *TPS1* y *DREB2*, y que se reprimen en respuesta a alta Glc (apartado IV.5.3.3), mostraron una menor represión en las mutantes *gin6* y *gin7*. Estos resultados indican que la regulación por Glc de los genes *TPS1* y *DREB2* así como de *COR15A* y *P5CS1*, depende al menos en parte de *ABI4/GIN6* y de *GIN7*. Es probable que la resistencia a estrés osmótico de las mutantes *gin6* y *gin7* se deba en cierta medida a la mayor expresión de los genes de respuesta a estrés *COR15A*, *P5CS1*, *TPS1* y *DREB2*.

Con la finalidad de saber si genes que hemos encontrado que forman parte de la cascada de señalización de Glc están también afectados en la mutante *gin7*, se analizó la expresión de los genes *ABI4* y *ABI5*. Como se muestra en la Fig. 28C, la expresión del gen *ABI4* en respuesta a Glc está abatida en esta mutante, pero sorprendentemente la mutación *gin7* no afecta la inducción de *ABI5* como sucede con todas las mutante con fenotipo *gin* analizadas hasta el momento (Arroyo et al., 2003; apartado IV.5.3.3).

Una serie de características hacen de *gin7* una mutante única en este trabajo. Esta planta es la primera de nuestras mutantes que no parece estar afectada ni en la biosíntesis ni en la señalización de ABA como sucede con *gin1/aba2*, *gin5/aba3*, *gin8/nced3?*, *gin6/abi4* y *abi5*. Sin embargo, a pesar de ello la aplicación exógena de ABA (100 nM) a *gin7* restablece la señalización mediada por Glc, y con esta, la respuesta de represión del desarrollo de la planta. Este dato apoya que la señalización de Glc está íntimamente ligada a la hormona ABA. Además, es la única mutante *gin* hasta ahora caracterizada que sólo afecta la expresión de *ABI4* y no de *ABI5*.

IV.5.5 Análisis preliminares de nuevas mutantes *gin*.

En adición a la caracterización de las mutantes descritas en los capítulos anteriores, se realizaron algunos estudios preliminares de otras mutantes de la colección generada en este trabajo, con el fin de determinar algunas características que sean comunes entre ellas así como posibles diferencias fenotípicas. De esta manera podríamos hacer una clasificación preliminar de las mutantes de nuestra colección. Una de las ventajas de este análisis fenotípico sería poder encontrar mutantes que no estén afectadas ni en la biosíntesis ni en la señalización de ABA. Dentro de estos bioensayos se incluyeron a otras mutantes con fenotipo *gin* que fueron aisladas por el grupo de la Dra. Jen Sheen, con la que mantenemos una colaboración en este proyecto. De tal manera que se podrían identificar mutantes con fenotipos en común y que incluso pudieran ser alélicas.

En la Tabla 16 se muestran los análisis fenotípicos preliminares realizados en un grupo de las nuevas mutantes *gin*, incluyendo a las mutantes ya caracterizadas. Así mismo, en esta tabla se integra parte del conocimiento actual de todas las mutantes aisladas con fenotipo *gin*.

Como resultado de este análisis preliminar, concluimos algunos puntos que se mencionan a continuación:

- 1 Una de las herramientas utilizadas en los análisis de expresión para determinar la participación de la HXK en respuesta a Glc, es el uso de análogos sintéticos de este azúcar como la 2DG (Smeekens y Rook, 1997). Este análogo de Glc es fosforilable por la HXK pero no es metabolizable por la célula. La 2DG se utiliza en concentraciones mínimas (0.5 a 10 mM), lo que elimina el efecto osmótico causado por los altos niveles de Glc, misma que se utiliza en concentraciones de 330 a 388 mM. Las mutantes *gin1*, *gin6/abi4* y *gin9/abi5* fueron resistentes a 2DG (0.8 a 2 mM) en el medio de crecimiento. Estos resultados apoyan fuertemente la idea de que los genes *GIN1/ABA2*, *ABI4/GIN6* y *ABI5* participan en la vía de detección de Glc mediada por HXK de forma independiente del efecto osmótico (Zhou et al., 1998; Pego, et al., 1999; Arroyo et al., 2003). Cabe mencionar que este tipo de ensayo no ha sido reportado hasta el momento en el aislamiento de mutantes *gin*, representando potencialmente un nuevo método de selección génica para encontrar componentes de la vía dependiente de HXK.

Tabla 16. BIOENSAYOS EN MUTANTES *gin*

Mutante	<i>gin1</i>	<i>gin2</i>	<i>gin3</i>	<i>gin4</i>	<i>gin5</i>	<i>gin6</i>	<i>gin7</i>	<i>gin8</i>	<i>gin9</i>	<i>gin10</i>	<i>gin11</i>	<i>gin12</i>	<i>gin13</i>	<i>gin14</i>	<i>gin15</i>	<i>gin16</i>	<i>gin17</i>	<i>gin18</i>	<i>gin19</i>
Nombre original					26a	20a	24f	51b	78a,b	57u*2	22a	28a	32i	35b	55b	59a	68a	70m	81a
Alélica a:	<i>aba2</i>	<i>lvkl</i>		<i>cr1</i>	<i>aba3</i>	<i>abi4</i>		<i>nced3?</i>	<i>abi5</i>										
En cromosoma:	1	4		5	1	2		3	2										
¿Presenta fenotipo <i>abi?</i> (3 y 5 μ M)	X	X	X	sí	X	sí	X	X	sí	X	X	X	+/-	X	X				
¿Presenta fenotipo <i>wily?</i>	sí	X			sí	X	X	sí	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
¿Fenocopia en ABA 100 nM?	sí	sí	X	X	sí	X	sí	sí	sí	sí	sí	sí	+/-	sí	sí	sí	sí	sí	sí
¿Es resistente a osmótico o NaCl?	sí				sí	sí	sí	sí	sí										
¿Retrasa la floración en Glc?	X					sí	sí	X											
¿Afecta la internalización de Glc?	X					X	X	X											
¿Es resistente a Fre?					sí	sí	sí	sí	sí										
¿Afecta desarrollo raíces 2ras en 6% Sac?						X	sí	X											
¿Es resistente a 2% Glc (sin MS)?	sí	sí				sí	sí	sí											
¿Es resistente a 2DG (2mM)?	sí					sí			sí										
¿Presenta Triple Respuesta Constitutiva?						X	X	X			X				X				
¿Es resistente a auxinas?		sí																	
¿Es insensible a NO ₃ (10mM)?	sí					sí		sí	sí	sí	sí								
Km ^R en T6 (%)	100				100	100	100	100	84	96	100	100	100	60	0	100	95	100	12

- 2 La mutante *gin2/hxk1*, así como *gin7*, no es insensible a ABA ni parecen ser deficientes en esta hormona, y además recupera la sensibilidad a Glc en presencia de ABA. Otras mutantes de la colección como *gin10*, *gin11*, *gin12*, *gin14* y *gin15* comparten estas características, por lo que es necesario determinar si estas plantas son alélicas entre sí. Si no fuera el caso, potencialmente tendríamos nuevos elementos de la señalización de Glc no relacionados ni con la biosíntesis ni con la señalización de ABA.
- 3 Prácticamente todas las nuevas mutantes *gin* recuperan la sensibilidad a Glc en presencia de ABA 100 nM, lo que indica que esta hormona es esencial para la señalización de Glc, y que probablemente la participación de ABA no es separable de este proceso, al menos durante la germinación y el desarrollo temprano de la planta.
- 4 La mutante *ctr1/gin4* (afectada en la señalización de etileno y Glc) tiene fenotipo insensible a ABA, afectando también la señalización de esta hormona. Este fenotipo en *ctr1* también fue observado por otros grupos (Beaudoin et al, 2000; Ghassemian et al, 2000). Los fenotipos mostrados por la mutante *ctr1* apoyan la existencia de una intercomunicación estrecha entre las tres vías: etileno, Glc y ABA.
- 5 Cada vez existen más evidencias que apoyan la existencia de interacciones muy estrechas entre la señalización del C y el N. Uno de los eventos de desarrollo post-embriónico que responden a estas dos señales es el desarrollo de raíces laterales (Zhang y Forde, 2000; Signora et al., 2001). En un experimento preliminar realizado por Elizabeth Córdoba en el laboratorio, las mutantes *gin1*, *gin6*, *gin8*, *gin9*, *gin10* y *gin11* resultaron insensibles a NO₃ respecto a la inhibición de la longitud y desarrollo de raíces laterales, lo que sugiere que independientemente del ABA, las mutantes insensibles a Glc también son insensibles a la señalización activada por nitrato. La relevancia biológica de este hecho es parte de otro trabajo de investigación que se está iniciando en el laboratorio.

Sin embargo, aún falta mucho por conocer de las nuevas mutantes *gin* y seguramente nos revelarán nuevos secretos del complejo mundo de “LA INTERCOMUNICACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN”.

V DISCUSIÓN.

V.1 *Detección de señales múltiples por las plantas y la importancia de las selecciones génicas.*

Las plantas, así como las células individuales, pueden detectar gradientes de muchos factores ambientales, nutrientes, el clima, una huella, una roca cercana, otras plantas de la misma o diferente especie, etc. La percepción de estas señales tienen lugar dentro de un contexto de un ambiente que cambia minuto a minuto, y las plantas integran y responden coordinadamente a toda la información que reciben. La coordinación entre diferentes células y tejidos de una planta requiere mecanismos complejos de comunicación de señales. Una plétora de moléculas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, reguladores del crecimiento, minerales, diversos lípidos, AZÚCARES, fragmentos de pared y otros carbohidratos complejos, participan en la comunicación entre células y tejidos. Incluso dentro de la célula, la comunicación y coordinación entre organelos como los plástidos, la mitocondria y el núcleo, son igualmente cruciales (León *et al.*, 1998). ¿Cómo es que las células vegetales individuales organizan, integran y responden a esta enorme cantidad de información? Esto es algo que aún no se entiende, por lo que en este trabajo está enfocado a la disección de un punto de esta enorme red de comunicación de señales, la de los azúcares. Cuando se intenta analizar la señalización en células individuales, la respuesta de la planta completa no debe ser minimizada. Por tales motivos este estudio se realizó en plantas completas, tratando de evitar en lo posible la pérdida de dichos tipos de moléculas señalizadoras y mantener un aspecto integral.

Las plantas monitorean continuamente una serie de variables ambientales con bastante sensibilidad (Fig. 29), y cada una puede modificar la respuesta de las otras. No es difícil pensar que hay receptores para la mayoría de estas señales, las cuales son transducidas en fracciones de segundo a través de un gran número de moléculas como son las GTPasas pequeñas, segundos mensajeros, y múltiples proteínas cinasas (Kaul *et al.*; 2000). Este flujo de información es continuo, y parte de esta información es sumada, mientras que otra parte del flujo de información interactúa de manera sinérgica. La respuesta final de la planta se construye después de integrar toda la información y tal respuesta coordinada requiere INTERCOMUNICACIÓN. Una de las características más sobresalientes que ha mostrado la caracterización fenotípica y molecular de mutantes resistentes a Glc como las analizadas en este trabajo, es la **identificación de genes que previamente se habían involucrado en la biosíntesis o señalización de fitohormonas, adjudicado así funciones nuevas a antiguos genes y antiguas hormonas, y evidenciando la existencia de una complicada red de interacciones entre la señalización de azúcares y otras vías activadas por fitohormonas.** El análisis más detallado de dichas mutantes demostró que otras señales como la disponibilidad de N, luz e incluso las señales de

estrés hídrico, también interaccionan con la señalización de azúcares. Los múltiples efectos de los azúcares en el desarrollo, el metabolismo, la expresión génica y las respuestas a estrés de las plantas es congruente con dichas interacciones. A la par de este trabajo, se han llevado a cabo otros “screenings” genéticos por diversos grupos de investigación, con el fin de identificar componentes de las vías de señalización de azúcares (ver apartado I.6). A pesar de que los diseños de selección génica son diferentes, muchas mutantes insensibles a azúcares aisladas de forma independiente han resultado alélicas, lo que sugiere que las plantas usan mecanismos conservados en las respuestas a azúcar. Este tipo de estrategia resalta la importancia de la obtención y estudio de mutantes para la disección de procesos complejos como lo son las vías de señalización. Sin embargo, dicha estrategia también tiene importantes limitaciones dado que no permite identificar genes letales o genes con funciones redundantes que también participen en los procesos de interés, para lo cual otro tipo de estrategias deben ser consideradas.

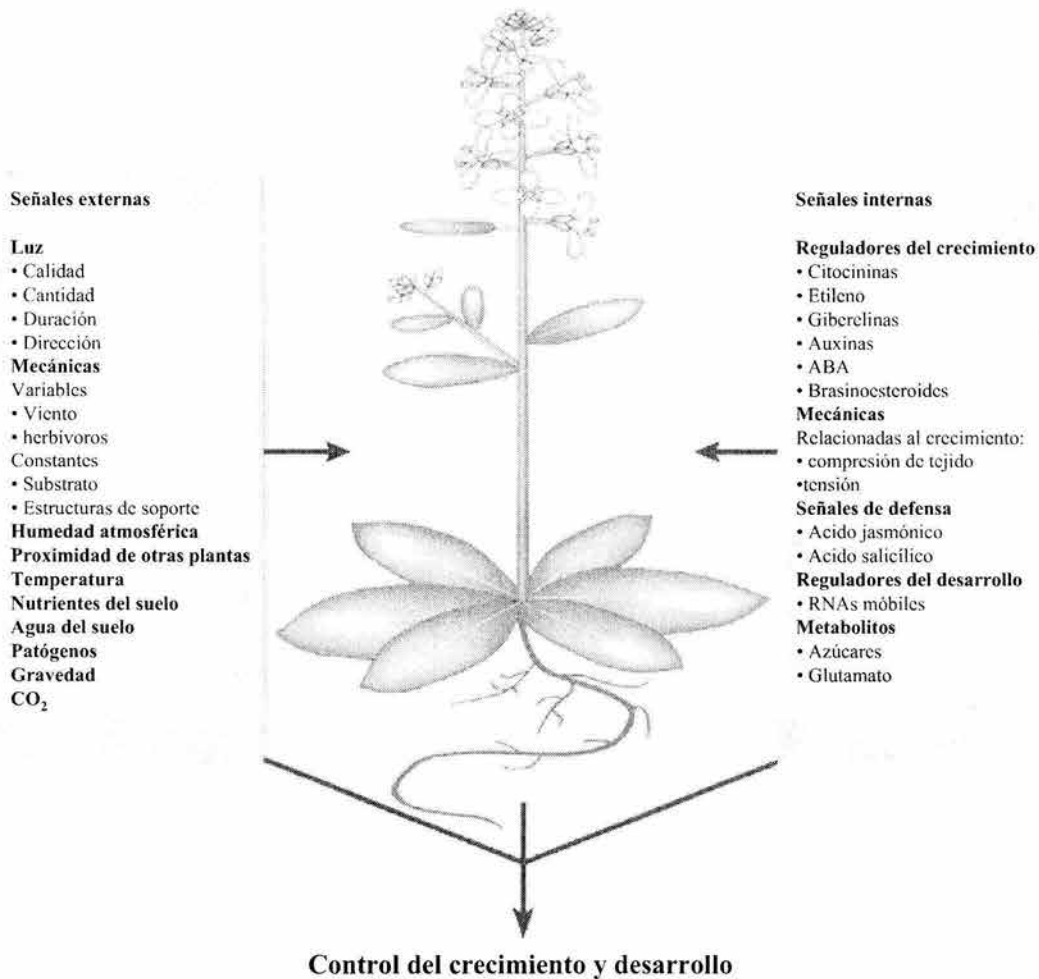


Figura 29. Las plantas monitorean continuamente una amplia variedad de señales que determinan su crecimiento y desarrollo. Esquema tomado de Gilroy y Trewavas (2001).

La elucidación del genoma completo de *Arabidopsis*, nos ha llevado a una era en la que los procedimientos de selección génica (“screenings”) son aún más importantes para evaluar la función de sus aproximadamente 27 000 genes. La caracterización funcional de su genoma depende en gran medida de procedimientos de selección génica por fenotipo (“forward genetics”), lo cual es una estrategia muy poderosa para la identificación de genes que participan en muchos aspectos del ciclo de vida de las plantas. En este trabajo hemos tomado ventaja de esta estrategia para aislar algunos de los componentes de la(s) vía(s) responsables de detectar y transmitir la señal de Glc en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Como parte de este trabajo se formó una colección de 163 plantas afectadas en la detección de Glc. A pesar de que una parte de ellas pueden ser plantas hermanas y otra parte pueden ser alélicas, es de llamar la atención que cerca del 50% de los “pooles” de líneas mutagenizadas analizados (36 de 73 totales) se obtuviese al menos una mutante, estando representado el genoma de *Arabidopsis* en menos de un 10% en esta colección de mutantes. ¿Cual sería la razón por la que podrían existir tantas mutaciones relacionadas con la señalización de azúcares en estas plantas? ¿Cuántos genes participan en la especificación de los componentes de la transducción de dicha señal? Se ha calculado que se requiere un mínimo de 300 genes para tener las funciones mínimas esenciales de una célula bacteriana; sin embargo, bacterias tales como *Escherichia coli* tienen 3000 genes. Se cree que los 2700 genes aparentemente no esenciales (90%), son necesarios para proveer a la bacteria con la habilidad de tolerar y/o contender azarosamente con las variaciones ambientales. Extrapolando estas estimaciones a las plantas superiores, las cuales siendo sésiles se desarrollan y se reproducen exitosamente en ambientes igualmente fluctuantes; la mayor parte del genoma entonces podría estar participando en la transducción de tal multitud de señales. Un número considerable de genes estarían participando en la señalización necesaria para especificar la posición y el destino celular dentro de las raíces y hojas durante el desarrollo. Para ello, deben estar presentes las moléculas señalizadoras del desarrollo celular con su maquinaria de transducción, pues las células (p. e. las células meristemáticas) cambian de posición continuamente durante el crecimiento, y deben actualizar sus condiciones espaciales y temporales. Otro circuito complejo de transducción de señales debe estar presente para asegurar la estabilidad de la morfogénesis así como la forma global de las hojas, raíces, flores, etc.

V.2 ***Intercomunicación entre las vías de señalización de Glc, ABA y etileno.***

La caracterización de las primeras mutantes aisladas en este trabajo permitió identificar (a la par de otros grupos) que la fitohormona ABA es una molécula esencial para la detección de Glc. Así mismo

se identificaron dos factores transcripcionales que regulan la respuesta a Glc, ABI4 y ABI5, siendo estos mismos elementos participantes en la señalización del ABA (Finkelstein *et al.*, 1994; Arenas *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001). También se demostró que tanto *ABI4* como *ABI5* además de su participación previamente reportada en la señalización del ABA durante la germinación de las semillas (Finkelstein *et al.*, 1994), también juegan un papel esencial en la respuesta a Glc durante el desarrollo vegetativo temprano (Arenas *et al.*, 2000). La presencia de mutaciones en estos genes (*gin6/sun6/sis5/isi3/abi4* y *gin9/abi5*) producen un fenotipo insensible a Glc y Sac (Arenas *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001). Previamente a este trabajo, se habían aislado mutaciones en ambos genes durante la búsqueda de mutantes insensibles a ABA (Finkelstein *et al.*, 1994). A diferencia de las mutantes *abi4* y *abi5*, otras mutantes insensibles a ABA como *abi1*, *abi2* y *abi3* no tienen fenotipo *gin*, lo que sugiere que sólo una parte de los componentes de la vía de señalización de ABA participa también en la señalización de Glc (Arenas *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001). A diferencia del fenotipo de la mutante *abi3*, la cual no afecta su respuesta a Glc, la sobreexpresión de ABI3 (factor transcripcional con un dominio de unión a DNA del tipo B3) produce hipersensibilidad a Glc, tal como sucede con la sobreexpresión de ABI4 y ABI5 (Finkelstein *et al.*, 2002). Este hecho ha sugerido que ABI3 también podría tener un papel en la señalización de azúcares en *Arabidopsis* (Finkelstein *et al.*, 2002).

La clonación del gen *ABI4* reveló que su secuencia tiene homología con una familia de factores transcripcionales únicos de las plantas que contienen un dominio de unión a DNA llamado APETALA2 (Finkelstein, 1998). Así mismo, contiene un dominio rico en Ser/Tre que podría ser blanco de fosforilación y regulación de PKs como las de la familia SnRK, las cuales parecen participar en las respuestas a estrés nutricional y/o ambiental tanto en las plantas como en la levadura y los mamíferos (Hardie *et al.*, 1998). *ABI5* también fue clonado recientemente y la proteína que se predice de la secuencia muestra similitudes estructurales con reguladores transcripcionales del tipo bZIP (cierres básicos de leucina) (Finkelstein y Lynch, 2000; Lopez y Chua, 2000). La identificación de estos 2 factores transcripcionales involucrados en la señalización de ABA, muestra una clara interrelación y dependencia de esta hormona en las respuestas a azúcar.

El binomio azúcar-ABA se ve reforzado por la caracterización de otras mutantes resistentes a azúcar como la mutante *gin5*, la cual resultó ser una mutante deficiente en ABA, y donde se demostró el requerimiento de ABA en la señalización de Glc dependiente de HXK; y más aún, el aumento en los niveles de esta hormona en respuesta a Glc (Arenas *et al.*, 2000). Otras mutantes aisladas previamente por ser deficientes en la biosíntesis de ABA, *aba1*, *aba2* y *aba3* (León-Kloosterziel *et al.*, 1996), también son insensibles a Glc (Arenas *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000). El otro caso

descrito fue la caracterización de las mutantes *gin1*, *sis4* e *isi4*, las cuales resultaron alélicas a *aba2* (Cheng *et al.*, 2002; Laby *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001). Estas evidencias, aunadas a la identificación de *gin8* como una mutante deficiente en ABA, confirman el requerimiento de esta hormona en las respuestas a azúcares.

A continuación se enlistan los genes identificados durante la caracterización de mutantes con fenotipo *gin* así como algunos de sus alelos (Tabla 17).

Tabla 17. Identidad molecular de las mutantes de Arabidopsis con fenotipo insensible a Glc (*gin*).

Gen	Alelos mutantes	Cromo-soma	Identidad molecular / función	Referencia
<i>ABA1</i>	<i>aba1</i> , <i>los6</i>	5	Zeaxantina epoxidasa / biosíntesis de ABA	Arenas, <i>et al.</i> 2000; Laby <i>et al.</i> , 2000; Huijser <i>et al.</i> , 2000; Xiong, <i>et al.</i> 2002.
<i>ABA2</i> , <i>SDR1</i>	<i>gin1</i> , <i>aba2</i> , <i>sis4</i> , <i>isi4</i> , <i>sañ3</i> , <i>srel</i>	1	Xanthoína oxidasa / biosíntesis de ABA	Zhou <i>et al.</i> , 1998; este trabajo (Cheng <i>et al.</i> , 2000); Laby <i>et al.</i> , 2000; Huijser <i>et al.</i> , 2000; Rook <i>et al.</i> , 2001; González-Guzmán <i>et al.</i> , 2002.
<i>ABA3</i>	<i>gin5</i> , <i>aba3</i> , <i>los5</i> , <i>frs1</i>	1	Mo-cofactor sulfurasa / biosíntesis de ABA	Arenas, <i>et al.</i> 2000; Laby <i>et al.</i> , 2000; Huijser <i>et al.</i> , 2000; Llorente <i>et al.</i> , 2000; Xiong <i>et al.</i> , 2001.
<i>NCED3?</i>	<i>gin8</i>	3	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa / biosíntesis de ABA	Este trabajo
<i>AAO3</i>	<i>aao3</i>	2	Abscísico aldehído oxidasa / biosíntesis de ABA	Seo <i>et al.</i> , 2000; León, datos no publicados.
<i>HXK1</i>	<i>gin2</i>	4	Hexocinasa 1 / sensor de azúcar	Moore <i>et al.</i> 2003.
<i>CTR1</i>	<i>gin4</i> , <i>ctr1</i> , <i>sis1</i>	5	PK tipo Raf / respuesta a etileno	Zhou <i>et al.</i> , 1998; Cheng, <i>et al.</i> 2002.
<i>ABI4</i>	<i>gin6</i> , <i>abi4</i> , <i>sun6</i> , <i>sis5</i> , <i>isi3</i> , <i>sañ5</i>	2	FT tipo AP2 / maduración de la semilla y señalización de azúcar y ABA	Este trabajo (Arenas, <i>et al.</i> 2000); Laby <i>et al.</i> , 2000; Huijser <i>et al.</i> , 2000; Rook <i>et al.</i> , 2001; Quesada <i>et al.</i> , 2000.
<i>ABI5</i>	<i>gin9</i> , <i>abi5</i>	2	FT tipo bZIP / maduración de la semilla y señalización de azúcar y ABA	Este trabajo (Arenas, <i>et al.</i> 2000); Cortés, <i>et al.</i> (nuestro laboratorio)

Nota: en **negritas** se indican las mutantes aisladas en este trabajo.

Por otra parte se sabe que la señalización de etileno también interacciona con la señalización de Glc en Arabidopsis, pues la aplicación exógena de un precursor de etileno a plantas silvestres, provoca la pérdida de la sensibilidad a Glc en estas plantas, es decir, se vuelven insensibles. En concordancia con esto, mutantes sobreproductoras de etileno (*eto1*) o señalizadoras constitutivas de esta hormona (*ctr1*), se comportan como insensibles a Glc, mientras que las mutantes insensibles a etileno *etr1-1*, *ein2*, *ein3*, *ein4* y *ein6* presentan un fenotipo hipersensible a Glc (Zhou *et al.*, 1998; Gibson *et al.*, 2001; León y Sheen, 2003; Yanagisawa *et al.*, 2003). Por lo tanto, la señalización de etileno antagoniza a la de Glc. Este hecho ha sido comprobado mediante el análisis del factor transcripcional que regula la señalización de etileno EIN3, cuya mutación causa hipersensibilidad a Glc, mientras que la sobreexpresión del mismo causa hiposensibilidad. EIN3 es degradado por el proteasoma 26S, y esta degradación es acelerada por la presencia de Glc, mientras que el etileno estabiliza esta proteína,

demostrándose la relación antagonista de ambas señales (Yanagisawa *et al.*, 2003). Por lo tanto, el etileno antagoniza la respuesta a Glc, mientras que ABA promueve dicha respuesta. Así mismo, el hecho de que la mutante con señalización constitutiva de etileno *ctr1* sea también insensible a ABA, y que la mutante insensible a etileno *ein2* sea alélica a la mutante hipersensible a ABA *era3*, demuestra que el etileno y el ABA son claros antagonistas entre ellos (este trabajo; Ghassemian *et al.*, 2000; Beaudoin *et al.*, 2000).

Cabe mencionar que se sabe que el ABA puede inducir la expresión de la proteína ABI5 (López-Molina *et al.*, 2001). Resulta interesante que en ausencia de ABA, la proteína ABI5 se degrada rápidamente también por una vía dependiente del proteasoma y esta degradación es bloqueada en presencia de ABA exógeno (López-Molina, *et al.*, 2003; Smalle *et al.*, 2003). Es decir, la expresión de ABI5 no sólo se induce por ABA, sino que también la proteína misma es estabilizada por la hormona. Esta observación sugiere que el ABA podría ser capaz de bloquear la ubiquitilación de ABI5 o de regular negativamente a la E3 (ligasa de ubiquitina) correspondiente; y la ausencia de ABA resulta en la degradación rápida y el término de la señal generada (López-Molina, *et al.*, 2003). Es interesante saber si en respuesta a azúcares, tanto ABI5 como ABI4, utilizan el mismo mecanismo dependiente de proteasoma, o alguna variante del mismo; aspecto que de hecho está siendo abordado en nuestro laboratorio.

V.3 La señal de Glc regula positivamente a elementos de su propia vía de señalización.

En este trabajo (y otros estudios recientes) se demostró que los genes *ABI4* y *ABI5*, así como varios genes de la biosíntesis de ABA, son inducidos por Glc (Cheng *et al.*, 2002; Brocard *et al.*, 2002, Arroyo *et al.*, 2003). Este tipo de regulación podría ser indicadora de una retroalimentación positiva de la vía de señalización activada por Glc. Durante el análisis de expresión de *ABI4* y *ABI5*, también se incluyó al gen *CTR1*, y se vio que también responde positivamente a la señal de Glc (Arroyo *et al.*, 2003). Esto sugiere que se requiere del bloqueo de la señalización de etileno, a través del regulador negativo *CTR1*, para que se lleve a cabo la respuesta a Glc.

En un análisis de búsqueda de secuencias consenso de acción en *cis* de respuesta a azúcar, se encontró que dentro de una distancia de 2 Kb hacia arriba del ATG de *ABI4* se localizan algunos elementos en *cis* putativos, que podrían contribuir a la regulación mediada por Glc de este gen. Son de especial interés unas secuencias presentes en ocasiones múltiples a lo largo de esta región y que comparten 100% de homología con elementos reconocidos por los factores Dof. Estos factores participan en la regulación de genes del metabolismo de carbohidratos, de almacenamiento y de

respuesta a hormonas y estrés (Yanagisawa, 2000). También, las secuencias consenso SP8b o SP8a están presentes corriente arriba no sólo de *ABI4*, sino también de *CTR1*, las cuales participan en la respuesta a Sac del gen de la β -amilasa de la papa. La caja SP8b (presente en el promotor de *ABI4*) es el sitio de unión del factor SP8BF y de la proteína de unión a DNA SPF1, y tiene homología con el elemento de respuesta a Sac de papa SURE2 (Ishiguro y Nakamura, 1992, 1994; Griergson *et al.*, 1994). Sin embargo aún falta por determinar si dichas cajas son funcionales tanto en *ABI4* como en *CTR1* en respuesta a Glc.

Inicialmente no se había encontrado alguna proteína con homología a *ABI4* en las bases de datos de otras especies vegetales. Pero un trabajo reciente, reportó un ortólogo de *ABI4* en la planta de maíz (*ZmABI4*), el cual es capaz de complementar a la mutante de *Arabidopsis* *abi4* en respuesta a Glc y ABA (Niu *et al.*, 2002). El gen *ZmABI4* comparte homología con el gen *AtABI4* únicamente en la región correspondiente al dominio de unión a DNA AP2, fuera de este dominio la secuencia es divergente aunque presenta características estructurales correspondientes a un FT. Recientemente se reportó la secuencia preliminar del genoma de una monocotiledónea, el arroz (Yu *et al.*, 2002); en esta base de datos se encontró una sola secuencia que comparte homología con el dominio AP2 de *AtABI4*, lo que sugiere que en arroz podría existir un sólo ortólogo de *ABI4* (Niu *et al.*, 2002). *ZmABI4* parece ser específico de la semilla y es capaz de unirse *in vitro* a la secuencia CACCG, la cual corresponde a un elemento previamente identificado llamado CE1 ("Coupling Element 1"), el cual es importante para la expresión génica regulada por ABA (Shen y Ho, 1995). Resulta interesante que dicho elemento se encuentra presente en las secuencias corriente arriba de diversos genes de maíz, cebada, *Craterostigma plantagineum* y arroz regulados por ABA (*ZmRab28*, *ZmRab17*, *OsRab16B*, *HVA1*, *HVA22*, *CpCdeT27*), incluyendo al propio *ABI4* de maíz, arroz y *Arabidopsis* (Niu *et al.*, 2002). En las secuencias corriente arriba de algunos genes regulados por azúcar y/o ABA como *ADH1*, *Em1*, *Em6*, *PC*, *ApL3*, incluyendo *ABI5* y *CTR1*, están presentes secuencias con homología al elemento CE1 (Niu *et al.*, 2002; y Tabla 18), lo cual coincide con el hecho de que la expresión de estos genes se encuentra afectada en alelos de la mutante *abi4* (este trabajo en Arenas *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2003; Finkelstein *et al.*, 1998; Huijser *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001). Sin embargo, se requiere de un análisis más detallado para evaluar la funcionalidad y la relevancia de las secuencias presentes en la región regulatoria de esta serie de genes.

V.4 *ABI4*, *ABI5* y *CTR1* también responden a estrés osmótico y ABA

Con la intención de discernir si la respuesta de *ABI4*, *ABI5* y *CTR1* a la Glc era separable de la respuesta osmótica, se analizó la expresión de estos genes en presencia de un agente osmótico, el Mtl. De estos experimentos se concluyó que a pesar de que estos genes responden al estrés osmótico, esta respuesta es separable de la respuesta a la Glc (Arroyo *et al.*, 2003). Vale la pena resaltar que la

respuesta a Mtl de los genes *ABI4*, *ABI5* y *CTR1* correlaciona con el patrón de respuesta a ABA, lo que sugiere que esta respuesta podría depender de ABA en cierta medida. En este sentido resulta interesante que en las regiones corriente arriba de estos genes, se encuentran secuencias consenso reconocidas por el complejo AtMYB/AtMYC (Tabla 18), el cual participa en las respuestas a déficit hídrico de forma dependiente de ABA (Abe *et al.*, 1997; Kizis *et al.*, 2001). Adicionalmente, la presencia de secuencias tipo ABRE (“ABA Responsive Elements-like”) tanto en *ABI4* como en *ABI5* (Tabla 18), también podrían contribuir a la inducción por ABA de estos dos genes (Shen y Ho, 1995).

Tabla 18. Elementos en *cis* de respuesta a azúcar, ABA y estrés hídrico presentes en la secuencia corriente arriba de los genes *ABI4*, *ABI5* y *CTR1*.

Gen	Caja	Posición respecto al ATG (pb)
<i>ABI4</i>	SP8b	-1418
	AtMYB	-1985
	AtMYC	-1851
	ABRE-like	-1505
	CE1-like	-158
<i>ABI5</i>	AtMYB	-32, -150
	AtMYC	-8, -225, -348
	ABRE-like	-347 y 7 más corriente arriba
<i>CTR1</i>	CE1-like	-827
	SP8a	-558
	AtMYB	-1859
	AtMYC	-1985
	CE1-like	-249

Cabe reiterar que a pesar de que el ABA es necesario para la señalización de Glc y para la respuesta de *ABI4*, *ABI5* y *CTR1* (de acuerdo a los análisis de expresión de estos genes en diferentes fondos mutantes), la señal de ABA por sí sola no es suficiente para regular la expresión de estos genes (este trabajo en Arenas *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2003). En forma similar se ha visto que otros genes regulados por azúcar como *ApL3* y *VvMSA* (incluyendo a *ABI4*), no se inducen por ABA o su respuesta es muy limitada; si embargo, el ABA potencia la inducción de estos genes por azúcar (Rook *et al.*, 2001; Cakir *et al.*, 2003; Arroyo *et al.*, 2003). Esto implica que la señalización de Glc requiere de otros elementos aún no identificados, que aunados al ABA determinan la sensibilidad de la planta al azúcar. Estos elementos podrían localizarse en tejidos diferentes a los tejidos efectores, o bien, podrían estar compartimentalizados de manera intracelular hasta tener las condiciones que les permitan ser transportados al lugar de respuesta. El análisis de otras mutantes no relacionadas con la biosíntesis y señalización de ABA ni etileno, como *gin7* y otras mutantes de esta colección, podría dar luz de la identidad de estos elementos aún no identificados.

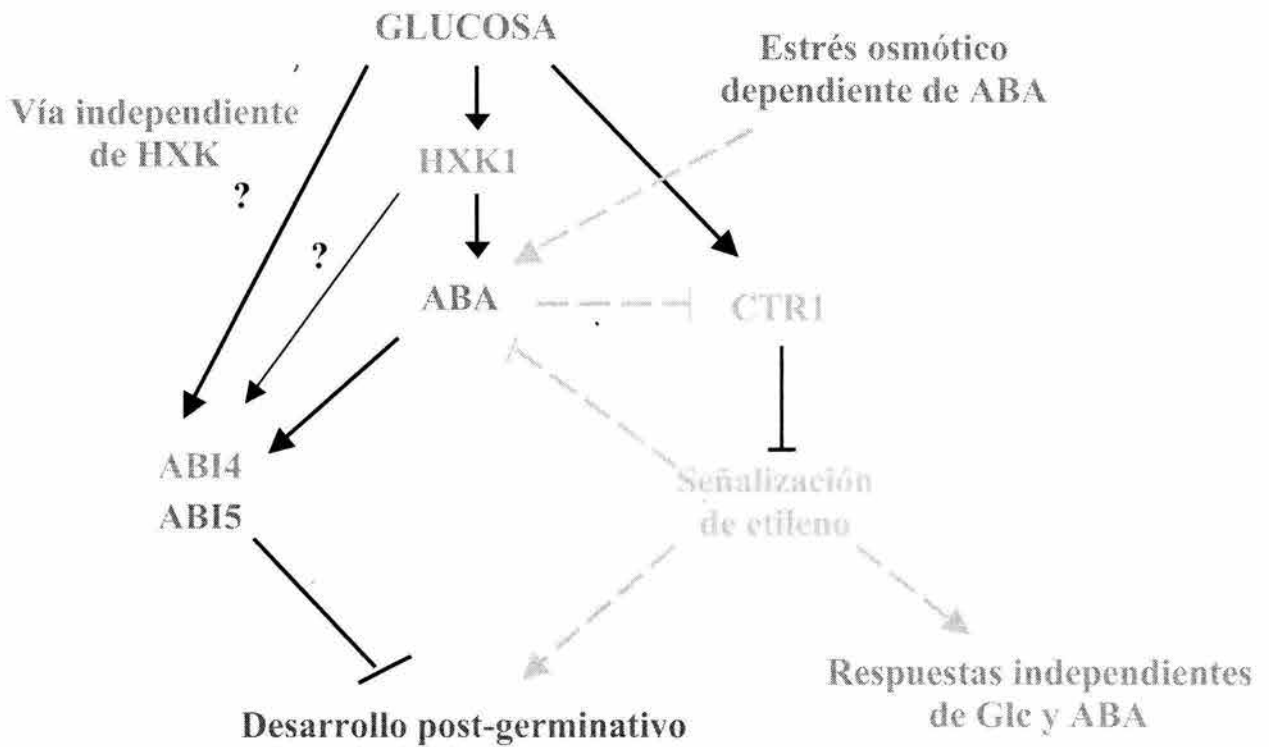


Figura 30. Modelo de regulación de la expresión de *ABI4*, *ABI5* y *CTR1* por diversas señales (integración de evidencias genéticas, moleculares y fisiológicas).

V.5 Las señales de azúcar interactúan también con las vías de transducción de otras fitohormonas

A nivel de la regulación de expresión génica también es evidente la estrecha relación de las señales de azúcares con otras hormonas además del ABA y el etileno, dada la enorme cantidad de genes responden a estas señales simultáneamente. Por ejemplo, la SnRK PKABA1 de cebada (involucrada en la regulación por azúcar), es inducida por ABA y media la represión por ABA de los genes de α -amilasa que son inducidos por GAs, hormona antagonista de ABA en ciertas circunstancias como la germinación (Gómez-Cadenas *et al.*, 1999). Además, otra SnRK de trigo llamada *WPK4*, se induce por citocininas y luz, mientras que la presencia de azúcares la reprime (Ikeda *et al.*, 1999). Existen casos como el del gen *CycD3*, cuya expresión es inducida por citocininas sólo en presencia de Sac, (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Los brasinoesteroides también se relacionan con las respuestas a azúcares, pues se ha demostrado en jitomate que la estimulación del crecimiento inducida por brasinoesteroides, está ligada al aumento en la provisión de carbohidratos mediante la inducción específica de tejido de una *Ivr* extracelular. Esta enzima es clave en la descarga apoplástica del floema y también es regulada por azúcares. El tratamiento con brasinoesteroides aumenta la actividad

enzimática y los niveles de RNAm de la *Ivr* unida a la pared celular Lin6, mientras que las *Ivrs* intracelulares no son afectadas (Goetz *et al.*, 2000).

La respuesta de los genes tanto a azúcares como a diversas hormonas se debe en parte a la presencia de cajas de respuesta a múltiples señales en los promotores de estos genes, y en otros casos al solapamiento de los elementos en *cis* (ver apartado I.4.1.1). Esto concuerda con la desregulación de diversos genes de respuesta a azúcares en las mutantes en biosíntesis o señalización de ABA, etileno, auxinas y citocininas (este trabajo; Zhou *et al.*, 1998; Németh *et al.*, 1998; Arenas *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2003). Así mismo, genes de la señalización de azúcares, como *ABI4*, *ABI5* y *CTR1*, además de ser regulados por Glc y ABA, también responden a etileno, auxinas, citocininas, brasinoesteroides y ácido jasmónico (este trabajo, datos no mostrados). Estas evidencias indican que los azúcares están íntimamente relacionados con una amplia red de comunicación con las diferentes fitohormonas. De hecho, la caracterización de la mutante en *HXK1 gin2*, evidenció la participación de otras dos hormonas en la señalización de Glc mediada por HXK, las auxinas y las citocininas. La mutante *gin2* además de ser insensible a Glc, también es insensible a auxinas e hipersensible a citocininas. De hecho las mutantes resistentes a auxinas *axr1*, *axr2* y *tir1*, así como las líneas transgénicas *CKII* y *ARR2* que presentan señalización de citocininas constitutiva, son insensibles a Glc. Dado que se sabe que las citocininas promueven la biosíntesis de etileno, y el etileno antagoniza la señalización de Glc, se corroboró que el efecto de las citocininas no fuera indirecto, y se demostró que las citocininas y el etileno actúan independientemente en la respuesta a Glc (Moore *et al.*, 2003). Este resultado contrasta con el hecho de que la mutante resistente a citocininas *ckr1* resultó ser alélica a *ein2* que es insensible a etileno e hipersensible a Glc (Németh *et al.*, 1998). El papel antagonístico de las citocininas en la represión por Glc ya había sido descrito en la expresión de genes regulados por Glc y luz, en donde las citocininas evitan la represión por Glc de genes fotosintéticos y tienen un efecto sinérgico en la activación de genes inducidos por Glc (Németh *et al.*, 1998).

La complejidad de las interacciones entre las vías de señalización de hormonas y azúcares y el grado de pleiotropía que pueden alcanzar se ve ejemplificado en los fenotipos de la mutante *prl1* ("pleiotropic regulatory locus 1"). PRL1 es una proteína nuclear que interacciona con otras proteínas del tipo SnRKs de forma dependiente de Glc (Bhalerao *et al.*, 1999). La mutación en este gen ocasiona fenotipos como hipersensibilidad a Glc, Sac, citocininas, etileno, auxinas, ABA y frío; sin embargo, no parece afectar las respuestas a GAs, ácido salicílico, fosfato, NaCl, choque térmico, ni sequía (Németh *et al.*, 1998). También la mutante *hyl1* ("hyponastic leaves 1") muestra fenotipos pleiotrópicos siendo resistente a auxinas y citocininas, pero hipersensible a Glc, ABA, NaCl y estrés osmótico. *HYL1* codifica para una proteína de unión a RNA de doble cadena y forma parte de un complejo

macromolecular nuclear que participa en la regulación génica mediada por microRNAs, aparentemente regulando la estabilidad del RNAs de la señalización de hormonas (Cheng y Fedoroff, 2000; Meng-Hsuan *et al.*, 2004). En la figura 31 se intenta esquematizar las relaciones existentes entre los azúcares y diferentes hormonas vegetales, aunque debe considerarse que estas relaciones pueden cambiar dependiendo del proceso y etapa de desarrollo analizado, así como la especie vegetal considerada.

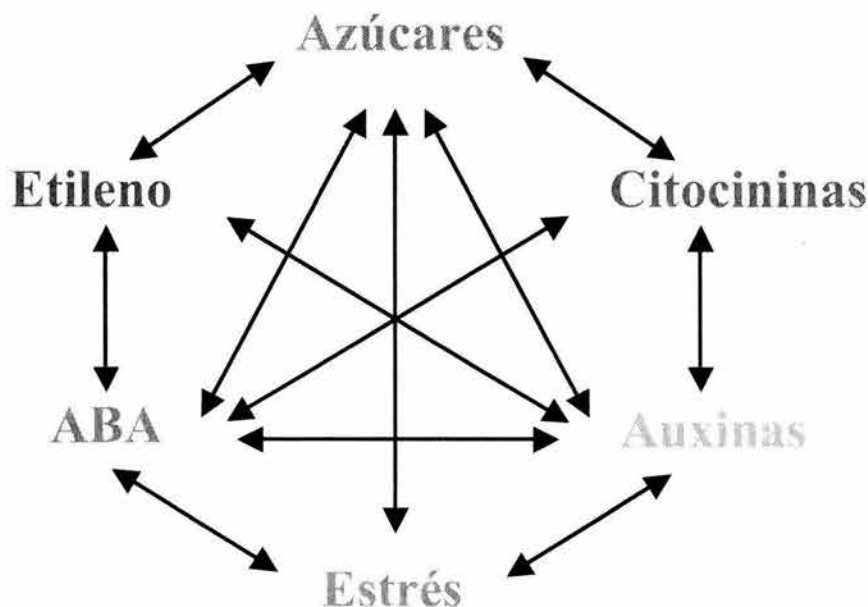


Figura 31. Esquema de la interacción de las vías de señalización de azúcares y las hormonas vegetales.

V.6 *Las mutantes gin son osmotolerantes y resistentes a condiciones salinas*

Estreses como la sequía, la salinidad y el frío afectan la toma, disponibilidad y conductancia del agua provocando un efecto osmótico (Hare P, 1998; Gucci *et al.*, 1998; Livingston y Henson, 1998; Thomashow, 1999; Wanner y Junttila, 1999). Otra de las características interesantes de las mutantes *gin* es que cuando son germinadas en concentraciones altas de sorbitol o Mtl (400 mM), presentan fenotipos osmotolerantes durante el desarrollo temprano de la plántula (este trabajo; Laby *et al.*, 2000). También cuando son germinadas en condiciones de alta salinidad (NaCl 150 mM), se comportan como resistentes a estrés salino. Esta respuesta se presenta tanto en las mutantes insensibles a ABA *gin6/abi4* y *abi5*, como en las deficientes en esta hormona *gin8* y *gin1*; incluso en la mutante *gin7*, la cual no parece estar afectada ni en la señalización ni en la biosíntesis de esta hormona. Estas observaciones coinciden con lo encontrado por otros grupos, ya que se han aislado alelos de las mutantes *aba* y *abi4*

en “screenings” de mutantes resistentes tanto a estrés salino como osmótico (Werner y Finkelstein, 1995; León-Kloosterziel *et al.*, 1996; Quesada *et al.*, 2000; González-Guzmán *et al.*, 2002).

El hecho de que todas las mutantes *gin* que hemos analizado han resultado osmotolerantes y resistentes a estrés salino desde la etapa de germinación, invita a sugerir que la señalización de azúcares se interrelaciona directamente con las vías de señalización de estrés osmótico y salino, compartiendo algunos de sus componentes. Sin embargo otra posibilidad es que las mutantes incapaces de detectar o responder a altos niveles de azúcares, podrían acumular concentraciones inusualmente altas de azúcares endógenos, los cuales podrían tener un efecto indirecto de osmoprotección. De hecho se sabe que ciertas plantas, algas marinas, bacterias y otros organismos acumulan solutos orgánicos tales como azúcares alcohólicos (Sac, Glc, Frc), otros azúcares poco complejos (fructanos, trehalosa, rafinosa), aminoácidos (prolina y aminos terciarias), como osmoprotectores. Estos compuestos son llamados solutos compatibles porque incluso en altas concentraciones no inhiben la actividad de las enzimas, y también pueden proteger a las enzimas y membranas contra los efectos desestabilizadores de iones como Na^+ y Cl^- . En muchos casos estos osmoprotectores se sintetizan en respuesta a estrés y se localizan en el citoplasma; mientras que los iones inorgánicos como el Na^+ y Cl^- son secuestrados preferencialmente en la vacuola. Esto mantiene el turgor de la célula en condiciones de estrés (Rathinasabathi, 2000).

Diversos estudios en plantas y semillas han demostrado que la Sac puede actuar como agente osmoprotector en diversas especies vegetales, pues la acumulación de este azúcar es paralela a la adquisición de tolerancia a desecación (Ingram *et al.*, 1997; Quick *et al.*, 1989). De hecho, la Sac es el azúcar acumulado predominantemente en todas las plantas de la resurrección deshidratadas estudiadas hasta ahora (Scott, 2000). Además de tener un papel directo en la osmoregulación, la Sac provee un carbohidrato rápidamente metabolizable para la producción de energía cuando el C está siendo dirigido hacia otras funciones diferentes al crecimiento (Hare *et al.*, 1998). Adicionalmente, la Sac, la Glc y la Frc son crioprotectores importantes, pues plantas expuestas a tratamientos en frío presentan incrementos en el contenido de estos azúcares (Crow *et al.*, 1987; Hayashi *et al.*, 1997; Déjardin *et al.*, 1999). En coincidencia, en la mutante resistente al frío *eskimo1*, y en la mutante sensible al frío *sfr4* (“*sensitive-to-freezing4*”) los niveles de azúcares están aumentados y disminuidos respectivamente, indicando que las vías definidas por estas mutaciones actúan directa o indirectamente en las concentraciones de azúcares (Stitt y Hurry, 2002). La alta salinidad también causa efectos de estrés hiperosmótico e hiperiónico, lo que puede activar respuestas de adquisición de tolerancia. Se ha demostrado en algunas plantas, que el estrés salino disminuye la tasa fotosintética y además altera los niveles y los tipos de carbohidratos y exportados por los tejidos productores (Gilbert *et al.*, 1997; Gucci

et al., 1998). Para corroborar si la osmotolerancia de las mutantes *gin* se debe a una acumulación inusual de azúcares, se requiere medir la cantidad de los mismos. Es importante resaltar que la acumulación de azúcares en respuesta a estrés podría interferir con su acción protectora, debido a que estos metabolitos también forman parte del metabolismo basal. Es aquí donde los sistemas de detección y señalización de azúcares y estrés podrían jugar un papel esencial.

La existencia de una posible interacción entre las respuestas a estrés salino, osmótico y azúcares ha sido apoyada por el aislamiento de mutantes de *Arabidopsis* tolerantes a NaCl, KCl, y Mtl. Una de ellas llamada *sañ5* (*salobreño 5*) resultó ser un alelo del gen *ABI4* (Quesada *et al.*, 2000), mismo que participa directamente en la señalización de azúcares y ABA como se ha mencionado anteriormente (este trabajo en Arenas *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000). Por su parte, *ABI5* es un miembro de la familia de factores transcripcionales tipo bZIP que se unen específicamente a la caja ABRE (“ABA-Response-Element”) denominada ABFs (“ABRE binding factors”). Su RNAm y/o proteína se induce por ABA, frío, sal, sorbitol y por Glc, y la presencia de mutaciones en este gen producen insensibilidad a Glc, ABA, sal y estrés osmótico, sugiriendo que *ABI5* podría integrar este grupo de señales (este trabajo; Finkelstein, 1994; Arenas *et al.*, 2000; López-Molina *et al.*, 2001; Brocard *et al.*, 2002).

También se han aislado alelos de las mutantes deficientes en la biosíntesis de ABA (*aba1*, *aba2/gin1* y *aba3/gin5*) en otras selecciones génicas de plantas resistentes a concentraciones altas de sales como el NaCl (*los6/aba1*, *sañ3/sre1/aba2*, *rss/los5/aba3*) (Werner y Finkelstein, 1995; González-Guzmán *et al.*, 2002). La tolerancia a sal en tales mutantes está restringida al periodo de germinación y el establecimiento temprano de la plántula, pues si estas mutantes son expuestas al estrés salino e inclusive osmótico (Mtl o sorbitol) después de haber germinado e iniciado su desarrollo, presentan fenotipos hipersensibles a estos estreses (Xiong *et al.*, 2001). Tales fenotipos podrían sugerir la existencia de una estrecha interrelación entre las respuestas a azúcares y estrés durante la germinación y el desarrollo temprano que posteriormente se deslindan. La aparente paradoja de que las plantas con niveles bajos de ABA sean tolerantes a estrés salino y osmótico durante la etapa germinativa, también puede explicarse por la posible falta de control de la germinación bajo condiciones desfavorables de disposición de agua. Al mismo tiempo, la observación de que las mutantes deficientes en ABA presentan una mayor sensibilidad a ABA (este trabajo), podría permitirle a estas mutantes responder al estrés imperante de forma más rápida que la planta silvestre.

En adición a los fenotipos de tolerancia a estrés osmótico en las mutantes *gin*, a nivel de la expresión génica también existen diferencias importantes en la expresión de genes de respuesta a este

tipo de estímulo. Los análisis de expresión de algunos genes que responden a estrés osmótico (*RD29A*, *RD29B*, *COR15A*, *RD22*, *ADH*, *P5CS1*, *DREB2A*, *TPS1*), indicaron que bajo las condiciones de baja (2%) y alta Glc (6%), el grupo de genes de respuesta a estrés responden positivamente a alta Glc en la planta silvestre, a excepción de los genes *TPS1* y *DREB2* los cuales se reprimieron en las mismas condiciones. Estos datos sugieren que las concentración de 6% de Glc causan un estrés osmótico capaz de inducir este tipo de genes. Sin embargo, sabemos que los niveles de ABA aumentan en respuesta a Glc como en respuesta a estrés osmótico (Arenas *et al.*, 2000; Zeevaart y Creelman, 1988), y los genes que se inducen en nuestras condiciones también se sabe que se inducen por ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; de Bruxelles *et al.*, 1996). De esta manera, la respuesta de inducción de esta serie de genes también puede deberse al aumento en los niveles de ABA en condiciones de alta Glc, respuesta que esta afectada en la mutante *gin8*. Por lo tanto, con estos estudios no se puede descartar la posibilidad de que estos genes también respondan a una señal específica derivada de la Glc de forma paralela al estrés osmótico. Resulta interesante que los genes inducibles por sequía (un tipo de estrés osmótico) *TPS1* y *DREB2A* se reprimen en respuesta a alta Glc, sugiriendo que estos dos genes responden a una señal específica derivada de la Glc que es independiente del estrés osmótico. Esta regulación parece ser independiente de ABA, dado que la mutante *gin8* no afecta la represión de estos 2 genes. Este resultado coincide con el hecho de que *DREB2A* se induce en respuesta a estrés, actuando en una vía independiente de ABA (Kisis *et al.*, 2001).

Muchos de los genes que responden a diversas señales de estrés contienen en sus promotores varias elementos en *cis*, como las cajas de respuesta a sequía y frío DRE/CRT (“drought response element/C-repeat”) y la caja ABRE (“ABA-response element”). Estos elementos en *cis* parecen funcionar independientemente o cooperativamente. Esto indica que las interacciones entre las diversas maquinarias de transcripción producen respuestas cruzadas entre diferentes vías de señalización. Quizá el ejemplo mejor estudiado es el del gen *RD29A/COR78/LTI78*, mismo que se induce por ABA, sequía, sal y frío. Cabe resaltar que este gen también se induce por Glc, y las tres mutantes *gin* analizadas afectan dicha inducción (este trabajo), por lo que se antoja probable que también existan interacciones de diversas cajas de respuesta a estrés y azúcares en la regulación de diversos genes. Además, como la fitohormona ABA está implicada en la transducción de señales de azúcar, es de esperarse que al menos un subgrupo de las respuestas de estrés dependientes de ABA también estén sometidas a señales de azúcares.

Otro caso interesante es el gen *COR15A*, el cual pertenece a un tipo de genes que responden al estrés por frío, los genes *COR* (“COLD REGULATED”) (Thomashow M. 1999). *COR15A* codifica para una proteína que interactúa con lípidos de la membrana cloroplástica para mantener su

funcionamiento durante los ciclos de congelación-descongelación; y su RNAm se acumula también en respuesta a Glc (este trabajo en Arenas *et al.*, 2000). El estrés por frío también induce rápidamente y de forma transitoria a una familia de factores transcripcionales llamada CBF/DREB1 (“C-repeat binding factor/dehydration-responsive element-binding protein 1”), mismos que inducen a los genes *COR* mediante su unión a las cajas CRT/DRE en sus promotores. La sobre-expresión de CBF/DREB1 conlleva a un aumento en los niveles de Pro mediante la inducción de la primera enzima de la biosíntesis de Pro (*P5CS*), así como un mayor contenido de azúcares (Gilmour *et al.*, 2000). Coincidentemente el gen *P5CS* también responde positivamente a Sac y Glc (Hellmann *et al.*, 2000; este trabajo), sugiriendo que la acumulación de Pro en dichas plantas sobrepresoras se podría deber al aumento de los niveles de azúcares más que a la inducción directa por el factor transcripcional. En este sentido, el hecho de que tanto *gin6* como *gin7* tengan mayores niveles de transcrito tanto de *COR15A* como de *P5CS1*, sugiere que el FT DREB1A podría estar expresado en mayores niveles en estas mutantes. Sin embargo, en este trabajo no fue posible detectar el transcrito de *DREB1A* por “northern blot” (datos no mostrados); sería conveniente utilizar otro tipo de estrategia para detectar este gen poco abundante.

Las diferencias en la expresión de este grupo de genes tanto en las mutantes afectadas (*gin6* y *gin8*) como en las no afectadas en ABA (*gin7*), sugieren que la regulación por Glc de los genes *TPS1* y *DREB2A* así como de *COR15A* y *P5CS1*, depende al menos en parte de ABI4/GIN6 y de GIN7 dado que en las mutantes *gin6* y *gin7*, estos genes se expresan en niveles mayores que los observados en la planta silvestre. Quizá la resistencia a estrés osmótico de estas dos mutantes se deba en cierta medida a los mayores niveles de expresión de dichos genes. La inducción por Glc de los genes *RD29A*, *RD29B*, *RD22* y *ADH* está claramente disminuida en las tres mutantes analizadas, lo que confirma el requerimiento de ABA para la expresión de estos genes y que su regulación también depende de ABI4/GIN6 y de GIN7. Esta serie de resultados esquematizan la complejidad de las interacciones entre las vías de señalización de azúcares y estrés osmótico, en las que la presencia de un tipo de estrés puede cambiar las respuestas de la planta o otros estreses, creando así efectos aditivos o interacciones sinérgicas.

Para analizar con exactitud el efecto del estrés sobre el estatus energético/azúcar en los tejidos de la planta, sería importante considerar situaciones de estrés no extremas y determinar los posibles efectos aditivos, sinérgicos y compensatorios de la misma. Así mismo, el análisis histográfico de la redistribución de la Glc y otros azúcares durante el desarrollo vegetativo, y el análisis comparativo en respuesta a fitohormonas y estrés abiótico, nos daría información real acerca de las respuestas de las plantas a todas estas señales y condiciones externas que suceden simultáneamente en la naturaleza.

V.7 *El fenotipo gin no es simplemente un fenotipo de resistencia a estrés osmótico*

Atendiendo a la estrecha relación tanto a nivel fenotípico como de expresión génica entre el estrés osmótico, el ABA y los azúcares, se puede pensar que el uso de condiciones extremas de selección utilizadas para el aislamiento de mutantes *gin* (7% de Glc - no fisiológicas), impone intrínsecamente un estrés osmótico provocado por dicha concentración del azúcar. Bajo estas condiciones, se podría beneficiar la selección de mutantes resistentes a estrés osmótico en lugar de aislar mutantes resistentes específicamente a Glc, lo cual explicaría la obtención de mutantes relacionadas con la biosíntesis o señalización de ABA. Sin embargo, diferentes diseños de "screenings" genéticos han dado como resultado el aislamiento de mutantes alélicas de manera independiente, aún cuando en algunos de ellos el efecto osmótico no está presente. De hecho, cuando este tipo de mutantes se crecen ya sea en Mtl o sorbitol en concentraciones equimolares a las usadas en la selección por azúcar (0.3–0.388 M), presentan fenotipos similares a la planta silvestre (Zhou *et al.*, 1998; este trabajo en Arenas *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000). De tal manera que el efecto osmótico producido por ambos agentes, no es suficiente para producir el fenotipo provocado por la Glc, ni es suficiente para explicar la participación de ABA en la tolerancia a Glc en Arabidopsis. Estos hechos, aunados al aislamiento de mutantes que no tienen afectada la biosíntesis o señalización de ABA, ni etileno, como *gin7* (entre otras mencionadas en el apartado IV.5.5), sugiere que las mutantes aisladas en nuestro "screening" no son exclusivamente resistentes a estrés osmótico.

V.8 *Relación de la señalización de azúcares y de N*

Otra de las interacciones sobresalientes de los azúcares es con el Nitrógeno. Las interacciones entre el metabolismo del C y el N tanto en organelos como en tejidos y plantas completas, han sido ampliamente reconocidas durante los últimos 30 años; sin embargo la naturaleza de dichas interacciones aún se desconocen en gran medida. Cada vez es más evidente que existen múltiples niveles de control y una comunicación compleja de ambas señales entre diferentes compartimentos celulares. Los cambios en el estatus del C y N tienen influencia determinante en la fisiología de los órganos y las relaciones entre la raíz y la parte aérea de la planta. La coordinación de la asimilación del C y N está bajo el control de múltiples factores y señales como hormonas, nitrato, azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos; y esta información es transducida e integrada en la regulación de la expresión de genes y actividades enzimáticas.

Siendo el C y el N elementos tan importantes, no es sorprendente que además de funcionar como metabolitos, también funcionen como señales capaces de activar una o más vías de señalización de

forma independiente y posiblemente mediante uno o más mecanismos convergentes (Paul y Stitt, 1993; Paul y Driscoll, 1997). De hecho los efectos de altos niveles de C y bajos niveles de N en la fotosíntesis son muy similares: tanto la deficiencia de N como la abundancia de azúcares inhiben rápidamente el crecimiento, se acumulan los carbohidratos y se inhibe la fotosíntesis. Esto sugiere que las vías de señalización de ambas señales podrían conectarse en algún punto dando como resultado los mismos efectos. Una forma de analizar con mayor precisión estos puntos de interacción es evaluando las respuestas a N en mutantes en la señalización de azúcares y *vice versa*. En este trabajo se evaluó si la ausencia de N afecta la sensibilidad de la planta a la Glc. De este análisis se concluyó que en ausencia de la fuente nitrogenada, la sensibilidad a la Glc de la planta silvestre aumenta de forma importante durante el proceso de germinación y el desarrollo post-germinativo, considerando la baja concentración de Glc utilizada (2%) en nuestros ensayos. Las mutantes *gin6*, *gin7* y *gin8* fueron resistentes en estas condiciones y dicha resistencia fue mucho más evidente durante el proceso de germinación en comparación con la condición de presencia de fuente nitrogenada y alta concentración de Glc (6%). Por lo tanto, la ausencia de la fuente nitrogenada es capaz de modificar y determinar la sensibilidad a Glc en las plantas tanto en la etapa de germinación como en etapas post-germinativas.

Por otra parte, en un experimento preliminar hecho por Elizabeth Córdoba en nuestro laboratorio se evaluó si las mutantes insensibles a Glc también eran insensibles a la señalización activada por nitrato (NO_3). El nitrato es la fuente de N más importante en el suelo y su disponibilidad controla el crecimiento y desarrollo de las plantas. A este nivel existe una interacción antagonista entre el NO_3 y el azúcar en la regulación del desarrollo de raíces laterales. La presencia de niveles altos de NO_3 (10 a 50 mM) inhibe el desarrollo de raíces laterales, modificando así la morfología de la raíz (Coruzzi y Bush, 2001; Coruzzi y Zhou, 2001; Foyer *et al.*, 2003; López-Bucio *et al.*, 2003; Paul y Pellny, 2003). Los efectos inhibitorios de altos niveles de NO_3 se reducen significativamente cuando se aumentan los niveles de Sac (Zhang y Forde, 2000). Este antagonismo C/N indudablemente requiere de la detección del estatus de C y N en la planta, por lo que se exploró la posibilidad de que las mutantes *gin* tuviesen afectada la detección de NO_3 , evaluando la inhibición de la longitud y desarrollo de raíces laterales en presencia de concentraciones inhibitorias de esta sal. Las mutantes *gin1/aba2*, *gin6/abi4*, *gin8/nced3?*, *gin9/abi5*, *gin10* y *gin11* resultaron insensibles a la señal de NO_3 . Estos resultados coinciden con los obtenidos en un análisis reciente enfocado a la relación del ABA con la señalización del NO_3 , en el que se demostró que las mutantes *abi4* y *abi5* (pero no *abi1*, *abi2* ni *abi3*) así como en las mutantes *aba1*, *aba2* y *aba3* son insensibles al efecto inhibitorio del NO_3 en el desarrollo de raíces laterales (Signora *et al.*, 2001). Estos fenotipos indican que el efecto inhibitorio del NO_3 requiere de la síntesis de ABA y de una rama de la señalización de esta hormona tal como sucede en la señalización

de azúcares (este trabajo en Arenas *et al.*, 2000). Esto sugiere que tanto la señalización de azúcar como la señalización del NO_3^- y ABA podrían compartir elementos en común, constituyendo dichos elementos puntos de contacto entre ambas vías. Sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que las mutantes insensibles a NO_3^- acumulen mayores niveles de azúcares internos que antagonicen el efecto del NO_3^- . Además, el hecho de que las mutantes *gin10* y *gin11*, que no parecen estar afectadas ni en la biosíntesis ni en la señalización de ABA, también afecten la señalización de NO_3^- , podría sugerir que independientemente del ABA, se requiere de la detección y señalización funcional de los azúcares, durante la respuesta a NO_3^- .

El análisis de otras mutantes afectadas en las respuestas a azúcares, también ha evidenciado la estrecha interacción entre las señales de N y azúcares. Se ha reportado que el promotor de la patatina en la construcción *Pat(B33)::GUS* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* se activa principalmente en la raíz, y también se activa por azúcares y por los aminoácidos Gln y Pro. Se ha sugerido que la prolina puede servir como una fuente de N y C de disposición inmediata durante la recuperación de estrés. Después de la mutagénesis química de dichas líneas transgénicas se aislaron varias mutantes *rsr* (“*reduced sugar response*”). En la mutante *rsr1-1* ni el azúcar ni la Pro son capaces de inducir el promotor de patatina. Esta mutante en señalización de azúcar también es hipersensible incluso a bajos niveles de Pro, lo que sugirió una estrecha intercomunicación entre dichas vías (Hellmann *et al.*, 2000).

Finalmente, la floración también está controlada por NO_3^- además de los azúcares. Especialmente en condiciones de días cortos, tanto la Glc como el NO_3^- en altas concentraciones retrasan el momento de la floración. Este efecto no parece ser tan notorio en condiciones de días largos (Loef *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1998; Ohto *et al.*, 2001). Ohto *et al.* (1999) han aislado mutantes con anomalías en el tiempo de floración y alteraciones en las respuestas a azúcar (mutantes *uns* “*unusual sugar responses*”). Entre ellas, *uns2*, *uns3* y *uns4* florecen antes que la planta silvestre en tierra bajo condiciones de días largos. Además, la expresión de los genes inducibles por azúcar *Atβ-Amy* y *CHS* así como la actividad de la β-amilasa y la acumulación de antocianinas y clorofilas también está afectada en estas mutantes. La clonación de *UNS2* reveló que codifica para el gen *HLS1*, un gen de respuesta a etileno (Ohto *et al.*, 2000). Estos fenotipos indican que esta hormona está implicada en la floración además de la respuesta a azúcar, lo que concuerda con el fenotipo de la mutante insensible a Glc *gin1*, la cual no retrasa la floración en respuesta a Glc ni en días cortos ni en días largos (Zhou *et al.*, 1998). El análisis de las respuestas a NO_3^- tanto a nivel de la raíz como a nivel de la floración en estas mutantes podría dar luz de la interrelación de estas vías, donde al menos respecto al tiempo de floración, los azúcares no parecen tener una función antagonista con el NO_3^- .

V.9 Efecto diferencial de los azúcares en las distintas etapas de desarrollo de las plantas

Resulta interesante que las mutantes *gin1*, *gin5*, *gin6*, *gin7* y *gin8*, que fueron aisladas como insensibles a Glc durante el desarrollo temprano, no se comporten siempre como insensibles durante otros procesos de desarrollo regulados por Glc. Por ejemplo, *gin6*, *gin7* y *gin8* no son insensibles a niveles altos de Glc durante la germinación. Esto coincide con los resultados obtenidos en un reporte reciente, donde se evaluó la sensibilidad a Glc de *abi4* y *gin2/hxk1* exclusivamente durante tal proceso y dichas mutantes no están afectadas (Price *et al.*, 2003). Así mismo, *abi5* al igual que *abi4*, no afecta la sensibilidad a Glc durante la germinación; lo cual revela que una vía de señalización de Glc diferente a la mediada por HXK1, ABI4 y ABI5 está activa durante la germinación (Dekkers *et al.*, 2004). *gin6* y *gin8* tampoco son insensibles a la inducción de la formación de raíces laterales activada por Sac como sucede con *gin7*, la cual fue insensible en este proceso de desarrollo. Otro proceso de desarrollo afectado por el azúcar es la transición floral, durante este proceso las mutantes *gin1* y *gin8* fueron insensibles a niveles altos de Glc, en cambio *gin6* y *gin7* se comportan como hipersensibles.

A nivel de la expresión génica, las señales de desarrollo también juegan un papel determinante en la expresión de los genes regulados por Glc. Por ejemplo se observó que el gen *ABI4* responde a Glc, 2DG y ABA solamente dentro de una ventana de tiempo durante el desarrollo temprano de *Arabidopsis* (este trabajo en Arroyo *et al.*, 2003). Este hecho correlaciona con la susceptibilidad de la planta de detener su desarrollo en respuesta a altas concentraciones de Glc, pues cuando este azúcar se adiciona en etapas más tardías (después de 3 días), las plantas ya no detienen su desarrollo (Gibson *et al.*, 2001). En el caso de *CTR1*, el patrón de respuesta a Glc cambia durante el desarrollo de la planta. Con base en estas observaciones se concluyó que la regulación por Glc de los transcritos de *ABI4* y *CTR1* es dependiente de la etapa de desarrollo de la planta, a diferencia de *ABI5* el cual mantiene la capacidad inducción a nivel transcripcional aún en etapas más tardías (este trabajo en Arroyo *et al.*, 2003; Brocard *et al.*, 2002).

Estas evidencias indican que hay un efecto diferencial de los azúcares en las distintas etapas de desarrollo de las plantas, lo que sugiere la participación de diferentes vías o mecanismos de señalización de los azúcares durante las diferentes etapas de desarrollo de la planta, que incluso podrían depender de la especie vegetal. Por estas razones es indispensable diseñar estrategias de selección que permitan conocer los componentes de las vías señalizadoras específicas de cada etapa de desarrollo, desde la germinación hasta la senescencia, y extenderlas a diferentes especies vegetales para así tener una idea integrada de la regulación y detección de azúcares en las plantas.

V.10 Comentario final

En resumen, la fitohormona ABA es una molécula esencial para la detección de Glc y los factores transcripcionales ABI4 y ABI5 forman parte de la cascada de transducción en respuesta a Glc. ABI4, ABI5 y CTR1 podrían estar integrando una serie de señales provenientes del azúcar a través de la interacción con otros componentes específicos dependiendo del estado metabólico, el momento en el desarrollo y las condiciones ambientales. Estos elementos podrían estar sometidos a distintos niveles de regulación incluyendo los niveles de transcrito, ya sea modulando la tasa de transcripción o la estabilidad del RNAm, y claro está a nivel postraduccional. A pesar de que antes se creía que el nivel de regulación más utilizado en respuesta a azúcar era el transcripcional, cada vez hay más evidencias de que los niveles de regulación postranscripcionales son muy socorridos en tal respuesta (Rolland *et al*, 2002; Yu, 1999). Por ello es indispensable determinar si los cambios a nivel de acumulación del RNAm observados en este trabajo, también se reflejan al menos a nivel de la abundancia de la proteína.

Toda esta serie de elementos nos lleva a concluir que la mayoría de los genes de las plantas superiores que responden a señales metabólicas, también son regulados por otras señales ambientales; de tal manera que todas las respuestas a azúcar pueden ser modificadas por su contexto ambiental. La contribución relativa de cada una de estas señales cambia de acuerdo a la etapa de desarrollo y el estado energético de la planta. Esto requiere de una red regulatoria compleja, en lugar de acciones jerárquicas como hasta hace poco tiempo se asumía, en la cual genes específicos están respondiendo a múltiples señales a través de "cross-talks" entre las diferentes vías señalización. Cada vez es más evidente que las respuestas a azúcares y a otras señales comparten componentes señalizadores en común, los cuales podrían interactuar y controlar respuestas específicas. Dicha intercomunicación permite integrar estímulos internos y externos, resultando en respuestas eficientes e integrales.

VI CONCLUSIONES.

Señalización activada por Glc

1. La caracterización de las primeras mutantes aisladas en este trabajo permitió identificar a la fitohormona ABA como una molécula esencial para la detección de Glc por una vía dependiente de HXK.
2. Los niveles de ABA aumentan en respuesta a Glc, y este aumento está afectado en las mutantes *gin1*, *gin5* y *gin8*, las cuales son deficientes en la biosíntesis de ABA.
3. ABI4 y ABI5 además de su participación previamente reportada en la señalización del ABA durante la germinación de las semillas, también juegan un papel esencial en la respuesta a Glc durante el desarrollo vegetativo temprano.
4. Las vías de señalización de Glc y de ABA comparten solamente parte de sus componentes, entre ellos ABI4 y ABI5.
5. La transducción de señales de azúcar en plantas está íntimamente ligada con ABA y con otros procesos afectados por esta hormona, tales como el estrés osmótico y la señalización de etileno.
6. A pesar de que el ABA es necesario para la señalización de Glc y para la respuesta de *ABI4*, *ABI5* y *CTR1*, la señal de ABA por sí sola no es suficiente para regular la expresión de estos genes. Esto indica que la señalización de Glc requiere de otros elementos aún no identificados, que aunados al ABA determinan la sensibilidad de la planta al azúcar.
7. La proteína ABI4 es un activador transcripcional fuerte en el sistema de levadura.

Regulación de la expresión génica por Glc

8. La señal de Glc es capaz de modular el nivel de transcrito de algunos de sus propios componentes señalizadores, sugiriendo la existencia de una retroalimentación positiva de la vía.
9. *ABI4*, *ABI5* y *CTR1* están finamente regulados durante el desarrollo de la planta por una variedad de señales incluyendo Glc, estrés osmótico y ABA.

10. A pesar de que la acumulación de mensajero de estos genes esta sujeta a una regulación de por múltiples factores, los análisis presentados en este trabajo permiten concluir que la Glc tiene un papel específico sobre el patrón de acumulación de dichos mensajeros. Este efecto es claramente diferenciable del efecto osmótico que produce la Glc.
11. La regulación por Glc de los transcritos de *ABI4* y *CTR1* es dependiente de la etapa de desarrollo de la planta, a diferencia de *ABI5* el cual mantiene su capacidad de inducción a nivel transcripcional aún en etapas tardías. Este hecho plantea la posibilidad de que diferentes moléculas señalizadoras del azúcar estén actuando simultáneamente en diferentes tejidos y etapas de desarrollo de la planta.
12. La inducción de *ABI4* y *ABI5* en respuesta a Glc depende al menos en parte de la fosforilación de la Glc.
13. La modulación por Glc de *ABI4*, *ABI5* y *CTR1* es independiente del bloqueo del desarrollo causado por las concentraciones altas de Glc.
14. La regulación por Glc de *ABI4* y *ABI5* está afectada en mutantes con fenotipo *gin*, a excepción de *gin7* donde la regulación de *ABI5* no parece estar afectada.
15. La regulación por Glc de algunos genes de respuesta a azúcar está afectada en las mutantes *gin5*, *gin6*, *gin7* y *gin8*, incluyendo genes de respuesta tanto positiva (*PAL1*) como negativa (*CAB1*, *PC*).
16. Los genes *TPS1* y *DREB2* que se sabe que se inducen en respuesta a estrés por sequía (un tipo de estrés osmótico), se reprimen en respuesta a Glc de forma aparentemente independiente de ABA. Además estos dos genes responden a una señal específica derivada de la glucosa que es independiente del estrés osmótico.
17. La regulación por Glc de los genes *TPS1* y *DREB2* así como de *COR15A* y *P5CS1*, depende al menos en parte de *ABI4/GIN6* y de *GIN7*.

Aspectos fisiológicos de las respuestas a Glc

18. La ausencia de la fuente nitrogenada es capaz de modificar y determinar la sensibilidad a Glc en las plantas tanto en la etapa de germinación como en etapas postgerminativas.

19. Los azúcares tienen un efecto diferencial en los distintos procesos de desarrollo de las plantas, lo que sugiere la participación de diferentes vías o mecanismos de señalización de los azúcares durante las diferentes etapas de desarrollo de la planta.
20. Se requiere ABA durante el proceso de transición floral en presencia de concentraciones altas de Glc.
21. Las mutantes con fenotipo *gin* son osmotolerantes y resistentes a condiciones salinas, independientemente de si están afectadas o no en la biosíntesis o señalización de ABA.
22. Las mutantes *gin1*, *gin6/abi4* y *gin9/abi5* son resistentes a 2DG (0.8 a 2 mM) en el medio de crecimiento, lo que apoya fuertemente la idea de que los genes *GIN1/ABA2*, *ABI4/GIN6* y *ABI5* participan en la vía de detección de Glc mediada por HXK de forma independiente del efecto osmótico.
23. Ninguna de las nuevas mutantes *gin* analizadas hasta el momento parece afectar ni la señalización ni la biosíntesis de ABA.
24. Las nuevas mutantes *gin* recuperan la sensibilidad a Glc en presencia de ABA 100 nM, lo que indica que esta hormona es esencial para la señalización de Glc, y que probablemente la participación de ABA no es separable de este proceso, al menos durante la germinación y el desarrollo temprano de la planta.
25. Se requiere de la detección y señalización funcional de los azúcares, durante la respuesta a NO_3^- , pues las mutantes insensibles a Glc también son insensibles a la señalización activada por nitrato independientemente del ABA.

VII PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas importantes derivadas de este proyecto, podemos mencionar algunas como:

SEÑALIZACIÓN ACTIVADA POR GLUCOSA:

- * Identificación de los genes mutados en otras mutantes de la colección generada en este trabajo.
- * Determinar la sensibilidad a Glc en diferentes procesos de desarrollo de las mutantes *gin*.
- * Búsqueda de supresores del fenotipo insensible a Glc en *abi4*, *abi5* y *ctr1* y de otras mutantes con fenotipo *gin* no relacionadas con ABA ni con etileno .
- * Aislamiento y caracterización de complejos proteicos que medien la señalización y respuesta a azúcares (proteínas de interacción con ABI4 y ABI5).
- * Determinar si en respuesta a azúcares, tanto ABI4 como ABI5, utilizan un mecanismo de proteólisis y/o estabilización dependiente de proteasoma.

FISIOLOGÍA DE LA RELACIÓN C/N:

- * Utilización de las mutantes *gin* como herramienta para estudiar la relación C/N (determinar si afectan la señalización de nitrógeno).
- * Montaje de condiciones fisiológicas de C/N que permitan la selección de mutantes en la detección de Glc.

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA REGULACIÓN DE AZÚCARES:

- * Perfiles proteómicos y metabolómicos de las plantas silvestres vs. mutantes tratadas sin y con Glc.
- * Análisis de la distribución de los azúcares en las mutantes vs. plantas silvestres en respuesta a determinados estímulos (por espectroscopía por Resonancia Magnética Nuclear o histografía de alta resolución).
- * El uso de nuevas moléculas reporteras basadas en derivados modificados de Glc y Sac, podría aportar información importante del transporte por el floema, el mecanismo de descarga del floema, la distribución, localización y destino de los azúcares, así como la localización de los transportadores y sensores del estado de azúcar en las células.
- * Determinar si la osmotolerancia de las mutantes *gin* se debe a la acumulación de azúcares.
- * Evaluación de la eficiencia fotosintética de las mutantes en altas concentraciones de CO₂: la fuente carbonada sustrato de la fotosíntesis.

BIOTECNOLOGÍA:

- * Y a largo plazo: Aumentar la eficiencia fotosintética y la resistencia a estrés hídrico y salino de cultivos importantes mediante la manipulación de las señales de azúcar y sus vías de señalización.

DESPUÉS DE TODO, LAS PLANTAS DOMINAN CADA RINCÓN Y CADA PAISAJE DEL
PLANETA.

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K. 1997. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9:1859-1868.
- Adams V, Griffin L, Towbin J, Gelb B, Worley K, McCabe ER. 1991. Porin interaction with hexokinase and glycerol kinase: Metabolic microcompartmentation at the outer mitochondrial membrane *Biochem. Med. Metab. Biol.* 45:271-291.
- Arenas F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P. 2000. Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Gen. Dev.* 14(16):2085-2096.
- Alderson A, Sabelli PA, Dickinson JR, Cole D, Richardson M, Kreis M, Shewry PR, Halford NG. 1991. Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8602-8605.
- Alms GR, Sanz P, Carlson M, Haystead TA. 1999. Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in *Saccharomyces cerevisiae*: Characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. *EMBO J.* 18:4157-4168.
- Aon MA, Cortassa S. 1998. Catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show altered fermentative metabolism as well as cell cycle behavior in glucose-limited chemostat cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 59(2):203-213.
- 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.
- Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA. 1997. T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth. *Trends Genet.* 13(4):152-156.
- Bachmair A, Novatchkova M, Potuschak T, Eisenhaber F. 2001. Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-traslational modification. *Trends Plant Sci.* 6:463-470.
- Bachmann M, Huber JL, Liao PC, Gage DA, Huber SC. 1996. The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Lett.* 387:127-131.
- Baier M, Hemmann G, Holman R, Corke F, Card R, Smith C, Rook F, Bevan MW. 2004. Characterization of mutants in Arabidopsis showing increased sugar-specific gene expression, growth, and developmental responses. *Plant Physiol.* 134:81-91.
- Ballard LAT, Wildman SG. 1964. Induction of mitosis by sucrose in excised and attached dormant buds of sunflower *Helianthus ammuus* L. *Aust. J. Biol. Sci.* 17:36-43.
- Ballicora MA, Frueauf JB, Fu Y, Schurmann P, Preiss J. 2000. Activation of the potato tuber ADP glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 275:1315-1320.
- Barker LDP, Templeton MD, Ferguson IB. 1998. A 67-kDa plasma membrane-bound Ca^{2+} -stimulated protein kinase active in sink tissue of higher plants. *Planta* 205:197-204.
- Barker L, Kuhn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Wrd J, Frommer W. 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12:1153-64.
- Barnes SA, Nishizawa NK, Quaggio RB, Whitelam GC, Chua N-H. 1996. Far-red light blocks greening of Arabidopsis seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *Plant Cell.* 8:601-615.
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12:1103-1115.
- Bell G, Pilkins S, Weber I, Polonsky K. 1996. Glucokinase mutations, insulin secretion and Diabetes mellitus. *Ann. Rev. Physiology.* 58:171-86.
- BeltrándelRio H, Wilson JE. 1992a. Coordinated regulation of cerebral glycolytic and oxidative metabolism, mediated by mitochondrially bound hexokinase dependent on intramitochondrially generated ATP. *Arch. Biochem. Biophys.* 296:116-124.
- BeltrándelRio H, Wilson JE. 1992b. Interaction of mitochondrially bound rat brain hexokinase with intramitochondrial compartments of ATP generated by oxidative phosphorylation and creatine kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 296:116-124.
- Benier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A and Lejeune P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5:1147-1155.
- Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T, Giraudat J, Parcy F. 2004. Analysis of an activated *ABI5* allele using a new selection method for

- transgenic *Arabidopsis* seeds. FEBS Letters 561:127-131.
- Bernard F, Andre B. 2001. Ubiquitin and the SCF^{Grr1} ubiquitin ligase complex are involved in the signaling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters. 496:81-85.
- Bhalerao RP, Salchert K, Bako L, Okresz L, Szabados L, Muranaka T, Machida Y, Schell J, Koncz C. 1999. Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5322-5327.
- Bihn EA, Paul AL, Wang SW, Erdos GW, Ferl RJ. 1997. Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of Arabidopsis and maize. The Plant J. 12:1439-1445.
- Bittner F, Oreb M, Mendel RR. 2001. ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 276(44):40381-40384.
- Bohnert H, Sheveleva E. 1998. Plant stress adaptations – making metabolism move. Curr. Op. Plant Biol. 1:267-274.
- Bonini BM, Van Vaeck C, Larsson C, Gustaffson L, Ma P, Winderickx J, Van Dick P, Thevelein JM. (2000). Expression of *Escherichia coli otsA* in a *Saccharomyces tps1* mutant restores trehalose 6-phosphate levels and partly restores growth and fermentation with glucose and control of glucose influx into glycolysis. Biochem. J. 350:261-268.
- Booij PP, Roberts MR, Vogelzang SA, Kraayenhof R, de Boer AH. 1999. 14-3-3 proteins double the number of outward-rectifying K⁺ channels available for activation in tomato cells. Plant J. 20:673-683.
- Borisjuk L, Weber H, Panitz R, Mantueuffel R, Wobus U. 1995. Embryogenesis in *Vicia faba* L.: Histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis. J Plant Physiol. 147:203-208.
- Borisjuk L, Walenta S, Weber H, Müller-Klieser W, Wobus U. 1998. High resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. Plant J. 15:583-91.
- Bouly JP, Gissot L, Lessard P, Kreis M, Thomas M. 1999. *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINα1, an SNF1-like protein kinase. Plant J. 18:541-550.
- Boxal S, Martin T, Graham I. 1996. A new class of *Arabidopsis thaliana* mutant that is carbohydrate-insensitive. 7th Int. Conf. on Arabidopsis Res. Abstract S96.
- Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR. 2002. Regulation and role of the Arabidopsis *Abscisic acid-insensitive 5* gene in abscisic acid, sugar, and stress response. Plant Physiol. 129:1533-1543.
- Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR. 2003. Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling. Plant Physiol. 131:78-92.
- Bunney TD, van Walraven HS, de Boer AH. 2001. 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. PNAS, USA 98:4249-4254.
- Bustos MM, Iyer M, Gagliardi SJ. 1998. Induction of a β-phaseolin promoter by exogenous abscisic acid in tobacco: developmental regulation and modulation by external sucrose and Ca²⁺ ions. Plant Mol. Biol. 37(2):265-274.
- Camoni L, Harper JF, Palmgren MG. 1998. 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). FEBS Letters 430:381-384.
- Carlson M. 1998. Regulation of glucose utilization in yeast. Curr. Opin. Genet. Dev. 8:560-564.
- Chan M-T, Yu S-M. 1998a. The 3' untranslated region of a rice α-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6543-6547.
- Chan M-T, Yu S-M. 1998b. The 3' untranslated region of a rice α-amylase gene mediates sugar-dependent abundance of mRNA. Plant J. 15:685-695.
- Cheng WH, Taliencio EW, Chourey PS. 1999. Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96(18):10512-17.
- Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen H-C, Arroyo A, León P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T, Sheen J. 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and Abscisic acid biosynthesis and functions. Plant Cell 14:2723-2743.
- Cheng L, Fedoroff N. 2000. A mutation on the Arabidopsis *HYL1* gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin and cytokinin. Plant Cell 12:2351-2365.
- Chikano, H, Taliencio EW, Ikeda Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. 2001. Two novel genes encoding SNF-1 related protein kinases from

- Arabidopsis thaliana*: Differential accumulation of AtSR1 and AtSR2 transcripts in response to cytokinins and sugars, and phosphorylation of sucrose synthase by AtSR2. *Mol. Gen. Genet.* 264:674-681.
- Chiou T-J, Bush D. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *PNAS* 95:4784-4788.
- Comparot S, Lingiah G, Martin T. 2003. Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 54(382):595-604.
- Conley T, Peng H-P, Shih M-C. 1999. Mutations affecting induction of glycolytic and fermentative genes during germination and environmental stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 119:599-607.
- Corbesier L, Lejeune P, Bernier G. 1998. The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206:131-137.
- Cortés S, Gromova M, Evrard A, Roby C, Heyraud A, Rolin DB, Raymond P, Brouquisse RM. 2003. In plants, 3-O-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiol.* 131:824-837.
- Coruzzi GM, Brenner E, Chiu J, Kouranov A, Lancien M, Martinez N, Shin M. 2000. Amino acid sensing and signaling in *Arabidopsis*. Symposium "Signals, sensing and plant primary metabolism"
- Coruzzi GM, Zhou L. 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging "matrix effects". *Curr. Op. Plant Biol.* 4:247-253.
- Coruzzi GM, Bush DR. 2001. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiol.* 125:61-64.
- Cotelle V, Meek SEM, Provan F, Milne FC, Morrice N, MacKintosh C. 2000. 14-3-3 regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells. *EMBO J.* 19:2869-2876.
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell Wistrom C. 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242:1-10.
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D. 1999. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11: 1253-1266.
- Dallaporta M, Perrin J and Orsini JC. 2000. Involvement of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in glucose-sensing in rat solitary tract nucleus. *Neurosci. Lett.* 278(1-2):77-80.
- da-Silva WS, Rezende GL, Galina A. 2001. Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: Implications for hexose phosphorylation. *J. Exp. Bot.* 52:1191-1201.
- De Bellis L, Ismail I, Reynolds S, Barrett M, Smith S. 1997. Distinct cis-acting sequences are required for the germination and sugar responses of the cucumber isocitrate lyase gene. *Gene* 197:375-378.
- de Bruxelles GL, Peacock WJ, Dennis ES, Dolferus R. 1996. Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 111:381-391.
- De Jager SM, Menges M, Bauer U-M, Murray JAH. 2001. *Arabidopsis* E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene *AtCDC6* and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Mol. Biol.* 47:555-568.
- Déjardin A, Sokolov LN, Kleczkowski LA. 1999. Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem. J.* 344:503-509.
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM. 2004. Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218:579-588.
- De Veylder L, de Alameda Engler J, Burssens S, Manevsky A, Lescure B, Van Montagu M, Engler G, Inzé D. 1999. A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta* 208(4):453-462.
- DeWald DB, Sadka A, Mullet JE. 1994. Sucrose modulation of soybean *Vsp* gene expression is inhibited by auxin. *Plant Physiol.* 104:439-444.
- De Winder j, Crauwels M, Hohmann S, Thevelein J, Winderickx J. 1996. Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur. J Biochem.* 241:633-643.
- Dickinson C, Altabella T, Chrispeels MJ. 1991. Slow-growth phenotype of transgenic tomato expressing apoplastic invertase. *Plant Physiol.* 95:420-425.
- Dickinson JR, Cole D, Halford NG. 1999. A cell cycle role for a plant sucrose nonfermenting-1-related protein kinase (SnRK1) is indicated by expression in yeast. *Plant Growth Regulation* 28:169-174.

- Diez-Sampedro A, Hirayama BA, Osswald C, Gorboulev V, Baumgarten K, Volk C, Wright EM, Koepsell H. 2003. A glucose sensor hiding in a family of transporters. *PNAS*. 100 (20):11753-11758.
- Di Fiore PP, Polo S, Hofmann K. 2003. When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4(6):491-7.
- Dijkwel P, Huijser C, Weisbeek P, Chua N-M, Smeeckens J. 1997. Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9:583-595.
- Donggiun K, Laby R, Gibson S. 1998. Regulation of sugar responses and characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced β -amylase activity. 9th Int. Conf. Arab. Res. Abstract 090.
- Duwenig E, Steup M, Kossmann J. 1997. Induction of genes encoding plastidic phosphorylase from spinach (*Spinacia oleracea* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.) by exogenously supplied carbohydrates in excised leaf discs. *Planta*. 203(1):111-20.
- Dynesen J, Smits HP, Olsson L, Nielsen J. 1998. Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose and mannose. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 50(5):579-82.
- Eastmond PJ, Li Y, Graham IA. 2003. Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants? *J Exp. Bot*. 54(382):533-537.
- Eastmond PJ, Graham IA. 2003. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Curr. Op. Plant Biol*. 6:231-235.
- 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.
- Entian K-D, Barnett JA. 1992. Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *TIBS* 17:506-510.
- Farras R, Rerrando A, Jasik J, Kleinow T, Okresz L, Tiburcio A, Salchert K, del Pozo C, Schell J, Koncz C. 2001. SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J*. 20:2742-2756.
- Farrelly C, Brown KS, Tieman A, Ren J, Lira SA, Hagan D, Gregg R, Mookhtiar KA, Hariharan N. 1999. Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: A sequestration mechanism in metabolic regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:14511-14516.
- Fernie AR, Roessner U, Geigenberg P. 2001. The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. *Plant Physiol*. 125:1967-1977.
- Ferrando A, Koncz-Kalman Z, Farras R, Tiburcio A, Schell J, Koncz C. 2001. Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labelling in plants cells. *Nucleic Acid Res*. 29:3685-3693.
- Finkelstein RR. 1994. Mutations at two new *Arabidopsis* response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J*. 5(6):765-771.
- Finkelstein RR, Lynch TJ. 2000. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*. 12(4):599-609.
- Finkelstein RR, Sodeman E, Brocard I, Lynch TJ. 2000. Genetic interactions among a network of transcription factors regulating seed development and ABA response. 11th Int. Conf. Arab. Res. Abstract 211.
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM. 1998. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*. 10(6):1043-54.
- Finnemann J, Schjoerring JK. 2000. Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant J*. 24:171-181.
- Freixes S, Thibaud M-C, Tardieu E, Muller B. 2002. Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant, Cell Environment*. 25:1357-1366.
- Fritzius T, Aeschbacher R, Weimken A, Wingler A. 2001. Induction of *ApL3* expression by trehalose complements the starch-deficient *Arabidopsis* mutant *adg2-1* lacking ApL1, the large subunit of ADP-glucose pyrophosphoryles. *Plant Physiol*. 126:883-889.
- Fowler MR, Eyre S, Scott NW, Slater A, Elliot MC. 1998. The plant cell cycle in context. *Mol. Biotechnol*. 10:123-153.
- Fox T, Green B, Kennedy R, Rumpho M. 1998. Changes in Hexokinase activity in *Echinochloa crus-gabonis* in response to abiotic stress. *Plant Physiol*. 118:1403-1409.
- Foyer CH, Parry M, Noctor G. 2003. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J. Exp. Bot*. 54(382):585-593.
- Fu H, Kim SY, Park WD. 1995. High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *SUS4* sucrose synthase gene required 5' and 3'

- flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell*. 7:1387-1394.
- Fujiki Y, Ito M, Nishida I, Watanabe A. 2000. Multiple signaling pathways in gene expression during sugar starvation. Pharmacological analysis of *din* gene expression in suspension-cultured cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 124:1139-1147.
- Galina A, da-Silva WS. 2000. Hexokinase activity alters sugar-nucleotide formation in maize root homogenates. *Phytochemistry* 53:29-37.
- Galina A, Reis M, Albuquerque M, Puyou A, Puyou MT, Meis L. 1995. Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinase in maize roots. *Biochem. J.* 309:105-112.
- Galina A, Logullo C, Souza EF, Rezende GL, da-Silva WS. 1999. Sugar phosphorylation modulates ADP inhibition of maize mitochondrial hexokinase. *Physiol. Plant*. 105:17-23.
- Gaubier P, Raynal M, Hull G, Huestis GM, Grellet F, Arenas C, Pages M, Delseny M. 1993. Two different *Em*-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Mol. Gen Genet.* 238:409-418.
- Gaudin V, Lunness PA, Fobert PR, Towers M, Riou-Khamlichi C, Murray JAH, Coen E, Doonan JH. 2000. The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the *Cyctoidea* gene. *Plant Physiol*. 122:1137-1148.
- Gancedo JM. 1998. Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(2):334-361.
- Geiger M, Stitt M, Geigenberg P. 1998. Metabolism on slices from growing potato tubers responds differently to addition of sucrose and glucose. *Planta* 206:234-244.
- Genoud T, Méxtraux J-P. 1999. Crosstalk in plant cell signalling: structure and function of the genetic network. *Trends in Plant Science* 4(12):503-7.
- Ghannoum O, von Caemmerer S, Barlow EWR, Conroy JP. 1997. The effect of CO₂ enrichment and irradiance on the growth, morphology and gas exchange of a C3 (*Panicum laxum*) and a C4 (*Panicum antidotale*) grass. *Aust J Plant Physiol*. 24:227-237.
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P. 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:1117-1126.
- Gibson S, Laby R, Zhang C, Kim D. 1998. Regulation of sugar responses and carbon flux in *Arabidopsis*. 9th Int. Conf. Arab. Res. Abstract 080.
- Gibson SI, Graham IA. 1999. Another player joins the complex field of sugar-regulated gene expression in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 4746-4748.
- Gibson SI, Laby RJ, Kim D. 2001. The *sugar-insensitive1 (sis1)* mutante of *Arabidopsis* is allelic to *ctrl*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:196-203.
- Giese J, Ruten T, Herbers K, Sonnewald U. 2000. Molecular characterization of the hexokinase gene family in *Nicotiana tabacum*. Symposium "Signals, sensing and plant primay metabolism".
- Gilbert G, Wilson C, Madore M. 1997. Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in coleus. *Plant Physiol*. 114:1267-1276.
- Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF. 2000. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol*. 124:1854-1865.
- Girard J, Ferre P, Foufelle F. 1997. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Ann. Rev Nutr* 17:325-52.
- Goddijn O, Smeekens S. 1998. Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J.* 14:143-146.
- Goddijn OJ, van Dun K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Sci.* 4:315-319.
- Goetz M, Godt DE, Roitsch T. 2000. Tissue-specific induction of the mRNA for an extracellular invertase isoenzyme of tomato by brassinosteroids suggests a role for steroid hormones in assimilate partitioning. *Plant J.* 22(6):515-522.
- Gómez-Cadenas A, Verhey SD, Holappa LD, Shen Q, Ho THD, Walker-Simmons MK. 1999. An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-supressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1767-1772.
- Gómez-Cadenas A, Mehouchi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M. 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta* 210(4):636-643.
- Gómez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons MK, Ho THD. 2001. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: Site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* 13:667-679.

- Gong D, Gong Z, Guo Y, Chen X, Zhu J-K. 2002. Biochemical and functional characterization of PKS11, a novel *Arabidopsis* protein kinase. *J Biol. Chem.* 277(31):28340-28350.
- González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodríguez PL. 2002. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* 14:1833-1846.
- Gonzali S, Pistelli L, Alpi A, De Bellis L. 2001. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* fructokinases by non-denaturing electrophoresis. *Plant Science* 160:1107-1114.
- Graf T. 1992. Myb: a transcriptional activator linking proliferation and differentiation in hematopoietic cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:249-255.
- Graham IA. 1996. Carbohydrate control of gene expression in higher plants. *Res. Microbiol.* 147:572-580.
- Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ. 1994. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *Plant Cell* 6:761-772.
- Granot D, Dai N, Matsevitz T, German M, Hanael R, Petreikov M, Schaffer AA. 2000. Modulation of fructokinase activity affects tomato plant growth and development but does not affect sugar sensing mechanism. 6th Int. Cong. Plant Mol. Biol. Abstract S 27-13.
- Grierson C, Du J-S, de Torres ZM, Beggs K, Smith C, Holdsworth M, Bevan M. 1994. Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and developmental regulation of potato tuber storage gene. *Plant J.* 5:815-826.
- Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma YH, Bauer M, Stewart TA. 1995. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic β cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* 83:68-78.
- Gucci R, Moing A, Gravano E, Gaudillère J. 1998. Partitioning of photosynthetic carbohydrates in leaves of salt-stressed olive plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 25:571-579.
- Gutierrez C. 1998. The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr. Opin. Plant Sci.* 1:492-497.
- Hadingham SA, Hemman G, Smith TC, Corke F, Holman R, Baier M, Rook F, Bevan MW. 2002. Sugar response mutants with altered expression of the starch biosynthetic gene, *ApL3*. 13th International conference on Arabidopsis research. Abstract 12-04.
- Halford NG, Hardie DG. 1998. SNF1-related protein kinases: Global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol. Biol.* 37:735-748.
- Halford NG, Hey S, Jhurrea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang Y. 2003. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* 54(382): 467-475.
- Halford NG, Purcell P, Hardie DG. 1999. Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trends Plant Sci.* 4:117-120.
- Hall DD, Markwardt DD, Parviz F, Heideman W. 1998. Regulation of the Cln3-Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17:4370-4378.
- Hanson J, Johannesson H, Engstrom P. 2001. Sugar dependent alterations in cotyledon and leaf development in transgenic plants expressing the HDZip gene *ATHB13*. *Plant Mol. Biol.* 45:247-262.
- Hardie DG, Carling D. 1997. The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* 246:259-273.
- Hardie D, Carling D, Carlson M. 1998. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eucariotic cell? *Ann. Rev. Biochem.* 67:821-855.
- Hare P, Cress W, van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21:535-554.
- Hark C, Myung J, Sook S, Ran S, Ryol J. 2000. Presence of multiple cDNAs encoding an isoform of ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit from sweet potato and characterization of expression levels. *Plant Cell Physiol.* 41: 1235-1242.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 51:463-499.
- 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.
- Hayashi H, Alia Mustardy L, Deshniem P, Ida M, Murata N. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* 12:133-142.
- Heikkinen S, Suppola S, Malkki M, Deeb S, Janne J, Laakso M. 2000. Mouse hexokinase II gene: structure, cDNA, promoter analysis, and expression pattern. *Mammalian Genome* 11:91-96.

- Heins L, Froberg C, Gatz C. 1992. The Tn10-encoded Tet repressor blocks early but not late steps of assembly of the RNA polymerase II initiation complex *in vivo*. *Mol. Gen. Genet.* 232:328-331.
- Heitz T, Gioffroy P, Friting B, Legrand M. 1991. Two apoplastic α -amylases are induced in tobacco by virus infection. *Plant Physiol.* 97: 651-656.
- Hellmann H, Funck D, Rentsch D, Frommer W. 2000. Hypersensitivity of an Arabidopsis sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiol.* 123:779-790.
- Hemerly AS, Ferreira P, Engler JA, Van Montagu M, Engler G, Inzé D. 1995. *cdc2* expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division. *Plant Cell.* 7:1711-1723.
- Herbers K, Meuwly P, Métraux J-P, Sonnewald U. 1996a. Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Letters* 397:239-244.
- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Métraux JP, Sonnewald U. 1996b. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8:793-803.
- Herrero P, Martínez CC, Moreno F. 1998. The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes for glucose repression in the *SUC2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 434(1-2):71-76.
- Ho S-L, Chao Y-C, Tong W-F, Yu S-M. 2001. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiol.* 125:877-890.
- Hodges M. 2002. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *J. Exp. Bot.* 53:905-916.
- Hoeren FU, Dolferus R, Wu Y, Peacock WJ, Dennis E. 1998. Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (*ADH1*) by low oxygen. *Genetics* 149:479-490.
- Hohmann S, Winderickx J, de Winde WH, Valckx D, Cabbaert P, Luyten K, Meirsmans CD, Ramos J, Thevelein JM. 1999. Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of *SUC2*. *Microbiology* 145:703-714.
- Hoot LC, Kim D, To JPC, Gibson S. 2000. The sugar-insensitive 2 (*sis2*) mutant germinates in the absence of gibberellin. 11th Int. Conf. Arab. Res. Abstract 404.
- Hoyt MA. 1997. Eliminating all obstacles: regulated proteolysis in the eukaryotic cell cycle. *Cell* 91:149-151.
- Hsieh M-H, Lam H-M, van de Loo FJ, Coruzzi G. 1998. A PII-like protein in Arabidopsis: putative role in nitrogen sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13965-13970.
- Huang N, Sutliff T, Litts J, Rodriguez R. 1990. Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Mol. Biol.* 14:655-668.
- Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeekens S. 2000. The Arabidopsis *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J.* 23(5):577-585.
- Hwang YS, Karrer EE, Thomas BR, Chen L, Rodriguez RL 1998. Three *cis*-elements required for rice α -amylase *Amy3D* expression during sugar starvation. *Plant Mol. Biol.* 36:331-341.
- Hwang YS, Thomas BR, Rodriguez RL 1999. Differential expression of rice α -amylase genes during seedling development under anoxia. *Plant Mol. Biol.* 40:911-920.
- Ikedo Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. 1999. Sucrose and cytokinin modulation of *WPK4*, a gene encoding a SNF1-related protein kinase from wheat. *Plant Physiol.* 121:813-820.
- Ikedo Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. 2000. Specific binding of 14-3-3 protein to autophosphorylated WPK4, an SNF1-related wheat protein kinase, and to WPK4-phosphorylated nitrate reductase. *Journal of Biological Chemistry* 275:31695-31700.
- Ingram J, Chandler J, Gallagher L, Salamini F, Bartels D. 1997. Analysis of cDNA clones encoding Sucrose-Phosphate synthase in relation to sugar interconversions associated with dehydration in Resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant Physiol.* 115:113-121.
- Ishiguro S, Nakamura K. 1992. The nuclear factor SP8BF binds to the 5' upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots. *Plant Mol. Biol.* 18:97-101.
- Ishiguro S, Nakamura K. 1994. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and β -amylase from sweet potato. *Mol. Gen. Genet.* 244:563-571.

- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 27:325-333.
- Iwata Y, Kuriyama M, Nakakita M, Kojima H, Ohto MA, Nakamura K. 1998. Characterization of a calcium-dependent protein kinase of tobacco leaves that is associated with the plasma membrane and is inducible by sucrose. *Plant Cell Physiol.* 39(11):1176-1183.
- Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JDR. 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trend Cell Biol.* 10:429-439.
- Jacobs TW. 1995. Cell cycle control. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:317-339.
- Jacobsen JV, Hanson AD, Chandler PC. 1986. Water stress enhances expression of an α -amylase gene in barley leaves. *Plant Physiol.* 80:350-359.
- Jahn T, Fuglsang AT, Olsson A, Bruntrup IM, Collinge DB, Volkmann D, Sommarin M, Palmgren MG, Larson C. 1997. The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell* 9:1805-1814.
- Jang J-C, Sheen J. 1994. Sugar sensing in Higher plants. *Plant Cell* 6:1665-1679.
- Jang J-C, Sheen J. 1997. Sugar sensing in Higher plants. *TIPS* 2(6):208-214.
- Jang J-C, León P, Zhou L, Sheen J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in Higher plants. *Plant Cell* 9:5-19.
- Jebanathirajah JA, Ferreira F, Coleman JR. 1998. High CO₂ insensitive mutants of *Arabidopsis*. 9th Int. Conf. Arab. Res. Abstract 088.
- Jefferson R, Goldbrough A, Bevan M. 1990. Transcriptional regulation of a patatin-1 gene in potato. *Plant Mol. Biol.* 14:995-1006.
- Jiang R, Carlson M. 1996. Glucose regulated protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes and Development.* 10:3105-3115.
- Jiang R, Carlson M. 1997. The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell Biol.* 17:2099-2106.
- Jitla D, Rogers S, Seneweera A, Basra A, Oldfield R, Conroy J. 1997. Accelerated early growth of rice at elevated CO₂: is it related to developmental changes in shoot apex? *Plant Physiol.* 115:15-22.
- John PLC. 1998. Cytokinin stimulation of cell division: essential signal transduction is via cdc25 phosphatase. *J. Exp. Bot.* 49(Suppl):91
- Johnson JD, Misler D. 2002. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate-sensitive calcium stores initiate insulin signaling in human beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:14566-14571.
- Johnson J, Ogawa A, Chen S, Orci L, Newgard C, Alam T, Unger R. 1990. Underexpression of β cell high Km glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes. *Science* 250:546-549.
- Johnston M. 1999. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.* 15:29-33.
- Kanayama Y, Dai N, Granot D, Petreikov M, Schaffer A, Bennett AB. 1997. Divergent fructokinase genes are differentially expressed in tomato. *Plant Physiol.* 113:1379-1384.
- Kanayama Y, Granot D, Dai N, Petreikov M, Schaffer APowell A, Bennett AB. 1998. Tomato fructokinase exhibit differential expression and substrate regulation. *Plant Physiol.* 117(1):85-90.
- Kang J, Choi H, Im M, Kim SY. 2002. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 14:343-357.
- Kang J, Turano FJ. 2003. The putative glutamate receptor 1.1 (*AtGLR1.1*) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(11):6872-6877.
- Kaul B et al. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815.
- Kawaguchi R, Bailey-Serres J. 2002. Regulation of translational initiation in plants. *Curr. Op. Plant Biol.* 5:460-465.
- Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen Z-P, Witters LA. 1999. Dealing with energy demand: The AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem. Sci.* 24:22-25.
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR. *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72:427-441.
- Kim D-J, Smith SM, Leaver CJ. 1997. A cDNA encoding a putative SPF1-type DNA-binding protein from cucumber. *Gene* 185:265-269.
- Kim D, Laby R, Gibson S. 1998. Regulation of sugar responses and characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced beta-amylase activity. 9th Int. Conf. Arab. Res. Abstract 090.

- Kim K-N, Gultinan MJ. 1999. Identification of *cis*-acting elements important for expression of the starch-branching enzyme I gene in maize endosperm. *Plant Physiol.* 121:225-236.
- Kim S-R, Costa MA, An G. 1991. Sugar response element enhances wound response of potato proteinase inhibitor II in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 17:973-983.
- Kim SY, May GD, Park WD. 1994. Nuclear protein factors binding to a class I patatin promoter region are tuber-specific and sucrose-inducible. *Plant Mol. Biol.* 26:603-615.
- Kimura S, Ishibashi T, Hatanaka M, Sakakibara Y, Hashimoto J, Sakaguchi K. 2000. Molecular cloning and characterization of a plant homologue of the origin recognition complex 1 (ORC1). *Plant Sci.* 158:33-39.
- Kinsman E, Lewis C, Davies M, Young J, Francis D, Vilhar B, Ougham H. 1997. Elevated CO₂ stimulates cells to divide in grass meristems: a differential effect in two populations of *Dactylis glomerata*. *Plant Cell Environ.* 20:1309-1316.
- Kizis D, Pages M. 2002. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J.* 30(6): 679-689.
- Kizis D, Lumbreras V, Pages M. 2001. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett.* 498: 187-189.
- Kleinow T, Bhalerao R, Breuer F, Umeda M, Salchert K, Koncz C. 2000. Functional identification of an *Arabidopsis* Snf4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of *snf4* deficiency in yeast. *Plant J.* 23(1): 115-122.
- Koch KE. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:509-540.
- Koch KE, Ying Z, Wu Y, Avigne WT. 2000. Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *J. Exp. Bot.* 51 Spe. No.417-27.
- Koizuka N, Tanaka Y, Morohashi Y. 1995. Expression of α -amylase in response to wounding in mung bean. *Planta* 195: 530-534.
- Koncz C, Fárás R, Ferrando A, Kleinow T, Breuer F, Jásik J. 2003. *Arabidopsis* SNF1-related protein kinases mediate proteasomal coupling of SCF ubiquitin ligase complexes. Resumen no. W06-6 en el "7th International congress of plant molecular biology", Barcelona, Esp. Junio 23-28. p.472.
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM. 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 61:377-383.
- Kortstee A, Pego J, Huijter C, Smeekens S. 1998. *Arabidopsis thaliana* mutants altered in sugar sensing. 9th Int. Conf. Arab. Res. Abstract 091.
- Kraakman LS, Winderickx J, Thevelein JM, de Winde JH. 1999. Structure-function analysis of yeast hexokinase: structural requirements for triggering cAMP signalling and catabolite repression. *Biochem. J.* 343:159-168.
- Krapp A, Stitt M. 1995. An evaluation of direct and indirect mechanism for the "sink-regulation" of photosynthesis in spinach: changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* 195:313-323.
- Kuchin S, Treich I, Carlson M. 2000. A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:7916-7920.
- Laby RJ, Kincaid MS, Donggium K, Gibson SI. 2000. The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J* 23(5):587-596.
- Laby RJ, Kim D, Gibson SI. 2001. The *ram1* mutant of *Arabidopsis* exhibits severely decreased β -amylase activity. *Plant Physiol.* 127:1798-1807.
- Lakatos L, Klein M, Höfgen R, Bánfalvi Z. 1999. Potato StubSNF1 interacts with StubGAL83: a plant protein kinase complex with yeast and mammalian counterparts. *Plant J.* 17:569-574.
- Lalond S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM. 1999. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11:707-726.
- Lam HM, coschicano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:569-593.
- Lam HM, Hsieh M-H, Coruzzi GM. 1998. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16:345-353.
- Lam HM, Peng SSY, Coruzzi GM. 1994. Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106:1347-1357.
- Lancien M, Gadal P, Hodges M. 2000. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiol.* 123:817-834.
- Laurie S, McKibbin R, Burrell MM, Freeman JP, Halford N. 2000. Manipulation of signalling

- pathways involved in carbon partitioning in potato and wheat. 6th. Int. Cong. Plant Mol. Biol. Abstract S 27-19.
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive Fd, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A. 1999. Molecular and functional regulation of two NO₃- uptake system by N- and C-status of Arabidopsis plants. *Plant J.* 18(5):509-519.
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Muller C, Krapp A, von Wirén N, Daniel-Vedele F, Gojon A. 2003. Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell* 15:2218-2232.
- León-Kloosterziel KM, Alvarez M, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JAD, Koornneef M. 1996. Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J.* 10(4):655-661.
- León P, Arroyo A, Mackenzie S. 1998. Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:453-480.
- León P, Sheen J. 2003. Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* 8(3): 110-116.
- Leyman B, Van Dijck P, Thevelein JM. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci.* 6:510-513.
- Li FN, Johnston M. 1997. Grr1 of *S. cerevisiae* is connected to the ubiquitination machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression end cell cycle. *EMBO J* 16:5629-5638.
- Li CY, Shi JX, Weiss D, Goldschmidt EE. 2003. Sugars regulate sucrose transporter gene expression in citrus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 306:402-407.
- Lillo C, Kazazaic S, Ruoff P, Meyer C. 1997. Characterization of nitrate reductase from light- and dark-exposed leaves. Comparison of different species and effects of 14-3-3 inhibitor proteins. *Plant Physiol.* 114:1377-1383.
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8:457-463.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinizaki, Shinozaki K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* 10:1391-1406.
- Livingston DP, Henson CA. 1998. Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plan Physiol.* 116:403-408.
- Llorente F, Oliveros JC, Martínez-Zapater JM, Salinas J. 2000. A freezing-sensitive mutant of Arabidopsis, *frs1*, is a new *aba3* allele. *Planta* 211:648-655.
- Lo W-S, Duggan L, Emre NCT, Belotserkovskya R, Lane WS, Ahiekhattar R, Berger SL. 2001. Snf1: A histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* 293:1142-1146.
- Loef I, Hörste GM, Krapp A, Stitt M. 2000. Effect of Nitrate on flowering in *Arabidopsis thaliana*. Symposium "Signals, sensing and plant primary metabolism".
- López-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulation root architecture. *Curr. Op. Plant Biol.* 2:280-287.
- López-Molina L, Chua N-H. 2000. A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 41(5):541-547.
- López-Molina L, Mongrand S, Chua N-H. 2001. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(8):4782-4787.
- López-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua N-H. 2003. AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev.* 17:410-418.
- Loreti E, Alpi A, Perata P. 2000. Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. *Plant Physiol.* 123(3):939-948.
- Loreti E, de Bellis L, Alpi A, Perata P. 2001. Why and how do plant cells sense sugars. *Annals Bot.* 88:803-812.
- Lu C-A, Lim E-K, Yu S-M. 1998. Sugar response sequence in the promoter of a rice α -amylase gene serves as a transcriptional enhancer. *J.Biol. Chem.* 273:10120-10131.
- Lu C-A, Ho TD, Ho S-L, Yu S-M. 2001. Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of α -amylase gene expression. *Plant Cell* 14:1963-1980.
- Lu C, Fedoroff NV. 2000. A mutation in the Arabidopsis *HYL1* gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin and cytokinin. *Plant Cell* 12:2351-2366.

- Lu G, DeLisle AJ, de Vetten NC, Ferl RJ. 1992. Brain proteins in plant: An Arabidopsis homologue to neurotransmitter pathway activators is part of a DNA binding complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:11490-11494.
- Ludewig F, Sonnewald U. 2000. High CO₂-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. FEBS Letters 479:19-24.
- Lukas J, Bartkova J, Bartek J. 1996. Convergence of signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. Mol. Cell Biol. 16:6917-6925.
- Lumbreras V, Alba MM, Kleinow T, Koncz C, Pages M. 2001. Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. EMBO Rep. 2:55-60.
- MacKintosh C, Meek SEM. 2001. Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. Cell Mol. Life Sci. 58:205-214.
- Maekawa F, Toyoda Y, Torii N, Miwa I, Thompson RC, Foster DL, Tsukahara H, Tsukamura H, Maeda K. 2000. Localization of glucokinase-like immunoreactivity in the rat over brain stem: for possible location of brain glucose-sensing mechanisms. Endocrinology 141(1):375-84.
- Maeo K, Tomiya T, Hayashi K, Akaike M, Morikami A, Ishiguro S, Nakamura Kenzo. 2001. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for β-amylase of sweet potato. Plant Mol. Biol. 46:627-637.
- Martin T, Hellmann H, Schmidt R, Willmitzer L, Frommer W. 1997. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. Plant J 11(1):53-62.
- Martin T, Bosall SF, Regad F, Oswald O, Graham IA. 1998. Biochemical and molecular characterization of carbohydrate insensitive (*cai*) Arabidopsis mutants. 9th Int. Conf. Arab. Res. Abstract 096.
- Martin T, Oswald O, Graham IA. 2002. Arabidopsis seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. Plant Physiol. 128:472-481.
- Masgrau R, Churchill GC, Morgan AJ, Ashcroft SJH, Galione A. 2003. NAADP: A new second messenger for glucose-induced Ca²⁺ responses in clonal pancreatic β cells. Curr. Biol. 13:247-251.
- Matschinsky F, Liang Y, Kesavan P, Wang L. 1993. Glucokinase as pancreatic β-cells glucose sensor and diabetes gene. J. Clin. Invest. 92:2092-2098.
- Matsukura C-a, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi 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.
- Meijer M, Murray JAH. 2000. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. Plant Mol. Biol. 43:621-633.
- Meng-Hsuan H, Goud S, Song L, Fedoroff N. 2004. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. PNAS 101(4):1093-1098.
- Meskiene I, Bögre L, Dahl M, Pirck M, Cam DT, Swoboda I, Heberle-Bors E, Ammerer G, Hirt H. 1995. CycMs3 a novel B-type alfalfa cyclin gene, is induced in the G0 to G1 transition of the cell cycle. Plant Cell. 7:759-771.
- Miernik JA, Dennis DT. 1983. Mitochondrial, plastid and cytosolic isoenzymes of hexokinase from developing endosperm of *Ricinus communis*. Arch. Biochem. Biophys. 226:458-68.
- Mironov V, De Veylder L, Van Montagu M, Inzé D. 1999. Cyclin-dependent kinases and cell cycle division in plants_ the nexus. Plant Cell. 11:509-521.
- Mita S, Suzuki-Fujii K, Nakamura K. 1995. Sugar-inducible expression of a gene for β-amylase in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 107:895-904.
- Mita S, Hideyuki H, Nakamura K. 1997a. Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 114:575-582.
- Mita S, Murano N, Akaike M, Nakamura K. 1997b. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. Plant J 11(4):841-851.
- Moller SG, Ingles PJ, Whitelam GC. 2002. The cell biology of phytochrome signaling. New Physiol. 154:553-590.
- Moore B, Sheen J. 1999. Plant sugar sensing and signaling - a complex reality. Trends Plant Sci. 4: 250.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W-H, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. Science 300:332-336.
- Moorehead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill J, Morrice N, et al., 1999. Phosphorylation-

- dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J.* 18:1-12.
- Morita A, Umemura TA, Kuroyanagi M, Fursuhara Y, Perata P, Yamaguchi J. 1998. Functional dissection of a sugar-repressed α -amylase gene (*RAmy1A*) promoter in rice embryos. *FEBS Lett.* 423:81-85.
- Moreno S, Tandecarz JS. 1996. Analysis of primer independent phosphorylase activity in potato plants: high levels of activity in sink organs and sucrose-dependent activity in cultured stem explants. *Cell Mol Biol.* 42(5):637-43.
- Muñoz-Alonso MJ, Guillemain G, Kassis N, Girard J, Burnol AF, Leturque A. 2000. A novel cytosolic dual specificity phosphatase, interacting with glucokinase, increases glucose phosphorylation rate. *J. Biol. Chem.* 275:32406-32412.
- Muranaka T, Banno H, Machida Y. 1994. Characterization of tobacco protein kinase NPK5, a homolog of *Saccharomyces* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible SUC2 gene for a secreted invertase of *S cerevisiae*. *Mol, Cell Biol.* 14:2958-2965.
- Murata T, Katagiri H, Ishihara H, Shibasaki Y, Asano T, Toyoda Y, Pekiner B, Pekiner C, Miwa I, Oka Y. 1997. Co-localization of glucokinase with actin filaments. *FEBS Lett.* 406(1-2):109-13.
- Müller J, Boller T, Wiemken A. 1998. Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. *J Plant Physiol.* 153:255-57.
- Müller J, Weimken A, Aeschbacher R. 1999. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Sci.* 147:37-47.
- Müller J, Aeschbacher R, Sprenger N, Boller T, Wiemken A. 2000. Disaccharide-mediated regulation of sucrose: fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiol.* 123:265-73.
- Müller J, Aeschbacher R A, Wingler A, Boller T, Wiemken A. 2001. Trehalose and trehalase in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 125:1086-1093.
- Nakamura Y. 2002. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: Rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol.* 43:718-725.
- Nehls U, Ecke M, Hampp R. 1999. Sugar- and nitrogen-dependent regulation of an *Amanita muscaria* phenylalanine ammonium lyase gene. *J Bacteriol.* 181(6):1931-1933.
- Németh K, Salcher K, Putnoky P, Bhalerao R, Koncz-Kálmán Z, Stankovic-Stangeland B, Bakó L, Mathur J, Ökrész L, Stabel S, Geigenberger P, Stitt M, Rédei G, Schell J, Koncz C. 1998. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in Arabidopsis. *Gen. Dev* 12:3059-3073.
- Newcomb LL, Diderich JA, Slattery MG, Heideman W. 2003. Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eukaryotic Cell* 2:143-149.
- Ninfa AJ, Atkinson MR. 2000. PII signal transduction proteins. *Trends Microbiol.* 8:172-179.
- Niu X, Helentjaris T, Bate NJ. 2002. Maize ABI4 binds Coupling Element1 in Abscisic acid and sugar response genes. *Plant Cell* 14:2565-2575.
- Noh YS, Amasino MN. 1999. Regulation of developmental senescence is conserved between Arabidopsis and *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 41:195-206.
- Ohba H, Steward N, Kawasaki S, Berberich T, Ikeda Y, Koisumi N, Kusano T, Sano H. 2000. Diverse response of rice and maize genes encoding homologs of WPK4, an SNF1-1 related protein kinase from wheat, to light, nutrients, low temperature and cytokinins. *Mol. Gen. Genet.* 263:359-366.
- Ohta S, Hattori T, Morikama A, Nakamura K. 1991. High level expression of sweet potato sporamin gene promoter: β -glucuronidase (GUS) fusion gene in the stems of transgenic tobacco plants is conferred by multiple cell type-specific regulatory elements. *Mol. Gen. Genet.* 225:369-378.
- Ohto M, Furukawa Y, Aoki E, Hayashi S, Nakamura K. 1999. Isolation and characterization of *uns* mutants showing unusual sugar responses. 10th Int. Conf. Arab. Res. Abstract 9-13.
- Ohto M, Hayashi K, Isobe M, Nakamura K. 1995. Involvement of Ca²⁺ signalling in the sugar-inducible expression of genes coding for sporamine and β -amylase of sweet potato. *Plant J.* 7:297-307.
- Ohto M, Hayashi S, Furukawa Y, Nakamura K. 2000. Isolation and characterization of *uns2* mutant of Arabidopsis showing unusual sugar response. 11th. Int. Conf. Arab. Res. Abstract 415.
- Ohto M, Nakamura-Kito K, Nakamura K. 1992. Induction of expression of genes coding for sporamine and β -amylase by polygalacturonic acid in leaf-petiole cuttings of sweet potato. *Plant Physiol.* 127:252-261.
- Ohto M, Nakamura K. 1995. Sugar-induced increase of calcium-dependent protein kinases associated

- with the plasma membrane in leaf tissues of tobacco. *Plant Physiol.* 109:973-981.
- Ohto M, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K. 2001. Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127:252-261.
- Oliveira IC, Coruzzi GM. 1999. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 121(1):301-310.
- Onai K, Ohto M, Nakamura K. 1999. Isolation and characterization of the mutant *uns1*, which shows abnormal responses to sugars. 10th. Int. Conf. Arab. Res. Abstract 8-32.
- Oswald O, Martin T, Dominy PJ, Graham IA. 2001. Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(4):2047-2052.
- Özcan S, Dover J, Rosenwald AG, Wöfl S, and Johnston M. 1996. Two glucose transporters in *S. cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:12428-12432.
- Parks BM, Hangarter RP. 1994. Blue light sensory systems in plants. *Cell Biol.* 5:347-353.
- Parviz F, Heideman W. 1998. Growth-independent regulation of *CLN3* mRNA levels by nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 180:225-230.
- Pattison DL, Donggiun K, Gibson SI. 2000. The *sugar-insensitive3 (sis3)* mutant exhibits decreased sensitivity to the inhibitory effects of sugars on early seedling development. 11th Int. Conf. Arab. Res. Abstract 417.
- Paul M, Driscoll SP. 1997. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling N deficiency through source:sink imbalance. *Plant Cell Environment* 20:110-116.
- Paul M, Stitt M. 1993. Effects of nitrogen and phosphate deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes in metabolites in seedlings of tobacco, and their response to exogenous sucrose. *Plant Cell Environment* 16:1047-1057.
- Paul M, Pellny T. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J Exp. Bot.* 54(382):539-547.
- Paul M, Pellny T, Goddijn O. 2001. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci.* 5:531-536.
- Pego JV, Kortstee AJ, Huijser C, Smeekens SCM. 2000. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J Exp. Bot.* 51 Spec. No. :407-416.
- Pego JV, Smeekens SCM. 2000. Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends Plant Sci.* 5(12):531-536.
- Pego JV, Weisbeek P, Smeekens SCM. 1999. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiol.* 119:1017-1023.
- Pellesschi S, Guy S, Kim J-Y, Pointe C, Mahé A, Barthes L, Leonardi A, Prioul J-L. 1999. *Ivr2*, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Mol. Biol.* 39(2): 373-380.
- Perata P, Matsukura C, Vernieri P, Yamaguchi J. 1997. Sugar repression of gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. *Plant Cell* 9:2197-2208.
- Pfannschmidt T. 2003. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.* 8(1):33-41.
- Pfannschmidt T, Nilsson A, Allen JF. 1999. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397:625-628.
- Pfannschmidt T, Allen JF, Oelmüllera R. 2000. Redox control of photosynthetic gene expression in higher plants. Symposium "Signals, sensing and plant primary metabolism".
- Pla M, Vilardell J, Guiltinan M, Marcotte W, Niogret M, Quatrano R, Pages M. 1993. The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab28*. *Plant Mol. Biol.* 21, 259-266.
- Poole M, Evans H, Juda L, Smith R, Dilton-Hill F, Dubos C, Campbell M. 2003. ATMYB61 re-orient of plant development and metabolism in response to sugar. Resúmen no. M-62 en el "7th International congress of plant molecular biology", Barcelona, Esp. Junio 23-28. p.443.
- Pourtau N, Wingler A. 2003. Effect of sugars on the regulation of senescence in *Arabidopsis thaliana*. Resúmen no. S19-45 en el "7th International congress of plant molecular biology", Barcelona, Esp. Junio 23-28. p. 267.
- Pradel KS, Kirschning A, Buckhout TJ, Ehwald R. 2000. Investigation of phloem unloading of glucose and sucrose analogues in maize seedlings. Symposium "Signals, sensing and plant primary metabolism".
- Prata RTN, Williamson JD, Conkling MA, Pharr DM. 1997. Sugar repression of mannitol dehydrogenase activity in celery cells. *Plant Physiol.* 114:307-314.
- Price J, Li T-C, Kang SG, Na JK, Jang J-C. 2003. Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132:1424-1438.

- Puente P, Wei N, Deng XW. 1996. Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 15:3732-3743.
- Purcell PC, Smith AM, Halford NG. 1998. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J.* 14:195-202.
- Quesada V, Ponce RM, Micol JL. 2000. Genetic analysis of salt-tolerant in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 154: 421-436.
- Quick P, Siegl G, Neuhaus E, Feil R, Stitt M. 1989. Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. *Planta* 177:535-546.
- Quirino BF, Noh YS, Himelblau E, Amasino RM. 2000. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* 5:278-282.
- Ramírez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutierrez C. 1999. The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acids Res.* 27:3527-3533.
- Rathinasabapathi B. 2000. Metabolic engineering for stress tolerance: Installing osmoprotectant synthesis pathways. *Ann. Bot.* 86:709-716.
- Reidel J, Tischner R, Mack G. 2001. The chloroplastic glutamine synthetase (GS-2) of tobacco is phosphorylated and associated with 14-3-3 proteins inside the chloroplast. *Planta* 213:396-401.
- Rendez GF, Herrero P, Sanz P, Prieto JA, Moreno F. 1998. Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 425(3):475-478.
- Renz A, Stitt M. 1993. Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers. *Planta* 190:166-175.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C-Z, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Froun P, Zhang JZ, Ghandhari D, Sherman BK, Yu G-L. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290:2105-2110.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquemard A, Murray JAH. 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283:1541-1544.
- Riou-Khamlichi C, Manges M, Healy JMS, Murray JAH. 2000. Sugar control of the plant cell cycle: Differential regulation of *Arabidopsis* D-Type cyclin gene expression. *Mol. Cell Biol.* 20(13):4513-4521.
- Robinson K, Jones D, Howell S, Sonejl Y, Martin S, Aitken A. 1995. Expression and characterization of maize ZBP14, a member of a new family of zinc-binding proteins. *Biochemistry J.* 307:267-272.
- Rodríguez-Concepción M, Boronat A. 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* 130:1079-1089.
- 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-source regulation. *Plant Physiol.* 108:285-294.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Op. Plant Biol.* 2: 198-206.
- Roldán M, Gómez-Mena C, Ruiz-García L, Salinas J, Martínez-Zapater JM. 1999. Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *Plant J.* 20:581-590.
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 26(5):310-317.
- Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell Supplement:* 185-205.
- Roscher A, Emsley L, Raymond P, Roby C. 1998. Unidirectional steady state rates of central metabolism enzymes measured simultaneously in a living plant tissue. *J. Biol. Chem.* 273:25053-25061.
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, van Kampe M, Borrias M, Weisbeek P, Smeeckens S. 1998. Sucrose-specific signaling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J.* 15:253-63.
- Rook F, Corke F, Card R, Smith C, Bevan M. 2000. Impaired sucrose induction (*isi*) mutants reveal a role for ABA in the regulation of starch biosynthetic genes. Symposium "Signals, sensing and plant primary metabolism"
- Rossetti L. 2000. Perspective: Hexosamines and nutrient sensing. *Endocrinology* 14(6):1922-1925.
- Rushton P, Macdonald H, Huttly A, Lazarus C, Hooley R. 1995. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved *cis-*

- element in the promoters of α -Amy2 genes. *Plant Mol. Biol.* 29:691-702.
- Rustenbeck I. 2002. Desensitization of insulin secretion. *Biochem. Pharmacol.* 63:1921-1935.
- Saier MH, Chauvaux S, Deutscher J, Reizer J, Ye J-J. 1995. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *TIBS* 20:267-271.
- Salanoubat M, Belliard G. 1989. The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene* 84:181-185.
- Salchert K, Bhalariao R, Koncz-K Z, Koncz C. 1998. Control of cell elongation and stress responses by steroid hormones and carbon catabolic repression in plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353:1517-1520.
- Salzman R, Tikhonova I, Bordelon B, Hasegawa P, Bressan R. 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 117:465-472.
- Sanz P, Alms G, Haystead T, Carlson M. 2000. Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20:1321-1328.
- Sarah CJ, Graham IA, Reynolds SJ, Leaver CJ and Smith SM. 1996. Distinct cis-acting elements direct the germination and sugar responses of the cucumber malate synthase gene. *Mol. Gen. Genet.* 250:153-161.
- Schnarrenberger C. 1990. Characterization and compartmentation, in green leaves, of hexokinases with different specificities for glucose, fructose, and mannose and for nucleoside triphosphates. *Planta.* 181:249-255.
- Schultz TF, Medina J, Hill A, Quatrano RS. 1998. 14-3-3 proteins are part of an ABA VIVIPAROUS1 (VP1) response complex in the Em promoter and interact with VP1 and EmBP1. *Plant Cell* 10:837-847.
- Schumann P, Jacquot J-P. 2000. Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:371-400.
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD. 2003. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes. *Plant Physiol.* 131:1591-1601.
- Scott P. 2000. Resurrection plants and the secrets of eternal life. *Annals of Bot.* 85:159-166.
- Sehnke PC, Chung HJ, Wu K, Ferl RJ. 2001. Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *PNAS, USA* 98:765-770.
- Sehnke PC, DeLille JM, Ferl RJ. 2002. Consummating signal transduction: The role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-transitions in protein activity. *Plant Cell* S339-S354.
- Sekine M, Ito M, Uemukai K, Maeda Y, Nakagami H, Shinmyo A. 1999. Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett.* 460:117-122.
- Seo M, Peeters AJM, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart JAD, Koorneef M, Kamiya Y, Koshiba T. 2000. The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *PNAS* 97(23):12908-12913.
- Sharkey TD, Vassey TL, Vandever PJ, Viestra RD. 1991. Carbon metabolism and photosynthesis in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) having excess phytochrome. *Planta* 185:287-296.
- Sharma R, Schopfer P. 1987. Phytochrome-mediated regulation of β -amylase mRNA level in mustard (*Sinapsis alba* L.) cotyledons. *Planta* 171:313-320.
- Shaw JR, Ferl RJ, Baier J, St Clair D, Carson C, McCarty D, Hannah LC. 1994. Structural feature of the maize *sus1* gene and protein. *Plant Physiol.* 106:1659-1665.
- Sheen J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2:1027-1038.
- Sheen J. 1994. Feedback control of gene expression. *Photosyn. Res.* 39:427-438.
- Sheen J, Zhou L, Jang J-C. 1999. Sugars as signaling molecules. *Curr. Op. in Plant Biol.* 2:410-418.
- Shen Q, Ho T-HD. 1995. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell* 7:295-307.
- Sherr CJ. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79:551-555.
- Sherson SM, Hemmann G, Wallace G, Forbes S, Germain V, Stadler R, Bechtold N, Sauer N, Smith SM. 2000. Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of *Arabidopsis* seeds and seedlings to sugars. *Plant J.* 24:849-857.
- Sherson SM, Alford HL, Forbes S, Wallace G, Smith SM. 2003. Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 54(382):525-531.
- Sheu J-J, Jan S-P, Lee H-T, Yu S-M. 1994. Control of transcription and mRNA turnover as mechanisms of metabolic repression of α -amylase gene expression. *Plant J.* 5:655-664.

- Sheu J-J, Yu T-S, Tong W-F, Yu S-M. 1996. Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice α -amylase genes that is modulated through complicated transcriptional and posttranscriptional processes. *J Biol. Chem* 271:26998-27004.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Op. Plant Biol.* 3:217-223.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Op. Plant Biol.* 6:410-417.
- Shiraishi A, Yamada Y, Tsuura Y, Fijimoto S, Tsukiyama K, Mukai E, Toyoda Y, Miwa I, Seino Y. 2001. A novel glucokinase regulator in pancreatic β cells: Precursor of propionyl-CoA carboxylase β subunit interacts with glucokinase and augments its activity. *J. Biol. Chem.* 276:2325-2328.
- Short TW. 1999. Overexpression of *Arabidopsis* phytochrome B inhibits phytochrome A function in the presence of sucrose. *Plant Physiol.* 119:1497-1505.
- Signora L, Smet ID, Foyer CH, Zhang H. 2001. ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant J.* 28(6):655-662.
- Smalle J, Kurepa J, Yang P, Emborg TJ, Babiychuk E, Kushnir S. 2003. The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in *Arabidopsis* growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15:965-980.
- Smeekens S. 1998. Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr. Op. Plant Biol.* 1:230-234.
- Smeekens S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:49-81.
- Smeekens S, Rook F. 1997. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol.* 115:7-13.
- Smith CS, Weljie AM, Moorhead GBG. 2003. Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 33:353-360.
- Sokolov LN, Déjardin A, Kleczkowski LA. 1998. Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochem. J.* 336:681-687.
- Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JAH. 1995. A family of cyclin D homologous from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell.* 7:85-103.
- Sonnewald U, Brauwer M, Von Schaeuwen A, Stitt M and 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 sink/source interactions. *Plant J.* 1:95-106.
- Sonnewald U, Herbers K. 1999. Sugars, far more than just fuel for plant growth. En Bryant JA, Burrell MM, Kruger NJ. Eds. *Plant carbohydrate biochemistry*. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers Ltd, 69-78.
- Stitt M. 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell Environment* 14:741-762.
- Stitt M, Hurry V. 2002. A plant for all seasons: alterations on photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Curr. Op. Plant Biol.* 5:199-206.
- Stitt M, Sonnewald U. 1995. Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:341-368.
- Stocker H, Hafen E. 2000. Genetic control of cell size. *Curr. Op. Genet. Dev.* 10:529-535.
- Strand A, Hurry V, Gustafsson P, Gardeström P. 1997. Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *Plant J.* 12(3):605-614.
- Strand A, Hurry V, Henkes S, Huner N, Gustafsson P, Gardeström P, Stitt M. 1999. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiol.* 119:1387-1397.
- Strizhov N, Abraham E, Okresz L, Blickling S, Zilberstein A, Shell J, Koncz C, Szabados L. 1997. Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABAI*, *ABII* and *AXR2* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 12(3):557-569.
- Stulke J, Hillen W. 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Op. Microbiol.* 2:195-201.
- Sturm A, Tang GQ. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* 4: 401-407.

- Sturm A, Chrispeels MJ. 1990. CDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2:1107-1119.
- Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG. 1999. Two Snf1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiol.* 120:257-274.
- Sun C, Sathish P, Ahlandsberg S, Jansson C. 1999. Analyses of isoamylase gene activity in wild-type barley indicate its involvement in starch synthesis. *Plant Mol. Biol.* 40:431-443.
- Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Borén M, Ahlandsberg S, Jansson C. 2003. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter. *Plant Cell* 15:2076-2092.
- Takano M, Kajiya-Kanegae H, Funatsuki H, Kikuchi S. 1998. Rice has two distinct classes of protein kinase genes related to SNF1 of *Saccharomyces cerevisiae*, which are differently regulated in early seed development. *Mol. Gen. Genet.* 260(4):388-394.
- Takeda S, Mano S, Ohto MA, Nakamura K. 1994. Inhibitors of phosphatases 1 and 2A block the sugar inducible gene expression in plants. *Plant Physiol.* 106:567-574.
- Tang BQ, Jeoung DI, Sonenberg M. 1995. Effect of human growth hormone and insulin on [3 H] thymidine incorporation, cell cycle progression, and cyclin D expression in 3T3-F442A preadipose cells. *Endocrinology* 136:3062-3069.
- Thevelein JM. 1994. Signal transduction in Yeast. *Yeast* 10:1753-1790.
- Thevelein JM, Hohmann S. 1995. Trehalose synthase: Guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem.Sci.* 20:3-10.
- Thomas BR, Rodriguez RL. 1994. Metabolite signals regulate gene expression and sink/source relations in cereal seedlings. *Plant Physiol.* 106:1235-1239.
- Thomashow M. 1999. Plant Cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:571-599.
- Thompson-Jaeger S, Francois J, Gaughran JP, Tatchell K. 1991. Deletion of *SNF1* affects the nutrient response of yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. *Genetics* 129:697-706.
- Thum KE, Shasha DE, Lejay LV, Coruzzi GM. 2003. Light- and carbon-signaling pathways. Modeling circuits of interactions. *Plant Physiol.* 132:440-452.
- Thum KE, Shin MJ, Palenchar PM, Kouranov A, Coruzzi GM. 2004. Genome-wide investigation of light and carbon signaling. *Genome Biol.* 5:R10.
- Tiessen A, Hendriks JHM, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farré EM, Geigenberg P. 2002. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-Glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to sucrose supply. *Plant Cell* 14:2191-2213.
- Toroser D, Huber S. 1997. Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase. *Plant Physiol.* 114:947-955.
- Toroser D, Athwal G, Huber S. 1998. Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 proteins. *FEBS Lett.* 435:110-114.
- Toroser D, Plaut Z, Huber SC. 2000. Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 123(1):403-412.
- Toyoda Y, Miwa I, Kamiya M, Ogiso S, Nonogaki T, Aoki S, Okusa J. 1994. Evidence of glucokinase translocation by glucose in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:252-256.
- Toyofuku K, Umemura T, Yamaguchi J. 1998. Promoter elements required for sugar-repression of the *TAmy3D* gene for α -amylase in rice. *FEBS Lett.* 428:275-280.
- Toyofuku K, Loreti E, Vernieri P, Alpi A, Perata P, Yamaguchi J. 2000. Glucose modulates the abscisic acid-inducible *Rab16A* gene in cereal embryos. *Plant Mol. Biol.* 42:451-460.
- Tsukagoshi H, Shibata D, Morikami A, Nakamura K. 2003. A novel sugar signaling mutant of *Arabidopsis thaliana*, *hsi2*. Resúmen no. S05-66 en el "7th International congress of plant molecular biology", Barcelona, Esp. Junio 23-28. p. 87
- Tsukaya H, Ohshima T, Naito S, Chino M, Komeda Y. 1991. Sugar dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 97:1414-1421.
- Tymowska-Lalanne Z, Kreis M. 1998. Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta* 207(2):259-265.
- Urwin NAR, Jenkins GL. 1997. A sucrose repression element in the *Phaseolus vulgaris rbcS2* gene promoter resembles elements responsible for

- sugar stimulation of plant and mammalian genes. *Plant Mol. Biol.* 35:929-942.
- Van Oosten JJ, Wilkins D, Besford RT. 1994a. Regulation of the gene expression of photosynthesis nuclear genes by CO₂ is mimicked by regulation by carbohydrates: A mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO₂? *Plant Cell Environ.* 17:913-923.
- Van Oosten JJ, Besford RT. 1994b. Sugar feeding mimics effect of acclimation to high CO₂-rapid down-regulation of rubisco small-subunit transcripts but not of the large subunit transcripts. *Plant Physiol.* 143:306-312.
- Van Oosten J, Gerbaud A, Huijser C, Dijkwel P, Chua N-M, Smeeckens. 1997. An Arabidopsis mutant showing reduced feedback inhibition of photosynthesis. *Plant J* 12(5):1011-1020.
- Van Schaftingen E, Detheux M, Veiga da Cunha M. 1994. Short-term control of glucokinase activity: Role of a regulatory protein. *FASEB J.* 8:414-419.
- Van Vaeck C, Wera S, van Dick P, Thevelein JM. 2001. Analysis and modification of trehalose 6-phosphate levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the use of *Bacillus subtilis* phosphotrehalase. *Biochem. J.* 353:157-162.
- Vaulont S and Kahn A. 1994. Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J.* 8:28-35.
- Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A. 2000. Glucose regulation of gene transcription. *J Biol. Chem.* 275:31555-31558.
- Veramendi J, Roessner U, Renz A, Willmitzer L, Trethewey RN. 1999. Antisense repression of hexokinase1 leads to an overaccumulation of starch in leaves of transgenic potato plants but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* 121:123-133.
- Vierstra RD. 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.* 8(3): 135-142.
- Vincent O, Carlson M. 1999. Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J.* 18:6672-6681.
- Walker-Simmons MK. 1998. Protein kinases in seeds. *Seed Sci. Res.* 8:193-200.
- Wang N-D, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ. 1995. Impaired energy homeostasis in C/EBP α -knockout mice. *Science* 269:1108-1112.
- Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. 1998. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393:684-8.
- Wanner L, Junttila O. 1999. Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 120:391-399.
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Buchner P, Wobus U. 1995. Seed coat-associated invertases of faba bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell-type specific expression. *Plant Cell* 7:1835-46.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1996. Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant J.* 10, 823-830.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1997a. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends Plant Sci.* 2:169-174.
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U. 1997b. A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell.* 9:895-908.
- Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Manteuffel R, Wobus U. 1998a. Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. *Plant J.* 16:163-172.
- Weber H, Golombek S, Heim U, Borisjuk L, Panitz R, Manteuffel R, Wobus U. 1998b. Integration of carbohydrate and nitrogen metabolism during legume seed development: implication for storage product synthesis. *J Plant Physiol.* 152:641-648.
- Weiner H, Kaiser WM. 1999. 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase of spinach leaves. *FEBS Letters* 455:75-78.
- Weise A, Barker L, Kuhn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer W, Ward J. 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* 12:1345-55.
- Wenzler HC, Mignery G, Fisher L, Park W. 1989. Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 13:347-54.
- Werner JE, Finkelstein RR. 1995. Arabidopsis mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 93:659-666.
- Whittaker A, Bochicchio A, Vazzana C, Lindsey G, Farrant J. 2001. Changes in leaf hexokinase activity and metabolite levels in response to drying in the desiccation-tolerant species

- Sporobolus stapfianus* and *Xerophyta viscosa*. J Exp. Bot. 52(358):961-969.
- Wiese A, Gröner F, Lerchl J, Sonnewald U, Deppner H, Hebbeker U, Flügge UI, Weber A. 1999a. Subcellular localization of plant hexokinases and their possible role in a sugar sensing pathway. 10th Int. Conf Arab. Res. Abstract 5-45
- Wiese A, Gröner F, Sonnewald U, Deppner H, Lerchl J, Hebbeker U, Flügge U, Weber A. 1999b. Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane plastids. FEBS Lett. 461:13-18.
- Wiese A, Elzinga N, Wobbes B, Rahmani F, Smeekens JCM. 2003. Arabidopsis bZIP genes contain a conserved uORF in their 5' UTR essential for sucrose induced repression of translation. Abstract 401 en el "14th International conference on Arabidopsis research", Madison, WI. Junio 20-24.
- Wilczynski G, Kulma A, Szopa J. 1998. The expression of 14-3-3 isoforms in potato is developmentally regulated. Plant Physiol. 153:118-126.
- Wilhelm KS, Thomashow MF. 1993. *Arabidopsis thaliana cor15b*, an apparent homolog of *cor15a*, is strongly responsive to cold and ABA, but not to drought. Plant Mol. Biol. 23:1073-1077.
- Wingler A, von Schaewen A, Leegood R, Lea P, Quick W. 1998. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. Plant Physiol. 116: 329-335.
- Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher RA. 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene ApL3, and starch synthesis in Arabidopsis. Plant Physiol. 124:105-114.
- Winter H, Huber S. 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. Critical Rev. Plant Sci. 19(1):31-67.
- Wobus, U., H. Weber. 1999. Sugars as signal molecules in plant seed development. Biol Chem. 380: 937-944.
- Wu K, Rooney MF, Ferl RJ. 1997. The Arabidopsis 14-3-3 multigene family. Plant Physiol. 114:1421-1431.
- Xiao W, Sheen J, Jang JC. 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. Plant Mol. Biol. 44:451-461.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu J-K. 2001. The Arabidopsis *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. Plant Cell 13:2063-2083.
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu J-K. 2002. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis*. J Biol. Chem. 277:8588-8596.
- Xiong L, Zhu J-K. 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. Plant Physiol. 133:29-36.
- Xu X, van Lammeren AA, Vermeer E, Vreugdenhil D. 1998. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. Plant Physiol 117:575-84.
- Yamaguchi-Shinosaki K, Shinosaki K. 1993. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet. 238(1-2):17-25.
- Yamaguchi-Shinosaki K, Shinosaki K. 1994. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell 6:251-264.
- Yanagisawa S. 2000. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize.
- Yanagisawa S, Yoo S-D, Sheen J. 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signaling in plants. Nature 425:521-525.
- Yanovsky MJ, Alconada-Magliano TM, Mazzella MA, Gatz C, Thomas B, Casal JJ. 1998. Phytochrome A affects stem growth, anthocyanin synthesis, sucrose phosphate synthase activity and neighbour detection in sunlight-grown potato. Planta 205:235-241.
- Yokoyama R, Hirose T, Fujii N, Aspuria E, Kato A, Uchimiya H. 1994. The *rolC* promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. Mol. Gen. Genet. 244:15-22.
- Yu J, et al., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L.spp. *indica*). Science 76: 79-92.
- Yu S-M. 1999. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. Plant Physiol. 121:687-693.
- Zeevart JAD, Creelman RA. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39:439-473.
- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE. 1998. Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. Plant Physiol. 116:1573-1583.

- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE. 1999. Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/Sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. *Plant Physiol.* 121:599-608.
- Zhang H, Forde BG. 2000. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* 51(342):51-59.
- Zhou L, Jang J-J, Jones T, Sheen J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. *PNAS* 95:10294.
- Zhu-Shimoni JX, Galili G. 1998. Expression of an Arabidopsis aspartate kinase/homoserine dehydrogenase gene is metabolically regulated by photosynthesis-related signals but not by nitrogenous compounds. *Plant Physiol.* 116:1023-1028.
- Ziegelhoffer EC, Medrano LJ, Meyerowitz EM. 2000. Cloning of the Arabidopsis *WIGGUM* gene identifies a role for farnesylation in meristem development. *PNAS* 97(13):7633-7638.
- Zourelidou M, Torres-Zabala M, Smith C, Bevan MW. 2002. Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *Plant J* 30(4): 489-479.

ANEXOS

A. Artículo:

Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants.

Patricia León, Analilia Arroyo, and Sally Mackenzie.

Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. 49:453-80.

NUCLEAR CONTROL OF PLASTID AND MITOCHONDRIAL DEVELOPMENT IN HIGHER PLANTS

P. Leon and A. Arroyo

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Morelos 62250 Mexico; e-mail: patricia@ibtiumam.mx

S. Mückenzie

Department of Agronomy, Lily Hall of Life Sciences, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907

KEY WORDS: organelle biogenesis, transcriptional regulation, posttranscriptional regulation, chloroplast mutants, mitochondrial mutants

ABSTRACT

The nucleus must coordinate organelle biogenesis and function on a cell and tissue-specific basis throughout plant development. The vast majority of plastid and mitochondrial proteins and components involved in organelle biogenesis are encoded by nuclear genes. Molecular characterization of nuclear mutants has illuminated chloroplast development and function. Fewer mutants exist that affect mitochondria, but molecular and biochemical approaches have contributed to a greater understanding of this organelle. Similarities between organelles and prokaryotic regulatory molecules have been found, supporting the prokaryotic origin of chloroplasts and mitochondria. A striking characteristic for both mitochondria and chloroplast is that most regulation is posttranscriptional.

CONTENTS

INTRODUCTION	454
A DEVELOPMENTAL CONSIDERATION	455
NUCLEAR REGULATION OF THE EARLY PHASES OF CHLOROPLAST DEVELOPMENT	455

453

1 040-25 19-938 0601-0453\$08.00

<i>Initial Steps</i>	455
MUTANTS THAT AFFECT EARLY CHLOROPLAST DEVELOPMENT	456
<i>Early Developmental Mutants</i>	456
<i>Young Mutants</i>	457
NUCLEAR REGULATION DURING CHLOROPLAST DEVELOPMENT	458
<i>Division</i>	458
<i>Transcription</i>	459
<i>Posttranscriptional Processing</i>	460
<i>Nuclear Regulation of Targeting</i>	463
NUCLEAR SIGNALS FOR CHLOROPLAST DEVELOPMENT	464
<i>Light Regulation</i>	464
MUTATIONAL ANALYSIS OF PLANT MITOCHONDRIA	465
NUCLEAR REGULATION OF MITOCHONDRIAL GENE EXPRESSION	466
<i>Regulation of Transcription</i>	466
<i>Transcript Processing</i>	467
<i>Transcript Editing</i>	468
<i>Translational Posttranslational Regulation</i>	469
NUCLEAR INFLUENCE ON THE MITOCHONDRIAL GENOME	470
PERSPECTIVES	472

INTRODUCTION

It is generally believed that higher plant evolution occurred through two different endosymbiotic events, both involving prokaryotic organisms. Eukaryotic cells initially acquired mitochondria through endosymbiosis of a bacterium. Later, the chloroplast was derived from a cyanobacteria-type organism (149). Mitochondria and plastids each contain an autonomous genome, yet the nucleus now plays a major role in determining organelle properties, because it encodes the majority of the genes required for function and maintenance. The presence of organelle genes in two different cellular compartments creates an obvious regulatory problem. The cell must coordinate the expression of nuclear-encoded genes, present in only one or a few copies per cell, with the expression of organelle-encoded genes present in several hundred or even thousands of copies. Coordinate control is a necessity for mitochondrial and chloroplast function and likely requires new regulatory pathways not present in the original endosymbionts (48).

Many of the structural genes required for the photosynthetic and respiratory reactions have been cloned and sequenced. We have much less information about the many nuclear genes required in development. This is a broad subject for study, as higher plants contain a variety of differentiated plastid types, reflecting cell and tissue type (85). This review concentrates primarily on recent advances in organelle development and function in vascular plants. Recent published reviews cover other photosynthetic organisms such as *Chlamydomonas* and *Engelma* (45, 54, 142, 160).

A DEVELOPMENTAL CONSIDERATION

Plastids exhibit a very clear developmental program. All plastids are derived from proplastids present in meristematic cells (85). Upon cell differentiation, proplastids also differentiate. Plastids can also redifferentiate in response to external environmental signals (85). The best characterized differentiation process results in a chloroplast.

Almost every step of plastid development depends on the direct action of nuclear-encoded molecules. Molecules required in the initial stages of organelle differentiation could affect all plastid types, whereas molecules necessary at later stages should affect only one plastid type.

Chloroplast differentiation appears to start very early during plant development. The leaf primordia that develop from the apical meristem contain mesophyll tissue from which most of the chloroplasts will be derived. Mesophyll chloroplasts can then undergo further differentiation, as is well-documented for differentiation of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of C4 plants (124).

Microscopic studies have provided a sequential picture of the events during plastid differentiation (95). Further refinement of these events at the molecular level has been difficult. It is possible that many events during chloroplast differentiation are concurrent or occur in such a brief period that they cannot be dissected with the available techniques. In monocot leaves initial differentiation events include DNA replication and production of the chloroplast decoding apparatus (11, 123). Production of thylakoid membranes and accumulation of specific photosynthetic complexes are detected in later stages (85, 123).

The study of the participation of nuclear genes in plastid development has benefited from the isolation and characterization of an enormous number of mutants, many of which will be described in this review. In contrast to the well-defined developmental program of the chloroplast, the mitochondrion does not have an obvious developmental program. However, it is clear that mitochondria play essential roles throughout cellular differentiation and take on a pronounced role at particular points in higher plant development.

NUCLEAR REGULATION OF THE EARLY PHASES OF CHLOROPLAST DEVELOPMENT

Initial Steps

Transcription is a central regulatory point during the early stages of chloroplast differentiation (54, 123). Transcription is low in the proplastid, and is activated in the immature chloroplast (11). In parallel, the synthesis of both the transcription and translation apparatus takes place (63). Several lines of evidence suggest a nuclear origin for the enzyme responsible for initial transcriptional activity in

the chloroplast (69, 70, 74, 122). For example, in the parasitic plant *Epifagus virginiana*, which lacks the chloroplast-encoded subunits of RNA polymerase, and in the *albostrians* barley mutant, which lacks ribosomes, transcription of particular plastid genes has been detected (70, 122).

Allison et al. (2) have shown that a subset of the chloroplast-encoded genes are transcribed by a second RNA polymerase in which at least some subunits are nuclear-encoded. The role of this nuclear-encoded RNA polymerase (NEP polymerase) seems to be primarily, but not exclusively, the expression of housekeeping genes during the early phases of chloroplast development (54, 123, 160). Among the genes transcribed by this enzyme are the rRNA genes (2), ribosomal proteins (70), and the *rpoB* operon (72), which encodes the subunits of the plastid-encoded RNA polymerase. Candidates for the NEP enzyme have been purified from spinach (97). NEP is probably encoded by the *RpoP1* gene recently isolated from *Arabidopsis* (68); it shares important similarities with phage-type RNA polymerases.

Concomitant with transcription of the rRNA genes, nuclear-encoded ribosomal proteins are synthesized (63) and imported into the chloroplast to form ribosomes, in preparation for translation in later stages of development. The current view is that the nucleus initiates chloroplast differentiation and provides key components of the transcriptional and translational machinery required for later stages of development (123).

MUTANTS THAT AFFECT EARLY CHLOROPLAST DEVELOPMENT

Early Developmental Mutants

Although many chloroplast developmental mutants have been isolated, few of them affect initial events in organelle biogenesis. Because the plastid produces many essential compounds such as hormones, lipids, and cofactors, mutations that interrupt these pathways will probably disrupt both plastid biogenesis and plant function. The *amidophosphoribosyl-transferase deficient (atd)* mutant from *Arabidopsis* is an example; chloroplast development is arrested at an early stage in *atd* lines because one of the genes encoding the *ATase* enzyme, (*ATase2* gene) is disrupted; a key enzyme of purine biosynthesis. This nuclear gene provides the only *ATase* activity in photosynthetic tissue, but a second gene might permit purine biosynthesis in other tissues (170).

Similar examples of fundamental mutants include *del* from tomato (80), *dag* from *Amaranthum* (18), and the *Arabidopsis* albino T-DNA tagged *chl-1* (110). Plastids present in these plants are very small, with almost no thylakoid

membrane, and thus resemble proplastids. mRNA analyses showed that *CLA1*, *DAG*, and *DCL* genes are normally expressed not only in photosynthetic but also in nonphotosynthetic tissue, suggesting that these genes are probably required for the development of different plastid types. In both *clat-1* (Estevez, A. Arroyo, A. Cantero & P. Leon, unpublished results) and *dag* (18) plants, chloroplasts and etioplasts are abnormal. Each of these genes encodes a novel plastid-localized protein of unknown function. Null mutations of the *DCL* gene cause embryo abortion (J.S. Keddie & W. Gruissem, unpublished data). Proteins homologous to *CLA1* are found in photosynthetic and nonphotosynthetic prokaryotes; recent data indicate that this protein may be involved in the biosynthesis of a novel isoprenoid pathway conserved in evolution (J. Estevez, A. Arroyo, A. Cantero & P. Leon, unpublished results). At the morphological level, *dag* and *clt* plants apparently lack palisade cells (18, 80).

Similar alterations occur in plastids after disruption of the *PALE CRESS* (*PAC*), *IMMUTANTS* (*IM*), and *ATD* genes of *Arabidopsis* (139, 170, 178). Because it seems unlikely that all these genes directly regulate leaf differentiation, a novel signaling system during early plastid development has been hypothesized that would affect the final divisions of mesophyll cells in the prepalisade stage (18). Compelling evidence indicates that a factor originating in the chloroplast signals its developmental stage to the nucleus, coordinating the expression of many nuclear-encoded genes (reviewed in 162, 165). Alterations in this signal transduction pathway do not have any obvious impact on mesophyll morphology. These results suggest that multiple signals might exist to ensure proper coordination between cell and organelle during plastid development.

Genes involved in early plastid development have also been described in C4 maize plants. Phenotypic characteristics of the *bsd3* (R. Roth & J. Langlade, unpublished data) mutant resemble those described above, with no thylakoid formation and alterations in different plastid types. However, in the *bsd3* mutant, neither the morphology of the photosynthetic tissue nor accumulation of the C4 nuclear-encoded photosynthetic genes is altered. These results suggest that, in contrast to what is found in C3 plants, leaf development in C4 plants such as maize might not rely on chloroplast signals for final differentiation.

Pigment Mutants

Direct participation of pigment biosynthesis in chloroplast development has been difficult to establish because of pleiotropy. Several mutants with altered chlorophyll accumulation have been described (158). In all cases, chloroplast development was arrested at initial membrane assembly, suggesting that chlorophyll synthesis and chloroplast development may be interdependent (174). Because these kinds of mutations can disrupt different metabolic activities, loss of

chlorophyll along with other plastid components might represent secondary effects (62). Recent data that support the hypothesis that chlorophyll production has the potential to influence organelle development come from work with mutants altered in chlorophyll *a/b* ratio (40) and the *olive* (*olt*) mutant from *Arabidopsis* (73). The *OLT* gene seems to encode a key enzyme of the chlorophyll biosynthetic pathway, the porphyrin IX Mg-chelatase. *olt* conditionally affects chlorophyll synthesis and organelle development, and the chloroplasts in this mutant contain thylakoids but no grana. This phenotype seems to be the direct result of a block in chlorophyll biosynthesis, not a result of photo-oxidation (73). Chlorophyll *b*-deficient mutants usually result in smaller photosynthetic unit sizes (115), possibly because of LHC destabilization and an abnormal thylakoid membrane system (39). Chlorophyll appears to be necessary for either translation or stability of the nuclear-encoded apoproteins of the light-harvesting complex and the formation of grana-deficient thylakoid membranes (64, 88). Gene disruptions at other steps of chlorophyll biosynthesis display alterations in plastid development even in the dark, where photo-oxidative damage does not exist, supporting the hypothesis that chlorophyll is involved directly (39, 64, 146, 158).

NUCLEAR REGULATION DURING CHLOROPLAST DEVELOPMENT

Division

Organelle division is a fundamental process in chloroplast and mitochondrial biogenesis. With the recent isolation of several mutants from *Arabidopsis thaliana*, Pyke and coworkers have contributed to our understanding of the molecular basis of control of chloroplast division (135, 136). These mutants, named *arc* for "accumulation and replication of the chloroplast," demonstrate that several nuclear genes are required. Interestingly, all mutants analyzed so far show a reduction in chloroplast number per mesophyll cell, but no obvious plant morphological alterations (134a, 135). It is likely that the total amount of chloroplast material within a cell is the important parameter for cell function rather than chloroplast number.

Physiological analysis of most *arc* mutants shows plastid division to be altered only in chloroplast (134a). An exception is the *arc6* mutant, the most extreme mutation isolated, which may affect division at the proplastid state (134a) the gene affected in the *arc6* mutant appears to be a homolog of the *FtsZ* protein, implicated in bacterial cell division (12, 31, 131). *FtsZ*, which polymerizes similarly to eukaryotic cytoskeletal elements, may be a progenitor of tubulin

(38), which raises the intriguing possibility that the mechanism of organelle division may be, to some degree, conserved between prokaryotes and plants.

Transcription

Although transcriptional control is the key element setting expression of nuclear-encoded plastid-localized gene products (90), the relative transcription rates of many chloroplast-encoded genes are constant in different tissues and at different developmental stages. This suggests that posttranscriptional events may predominate in chloroplast gene regulation (29). Evidence suggests, however, that stage-specific transcriptional regulation occurs during leaf maturation. For example, some plastid-encoded genes fluctuate in transcription levels in response to factors such as light and plastid type (103, 114, 123, 138). This is the case for the light-activated genes such as *psbA* in barley and maize (86), *psbD-psbC* in barley (150), and *petG* from maize (59). Similarly, the transcription rates of *rbcL*, *psbA*, and *atpB/E* genes from *Arabidopsis* are specifically reduced in amyloplasts (77). All these genes are preferentially transcribed by the better-characterized plastid-encoded RNA polymerase (74). It is tempting to attribute the selectivity of the transcriptional response during chloroplast development to the interaction of the core RNA polymerase with specific regulatory molecules (103). These factors might be available only under certain conditions and in this way might regulate gene transcription during development.

Two types of factors seem to play a role in the regulation of chloroplast transcription: factors that bind DNA only in the presence of the RNA polymerase (sigma-like factors) and sequence-specific proteins acting as activators or repressors. Several sigma-like factors have been recognized (102, 167). For example, a 90-kDa sigma-like factor from mustard is present in young but not in mature spinach leaves (96). In contrast, the transcriptional activity of chloroplasts and etioplasts in mustard appears to be modulated by differential phosphorylation of three sigma factors in response to light (166). In this way only dephosphorylated factors permit efficient transcription initiation of promoters like that of *psbA*. The most likely candidate responsible for phosphorylation of these sigma-like factors is a serine/threonine kinase found to associate with the active transcription complex (103).

Evidence has emerged recently for a number of sequence-specific binding factors that might also modulate expression of photosynthetic genes under specific conditions. A nuclear factor involved in differential light-mediated transcription of the *psbD* gene has been isolated (84). This element (AGF) interacts at a specific site within the promoter region of the *psbD* gene and shares similarity with a specific DNA binding factor, CDF2 (for chloroplast DNA binding factor 2), isolated recently (76). Both factors have similar properties,

suggesting that they may belong to a larger family of DNA-binding proteins, but their specific function remains to be seen.

Posttranscriptional Processing

Posttranscriptional and translational events play a major role in regulating the differential accumulation of many plastid-encoded mRNAs during chloroplast development (for extensive reviews, see 53, 54, 114, 142). Most chloroplast-encoded genes are transcribed as polycistronic units (53). These precursors undergo a series of complex maturation events that include processing of the mature mRNAs, although only in *Chlamydomonas* (98, 141, 142), the importance of posttranscriptional processing understood. One of the few exceptions in higher plants is the *CRP1* gene from maize, which seems to be required for the efficient translation of two chloroplast mRNAs (*petA* and *petD*) (9). This gene affects processing of the *petD* mRNA in such a way that the monocistronic transcript is absent, implying a mechanistic link between RNA processing and translation. It is hypothesized that in this mutant the *petD* protein is no longer synthesized, because the ribosome cannot initiate within the polycistronic mRNA, due to masking of the translation initiation region. The *CRP1* gene has been cloned, but the encoded protein shows no significant similarity to any known protein (M Walker & A Barkan, unpublished data).

In contrast to processing, mRNA stability seems to be important for the accumulation of several photosynthetic mRNAs required during the transition from proplastid to chloroplast. For example, as measured by run-on experiments, steady state levels of the *psbA* and *atpB* transcripts increase during greening of etiolated spinach cotyledons without changes in the transcription rate (29). In addition, the stability of several chloroplast-encoded transcripts seems to be dramatically increased during chloroplast development in barley (83) and spinach (51). Stabilization seems to occur by the correct processing of the polycistronic mRNAs in the differentiated chloroplasts, whereas in proplastids these mRNAs appear to be rapidly degraded (53). It has recently been established that nuclear-encoded enzymes are required for correct mRNA processing (66). Both exo- and endoribonuclease activities are found in a high-molecular-weight complex that binds near stem and loop sequences found in the 3' region of chloroplast transcripts (53, 114, 142). Although this complex has not been fully characterized, similarities have been postulated with a ribonucleolytic complex ("degradosome") in *Escherichia coli* (66). In addition to the action of the chloroplast high-molecular-weight complex, stabilization of transcripts requires additional factors that inhibit rapid degradation (53, 66). One of these factors is a nuclear-encoded 28-kDa protein (28RNP) (53) that interacts with both the transcript and the high-molecular-weight complex (66). This protein is differentially expressed during plant development, is modified by

phosphorylation, and is likely necessary to direct the correct 3'-end processing of plastid transcripts under particular developmental conditions (66).

Unexpectedly, polyadenylation is the signal for degradation of specific chloroplast transcripts. Following the endonucleolytic cleavage events in the *petD* mRNA by components of the high-molecular-weight complex, the products are then polyadenylated (89). By increasing susceptibility to degradation in response to conditions such as light, polyadenylation seems to play a critical role in regulating chloroplast transcript stability. For example, in dark-adapted plants, the extent of polyadenylated *petD*-specific transcripts is higher than in plants grown in light (89). This unexpected process is probably not restricted to a particular transcript and will most likely require the action of additional nuclear regulatory factors.

The modulation of transcript stability during the differentiation of chloroplasts in C4 plants has also been documented. In the dimorphic cells of the C4 plant, the photosynthetic genes are expressed in a cell-specific manner. The characterization of plants altered in bundle sheath cell differentiation in maize has led to identification of a nuclear gene (*Bsd2*) that influences the regulation of transcript stability and/or translation of *rbcL* mRNA. In this mutant, chloroplast development is prevented in bundle sheath cells; this is likely the result of photo-oxidative damage in the absence of the RuBPCase protein in these cells (145). It is conceivable that the product of the *Bsd2* gene might interact in a sequence-specific manner with the *rbcL* mRNA in bundle sheath cells to stabilize this transcript.

A few other mutants have been described that alter stability of specific RNA transcripts, including the maize *hcf2* and *hcf6* mutations (118). Still others have a more general effect on the stability of multiple transcripts such as *hcf38* from maize (7, 118) and the *hcf109* and *hcf5* mutants from *Arabidopsis* (35, 116).

In both mitochondria and chloroplasts unspliced transcripts can accumulate to high levels (177). The role of splicing in the regulation of chloroplast development in higher plants has not been extensively studied, but recent studies in maize show that the relative abundance of spliced and unspliced transcripts differs among plastid types. Compared to chloroplasts, unspliced forms predominate in both amyloplasts and proplastids (6). RNA splicing could exert control in plastid development by regulating the abundance of plastid-encoded proteins.

Probably the best evidence for participation of splicing in chloroplast development comes from the work with the *crx* (chloroplast RNA splicing) mutants in maize. Chloroplast genes in higher plants contain multiple group II introns, from both the A and B subgroups (117). These introns are capable of self-splicing *in vitro*; genetic evidence indicates that *trans*-acting factors are required for efficient splicing *in vivo* (148). Recently, two nuclear genes, *crs1*

and *crs2*, were reported to be required for the proper splicing of group II introns in maize chloroplasts (79). Mutation at *crs1* specifically blocks splicing of the *atpF* type IIA intron that encodes subunit I of the chloroplast ATP synthase, whereas mutation at the recently cloned *crs2* gene blocks the splicing of many group IIB introns. Disruption of chloroplast development in these mutants provides important biological evidence for the structural division of type II introns because different splicing factors are required to process IIA and IIB introns. Previously described mutants might also reflect splicing deficiencies. For example, in plants with the nuclear gene *tegap* (*ij*) splicing of most IIA introns is defective (16). Whether there is a direct relationship between *ij* and *crs1* remains to be deduced.

Translational and posttranslational regulation has been documented in *Chlamydomonas*, *Euglena*, and higher plants (45, 54, 142, 160). This control could underlie the rapid changes in protein accumulation prominent in several photosynthetic factors during chloroplast development; for example, the product of the *psbA* transcripts does not accumulate during senescence of bean leaves (10), in etiolated leaves (159), in roots, and in cultured cells (71). Translational control is possible at several steps, but the best analyzed so far is during ribosome binding to the mRNA. Both 5' and 3' untranslated leader (UTR) sequences play important roles during translation in eukaryotes, and several *crs*-acting sequences have been identified (45). Nuclear-encoded proteins have been identified that interact with specific stem-loop sequences in the 5' UTR of chloroplast transcripts in several organisms (27, 65, 71). These 5' UTR binding complexes seem to modulate ribosome binding, acting as translational activators or repressors (28, 114). The nuclear-encoded factors identified to date are mostly from *Chlamydomonas*; these factors can regulate the translation of either individual or a group of transcripts (45, 142). In higher plants, a specific protein factor(s) was recently demonstrated to be required for the efficient translation of *psbA* mRNA in an *in vitro* translation system from tobacco chloroplasts. This factor interacts with specific elements of the 5' UTR of the *psbA* mRNA (71). This approach has an enormous potential to analyze the molecular mechanisms of translational regulation in vascular plants.

Coordinate protein accumulation for different photosynthetic protein complexes depends on translational control. It is known that in order to maintain the stoichiometric levels of different plastid complexes, their subunits are rapidly degraded when prevented from assembling (142). Until now, the molecular mechanism has been little studied, but evidence currently exists to suggest it as an important point of translational regulation. For example, in *Chlamydomonas* mutants, the accumulation of cytochrome *f* decreases in the absence of other genes of the cytochrome *b₆/f* complex (*petB* or *petD*), although its transcript level remains unchanged. The most likely interpretation of this phenomenon

is the direct autoregulation of the cytochrome *f* so that when unassembled, its translation is attenuated (160).

A similar mechanism appears to be present in higher plants. It has been shown that the translation of the large subunit protein (L.S) of the Rubisco enzyme is controlled by levels of the small subunit (SS). The levels of the *rbcL* transcript remain unchanged, again suggesting translational regulation. Though the mechanism underlying this mode of regulation is still unclear, one might postulate that proteins such as SS may act as activators during translation of the *rbcL* transcript (144).

Posttranslational proteolysis is important during plastid differentiation. For example, during chloroplast to chromoplast differentiation, massive degradation of the photosynthetic complexes and the accumulation of new sets of proteins must occur (111). Likewise, photosystem D1 protein is specifically degraded after damage by oxygen radicals during electron transport (92), and this degradation is mediated by a specific protease (75). Several nuclear proteins involved in proteolytic degradation in chloroplasts have been identified. The gene homologous to ClpA, a subunit of the ATP-dependent serine protease (Clp) (47), is nuclear-encoded and transported into the chloroplast (81), where it may be involved in the degradation of soluble and thylakoidal proteins (151). This offers a means by which the nucleus may regulate protein accumulation during specific stages in the biogenesis of the organelle. This subject, though not yet extensively studied, likely represents a very important point in plastid developmental regulation.

Concomitant with the accumulation of the photosynthetic complexes, extensive proliferation of thylakoid membranes and the formation of grana stacks occurs in maturing chloroplast. It has been suggested that incorporation of the light-harvesting complex (LHC II) into the thylakoid membrane plays an important role in thylakoid stacking in *Chlamydomonas* and higher plants (35, 158). Only recently has participation of other nuclear genes been analyzed (36). One interesting example is development of transgenic *Arabidopsis* plants with low levels of a dynamin-like gene (*ADL1*), which show a greatly reduced thylakoid membranes and an increase in lipid granules. Because dynamin-like proteins in other systems are involved in the formation of membrane vesicles (180), it is proposed that the nuclear-encoded *ADL1* gene participates in thylakoid biogenesis in higher plants (JM Park, JH Cho, SC Kang, HJ Kang, KT Pih, et al, unpublished data).

Nuclear Regulation of Targeting

The proper allocation of the nuclear-encoded subunits is required for organelle functionality and development. Plastids have developed an elaborate sorting system to ensure proper targeting of multimeric protein complexes. The presence

of three distinct membranes requires that proteins are incorporated into the chloroplast and later reallocated within the organelle (21). General aspects of chloroplast protein import have been known for some time, but the mechanisms for sorting and import are just beginning to be elucidated. Most genes involved in this process are nuclear-encoded, and their proper expression regulates correct targeting during chloroplast development (21).

A fairly detailed picture has emerged recently for the integration of proteins into the thylakoid membrane. Mutations in four nuclear genes of maize interfere with plastid biogenesis by disrupting the translocation of thylakoid proteins (8). Mutations in the *tha1* and *tha5* genes affect a SecA-type pathway, whereas mutations in the *hcf106* and *tha4* genes disrupt a Dph pathway that depends on pH (112, 172). These nuclear mutations are recessive and result in pale-green, nonphotosynthetic seedlings that die after endosperm depletion. The *tha1* mutant affects chloroplast development specifically in the mesophyll cells in which grana are found, but does not apparently affect bundle sheath chloroplasts that look normal (173). In the *hcf106* mutant, both plastid types are abnormal (112). *tha1* encodes a chloroplast-localized SecA protein homologous to the SecA protein from *E. coli*. This suggests that at least one of the plastid targeting mechanisms is similar to the prokaryotic secA:Y/E pathway (173). Recently the *tha4* gene has also been cloned; it is closely related to an open reading frame of unknown function of *Synechocystis*. In *tha4* plants the Dph pathway is disrupted; this pathway may have evolved from a cyanobacterial progenitor (M Walker & A Barkan, unpublished data). It is unknown why two distinct translocation pathways exist for the thylakoidal proteins and what the differences are between both mechanisms. Given the recent identification of the proteins involved in thylakoidal protein import, important progress in the future is expected.

NUCLEAR SIGNALS FOR CHLOROPLAST DEVELOPMENT

Light Regulation

Organelle development and plant development respond to external signals, particularly light. Light regulation is mediated by the photoreceptors: a phytochrome, blue/UV-A cryptochromes, and the UV-A and -B receptors. Several nuclear genes are part of the signal transduction system coupling light to plastid and plant development (19, 37, 137). Mutants with a de-etiolated phenotype—*det*, *fax*, and *cop* classes—have a morphology when grown in the dark similar to light-grown wild-type seedlings (91, 137, 173a); these mutants

have altered expression of several nuclear- and chloroplast-encoded photosynthetic genes (119, 137). The plastids in *det1*, *cop1*, and *cop9* develop a mature thylakoid system when grown in the dark, even though they do not accumulate chlorophyll. These mutants together with several *fis* mutants also affect the amyloplast, by promoting differentiation of a chloroplast, resulting in a constitutive default photomorphogenic developmental pathway (91, 119). In contrast, other de-etiolated mutants such as *det2* show no impact in chloroplast development (20). Several of the genes affected in these mutants have been cloned (30, 100, 132, 176), and the characteristics and localization of their gene products suggest that they may be nuclear regulators (17). The COP1 protein is probably one of the best studied light regulators; it is a negative transcriptional regulator capable of direct interaction with upstream DNA sequences of its target genes (137). Other genes such as COP8, COP9, and COP11, seemed to act in the same pathway (176a).

The *cnc* mutants, were selected to identify elements that play a positive role during de-etiolation in *Arabidopsis* (99, 105). Most *cnc* genes influence chloroplast development in the light and appear to modulate expression levels of particular nuclear-encoded photosynthetic genes. *CUE1* encodes a phosphate phosphoenolpyruvate translocator (PPT) of the chloroplast inner envelope membrane (42, 161). PPT is likely required early in chloroplast development; loss of this function probably directly influences signals from the chloroplast that affect nuclear expression of light-regulated genes.

MUTATIONAL ANALYSIS OF PLANT MITOCHONDRIA

Unlike the chloroplast case, there are few mutations in mitochondrial development. Most loss of function mutation in mitochondria are lethal unless maintained in a heteroplasmic state (125). Some dominant mitochondrial mutations, resulting from expression of novel open reading frames in mtDNA, survive in higher plants. For the most part, these mutations lead to a similar phenotype of pollen inviability known as cytoplasmic male sterility (*cms*) (61). This maternally inherited trait has been reported in over 150 plant species, and in all cases examined in detail results from expression of novel mitochondrial polypeptides. Usually, these novel polypeptides contain at least one hydrophobic domain, likely facilitating membrane association. Each *cms*-associated polypeptide identified has been unique, and their modes of action are unclear.

Cms mutations have proven particularly useful in defining nuclear regulation of mitochondrial functions. Nuclear suppressors of the *cms* phenotype are readily identified as nuclear fertility restorer (*Rf*) genes. In the majority of cases, *Rf*

genes act as single, dominant loci, though examples exist of polygenic restorer systems. Nuclear-directed mitochondrial functions identified via the analysis of fertility restoration mechanisms include mitochondrial transcript processing (154, 164, 182), posttranscriptional functions (157, 185), possible modes of biochemical detoxification (26), and alteration of mitochondrial genome organization (108).

NUCLEAR REGULATION OF MITOCHONDRIAL GENE EXPRESSION

Regulation of Transcription

A particularly unusual feature of plant mitochondria is the variable and complex pattern of transcripts arising from a given mitochondrial gene. Variation in transcript size can arise from use of multiple transcription start sites and terminations sites (50). Complexity is compounded by posttranscriptional processing, described below.

Transcriptional regulation of mitochondrial gene expression does occur, although it does not appear to be the predominant means of gene modulation. For example, tissue-specific differences in transcript accumulation have been detected in various tissues of the maize seedling using *in situ* hybridization (101). It is unknown whether these differences reflect cell-specific changes in transcription rate, as opposed to posttranscriptional processes; it clear that cell-to-cell modulation of mitochondrial expression can occur. Plant mitochondrial transcription appears to be mediated by at least one nuclear-encoded RNA polymerase bearing striking similarity to the RNA polymerases of bacteriophages T7, T3, and SP6 (68).

Data to date suggest that variation in promoter strength is likely a primary influence on relative transcription rates (15, 41, 50). Nuclear factors regulating transcription rate or promoter selection are difficult to detect. Perhaps the most compelling demonstration of nuclear influence on mitochondrial transcription is described in a *Zea mays* *Zea perennis* alloplasmic line. A single nuclear gene, designated *Mct*, influences promoter selection in the cytochrome oxidase subunit II (*coxII*) gene in maize (22, 126). Transcriptional initiation at position -907 produces the predominant *coxII* transcript of ~1900 nucleotides. The dominant *Mct* allele apparently directs transcriptional initiation at a second site (-347) upstream to the *coxII* locus. Interestingly, this alternate initiation site, detected as a shorter *coxII* transcript, does not conform to the consensus promoter sequence described for maize. This provides the first evidence that specific cofactors may influence promoter selection in plant mitochondria, unlike yeasts and mammalian systems.

Certain nuclear-directed changes in mitochondrial transcript levels appear to be tissue-specific. This has been suggested by *in situ* hybridization studies of maize seedling tissues, where several mitochondrial transcripts appeared to be present at different levels depending on tissue type (101). Similar studies in developing anthers of sunflower demonstrated a marked accumulation of *atpA*, *atp8*, *cab*, and *rna26* transcripts in young meiotic cells, with a concomitant increase in their respective protein products (157). Moreover, *orf22* transcripts decrease in *cms* sunflower; the encoded 15-kDa protein is observed in anthers when the nuclear *Rf* gene, likely acting posttranscriptionally, is present (121). These results imply that nuclear-directed modulation of mitochondrial gene expression may occur in a cell-specific pattern. Further support comes from observations in *cms* Petunia where restoration of fertility by a nuclear *Rf* gene is associated with the tissue-specific reduction in a particular transcript derived from the *psf* mitochondrial region (185).

Transcript Processing

Nuclear background influences mitochondrial transcription patterns in particular genomic regions. For example, nuclear background alters transcription of *atpA* in the Ogura cytoplasm of radish (109) and the *cms* gene (*T-urf13*) in the T cytoplasm of maize. The *T-urf13* sterility-associated sequence is cotranscribed with the *orf221* open reading frame. Specific lines of maize revealed a marked influence of nuclear background on its pattern of transcription (82). Rocheford & Pring (1994) demonstrated that the transcript changes were not only a function of the mitochondrial genomic environment encompassing the *T-urf13/orf221* region but also of dominant nuclear gene action influencing the pattern of posttranscriptional processing these transcripts undergo (143).

Transcript processing is a widespread phenomenon in plant mitochondria though not yet well understood mechanistically. It was first deduced by the observation that unusually complex transcript in certain regions of the plant mitochondrial genome were produced not only by multiple transcription start and stop sites, but also by internal transcript processing (reviewed in 50). Although the role of processing in gene regulation is not yet clear, nuclear regulation of transcript processing could be an important means of mitochondrial gene suppression. This conclusion is based on the observation that three different nuclear *Rf* loci directly influence transcript processing within the respective mitochondrial *cms*-associated regions.

In *cms-T* maize, perhaps the most well-investigated example of cytoplasmic male sterility, fertility restoration requires dominant alleles of two unlinked nuclear loci, *Rf1* and *Rf2* (94). Compelling evidence demonstrates that the product of *Rf1*, essential though not sufficient to restore fertility, directly influences

transcript processing of the *T-urf13* mitochondrial region (182). Processing of *T-urf13* transcripts appears to be directly associated with a marked reduction in the expression of the encoded 13-kDa T-URF13 polypeptide (43). The action of *Rf2* will be discussed in a later section. In sorghum line IS112C, *cms* is associated with expression of the *orf107* open reading frame (164). Again, fertility restoration is associated with altered processing of *orf107* transcripts, and the concomitant reduction in the accumulation of a 12-kDa polypeptide presumed to be the gene product (164). Of particular interest is the observation that the transcript processing sites described in both *cms-T* maize and *cms* sorghum share sequence features (34), implying that sequence motifs exist within plant mitochondrial genes that may act as targets for nuclear-directed gene modulation.

cms in the *Brassica napus* (oilseed rape) Polima cytoplasm is associated with aberrant expression of a region encoding the *atp6* gene cotranscribed with a downstream chimeric sequence, *orf224* (152). Fertility restoration, conditioned by either of two dominant single nuclear loci, results in a transcript processing event that generates predominantly monocistronic *atp6* transcripts (152, 153). Generation of monocistronic *atp6* transcripts cosegregates with a single dominant fertility restorer locus, *Rfp1* (154). Most intriguing, however, is the observation that an alternate recessive allele at this locus, *orfpl* or a second locus tightly linked to *rfpl*, influences transcript processing of two other mitochondrial genes not associated with sterility, *nad4* and a *cell*-like gene that may be involved in cytochrome *c* biogenesis. At all four processing sites under *Rfp1/orfpl* control, there is UUGUGG or UUGUUG, a sequence motif located very near the processing site.

Transcript Editing

One of the more surprising features distinguishing plant mitochondrial gene expression from that of yeast and mammals is the extensive editing of plant mitochondrial transcripts. The biochemistry and pattern of transcript editing has been reviewed recently (49, 60). The mechanisms regulating the rate of editing, as well as the local sequence features determining sites to be edited, are not yet understood. Evidence to date indicates that local features of the editing site are important (24, 55, 56) and that sites that alter codons may be preferentially edited (181). Nuclear genotype (181) as well as tissue type, developmental stage, and growth conditions may influence the extent of transcript editing (52). Perhaps the most definitive evidence of nuclear influence on transcript editing involves differential *nad3* editing in a particular Petunia mitochondrial genotype when combined with different nuclear backgrounds. The extent of *nad3* editing changes dramatically in response to different nuclear backgrounds, with a high extent of editing segregating

as a single dominant nuclear locus. Interestingly, this genetic variation for extent of transcript editing pertained exclusively to *nad3*; this implies specificity in nuclear control of editing and predicts that additional nuclear factors exist.

Translational/Posttranslational Regulation

Relatively little evidence currently exists for nuclear-directed, translational regulation in plant mitochondria. In contrast, several nuclear factors influence translation of specific mitochondrial genes in yeast (44). In plants, sequence conservation exist upstream of some mitochondrial start codons, but it is not clear whether these sequences actually function as specific binding sites for translational components (134). Furthermore, although particular mitochondrial polypeptide differences have been associated with changes in plant nuclear background (23), it is not yet determined whether the protein differences result from differential transcription or translation.

Perhaps more provocative at this stage is the accumulating evidence suggesting surprisingly limited regulation of translation in mitochondria, particularly in light of extensive translational control in plastids. One unexpected observation of transcript editing is that both edited and unedited transcripts are translationally competent. Both edited and partially edited transcripts appear to be represented in association with polysomes (57, 106). Moreover, little discrimination by the ribosome occurs with regard to untranslated leader sequences or transcript splicing status (184).

It may be argued that polysome association does not, in itself, demonstrate nonselective translation. Using antibodies against the predicted polypeptide product of the *rps12* unedited transcript, compelling evidence demonstrates that polypeptides are produced from partially edited or unedited transcripts, as well as edited forms (107, 133). Not unexpectedly, these aberrant polypeptides are not incorporated into functional ribosomes (133).

These observations raise the obvious general question about the fate of aberrant translation products, and why they are not more commonly detected within plant mitochondria. One explanation may be differences in half-life for products of edited vs unedited transcripts. Although protein import and the concomitant processing events associated with import have been well described (reviewed in 46, 179), little is yet known about posttranslational proteolysis of mitochondrial gene products. Mitochondrial proteolysis has been best detailed in yeast, where several proteases, both matrix and membrane-localized, have been characterized (reviewed in 140). In plants, no proteolytic activity has been detected in the matrix of mitochondria, but limited activity is detected within the inner membrane, and there is some indication that this activity may be involved in the proteolysis of unassembled, imported proteins (87).

In common bean, posttranslational regulation of the *cms*-associated mitochondrial protein appears to occur in vegetative tissues. In bean, *cms* is associated with the expression of a 239-amino acid polypeptide, (ORF239) (1, 67) that accumulates only in reproductive tissues, with no detectable ORF239 in vegetative (seedling, leaf, or root) tissues (1). More extensive investigation shows that the ORF239 protein is subject to proteolysis in vegetative tissues, dependent in part on a mitochondrial protease related to the *lor* homologs of yeast (163, 171) and human (175; R. Sarria, A. Lyznik, E. Vallejos & S. Mackenzie, submitted manuscript). Whether this newly identified plant protease is involved in the degradation of other aberrant mitochondrial gene products remains an active area of inquiry.

Detoxification of metabolic poisons is a quite unexpected means of influencing mitochondrial functions posttranslationally. The *Rf2* fertility restorer gene in *cms-T* maize encodes a putative aldehyde dehydrogenase (26). Although the function of this gene in fertility restoration is not yet clear, recent biochemical studies have confirmed its enzymatic activity identity (P. Schneible, personal communication). It has been speculated that the *Rf2* gene product may play a role in the detoxification of a pollen-specific product that interacts with the T-URF13 protein to cause premature tapetal breakdown.

NUCLEAR INFLUENCE ON THE MITOCHONDRIAL GENOME

The plant mitochondrial genome, now fully sequenced in *Arabidopsis* (169) and *Martynia* (128), is organized in a much more complex and variable structure than is observed in other higher eukaryotes (reviewed in 183). In most higher plants, this organization is defined by the presence of recombinationally active repeated sequences that allow for high- and low-frequency inter- and intramolecular recombination events to occur (3). The physical organization of the mitochondrial genome in plants has been difficult to define. Although most genomes map as circular molecules defined by overlapping clones, direct physical observation by pulsed field gel electrophoresis, electron microscopy, and other procedures has indicated that the genome may consist of both linear and circular forms, with molecules much larger than the multiple circles constructed by clone analysis (3, 14, 130).

The nucleus definitely affects mitochondrial genome organization. One value of the remarkable mitochondrial DNA variation existing within plant families is the information it provides regarding evolution of this unusual genome and the cellular forces molding current organization. Examination of variation within the legume family (Fabaceae) provides striking evidence for the ongoing evolutionary transfer of functional genetic information from the mitochondrion

to the nucleus via RNA intermediates (25, 127). This evolutionary transfer of mitochondrial genes to the nucleus has presented some intriguing problems, most notably the requirement to move tRNA into mitochondria (33). There is evidence that this transfer likely requires association with the appropriate aminoacyl tRNA synthase to mediate transmembrane import (32).

A multipartite genome organization exists in the mitochondrion of most plant species, with each molecule containing only a portion of the genetic information. Overall structure is further complicated by the variable stoichiometry of specific subgenomic regions. Remarkably, in several plant species, a subset of mitochondrial DNA molecules, atypical genomic organizations termed "sublimons," can be retained indefinitely in nearly undetectable levels (155, 156). The relative copy number of the various mitochondrial DNA forms and their recombinational activity appears to be under nuclear control. One of the most pronounced examples is the observed loss of a mitochondrial genomic molecule in response to a single nuclear gene in common bean. The *cms*-associated mitochondrial mutation in common bean, *psv-orf239*, appears to be maintained on a single 210-kb molecule within a tripartite mitochondrial genome organization (78). Introduction of a single dominant nuclear factor, *F_r*, results in a genomic shift of the *psv-orf239*-containing molecule to substoichiometric levels within the genome, thus restoring pollen fertility (H Janska, R Sarría, M Woloszyńska, M Arrieta-Montiel & S Mackenzie, manuscript submitted).

The development of alloplasmic lines, derived by recurrent backcrossing strategies or protoplast fusion to combine different mitochondrial and nuclear genotypes, routinely gives rise to changes in relative stoichiometries and mitochondrial genomic rearrangements in *Nicotiana* (5, 13, 58), *Brassica* (93, 104), and *Triticum* (120, 129, 168). In some cases, it has been possible to identify specific nuclear loci essential to establishing compatibility in individual nuclear-cytoplasmic combinations (4). Moreover, particular nuclear-cytoplasmic genetic combinations in maize can be predicted to give rise to a high frequency of specific mitochondrial mutations. These mutations, referred to collectively as nonchromosomal stripe mutations, generally result in loss of mitochondrial gene function, leaf striping, severe growth impairment, and infertility; *nes* mutations are maintained in a heteroplasmic state with wild-type, functional mitochondria (125). Several *nes* mutations affect distinct loci and have arisen by what appear to be different molecular events.

In *Arabidopsis*, the appearance of mitochondrial mutations is likewise associated with modification of the nuclear genotype. In the case of *Arabidopsis*, mutation at a single dominant nuclear gene, *CHM*, yields mitochondrial genomic rearrangements (113). Notably, the mutant mitochondrial forms arising upon *CHM* mutation are already present in the wild-type lines at substoichiometric levels (147), implying that the role of the *CHM* locus, like that of the *F_r* locus

in bean, may be to suppress copy number of mutant mitochondrial forms. Efforts are ongoing to determine whether the *F_r* locus in *cms* bean involve homologous functions (B Li & S Mackenzie, personal communication).

PERSPECTIVES

Chloroplast and mitochondrial development are regulated by complex intracellular interactions. In the case of the plastids, it is likely that the discrete nuclear factors set the program that determines to a large degree the stage of organelle development. In contrast, plastid signaling to the nucleus may be continual throughout development. In the next few years, we will likely see important advances in the characterization of chloroplast signals that trigger changes in nuclear expression.

In the past years, we have seen an important number of breakthroughs in several aspects of the chloroplast field as protein import, transcription, and posttranscriptional events. Now a clearer picture is emerging of the regulatory events that take place in each of these processes. Collectively, in the near future, it will be possible to understand the surprising variety of regulatory mechanisms that in concert permit chloroplast development. In the years to come, the implementation of new approaches will contribute to the identification of molecules required for alternative plastid development pathways. Novel classes of genetic loci in *Arabidopsis* define unsolved steps of early chloroplast differentiation. Detailed study of these genes during plant development will certainly help us understand the mechanisms operating in early chloroplast development.

In mitochondrial research, several laboratories are now quite close to cloning additional fertility restorers involved in transcript processing, as well as the *CHM* and *F_r* loci involved in differential amplification of the genome. A surprising picture emerges as we investigate mitochondrial regulation, namely, that the mitochondrial genome is permitted to expend what would appear to be tremendous energy in the execution of transcription and, in most cases, translation of products destined for rapid turnover. These observations imply that, unlike prokaryotes, factors other than energy conservation may be most influential in plant mitochondria. We predict that future investigations will discover the impetus for retaining functions as perplexing as substoichiometric genomic forms and prolific editing functions. Until such time, the plant mitochondrial genome remains an enigma.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank everyone who provided us with reprints, preprints, and unpublished results of their recent work, and especially K. Pyke and D. Stern for sharing

their expertise on selected topics. In addition, we thank Helena Porta, Kenneth Luehrsen, and Stewart Gillmor for critical reading of the manuscript. The work in our laboratories was supported by a grant of the DGAPA program IN206294 and the Pew Charitable Trust to PL, and from the USDA, National Science Foundation, and National Institutes of Health-GMS to SM.

Visit the Annual Reviews home page at
http://www.annualreviews.org.

Literature Cited

- Abad A, Meltrons B, Mackenzie S. 1995. Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male sterile bean. *Plant Cell* 7:271-85.
- Allison L, Simon L, Maliga P. 1996. Deletion of *psbB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J* 15:2802-9.
- Andre C, Levy A, Walbot V. 1992. Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes. *Trends Genet* 8:128-32.
- Asakura N, Nakamura C, Ohsaka J. 1997. RAPD markers linked to the nuclear gene from *Trichium imophloeum* that confers compatibility with *Aegilops squarrosa* cytoplasm on alloplasmic durum wheat. *Genome* 40:201-10.
- Aviv D, Galun E. 1987. Chloroquine analysis in sexual progenies of Nicotiana hybrids. *Theor. Appl. Genet* 73:821-26.
- Barkan A. 1989. Tissue-dependent plastid RNA splicing in maize: transcripts from four plastid genes are predominantly unspliced in leaf meristems and roots. *Plant Cell* 1:437-45.
- Barkan A, Miles D, Taylor W. 1986. Chloroplast gene expression in nuclear, photosynthetic mutants of maize. *EMBO J* 5:1421-27.
- Barkan A, Voelker R, Mendel-Hartvig J, Johnson D, Walker M. 1995. Genetic analysis of chloroplast biogenesis in higher plants. *Physiol. Plant* 93:163-70.
- Barkan A, Walker M, Nolasco M, Johnson D. 1994. A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J* 13:3170-81.
- Bate NJ, Straus NA, Thompson JE. 1990. Expression of chloroplast photosynthetic genes during leaf senescence. *Plant Physiol* 80:217-25.
- Baumgartner BJ, Rapp JC, Millet JE. 1989. Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development. *Plant Physiol* 89:1011-18.
- Begg K, Donachie WD. 1985. Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. *J. Bacteriol* 163:615-22.
- Bellard G, Vedel F, Pelleter G. 1979. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana glauca* by protoplast fusion. *Nature* 281:401-3.
- Bendich AJ. 1993. Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. *Curr. Genet* 24:279-90.
- Binder S, Marchfelder A, Brennicke A. 1996. Regulation of gene expression in plant mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 32:303-14.
- Byrne M, Taylor WC. 1996. Analysis of *Mutator*-induced mutations in the *logap* gene of maize. *Mol. Gen. Genet* 252:216-20.
- Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, et al. 1996. The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* 86:115-21.
- Chatterjee M, Sparvoli S, Edmunds C, Carosi P, Findlay K, Martin C. 1996. *DAG*, a gene required for chloroplast differentiation and palisade development in *Azadirachta indica*. *EMBO J* 15:4194-207.
- Chory J. 1993. Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *Trends Genet* 9:167-72.
- Chory J, Nagpal P, Peto CA. 1991. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3:445-59.
- Choi K, Henry R. 1996. Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:1-26.
- Cooper P, Butler E, Newton KJ. 1990. Identification of a maize nuclear gene which influences the size and number of *cox2* transcripts in mitochondria of perennial tussocks. *Genetics* 126:461-67.
- Cooper P, Newton KJ. 1989. Maize nuclear background regulates the synthesis of a 22-kDa polypeptide in *Zea mays* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7423-26.
- Covello PS, Gray MW. 1990. Differences in editing at homologous sites in messenger RNAs from angiosperm mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 18:5189-96.
- Covello PS, Gray MW. 1992. Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome oxidase (*cox2*) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer. *EMBO J* 11:3815-20.
- Cui XQ, Wise RP, Schnable PS. 1996. The *pr2* nuclear restorer gene of male sterile T-cytoplasm maize. *Science* 272:1334-36.
- Danon A, Mayfield SP. 1991. Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J* 10:3993-4001.
- Danon A, Mayfield SP. 1994. ADP-dependent phosphorylation regulates RNA-binding in vitro: implications in light-modulated translation. *EMBO J* 13:2227-35.
- Deng X-W, Grussem W. 1987. Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49:379-87.
- Deng X-W, Matsui M, Wei N, Wagner D, Chu AM, et al. 1992. *COP1*, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G₁ homologue domain. *Cell* 27:791-801.
- de Souza D, Osteryoung K, Pyke KA. 1997. Molecular genetics of chloroplast development in *Arabidopsis*. *Int. Conf. Arabidopsis Res.* 8th, Madison, Wis.
- Dietrich A, Marchalderouard L, Carneiro V, Cosset A, Small I. 1996. A single base change prevents import of cytosolic tRNA (ala) into mitochondria in transgenic plants. *Plant J* 10:913-18.
- Dietrich A, Small I, Cosset A, Weil JH, Marchalderouard L. 1996. Editing and import—strategies for providing plant mitochondria with a complete set of functional transfer RNAs. *Biochimie* 78:518-29.
- Dill CL, Wise RP, Schnable PS. 1998. *Rf8* and *Rf9* mediate unique *T-urf13*-transcript accumulation, revealing a mitochondrial consensus sequence associated with RNA processing and restoration of pollen fertility in T-cytoplasm maize. *Genetics*. In press.
- Dinkins RD, Bandaranayake H, Baeza L, Griffiths AJE, Green BR. 1997. *hcf5*, a nuclear photosynthetic electron transport mutant of *Arabidopsis thaliana* with a pleiotropic effect on chloroplast gene expression. *Plant Physiol* 113:1023-31.
- Dörmann P, Hoffmann-Benning S, Balbo I, Benning C. 1995. Isolation and characterization of an Arabidopsis mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell* 7:1801-10.
- Duckett CM, Gray JC. 1995. Illuminating plant development. *BioEssays* 17:101-3.
- Erickson HP. 1995. *PstZ*, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell* 80:367-70.
- Falbel TG, Meehl JB, Staehelin LA. 1996. Severity of mutant phenotype in a series of chlorophyll-deficient wheat mutants depends on light intensity and the severity of the block in chlorophyll synthesis. *Plant Physiol* 112:821-32.
- Falbel TG, Staehelin LA. 1994. Characterization of a family of chlorophyll-deficient wheat and barley mutants with defects in the Mg-insertion step on chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol* 104:639-48.
- Finnegan PM, Brown GG. 1990. Transcriptional and post-transcriptional regulation of RNA levels in maize mitochondria. *Plant Cell* 2:71-83.
- Fisher K, Kammerer B, Gutensohn M, Arburger B, Weber A, et al. 1997. A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate phosphate antiporter. *Plant Cell* 9:453-62.
- Forde BG, Oliver RJC, Leaver CJ. 1978. Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasm in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3841-45.
- Fox TD. 1996. Genetics of mitochondrial translation. In *Translational Control*, ed. J Hershey, M Matthews.

- N. Sonenberg, pp. 733-58. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.
45. Gillham NW, Boynton JE, Hauser CR. 1994. Translational regulation of gene expression in chloroplast and mitochondria. *Annu. Rev. Genet.* 28:71-93.
46. Glaser E, Ljoling S, Szgyarto C, Eriksson AC. 1996. Plant mitochondrial protein import: precursor processing is catalysed by the integrated mitochondrial processing peptidase (MPP) bc1 complex and degradation by the ATP-dependent proteinase. *Biochem. Biophys. Acta* 1275:33-37.
47. Gottesman S, Wickner S, Maurizi MR. 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* 11:815-23.
48. Gray MW. 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141:233-357.
49. Gray MW. 1996. RNA editing in plant organelles - a fertile field. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8157-59.
50. Gray MW, Harne-Joyce PJ, Covello PS. 1992. Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:145-75.
51. Green CD, Hollingsworth MI. 1992. Expression of the large ATP synthase gene cluster in spinach plastids during light-induced development. *Plant Physiol.* 100:1164-70.
52. Grosskopf D, Mulligan RM. 1996. Developmental and tissue-specificity of RNA editing in mitochondria of suspension-cultured maize cells and seedlings. *Curr. Genet.* 29:556-63.
53. Grunissen W, Schuster G. 1993. Control of mRNA degradation in organelles. In *Control of Messenger RNA Stability*, ed. J. Belasco, G. Brawerman, pp. 329-65. New York: Academic.
54. Grunissen W, Tonkyn JC. 1993. Control mechanisms of plastid gene expression. *Crit. Rev. Plant Sci.* 12:19-55.
55. Gualberto JM, Bonnard G, Lamattina I, Grienenberger JM. 1991. Expression of the wheat mitochondrial *nad2-rps12* transcription unit: correlation between editing and mRNA maturation. *Plant Cell* 3:1109-20.
56. Gualberto JM, Weil JH, Grienenberger JM. 1990. Editing of the wheat *coxIII* transcript: evidence for twelve C to U and one U to C conversions and for sequence similarities around editing sites. *Nucleic Acids Res.* 18:3771-76.
57. Gualberto JM, Wintz H, Weil JH, Grienenberger JM. 1988. The genes coding for subunit 3 of NADH dehydrogenase and for ribosomal protein S12 are present in the wheat and maize mitochondrial genome and are co-transcribed. *Mol. Gen. Genet.* 215:118-27.
58. Hakansson G, Ginnelius K. 1991. Extensive nuclear influence on mitochondrial transcription and genome structure in male-fertile and male-sterile alloplasmic *Nicotiana glauca* materials. *Mol. Gen. Genet.* 229:380-88.
59. Haley J, Bogorad L. 1990. Alternative promoters are used for genes within maize chloroplast polycistronic transcription units. *Plant Cell* 2:323-33.
60. Hanson M, Sutton C, Lu B. 1996. Plant organelle gene expression- altered by RNA editing. *Trends Plant Sci.* 1:57-64.
61. Hanson MR. 1991. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annu. Rev. Genet.* 25:461-86.
62. Harpster MH, Mayfield SP, Taylor WC. 1984. Effects of pigment-deficient mutants on the accumulation of photosynthetic proteins in maize. *Plant Mol. Biol.* 3:59-71.
63. Harraz H, Langrange T, Bisanz-Sever C, Lerbs-Mache S, Mache R. 1995. The expression of nuclear encoding plastid ribosomal proteins precedes the expression of chloroplast gene during early phases of chloroplast development. *Plant Physiol.* 108:685-92.
64. Harrison MA, Nemson JA, Melis A. 1993. Assembly and composition of the chlorophyll *a-b* light harvesting complex of barley: immunochemical analysis of the chlorophyll *b*-less and chlorophyll *b*-deficient mutants. *Photosynth. Res.* 38:141-51.
65. Hauser CR, Gillham NW, Boynton JE. 1996. Translational regulation of chloroplast genes. Proteins binding to the 5'-untranslated regions of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 271:1486-97.
66. Hayes R, Kudla J, Schuster G, Gabry L, Maliga P, Grunissen W. 1996. Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J.* 15:1132-41.
67. He S, Abad AR, Gevin SB, Mackenzie SA. 1996. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11763-68.
68. Hedlke B, Bomer T, Weihe A. 1997. Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277:809-11.
69. Hess WR, Muller A, Nagy F, Bomer T. 1994. Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal. *Mol. Gen. Genet.* 242:305-12.
70. Hess WR, Prombona A, Fieder B, Subramanian AR, Bomer T. 1993. Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1-C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning nonchloroplast encoded RNA polymerase. *EMBO J.* 12:563-71.
71. Hirose T, Sugita M. 1996. Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J.* 15:1687-95.
72. Hu J, Bogorad L. 1990. Maize chloroplast RNA polymerase: the 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1531-35.
73. Hudson A, Carpenter R, Doyle S, Coen ES. 1993. *Olive*: a key gene required for chlorophyll biosynthesis in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 12:3711-19.
74. Iglói G, Kössel HE. 1992. The transcriptional apparatus of chloroplast. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:525-58.
75. Inagaki N, Fujita S, Satoh K. 1989. Solubilization and partial purification of a thylakoidal enzyme of spinach involved in the processing of D1 protein. *FEBS Lett.* 246:218-22.
76. Iram R, Baeza R, Andreeva A, Mache R, Lerbs-Mache S. 1994. Regulation of the rDNA transcription in chloroplasts: promoter exclusion by a constitutive repression. *Genes Dev.* 8:2928-38.
77. Isono K, Niwa Y, Satoh K, Kobayashi H. 1997. Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiol.* 114:623-30.
78. Janska H, Mackenzie SA. 1993. Unusual mitochondrial genome organization in cytoplasmic male sterile common bean and the nature of cytoplasmic reversion to fertility. *Genetics* 135:869-79.
79. Jenkins BD, Kuhlman DJ, Barkan A. 1997. Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplast reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell* 9:283-96.
80. Kedde JS, Carroll B, Jones JDG, Grunissen W. 1996. The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *EMBO J.* 15:4208-17.
81. Keegstra K, Olsen IJ, Theg SM. 1989. Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:471-501.
82. Kernell JC, Wise RP, Pring DR. 1987. Influence of nuclear background on transcription of a maize mitochondrial region associated with Texas male sterile cytoplasm. *Mol. Gen. Genet.* 210:399-406.
83. Kim MY, Chnsiopher DA, Mullet JE. 1993. Direct evidence for selective modulation of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light responsive *psbD-psbC* promoter. *Plant Cell* 7:1445-57.
84. Kim MY, Mullet JE. 1995. Identification of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light responsive *psbD-psbC* promoter. *Plant Cell* 7:1445-57.
85. Kirk JTO, Tilney-Bassett RAE. 1978. *The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*. Amsterdam: Elsevier-North Holland, 960 pp.
86. Klein RR, Mullet JE. 1990. Light-induced transcription of chloroplast genes. *psbA* transcription is differentially enhanced in illuminated barley. *J. Biol. Chem.* 265:1895-902.
87. Knorr C, Szgyarto C, Glaser E. 1996. Evidence for a novel ATP-dependent membrane-associated protease in spinach leaf mitochondria. *Biochem. J.* 310:527-31.
88. Król M, Spangfort MD, Hüner NPA, Öquist G, Gustafsson P, Jansson S. 1995. Chlorophyll *a-b* binding proteins, pigment conversions and early light induced proteins in a chlorophyll *b*-less barley mutant. *Plant Physiol.* 107:873-83.
89. Kudla J, Hayes R, Grunissen W. 1996. Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. *EMBO J.* 15:7137-46.
90. Kuhlmeier C. 1992. Transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Plant Mol. Biol.* 19:1-14.
91. Kwok SF, Piekos B, Misera S, Deng X-W. 1996. A complement of ten essential and pleiotropic *Arabidopsis COP/DET/FUS* genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol.* 110:731-42.
92. Kyle DJ, Ohad I, Amren C. 1984.

- Membrane protein damage and repair: selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4070-74
93. Lundgren M, Zetterstrand M, Sundberg, Glimelius K. 1996. Alloplasmic male-sterile *Brassica* lines containing *B. tatarica* mitochondria express an ORF 5' of the *atps* gene and a 32 kDa protein. *Plant Mol. Biol.* 32:879-90
94. Laughnan JR, Gabay-Laughnan S. 1983. Cytoplasmic male sterility in maize. *Annu. Rev. Genet.* 17:27-48
95. Leech RM. 1986. Stability and plasticity during chloroplast development. In *Plasticity in Plants*, ed. D Jennings, A Trewas, pp. 121-53. Cambridge: Soc. Exp. Biol. Symp., 40
96. Lerbs S, Brautigam E, Maché R. 1988. DNA-dependent RNA polymerase of spinach chloroplast: Characterization of α a-like and α -like polypeptides. *Mol. Gen. Genet.* 211:459-64
97. Lerbs-Maché S. 1993. The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5509-13
- 97a. Levinger CS, Vasil I, eds. 1995. *The Molecular Biology of Plant Mitochondria*. Boston: Kluwer
98. Levy H, Kaudle KL, Stern D. 1997. A nuclear mutation that affects the 3' processing of several mRNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Cell* 9:825-36
99. Liu H-M, Culligan K, Dixon RA, Chory J. 1995. *CUE1*: a mesophyll cell-specific positive regulator of light-controlled gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 7:1599-610
100. Li JM, Nagpal P, Vitari V, McMorris TC, Chory J. 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272:398-401
101. Li X-Q, Zhang M, Brown GG. 1996. Cell-specific expression of mitochondrial transcripts in maize seedlings. *Plant Cell* 8:1961-75
102. Link G. 1994. Plastid differentiation: organelle promoters and transcription factors. In *Plant Promoters and Transcription Factors*, ed. J. Nover, pp. 63-83. Heidelberg: Springer-Verlag
103. Link G. 1996. Green life: control of chloroplast gene transcription. *BioEssays* 18:465-71
104. Liu JH, Lundgren M, Glimelius K. 1996. Transfer of the *B. tatarica* cytoplasm to *B. napus* for the production of cytoplasmic male sterile *B. napus*. *Physiol. Plant* 96:123-29
105. Lopez-Juez E, Stretfield S, Chory J. 1996. Light signals and autoregulated chloroplast development. In *Regulation of Plant Growth and Development by Light*, ed. WR Briggs, RI Heath, EM Tobin, pp. 144-52. Rockville, MD: Am. Soc. Plant Physiol.
106. Lu BW, Hanson MR. 1996. Fully edited and partially edited *nad5* transcripts differ in size and both are associated with polysomes in potato mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 24:1369-74
107. Lu BW, Wilson RK, Phreaner CG, Mulligan RM, Hanson MR. 1996. Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial *rps12* gene. *Mol. Cell Biol.* 16:1543-49
108. Mackenzie SA, Chase CD. 1990. Fertility restoration is associated with loss of a portion of the mitochondrial genome in cytoplasmic male sterile common bean. *Plant Cell* 2:905-12
109. Makaroff CA, Apel H, Palmer JD. 1990. Characterization of radish mitochondrial *atp6*: influence of nuclear background on transcription of *atp6*-associated sequences and relationship with male sterility. *Plant Mol. Biol.* 15:735-46
110. Mandel MA, Feldmann KA, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, Leon P. 1996. *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* 9:649-58
111. Marano M, Serra F, Orellano E, Carnillo N. 1993. The path of chloroplast development in fruits and flowers. *Plant Sci.* 94:1-17
112. Martensen RA, Barkan A, Freeling M, Taylor WC. 1989. Molecular cloning of a maize gene involved in photosynthetic membrane organization that is regulated by Robertson's *Mutator*. *EMBO J.* 8:1633-39
113. Martínez-Zapater JM, Gil P, Capel J, Somerville CR. 1992. Mutations at the *Arabidopsis CHM* locus promote rearrangements of the mitochondrial genome. *Plant Cell* 4:889-99
114. Mayfield SP, Yohn CB, Cohen A, Danon A. 1995. Regulation of chloroplast gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:147-66
115. Melis A. 1991. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1058:87-106
116. Meurer J, Meierhoff K, Westhoff P. 1996. Isolation of high chlorophyll fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterization by spectroscopy, immunoblotting and northern hybridization. *Planta* 198:385-96
117. Michel F, Umesono K, Ozeki H. 1989. Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns - A review. *Gene* 82:5-30
118. Miles D. 1994. The role of high chlorophyll fluorescence photosynthesis mutants in the analysis of chloroplast thylakoid membrane assembly and function. *Manduca* 39:35-45
119. Millar AJ, McGrath RB, Chua N-H. 1994. Phytochrome phototransduction pathways. *Annu. Rev. Genet.* 28:325-49
120. Mohr S, Schulte-Kappert E, Odenbach W, Oettler G, Kuck U. 1993. Mitochondrial DNA of cytoplasmic male-sterile *Triticum amopheves*: rearrangement of upstream sequences of the *atp6* and *orf25* genes. *Theor. Appl. Genet.* 86:259-68
121. Moneger F, Smart CJ, Leaver CJ. 1994. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. *EMBO J.* 13:8-17
122. Morden CW, Wolfe KH, de Pamphilis CW, Palmer JD. 1991. Plastid translation and transcription genes in a nonphotosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes. *EMBO J.* 10:3281-88
123. Mullet JE. 1993. Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.* 103:309-13
124. Nelson T, Langdale JA. 1989. Patterns of leaf development in C4 plants. *Plant Cell* 1:3-13
125. Newton KJ. 1995. Aberrant growth phenotypes associated with mitochondrial genome rearrangements in higher plants. See Ref. 97a, pp. 585-96
126. Newton KJ, Winberg B, Yamato K, Lupold S, Starn DB. 1995. Evidence for a novel mitochondrial promoter preceding the *cox2* gene of perennial tussocks. *EMBO J.* 14:585-93
127. Nugent JM, Palmer JD. 1991. RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 66:473-81
128. Oda K, Yamato K, Ohta E, Nakamura Y, Takenura M, et al. 1992. Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA: a primitive form of plant mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 223:1-7
129. Ogihara Y, Futami K, Tsuji K, Murai K. 1997. Alloplasmic wheats with *Aceitkops crassa* cytoplasm which express photoperiod-sensitive homeotic transformations of anthers, show alterations in mitochondrial DNA structure and transcription. *Mol. Gen. Genet.* 255:45-53
130. Oldenburg DJ, Bendich AJ. 1996. Size and structure of replicating mitochondrial DNA in cultured tobacco cells. *Plant Cell* 8:447-61
131. Osteryoung KW, Vierling E. 1995. Conserved cell and organelle division. *Nature* 376:473-74
132. Pepper A, Delaney T, Washburn T, Poole D, Chory J. 1994. *DET1*, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in *Arabidopsis*, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell* 78:109-16
133. Phreaner CG, Williams MA, Mulligan RM. 1996. Incomplete editing of *rps12* transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria. *Plant Cell* 8:107-17
134. Pring DR, Mullen JA, Kempken F. 1992. Conserved sequence blocks 5' to start codons of plant mitochondrial genes. *Plant Mol. Biol.* 19:313-17
- 134a. Pyke KA. 1997. The genetic control of plastid division in higher plants. *Am. J. Bot.* 84:1017-27
135. Pyke KA, Leech RM. 1992. Chloroplast division and expansion is radically altered by nuclear mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 99:1005-8
136. Pyke KA, Leech RM. 1994. A genetic analysis of chloroplast division and expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104:201-7
137. Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D. 1995. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* 268:675-80
138. Rapp JC, Baumgartner BJ, Mullet J. 1992. Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes. Transcription rates and mRNA levels vary over 300-fold; predicted mRNA stabilities vary 30-fold. *J. Biol. Chem.* 267:2140-11
139. Reiter RS, Coomber SA, Bourret TM, Bartley GE, Scolnik PA. 1994. Control of leaf and chloroplast development by the *Arabidopsis* gene *pale cress*. *Plant Cell* 6:1253-64
140. Rep M, Grivell LA. 1996. The role

- of protein degradation in mitochondrial function and biogenesis. *Curr. Genet.* 30:367-80.
141. Rochaix JD. 1992. Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:1-28.
142. Rochaix JD. 1996. Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 32:327-41.
143. Rocheford TR, Kennell JC, Pring DR. 1992. Genetic analysis of nuclear control of *Tar1/3orf221* transcription in T cytoplasm maize. *Theor. Appl. Genet.* 84:891-98.
144. Rodermel S, Haley J, Jiang C-Z, Tsa C-H, Bogorad L. 1996. A mechanism for intergenomic integration: abundance of ribulose biphosphate carboxylase small-subunit protein influences the translation of the large-subunit mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3881-85.
145. Roth R, Hall LN, Brutnell TP, Langdale JA. 1996. *bundle sheath defective 2*, a mutation that disrupts the coordinate development of bundle sheath and mesophyll cells in the maize leaf. *Plant Cell* 8:915-27.
146. Runge S, van Cleve B, Lebedev N, Armstrong G, Apel K. 1995. Isolation and classification of chlorophyll-deficient *ta1tha* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 197:490-500.
147. Sakamoto W, Kondo H, Murata M, Motoyoshi F. 1996. Altered mitochondrial genome expression in a maternal distorted leaf mutant of *Arabidopsis* induced by chloroplast mutator. *Plant Cell* 8:1377-90.
148. Saldanha R, Mohr G, Belfort M, Lambowitz AM. 1993. Group I and group II introns. *FASEB J.* 7:15-24.
149. Schwartz RM, Dayhoff MO. 1978. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplast. *Science* 199:395-403.
150. Sexton JB, Christopher DA, Mullet JE. 1990. Light-induced switch in barley *psbD-psbI* promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *EMBO J.* 9:4485-94.
151. Shanklin J, DeWitt ND, Flanagan JM. 1995. The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC, functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA; an archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant Cell* 7:1713-22.
152. Singh M, Brown GG. 1991. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region. *Plant Cell* 3:1349-62.
153. Singh M, Brown GG. 1993. Characterization of expression of a mitochondrial gene region associated with the Brassica "Polima" CMS: developmental influences. *Curr. Genet.* 24:316-22.
154. Singh M, Hamel N, Menassa R, Li X-Q, Young B, et al. 1996. Nuclear genes associated with a single Brassica CMS restorer locus influence transcripts of three different mitochondrial gene regions. *Genetics* 143:505-16.
155. Small ID, Isaac PG, Leaver CJ. 1987. Stoichiometric differences in DNA molecules containing the *atp4* gene suggest mechanisms for the generation of mitochondrial diversity in maize. *EMBO J.* 6:865-69.
156. Small ID, Suffolk R, Leaver CJ. 1989. Evolution of plant mitochondrial genomes via sub-stoichiometric intermediates. *Cell* 58:69-76.
157. Smart CJ, Monéger F, Leaver CJ. 1994. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell* 6:811-25.
158. Sorenville CR. 1986. Analysis of photosynthesis with mutants of higher plants and algae. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:467-507.
159. Staub JM, Maliga P. 1993. Accumulation of the D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. *EMBO J.* 12:601-6.
160. Stern DB, Higgs DC, Yang J. 1997. Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 2:308-15.
161. Sreethfield SJ, Post-Beitermiller D, Chory J. 1997. Analysis of the *etw1* (cab underexpressed) mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Int. Conf. Arabidopsis Res.*, 8th, Madison, Wis.
162. Susek R, Chory J. 1992. A tale of two genomes: role of a chloroplast signal in coordinating nuclear and plastid genome expression. *Aust. J. Plant Physiol.* 19:387-99.
163. Suzuki CK, Suda K, Wang N, Schatz G. 1994. Requirement for the yeast gene *ION* in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* 264:273-76.
164. Tang H-Y, Pring DR, Shaw LC, Salazar RA, Muza FR, et al. 1996. Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum. *Plant J.* 10:123-33.
165. Taylor WC. 1989. Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:211-33.
166. Tiller K, Link G. 1993. Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription systems from mustard (*Sisymbrium irio* L.). *EMBO J.* 12:1745-53.
167. Troxler RF, Zhang F, Hu J, Bogorad L. 1994. Evidence that σ factors are components of chloroplast RNA polymerase. *Plant Physiol.* 104:753-59.
168. Tsumewski K. 1993. Genome-plasmion interactions in wheat. *Jpn. J. Genet.* 68:1-34.
169. Unsell M, Marienfeld JR, Brandt P, Brenneke A. 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat. Genet.* 15:57-61.
170. van der Graaff E. 1997. *Developmental mutants of Arabidopsis thaliana obtained after T-DNA transformation*. PhD thesis. Leiden Univ. 179 pp.
171. Van Dyck L, Pearce DA, Sherman F. 1994. *PIM1* encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269:238-42.
172. Voelker R, Barkan A. 1995. Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *EMBO J.* 14:3905-14.
173. Voelker R, Mandel-Harvig J, Barkan A. 1997. Transposon-disruption of a maize nuclear gene, *hsl1*, encoding a chloroplast SecE homologue: in vivo role of cp-SecA in thylakoid protein targeting. *Genetics* 145:467-78.
- 173a. von Arnim A, Deng X-W. 1996. Light control of seedling development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:215-43.
174. von Wettstein D, Henningsen KW, Boynton JE, Kannangara GC, Nielsen OE. 1971. The genetic control of chloroplast development in barley. In *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, ed. N Boardman, A Linnae, R Smille, pp. 205-23. Amsterdam: North-Holland.
175. Wang N, Gottesman S, Willingham M, Gottesman MM, Maurizi MR. 1993. A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11247-51.
176. Wei N, Chamovitz DA, Deng X-W. 1994. Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* 78:117-24.
- 176a. Wei N, Deng X-W. 1996. The role of the COP9/LELUS genes in light control of Arabidopsis seedling development. *Plant Physiol.* 112:871-78.
177. Westhoff P, Hermann RG. 1988. Complex RNA maturation in chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 171:551-64.
178. Wetzel CM, Jiang C, Meehan LJ, Voytas DF, Rodermel SR. 1994. Nuclear-organellar interactions: the *immutans* variegation mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *Plant J.* 6:161-75.
179. Whelan J, Glaser E. 1997. Protein import into plant mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 33:771-89.
180. Wilsbach K, Payne GS. 1993. Vps1p, a member of the dynamin GTPase family, is necessary for Golgi membrane protein retention in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 12:3049-59.
181. Wilson RK, Hanson MR. 1996. Preferential RNA editing at specific sites within transcripts of two plant mitochondrial genes does not depend on transcriptional context or nuclear genotype. *Curr. Genet.* 30:502-8.
182. Wise RP, Dill CL, Schnable PS. 1996. Mutator-induced mutations of the *rf1* nuclear fertility restorer of T-cytoplasm maize alter the accumulation of *T-urf13* mitochondrial transcripts. *Genetics* 143:1383-94.
183. Wolstenholme DR, Farron CM-R. 1995. Mitochondrial genome organization. *See Ref. 97a*, pp. 1-60.
184. Yang AJ, Mulligan RM. 1993. Distribution of maize mitochondrial transcripts in polysomal RNA: evidence for nonselectivity in recruitment of mRNAs. *Curr. Genet.* 23:532-36.
185. Young IG, Hanson MR. 1987. A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* 50:61-69.