



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de hexocinasa III por su  
posible participación en la señalización por  
glucosa en Arabidopsis thaliana

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Gabriela Itzetzl Medina Ruiz



TUTORA

Patricia León Mejía



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.

*A mis padres por todo su amor y apoyo que siempre me han brindado.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Patricia León por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo.

A mis sinodales la Dra. Elizabeth Cordoba, el Dr. Bernardo Luna Ulloa, el Dr. José Luis Reyes Taboada y al Dr. Sol Cristians Niizawa por su tiempo brindado y por todas las aportaciones que fueron indispensables en la realización de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y porque siempre tuvieron la mejor disposición de ayudarme. Sobre todo a Elizabeth Cordoba por sus enseñanzas que fueron puntos clave en la realización de este trabajo.

A mis padres Rocío Ruiz y Arturo Medina, a mis hermanos Itzcóatl y Efectazin; por apoyarme en todo momento.

A mi abuelita Pachita y a toda mi familia por brindarme todo su cariño.

A mis amigas Daniela Carmona, Tatiana Luna y Sara Albarrán por su amistad incondicional y comprensión durante mi estancia en Morelos. A Oscar Villafranco por todo su amor y por formar parte de mi vida. Les agradezco a todos mis amigos de Cuernavaca por su amistad y a mis amigos de la Facultad de Ciencias por hacer de las salidas de campo toda una aventura.

Agradezco profundamente a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biotecnología por todo lo otorgado en la realización de esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
LOS AZÚCARES COMO SEÑALES EN LAS PLANTAS.....	16
Arabidopsis thaliana COMO MODELO DE ESTUDIO.....	19
LAS HEXOCINASAS.....	21
FUNCIONES DE LAS HXKs ASOCIADAS A SU LOCALIZACIÓN INTRACELULAR.....	23
<i>Hexocinasas de tipo A.....</i>	<i>23</i>
<i>Hexocinasas de tipo B.....</i>	<i>26</i>
<i>Hexocinasas de tipo C.....</i>	<i>27</i>
<i>Hexocinasas de tipo D.....</i>	<i>27</i>
HEXOCINASAS EN A. thaliana.....	29
<i>Expresión de los transcritos de los genes de HXKs en A. thaliana.....</i>	<i>29</i>
<i>La HXK1 tienen una función señalizadora de azúcares en A. thaliana.....</i>	<i>30</i>
<i>La HKL1 tiene una función reguladora de azúcares en A. thaliana.....</i>	<i>32</i>
ESTUDIOS FILOGENÉTICOS DE LAS HEXOCINASAS.....	33

ELEMENTOS DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE AZÚCARES EN LAS PLANTAS.....	35
<i>Sensores de azúcares</i> .....	36
<i>Transductores de la señal de azúcar</i> .....	36
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE AZÚCARES EN LAS PLANTAS.....	38
<i>Vía dependiente de la HXK</i> .....	39
<i>Vía dependiente de la HXK y del metabolismo</i> .....	40
<i>Vías independientes de la HXK</i> .....	40
<b>HIPÓTESIS</b> .....	42
<b>OBJETIVOS</b> .....	42
<i>Objetivos particulares</i> .....	42
<b>METODOLOGÍA</b> .....	43
CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDOS Y CLONACIÓN.....	43
<i>Aislamiento del gen HXK3 y fusión al vector de clonación</i>	
<i>pENTR/D/TOPO<sup>TM</sup></i> .....	43
<i>Incorporación del gen HXK3 a un sistema binario</i> .....	45
TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE <i>A. thaliana</i> Y OBTENCIÓN DE LÍNEAS	
SOBREEXPRESORAS DE HXK3.....	48
ANÁLISIS DE LA GENOTIPIFICACIÓN DE LAS MUTANTES <i>hvk3</i> .....	49
MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	49
<i>Ensayos de sensibilidad a glucosa</i> .....	49
<i>Análisis estadísticos</i> .....	50
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENÉTICA TIPO NORTHERN-BLOT.....	50

<b>RESULTADOS</b> .....	51
CONFIRMACIÓN DE LÍNEAS SOBREENPRESORAS 35S::HXK3.....	51
GENOTIPIFICACIÓN DE LA LÍNEA SALK_030722.55.75.X MUTANTE DE INSERCIÓN EN EL LOCUS AT1G47840 (HXK3).....	53
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LAS LÍNEAS 35S::HXK3 Y LA MUTANTE <i>hvk3</i> .....	56
EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE PLANTAS DE <i>A. thaliana</i> .....	57
ANÁLISIS DEL FENOTIPO EN LA GERMINACIÓN DE LAS LÍNEAS 35S::HXK3 Y LA MUTANTE <i>hvk3</i> .....	61
EVALUACIÓN DEL DESARROLLO TEMPRANO EN RESPUESTA A GLUCOSA DE LAS LÍNEAS 35S::HXK3 Y LA MUTANTE <i>hvk3</i> .....	64
<b>DISCUSIÓN</b> .....	68
EL DESARROLLO TEMPRANO ESTÁ AFECTADO EN LAS PLANTAS 35S::HXK3.....	69
LA MUTANTE <i>hvk3</i> PRESENTA UN FENOTIPO SIMILAR A LA SILVESTRE COL-0.....	69
LA ACUMULACIÓN DEL TRANSCRITO DE HXK3 CORRELACIONA CON EL FENOTIPO DE HIPERSENSIBILIDAD A GLUCOSA.....	70
CONSIDERACIONES FINALES.....	71
<b>CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	73
<b>ANEXO</b> .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Participación de los azúcares en las plantas.....	14
Figura 2. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
Figura 3. Mutantes <i>gin</i> ( <i>glucose insensitive</i> ) y <i>glo</i> ( <i>glucose oversensitive</i> ).....	20
Figura 4. Modelo de la estructura cristalográfica de HXK2 de levadura.....	21
Figura 5. Reacción de fosforilación de D-glucosa por la HXK.....	20
Figura 6. Fenotipo de la mutante <i>gin2-1</i> y complementación por <i>35S::AtHXK1</i> .....	31
Figura 7. Elementos de las vías de señalización de azúcares en plantas.....	35
Figura 8. Análogos de hexosas fosforilables y no fosforilables por la HXK.....	38
Figura 9. Vías de percepción y señalización de azúcares en plantas.....	41
Figura 10. Mapa de oligonucleótidos .....	43
Figura 11. Esquema de la construcción pENTR/D/TOPO:: <i>HXK3</i> .....	44
Figura 12. Electroforesis de productos de PCR a partir de plásmido purificado con la construcción pENTR/D/TOPO:: <i>HXK3</i> .....	45
Figura 13. Esquema de la reacción de recombinación (LR) .....	46
Figura 14. Electroforesis de los productos de PCR de las mutantes obtenidas de la recombinación LR.....	47
Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR en colonia de transformantes de <i>A. tumefaciens</i> .....	48

Figura 16. Electroforesis de productos de PCR de plantas resistentes al medio de selección GM con Kan (50 µg/µl).....	51
Figura 17. Análisis de los niveles de mRNA de <i>HXK3</i> por Northern-blot.....	52
Figura 18. Electroforesis de productos de PCR de plántulas del stock de SALK_030722.55.75.X.....	53
Figura 19. Análisis comparativo del fenotipo de dos líneas homocigas de <i>hvk3</i> .....	54
Figura 20. Electroforesis de productos de PCR para selección del estado homocigo de la mutante <i>hvk3</i> .....	55
Figura 21. Análisis de los niveles de mRNA de <i>HXK3</i> por Northern-blot.....	56
Figura 22. Germinación de las semillas de <i>A. thaliana</i> .....	57
Figura 23. Evaluación de la germinación en 1% de sacarosa.....	58
Figura 24. Evaluación de la germinación a las 48 horas.....	59
Figura 25. Evaluación de la germinación a las 72 horas.....	60
Figura 26. Análisis del fenotipo de las plantas a las 36 horas.....	61
Figura 27. Análisis del fenotipo de las plantas a las 72 horas.....	63
Figura 28. Análisis del fenotipo de las plantas en 4% de glucosa.....	63
Figura 29. Fenotipo de plantas con desarrollo detenido.....	64
Figura 30. Evaluación del desarrollo temprano en 3% de glucosa.....	65
Figura 31. Evaluación del desarrollo temprano en 6% de glucosa.....	66
Figura 32. Evaluación del desarrollo temprano en 7.5% de glucosa.....	67
Figura 33. Mapa de la secuenciación de la construcción pENTR/D/TOPO:: <i>HXK3</i> .....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hexocinasas de tipo A.....	26
Tabla 2. Tipos de hexocinasas.....	28
Tabla 3. Grupos filogenéticos de las hexocinasas.....	34
Tabla 4. Oligonucleótidos.....	79
Tabla 5. Composición de soluciones y amortiguadores.....	82
Tabla 6. Composición y elaboración de medios.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
°C	Grados Celsius
cDNA	DNA complementario
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilen diamonio tetra-acético
GFP	Proteína verde fluorescente
GM	Medio MS suplementado con sacarosa (1%)
HKL	Hexocinasa “ <i>like</i> ”
HXK	Hexocinasa
HXT	Transportador de hexosas
Kan	Kanamicina
LB	Medio Luria “ <i>Broth</i> ”
ml	Mililitro
µg	Microgramo
mRNA	RNA mensajero
MS	Medio “ <i>Murashige and Skoog</i> ”
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Sp	Espectinomicina
SOC	Medio rico en nutrientes y bajo en sales, usado para recuperar bacterias.
T-DNA	Transfactor de DNA del plásmido inductor de tumores en <i>A. tumefaciens</i>
TENS	Buffer para miniprep que contiene Tris-HCl, EDTA, NaOH y SDS

## ABSTRACT

Hexokinases (HXK) are dual function enzymes that, in addition of its catalytic activity, act as sugar sensors modulating gene expression in response to sugar levels. In most plant HXKs are encoded by a small gene family, for example in the *A. thaliana* genome there are 6 related *HXK* genes that encodes for HXKs. The participation of HXK in the sugar sensing mechanism has been mainly inferred from studies with the *HXK1* gene. Mutants in *HXK1* (*gin2-1*) are insensitive to sugars, these can growth in high concentrations. Recent analyses have shown that *HXK3* could participate in signaling sugars in *A. thaliana*. However, the role of the plastid-localized *HXK3* in the sugar perception is not clear. To analyze in more detail the function of *HXK3* in sugar signaling, in this work we analyzed the sugar sensitivity in plants that overexpressed this gene. We analyzed the sensitivity to different glucose concentrations during seed germination of four transgenic lines that overexpress the *HXK3* gene. We also analyzed seed germination in a mutant for the *HXK3* gene (*hvk3*) using similar experimental conditions. We observed that the *hvk3* mutant did not display a difference in the sugar response compared to the wild type, while the *HXK3* overexpressor lines show a sugar hypersensitive phenotype that correlates with the levels of *HXK3* transcript; when we increase the transcript levels also increase the sugar response. We conclude that the *HXK3* participate in sugar signaling in *A. thaliana*. We would have to analyze in detail its role in sink tissues because the *HXK3* expression is increased. These results open new possibilities for the study of the *HXK3* role in the plastids.

## RESUMEN

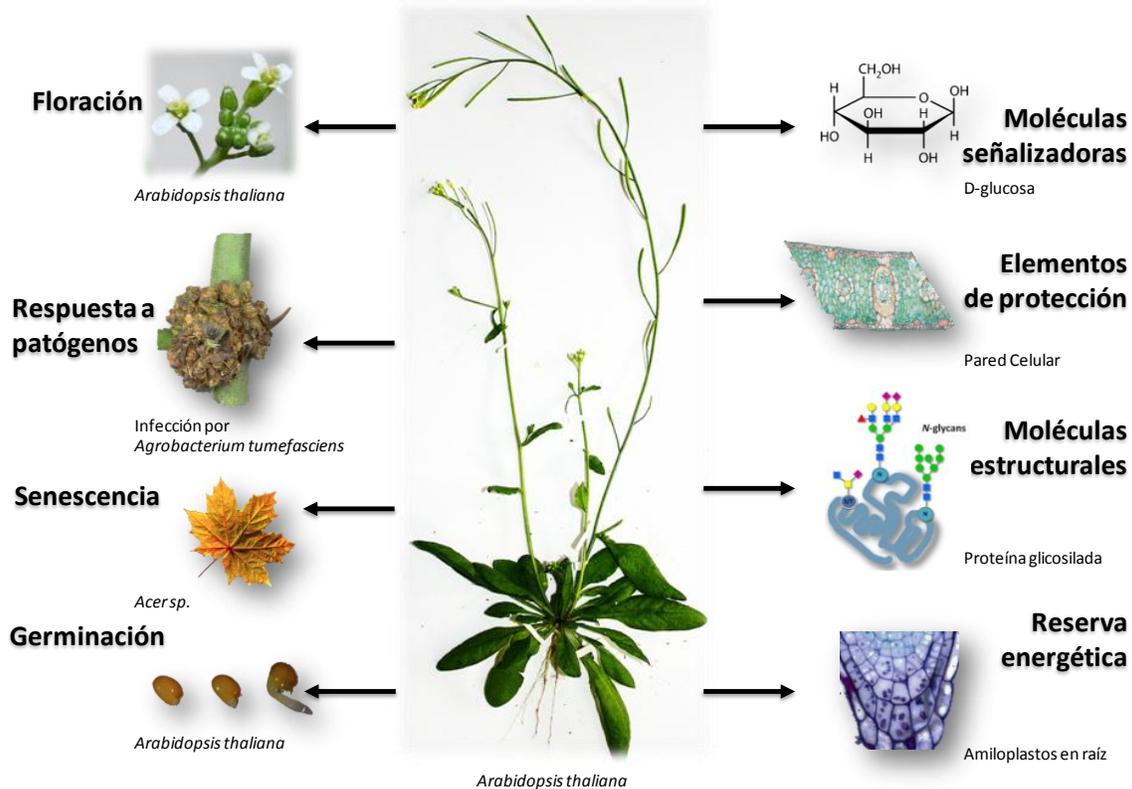
Las hexocinasas (HXKs) son proteínas con función dual. Además de su actividad catalítica de cinasas, actúan como sensores de azúcar modulando la expresión genética de genes fotosintéticos en respuesta a azúcares. La mayoría de las HXKs en plantas están codificadas por una pequeña familia de genes, por ejemplo: el genoma de *A. thaliana* posee 6 genes que codifican para hexocinasas. La participación de las HXKs en la percepción de azúcares se ha dilucidado a través del gen HXK1. Mutantes afectadas en este gen (*gin2-1*) son insensibles a azúcares y pueden crecer en altas concentraciones de fuentes carbonatadas. Análisis recientes muestran que la HXK3 plastídica parece tener funciones similares a la HXK1, pero su participación en la señalización de azúcares no está clara. Para analizar con más detalle la función de la HXK3 en la señalización de azúcares, en este trabajo se evaluó la sensibilidad a azúcares de cuatro líneas transgénicas sobreexpresoras y una mutante del gen *HXK3* en *A. thaliana* usando diferentes concentraciones de glucosa. A partir de este análisis se evidenció que las líneas sobreexpresoras muestran un fenotipo de hipersensibilidad a glucosa. Sin embargo, la mutante *hvk3* no presentó diferencias en su sensibilidad a azúcares respecto a la silvestre. Adicionalmente se observó una correlación del modo de hipersensibilidad con el incremento en los niveles de transcrito de *HXK3* en las líneas sobreexpresoras (líneas con mayor nivel de transcrito de HXK3 mostraron mayor grado de hipersensibilidad). Nuestros datos sugieren que HXK3 podría tener una participación en la señalización de azúcar en los plástidos. Nosotros sugerimos que hacen falta más estudios para analizar a detalle el papel de la HXK3 en tejidos de almacenamiento, ya que los niveles de expresión de este gen se encuentran incrementados en tejidos demandantes de la planta.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos fotoautótrofos capaces de transformar casi 100'000 millones de toneladas métricas de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en celulosa y otros productos orgánicos por año a través del proceso de fotosíntesis, por el cual se realiza la fijación de carbono para la generación de moléculas de azúcar en los cloroplastos que son indispensables para la vida en la Tierra (Nelson *et al.*, 2005). Los azúcares tienen múltiples funciones esenciales en el crecimiento y desarrollo de los organismos vivos, algunos actúan como elementos estructurales que confieren resistencia y sirven de protección, ejemplos de ello son los componentes de las paredes celulares como la celulosa en plantas y la quitina en bacterias, hongos y animales.

Los azúcares simples son usados como fuente de energía en casi todas las especies y su exceso es transformado en estructuras complejas formadas de polímeros de azúcares que sirven de reserva energética, un ejemplo de ello es el almidón en las plantas. El almacenamiento de azúcar es indispensable para solventar y responder ante la demanda fisiológica durante condiciones menos favorables. Algunos otros polímeros de glúcidos se unen covalentemente a proteínas o lípidos y funcionan como epítopes que determinan la localización intracelular de otras moléculas o el destino metabólico. Muchos otros azúcares forman estructuras altamente específicas que son parte de diversos receptores en las membranas celulares (Figura 1) (Nelson *et al.*, 2005).

Una función adicional que poseen los azúcares en todos los seres vivos es que actúan como moléculas señal, es decir; sus niveles son percibidos a nivel celular desencadenando diversas vías de señalización que culminan en la modulación de la expresión genética y por consiguiente confieren una adaptación metabólica a los organismos en respuesta al requerimiento energético. Particularmente en las plantas, los azúcares son señales que regulan numerosos procesos del desarrollo: embriogénesis, diferenciación organelar, floración, formación de la raíz, maduración de las hojas, respuesta a patógenos, senescencia de las hojas, entre otros (Figura 1) (von Schaewen *et al.*, 1990; Dickinson *et al.*, 1991; Ding *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1999; Dekkers *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Participación de los azúcares en las plantas. A la izquierda se ejemplifican algunos procesos del desarrollo coordinados por azúcares. A la derecha se ejemplifican algunas funciones principales de los azúcares.

Desde los organismos unicelulares como las bacterias y las levaduras hasta organismos multicelulares como las plantas y los animales requieren de un mantenimiento de la homeostasis energética para lograr un buen funcionamiento, en consecuencia los seres vivos han desarrollado diferentes mecanismos de percepción de azúcares que coordinan procesos del desarrollo.

Las plantas producen azúcares en las hojas maduras, los cuales son transportados a través del floema abasteciendo todos los tejidos, esta movilización de nutrientes se lleva a cabo gracias a un complejo sistema que permite integrar diferentes señales metabólicas, fisiológicas y ambientales (Koch, 1996; Roitsch, 1999; Sheen *et al.*, 1999; Smeekens *et al.*, 2000, 2010).

Hasta ahora se han caracterizado algunas vías de señalización y algunos de sus componentes, incluyendo sensores y transductores de la señal de azúcar en diferentes organismos modelo de hongos, plantas y animales (Rolland *et al.*, 2006). La molécula perceptora de hexosas mejor estudiada es la Hexocinasa (HXK), la cual tiene una función dual, por un lado tiene una función enzimática como cinasa y por otro lado una señalizadora. Estas propiedades de la HXK están conservadas desde la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (YHXK2), la de animales (HXKV) y la de plantas como *A. thaliana* (HXK1). En todos los casos se sabe que estas proteínas son un punto clave en el control del metabolismo y el desarrollo (Moore *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2002, 2006).

Los genes que codifican para las HXKs están conservados en diferentes especies, desde bacterias y levaduras hasta plantas y animales. En las plantas constituyen una familia que contiene de 1 a 10 miembros, los cuales presentan una expresión diferencial y las proteínas que codifican se localizan en diferentes compartimentos celulares. Esta especialización de isozimas de las HXKs les permite tener una amplia variedad de funciones metabólicas y de señalización (Claeyssen y Rivoal, 2007).

A continuación se describen, en primer lugar, a los azúcares como moléculas señal en las plantas, en segundo lugar, se describirá la familia de hexocinasas en las plantas y su papel central en la señalización de azúcares. Nuestra investigación está enfocada en estudiar la Hexocinasa III de *A. thaliana* (HXK3) y su participación en la percepción de azúcares. Para llevar a cabo esta investigación se construyeron plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *HXK3*, posteriormente se evaluó la respuesta a azúcar de las líneas sobreexpresoras y de una línea mutante *hvk3* en etapas tempranas del desarrollo. Nuestros datos indican que la hexocinasa plastídica HXK3 tiene una participación importante en la percepción de azúcares en *A. thaliana*.

## MARCO TEÓRICO

### Los azúcares como señales en las plantas

En organismos multicelulares como las plantas, el mantenimiento de la homeostasis energética requiere un monitoreo constante para llevar a cabo ajustes en la disponibilidad de nutrientes en las células y los tejidos. Las plantas necesitan mecanismos de señalización a corta y larga distancia para regular procesos fisiológicos como el crecimiento, el desarrollo y eventos de respuesta al medio ambiente. A través de la evolución, las plantas han desarrollado tejidos especializados altamente comunicados donde se conjunta la información de diversos procesos fisiológicos, que logran una respuesta metabólica.

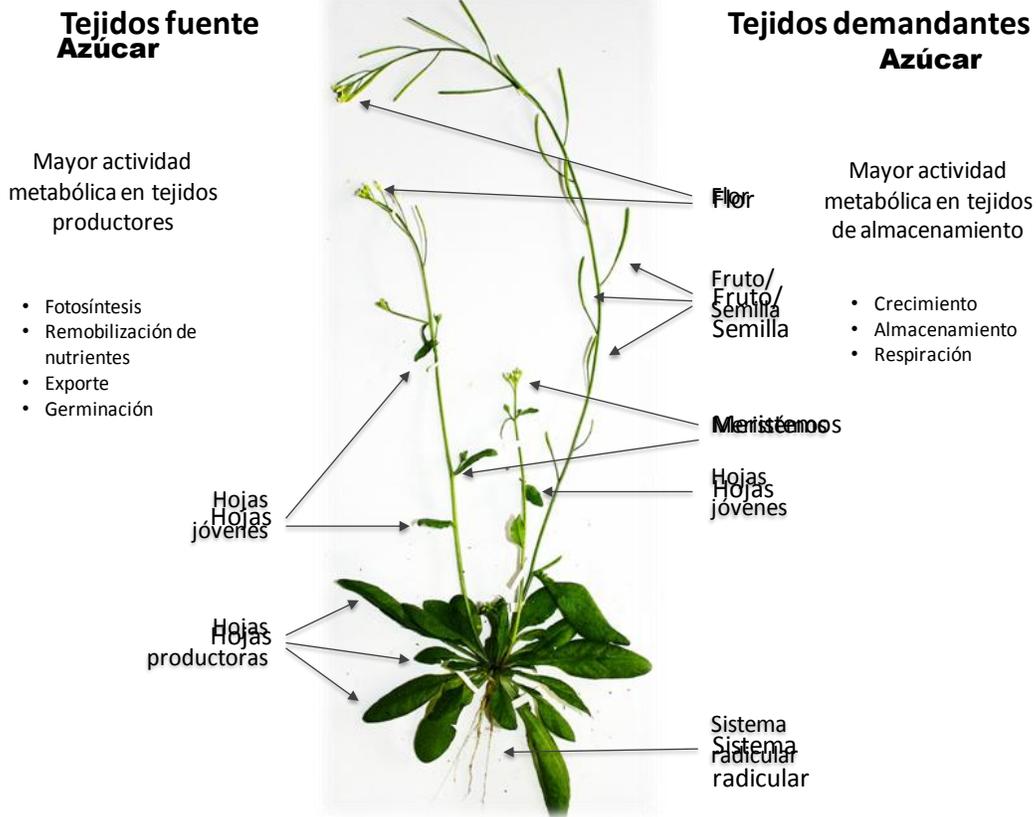
Las plantas poseen tejidos fuente ó de exporte (*source*) de azúcares y tejidos demandantes o de importe de azúcares (*sink*). Donde los primeros son tejidos fotosintéticos, que se encargan de la síntesis de azúcares y que exportan estas fuentes carbonadas a los tejidos de importe. En consecuencia el metabolismo en los tejidos demandantes responde a bajas concentraciones de azúcar y promueve la síntesis de fotosintatos, que posteriormente se movilizan y exportan a los tejidos demandantes. En contraste, los tejidos demandantes aumentan el metabolismo de almacenamiento de fotosintatos en respuesta a altas concentraciones de azúcares (Figura 2) (Ehness *et al.*, 1997; Smeekens *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2002; To *et al.*, 2002; Gibson, 2005; Smeekens *et al.*, 2010).

En los tejidos fotosintéticos, las triosas fosfato generadas en el ciclo de Calvin son transportadas del cloroplasto al citoplasma para la síntesis de sacarosa para su exporte a los tejidos demandantes. El exceso de carbono obtenido en la fotosíntesis es almacenado transitoriamente en forma de almidón durante el día en los cloroplastos de los tejidos fuente (To *et al.*, 2002). El almidón almacenado en el cloroplasto es metabolizado posteriormente para ser transportado al citosol en forma de maltosa y glucosa durante la noche para mantener los requerimientos energéticos de crecimiento durante la etapa nocturna. El exceso de fuentes de carbono es transformado en sacarosa para ser exportado a los tejidos demandantes a través del floema e importada por transporte apoplástico y simplástico en los tejidos demandantes donde la sacarosa es ocupada para las necesidades celulares; a su

vez, el exceso de sacarosa es almacenado en forma de almidón en los tejidos de almacenamiento (Paul y Foyer, 2001).

### Tejidos productores

### Tejidos de almacenamiento



**Figura 2.** *Arabidopsis thaliana*. A la izquierda se muestran los tejidos productores de carbono (*source*), como las hojas. A la derecha se muestran los tejidos demandantes de fuentes carbonatadas (*sink*), como flor, fruto/semilla/silicuas, meristemos, hojas jóvenes y sistema radicular.

Los niveles de azúcares modulan diferentes genes y enzimas que participan en la movilización de nutrientes (Koch, 1996; Weber *et al.*, 1998; Sheen *et al.*, 1999; Lejay *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2008). La expresión de algunas enzimas involucradas en la síntesis y degradación de sacarosa se encuentran altamente reguladas por los azúcares, esta regulación tiene un alto impacto durante el desarrollo y crecimiento de las plantas. Un ejemplo de ello son las invertasas que llevan a cabo el rompimiento de la sacarosa para formar glucosa y fructosa. Las invertasas están localizadas en diferentes compartimentos celulares como la invertasa de la pared celular (CW-INV), la invertasa citoplasmática (C-

INV) y la invertasa vacuolar (V-INV). Estudios donde expresan de manera específica la CW-INV en el meristemo apical de *A. thaliana*, demuestran que CW-INV tiene una repercusión importante en el desarrollo de la planta durante la formación de la semilla, la transición a floración y la respuesta al estrés abiótico (Tang et al., 1999; Sherson et al., 2003; Heyer et al., 2004). Otra enzima que participa en el rompimiento de sacarosa es la sacarosa sintasa (SUS) generando glucosa y UDP-glucosa, tanto las INV como las SUS son proteínas que se encuentran reguladas por mecanismos de retroalimentación que generan sus productos tanto a nivel de actividad como de expresión genética (Herbers *et al.*, 1996; Rosa *et al.*, 2009). Un ejemplo más de proteínas altamente reguladas por los niveles de azúcares son las que participan en la ruptura y almacenamiento del almidón como la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), enzima que forma parte de la síntesis de almidón y su función responde a la demanda de azúcares (Rolland *et al.*, 2006).

Numerosos estudios indican que el balance energético en las plantas requiere procesos de regulación de azúcares que están ligados a la síntesis y requerimiento de fotosintatos, sin embargo; además de los azúcares, existen otros nutrientes como el nitrógeno, el fosfato y el sulfato que también controlan una gran cantidad de procesos en el desarrollo de las plantas y que interactúan con las señales de azúcares (Sheen *et al.*, 1999). Actualmente se tiene evidencia que algunos azúcares como la sacarosa, la trehalosa, la glucosa y la fructosa actúan como moléculas señal que regulan procesos del desarrollo muy específicos en las plantas (Paul *et al.*, 2008; Wingler *et al.*, 2012; Smeekens *et al.*, 2010).

### ***Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio**

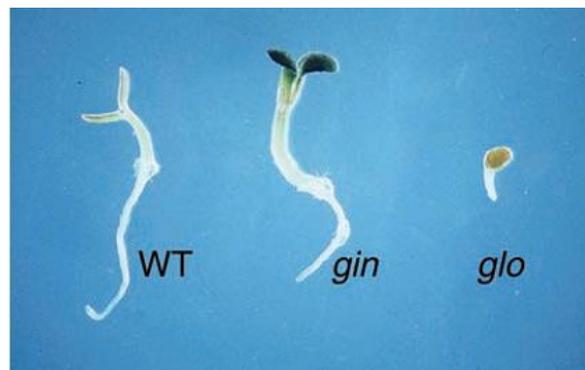
*A. thaliana* es una planta dicotiledónea (pequeña a 30cm) que pertenece a la familia Brassicaceae y es utilizada ampliamente como un organismo modelo en biología vegetal. A diferencia de otras plantas de esta familia, *A. thaliana* no tiene importancia agronómica; sin embargo, ofrece ventajas importantes para la investigación básica en la genética y biología molecular. Algunas de las ventajas radican en que posee un genoma pequeño (114.5 Mpb / 125 Mpb) y está secuenciado por completo. Además tiene un ciclo de vida rápido (alrededor de 6 semanas desde la germinación hasta la maduración de las semillas), es una planta hermafrodita y tiene una gran producción de semillas, además existen métodos de transformación eficientes utilizando *A. tumefaciens* para la generación de líneas transgénicas (The Arabidopsis Information Resource, TAIR).

El proceso de germinación de las semillas de *A. thaliana* (Col-0) comienza con la absorción de agua (imbibición), posteriormente se lleva a cabo la elongación celular incrementando la absorción de agua hasta la ruptura de la testa (34 horas), el crecimiento continúa y comienza la diferenciación celular hasta la síntesis de clorofila en sus cotiledones (56 horas). *A. thaliana* en su etapa adulta presenta hojas simples de forma elíptica a ovada, con el margen entero. Posee dos tipos de hojas, las basales que están en contacto con el sustrato de forma arrosetada y las caulinares que se encuentran a lo largo del tallo. La inflorescencia se presenta en racimo terminal, las flores son hermafroditas y el fruto es una silicua linear (Figura 2). *A. thaliana* tiene diferentes ecotipos que se diferencian por su distribución en el mundo, los ecotipos de uso frecuente son Landsberg erecta, Columbia y Wassilewskija (The Arabidopsis Information Resource, TAIR).

*A. thaliana* ha sido usada para el estudio de múltiples procesos gracias a la facilidad de generación de mutantes, se han aislado una gran cantidad de mutantes que son sensibles a diferentes condiciones de crecimiento. Uno de estos estudios ha sido la evaluación de la respuesta fisiológica y fenotípica en respuesta a azúcar, usando concentraciones variables.

Se han aislado mutantes que tienen alterada la percepción de azúcares; algunas presentan insensibilidad (*gin*) o hipersensibilidad (*glo*) a glucosa (Figura 3). Se ha corroborado que plantas silvestres crecidas en altas concentraciones de azúcar (>5%) presentan desarrollo detenido y despigmentación, este fenotipo es el resultado de la represión de genes fotosintéticos y de genes relacionados al crecimiento, al metabolismo y al desarrollo en las plantas (Jang y Sheen, 1997; Martin *et al.*, 1997; Matthew *et al.*, 2008; Rolland *et al.*, 2006).

Se ha corroborado que la administración de azúcar retrasa la germinación y afecta el desarrollo de las plantas silvestres; sin embargo, las mutantes *gin* (glucose insensitive) se caracterizan por presentar cotiledones bien desarrollados y enverdecidos en concentraciones mayores a 5% de azúcares, mientras que las mutantes *glo* (glucose oversensitive) presentan desarrollo detenido y despigmentación de sus cotiledones en concentraciones bajas de azúcar, menores al 4% (Figura 3) (Zhou *et al.*, 1998; Sheen *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2002).

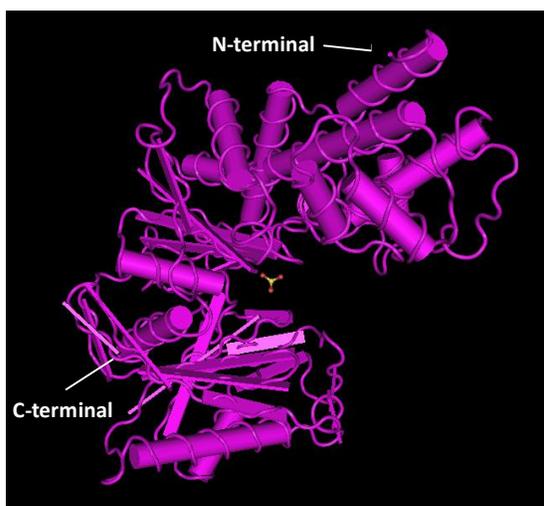


**Figura 3.** Mutantes *gin* (*glucose insensitive*) y *glo* (*glucose oversensitive*). WT, planta silvestre; *gin*, mutante insensible a azúcar; *glo*, mutante hipersensible a azúcar. Plantas de 5 días crecidas en luz, medio suplementado con 6% de glucosa. Imagen extraída de Rolland y colaboradores (2002).

## Las hexocinasas

Como su nombre lo indica las hexocinasas (HXKs) son enzimas que catalizan la fosforilación de hexosas mediante la transferencia del grupo fosforilo terminal del ATP a un aceptor nucleófilo, el aceptor en este caso es una hexosa. Esta reacción es irreversible y tiene gran importancia a nivel celular, ya que los productos hexosas-fosfato son retenidos dentro de la célula o de compartimentos celulares para ser asimilados en el metabolismo glucolítico (Nelson *et al.*, 2005).

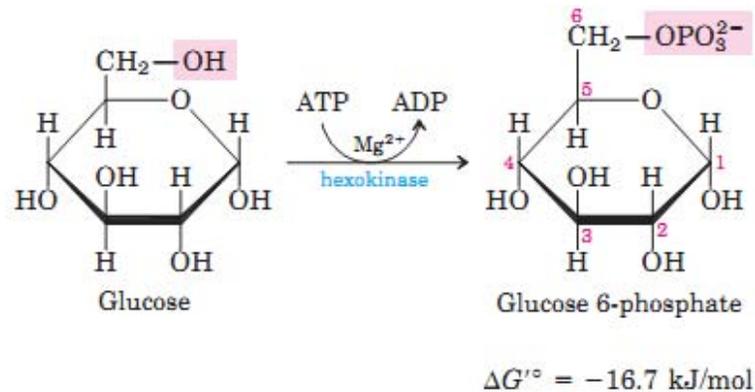
Estudios de la estructura cristalográfica de Hexocinasa II de levadura describen la disposición de la HXK al unirse a glucosa. La HXK posee dos dominios que le permiten actuar como bisagra teniendo dos conformaciones (abierta y cerrada). En la conformación abierta la hexosa se posiciona en el sitio activo de la enzima. La unión de la hexosa provoca una interacción entre los dos dominios induciendo la conformación cerrada, la cual permite disminuir la energía de solvatación para llevar a cabo la reacción de fosforilación (Bennett *et al.*, 1978; Kuser *et al.*, 2000).



**Figura 4.** Modelo de la estructura cristalográfica de HXK2 de levadura. Conformación abierta de HXK2, el sitio activo se encuentra entre los dos dominios que forman una bisagra. Estructura cristalográfica recreada usando el interactivo ion sulfato. Imagen extraída de NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=16184>.

Las HXKs pueden fosforilar hexosas como D-fructosa, D-manosa o D-galactosa; sin embargo, es importante enfatizar que las HXKs de plantas son la única familia de cinasas que fosforilan D-glucosa y tienen una mayor afinidad por la D-glucosa (0.02-0.1 mM), que por otras hexosas como la D-fructosa (2-120 mM), para la cual presenta una afinidad de tres órdenes de magnitud más baja respecto a la D-glucosa. La reacción de fosforilación de la D-glucosa requiere como sustrato el complejo  $MgATP^{2-}$  + D-glucosa produciendo glucosa-6-fosfato + ADP (Figura 5) (Nelson *et al.*, 2005).

El producto glucosa-6-fosfato puede ser asimilado por diferentes vías metabólicas: la vía de ácidos grasos, la vía oxidativa de las pentosas fosfato, la síntesis de almidón, la generación de sacarosa y conformación de la pared celular (Neuhaus y Emes, 2000).



**Figura 5.** Reacción de fosforilación de D-glucosa por la HXK. Figura extraída de Nelson *et al.*, 2005

## Funciones de las HXKs asociadas a su localización intracelular

Las HXKs se han estudiado en diferentes grupos de organismos fotoautótrofos desde musgos y licofitas, hasta plantas con semilla, las HXKs se han separado en cuatro grupos (A-D) clasificados de acuerdo al dominio N-terminal de la secuencia proteica. Se ha determinado que la secuencia N-terminal de las HXKs confiere la localización específica de estas enzimas dentro de la célula. En angiospermas, todas las HXKs pertenecen al grupo A, B o C, del grupo D sólo existen ejemplos en el musgo (Granot *et al.*, 2013). Algunas hexocinasas han perdido su actividad catalítica y son denominadas “Hexocinasas like” (HKLs), se piensa que estas proteínas podrían tener una función predominantemente señalizadora (Karve *et al.*, 2008).

### *Hexocinasas tipo A*

Las Hexocinasas tipo A tienen un péptido de tránsito a plástido de aproximadamente 30 aminoácidos localizado en el dominio N-terminal de la secuencia proteica. Actualmente se conocen HXKs de tipo A en musgos, licofitas y en plantas con semilla. El análisis *in silico* de las secuencias N-terminal en las diferentes HXKs ha brindado información sobre su localización intracelular. Dicha localización se ha corroborado para algunos miembros de HXKs *in vivo* en diferentes especies de plantas y en musgos (Tabla 1). A través de estudios transitorios en protoplastos utilizando una fusión de la región codificante de los genes de las HXKs a la GFP, se ha corroborado *in vivo* la localización plástidica de las isozimas de tipo A de *Physcomitrella patens* (HXK1), de *Nicotiana tabacum* (HXK2), *Solanum lycopersicum* (HXK4), de *A. thaliana* (HXK3) y de *Oryza sativa* (HXK4) (Tabla 1) (Olsson *et al.*, 2003; Thelander *et al.*, 2005; Giese *et al.*, 2005; Kandel-Kfir *et al.*, 2006; Karve *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2011).

Se propone que las hexocinasas de tipo A son importantes en la fosforilación de glucosa proveniente de la degradación del almidón. Durante la degradación del almidón se forma un sustrato lineal  $\alpha$ -1,4-glucanoses que es sustrato de la  $\beta$ -amilasa (BAM5), generando maltosa y maltotriosa. La maltotriosa puede ser transformada a glucosa por la enzima transglucosidasa plástidica (pTGD), la glucosa proveniente de esta reacción puede ser sustrato de una hexocinasa plástidica (Claeyssen y Rivoal, 2007).

También se ha sugerido que la formación de glucosa-6-fosfato a partir de la HXK plastídica podría ser sustrato de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) que es la primera enzima de la vía oxidativa de pentosas fosfato (OPP) (Neuhaus y Emes, 2000; Kruger y von Shaewen, 2003).

La función de una hexocinasa plastídica se estudió por primera vez en el musgo *P. patens* (HXK1) donde se corroboró que esta enzima participa en la señalización por glucosa (Olsson *et al.*, 2003). El análisis del fenotipo de la mutante nula *hck1* evidenció que esta enzima es importante para el desarrollo del tejido de almacenamiento del musgo llamado caulonema. Tratamientos con glucosa exógena comprobaron que la *hck1* es una mutante insensible a glucosa (0.15M) respecto al musgo silvestre (Olsson *et al.* 2003).

Estudios con diferentes hormonas de plantas demostraron que la mutante *hck1* tiene un fenotipo de insensibilidad a citocininas (1 $\mu$ M de BAP) y a ácido abscísico (1 $\mu$ M de ABA). Estos estudios apoyan la idea de que existe una fuerte interacción entre las vías de señalización de azúcares y las vías de hormonas, similar a lo que ocurre en plantas con semilla. Asimismo esta investigación dio pauta al estudio de hexocinasas de tipo A en angiospermas (Thelander *et al.*, 2005). El único estudio de HXKs de tipo A en monocotiledóneas se ha realizado en arroz, la HXK4 fue detectada en el estroma del cloroplasto (Cho *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2011); sin embargo, no hay datos que apoyen la importancia de este gen en arroz.

Actualmente no está clara la función de las HXKs plastídicas en dicotiledóneas, pero el análisis de su patrón de expresión indica que estas hexocinasas son más abundantes en tejidos de almacenamiento, lo cual sugiere una función importante en estos tejidos. La primera HXK de tipo A estudiada en angiospermas fue la HXK2 de tabaco, por Giese y colaboradores (2005). La HXK2 presenta una identidad a nivel de aminoácidos del 53% con las otras HXKs de tabaco y un 49% con la HXK1 plastídica de *P. patens*. Análisis de expresión del gen de GUS a partir del promotor del gen de HXK2 de *N. tabacum* demostró que presenta mayores niveles de expresión en el tejido vascular, particularmente en el xilema, en células guarda y en la punta de la raíz (Giese *et al.*, 2005).

Gracias al estudio de *HXK2* de tabaco y de *HXK1* de *P. patens*, se sugirió que las hexocinasas de tipo A podrían tener mayor importancia en el metabolismo de los tejidos de reserva (Giese *et al.*, 2005).

Otra hexocinasa plastídica que se ha estudiado en dicotiledóneas es la HXK4 de tomate, la cual se expresa en niveles bajos en casi todos los tejidos; sin embargo, es prácticamente el único gen de HXKs que se expresa en los frutos. La secuencia de la proteína HXK4 conserva una alta identidad con la hexocinasa de tabaco HXK2 (92%) y con una posible hexocinasa de papa HXKRP1 (97%); sin embargo, su similitud con otras HXKs de la misma especie no es alta. Se determinó que HXK4 de tomate se localiza en estrómulos y en extensiones tubulares de la membrana de los plástidos, lo que sugiere que la HXK4 es una proteína estromal capaz de ser transportada entre los plástidos (Kandel-Kfir *et al.*, 2006). Dado que la hexocinasa HXK4 de tomate se expresa mayoritariamente en frutos donde no se acumula almidón como otras hexocinasas plastídicas, se sugiere que esta enzima en particular podría tener una participación importante en la fosforilación de la glucosa que es importada a los frutos, más que la proveniente de la ruptura del almidón (Kandel-Kfir *et al.*, 2006).

A pesar de que *A. thaliana* es una planta que ha sido estudiada ampliamente, hasta la fecha no se ha analizado con detalle el papel de la hexocinasa plastídica HXK3. Dada la alta conservación de aminoácidos de la HXK3 con otras hexocinasas involucradas en la percepción de azúcares, se ha sugerido que ésta podría participar también en la señalización por azúcares (Claeyssen y Rivoal, 2007). Estudios iniciales mostraron que HXK3 tiene una mayor expresión durante el desarrollo del embrión en estadios de corazón y torpedo, que son momentos donde hay altas cantidades de hexosas que favorecen la división celular. Se ha sugerido que esta HXK podría ser importante en la fosforilación de hexosas durante estos momentos del desarrollo (Schmid *et al.* 2005; Weber *et al.*, 1997; Claeyssen y Rivoal 2007; Karve *et al.*, 2008). Estudios más recientes demostraron que HXK3 exhibe una localización en el estroma del cloroplasto y análisis del transcrito del gen, muestran una mayor acumulación en tejidos de almacenamiento en las plantas adultas de *A. thaliana*, similar al patrón de expresión de hexocinasas plastídicas en otras especies (Karve *et al.*, 2008).

**Tabla 1. Hexocinasas de tipo A**

Organismo	Genes	Función	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHXK3</i>	Mayor expresión en tejidos de reserva.	Karve <i>et al.</i> (2008)
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>LeHxk4</i>	Importante en los frutos.	Kandel-Kfir <i>et al.</i> (2006)
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>NtHXK2</i>	Importante en el metabolismo de los tejidos de reserva	Giese <i>et al.</i> (2005)
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsHXK4</i>	?	Cho <i>et al.</i> (2006a), Cheng <i>et al.</i> (2011)
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>PpHXK1</i>	Percepción de glucosa	Olsson <i>et al.</i> (2003); Thelander <i>et al.</i> (2005); Nilsson <i>et al.</i> (2011)

***Hexocinasas de tipo B***

Las HXKs de tipo B poseen un dominio N-terminal de anclaje a la membrana de la mitocondria de aproximadamente 24 aminoácidos. La localización de estas HXKs se ha estudiado a través de fusiones del dominio N-terminal de la proteína a GFP y mediante deleciones de este dominio. Se han corroborado la localización *in vivo* de estas HXKs asociadas a la membrana externa de la mitocondria en cuatro hexocinasas en *A. thaliana* (HXK1, HXK2, HKL1, HKL2), dos en *S. lycopersicum* (HXK1 y HXK2), una de *N. benthamiana* (HXK1), cinco de *O. sativa* (HXK2, HXK3, HXK5, HXK6 y HXK9), una de *Sorghum bicolor* (HXK3) y una de *Populus trichocarpa* (HXK1) (Tabla 2) (Cho *et al.*, 2006; Balasubramanian *et al.*, 2007; Karve *et al.*, 2008; Damari-Weissler *et al.*, 2007; Kandel-Kfir *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2011).

Se han estudiado las hexocinasas de tipo B en diferentes organismos, los estudios iniciales en chícharo (*Pisum sativum*) encontraron a estas hexocinasas asociadas a la mitocondria donde se propuso que podrían facilitar la respiración celular (Dry *et al.*, 1983; Giegé *et al.*, 2003). Asimismo, en el arbusto de ricino (*Ricinus communis*) se ha corroborado que las isozimas de HXKs asociadas a la mitocondria son indispensables para el desarrollo del endospermo durante la embriogénesis de la planta (Miernyk y Dennis, 1983).

Se ha determinado que dos hexocinasas de arroz (HXK5 y HXK6) pueden traslocarse al núcleo, similar a lo que ocurre en la HXK1 de *A. thaliana*, la cual tiene un papel fundamental en la señalización de azúcares (Cho *et al.*, 2009).

### ***Hexocinasas de tipo C***

Se sugiere que las HXKs del tipo C tienen una localización en el citoplasma, análisis *in silico* sugieren que estas HXKs tienen un dominio N-terminal truncado (Cho *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2011). Se ha corroborado un miembro en el musgo *P. patens* (HXK4), el cual también puede traslocarse al núcleo. En angiospermas se han confirmado pocos ejemplos de HXKs de tipo C, ya que solo hay un ejemplo en dicotiledóneas, en la papa (HXK1). En monocotiledóneas se han confirmado cuatro en arroz (HXK1, HXK7, HXK8 y HXK10) y una en sorgo, HXK8 (Tabla 2).

Las hexocinasas citosólicas han sido las menos estudiadas, quizá porque hay pocos ejemplos de ellas. Estudios iniciales de la hexocinasa de papa (HXK1), demostraron que la HXK citosólica es un paso comprometido en la vía del catabolismo del almidón para la síntesis de sacarosa y glucólisis por la noche (Veramendi *et al.*, 1999; Claeysen y Rivoal, 2007).

### ***Hexocinasas de tipo D***

Las HXKs de tipo D están codificadas por tres genes en *P. patens*, los cuales contienen dominios N-terminal de anclaje a la membrana y están asociados a la mitocondria, pero sus secuencias difieren de las HXKs de tipo B (Tabla 2).

**Tabla 2. Tipos de hexocinasas**

Especies	Genes tipo A	Genes tipo B	Genes tipo C ó D	Genes no identificados
<b>Dicotiledóneas</b>				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHXX3</i>	<i>AtHXX1, AtHXX2, AtHKL1, AtHKL2, AtHKL3</i>	-	-
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>SIHXX4</i>	<i>SIHXX1, SIHXX2, SIHXX3</i>	-	-
<i>Solanum chacoense</i>	-	-	-	<i>ScHXX1</i>
<i>Solanum tuberosum</i>	-	-	-	<i>StHXX1, StHXX2</i>
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>NtHXX2</i>	-	-	<i>NtHXX1, NtHXX3, NtHXX4, NtHXX5, NtHXX6, NtHKL1</i>
<i>Helianthus annuus</i>	-	-	-	<i>HaHXX1</i>
<i>Populus trichocarpa</i>	-	<i>PtHXX1</i>	-	<i>PtHXX2, PtHXX3, PtHKL1, PtHKL2, PtHKL3</i>
<i>Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon</i>	-	-	-	<i>VvHXX1, VvHXX2, VvHXX3, VvHKL1, VvHKL2, VvHKL3</i>
<i>Spinacia oleracea</i>	-	<i>SoHXX1</i>	-	-
<b>Monocotiledóneas</b>				
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsHXX4</i>	<i>OsHXX2, OsHXX3, OsHXX5, OsHXX6, OsHXX9</i>	<i>OsHXX1, OsHXX7, OsHXX8, OsHXX10</i> (Tipo C)	-
<i>Zea mays</i>	-	-	-	<i>ZmHXX3, ZmHXX4, ZmHXX5, ZmHXX6, ZmHXX7, ZmHXX8, ZmHXX9, ZmHXX10</i>
<i>Sorghum bicolor</i>	-	<i>SbHXX3</i>	<i>SbHXX8</i> (Tipo C)	<i>SbHXX1, SbHXX2, SbHXX4, SbHXX5, SbHXX6, SbHXX7, SbHXX9, SbHXX10</i>
<i>Triticum aestivum</i>	-	-	-	<i>HXX</i>
<b>Lycophyta y Bryophyta</b>				
<i>Selaginella mollendorffii</i>	-	-	<i>SmHXX3, SmHXX5</i> (Tipo C)	-
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>PpHXX1, PpHXX5, PpHXX6</i>	<i>PpHXX2, PpHXX3, PpHXX7, PpHXX8</i>	<i>PpHXX4</i> (Tipo C); <i>PpHXX9, PpHXX10</i> y <i>PpHXX11</i> (Tipo D)	-

At, *Arabidopsis thaliana*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza sativa*; Pp, *Physcomitrella patens*; Pt, *Populus trichocarpa*; Rc, *Ricinus communis*; Sb, *Sorghum bicolor*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Vv, *Vitis vinifera*; Zm, *Zea mays*.

## **Hexocinasas en *A. thaliana***

Se han identificado seis genes de la familia de hexocinasas en *A. thaliana* tres de ellos codifican para proteínas con función catalítica y los otros tres codifican para proteínas sin función catalítica, las cuales son denominados “HXKs like” (HKLs). Los genes de las HKLs poseen un alto grado de identidad con la HXK1 (de 45-85%), lo que apoya que éstas podrían tener funciones de señalización (Karve *et al.*, 2008, 2010).

### ***Expresión de los transcritos de genes de HXKs en A. thaliana***

Con base en los niveles de expresión de genes que codifican para las HXKs en diferentes tejidos, se han obtenido claves del papel fisiológico en el que participan. El análisis de la expresión del gen *HXK1* indica que la enzima correspondiente es importante para todos los tejidos de la planta, ya que los niveles de expresión del transcrito son abundantes en casi todos los tejidos (hojas, meristemos, raíces, silicuas, etc). En contraste, el gen que codifica para la HXK3 plastídica presenta mayores niveles de expresión en tejidos de almacenamiento de carbono (raíz y silicuas), sugiriendo que su función fisiológica se da mayoritariamente en estos tejidos. El gen que codifica para la HXK1 tiene un patrón de expresión similar al gen de la HXK2, aunque se sabe que las proteínas de ambos genes no son redundantes (Jang *et al.*, 1997; Karve *et al.*, 2008).

Por otra parte, los genes que codifican para las HKLs tienen también una expresión muy particular en los tejidos de las plantas. Análisis del promotor de la *HKL1* fusionado al gen reportero GUS, mostró una expresión localizada en raíz, tejidos vasculares y en los puntos donde emergen las raíces laterales, mientras que el gen que codifica para la HKL3 se expresa específicamente en flores. Por otra parte el gen que codifica para la HKL2 está expresado en la mayoría de los tejidos de *A. thaliana* (Karve y Moore, 2009).

### ***La HXK1 tiene una función señalizadora de azúcares en A. thaliana***

El único sensor de azúcares identificado y cuya función se ha demostrado en las plantas es la HXK1 la cual se encuentra altamente conservada con la HXK2 de levadura. La levadura posee varias cinasas que fosforilan hexosas la HXK1, la HXK2 y la GLK1, sin embargo se ha corroborado que la HXK2 es un componente clave en la percepción y señalización de azúcares, ya que es la responsable de la represión de genes por glucosa (Rolland *et al.*, 2001, 2002; Moreno *et al.*, 2005).

Debido a la alta conservación entre la HXK2 de *S. cerevisiae* y la HXK1 de *A. thaliana* se han realizado múltiples estudios que corroboraron la participación de la HXK1 como sensor de azúcar, uno de estos fue la comparación de plantas que sobreexpresan los genes de la HXK1 de *A. thaliana* y de la HXK2 de la levadura, en *A. thaliana*. Estos datos sugirieron que la HXK1 tiene una función específica en las plantas como molécula señalizadora, la cual no es reemplazable por la HXK2 de levadura (Jang *et al.*, 1997).

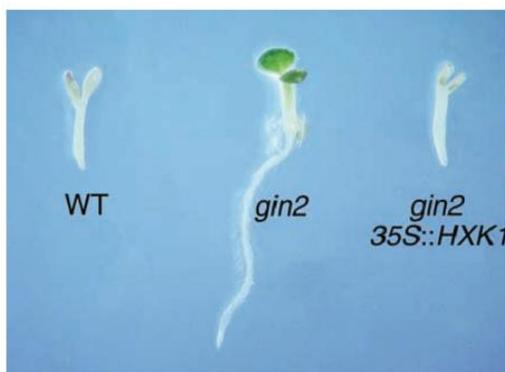
La HXK1 es una molécula que actúa como transductor y efector de la señal de azúcar. Experimentos de CHIP y expresión genética muestran que la HXK1 forma un complejo proteico con la VHA-B1 y la RPTSB, las cuales tienen contacto con blancos específicos en promotores de genes regulando directamente la represión transcripcional por glucosa en extractos de hoja; sorprendentemente estas tres proteínas interactúan solo en el núcleo y actúan sinérgicamente para modular la expresión genética (Cho *et al.*, 2006). Esta modulación de la expresión genética, interrelaciona diversas señales de nutrientes, luz y hormonas, para controlar el crecimiento y desarrollo en respuesta a cambios ambientales (Moore *et al.*, 2003).

A través del estudio de la mutante nula *gin2-1* que está afectada en el gen de la HXK1, se han confirmado algunas de las funciones específicas para esta proteína relacionadas a la señalización de glucosa en plantas. Se observó que la falta de la HXK1 en la mutante *gin2-1* provoca defectos intrínsecos en el crecimiento, resultando en un sistema radicular pequeño, hojas pequeñas, senescencia retrasada e inflorescencias cortas; también se observó que muchos de estos defectos son debido a una reducción en la expansión celular.

Dichos defectos en el desarrollo son consecuencia de la falta de actividad señalizadora de la HXK1 y no de su actividad catalítica (Moore *et al.*, 2003).

Moore y colaboradores (2003) demostraron que la actividad catalítica de la HXK1 puede ser separada de su función señalizadora, mediante análisis cuantitativos de metabolitos y la caracterización de dos mutantes catalíticamente inactivas de HXK1 (G104D y S177A) que conservan su actividad señalizadora en presencia de glucosa, reprimiendo genes fotosintéticos de manera similar a la silvestre. Las plantas transgénicas que expresan las versiones mutantes G104 y S177A en el fondo *gin2-1*, conservan su sitio de unión a glucosa; sin embargo, son incapaces de llevar a cabo la reacción de fosforilación. Concluyendo que HXK1 es una proteína “moonlight” por un lado posee una función señalizadora y por otro actúa como una cinasa (Jang y Sheen, 1997; Sheen, 1990; Xiao *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2006; Sheen, 2010).

La *gin2-1* es una mutante insensible a glucosa, la cual es capaz de crecer en tratamientos con altos niveles de azúcares (>5%). A pesar de tener defectos intrínsecos en el desarrollo, la mutante *gin2-1* presenta cotiledones verdes y bien expandidos en estas condiciones de azúcar, diferencia de la silvestre. La silvestre presenta una afectación en el desarrollo y cotiledones cloróticos en estas concentraciones de glucosa. Concordante con esto, la sobreexpresión de *HXK1* en el fondo mutante *gin2-1* confiere hipersensibilidad a glucosa y su fenotipo se encuentra mayormente afectado que la silvestre en altas concentraciones de azúcares (Figura 6).



**Figura 6.** Fenotipo de la mutante *gin2-1* y complementación por *35S::AtHXK1*. Plantas crecidas en medio MS (1962) con 6% de glucosa por 5 días. WT, tipo silvestre. Imagen extraída de Rolland y colaboradores (2002).

### ***La HKL1 tiene una función regulatoria de azúcares en A. thaliana***

La HKL1 por otra parte pertenece a la clase de “hexocinasas like” en *A. thaliana*, la cual tiene la capacidad de unirse a la glucosa pero no tiene actividad catalítica de hexocinasa. La HKL1 tiene una participación en el crecimiento y desarrollo de las plantas, posiblemente modula una conexión entre las vías de glucosa y hormonas. Estudios de Karve y colaboradores (2009) abordaron por primera vez el papel de HKL1 como molécula regulatoria en respuesta a azúcar, mediante el análisis de líneas sobreexpresoras del gen *HKL1* y de su mutante nula *hkl1* en *A. thaliana*. Estos estudios demostraron que las líneas sobreexpresoras de HKL1 tienen un fenotipo de insensibilidad a glucosa (6%), mientras que la mutante *hkl1-1* es hipersensible a glucosa (4%). Estos datos apoyan la idea de que la HKL1 podría estar funcionando como un modulador negativo y no actuando directamente en la modulación de la expresión genética, como ocurre con la HXK1. Se propone que los niveles de transcrito de la HKL1 aumentan por una señal mediada por hormonas cuando hay un exceso de azúcares, actuando como un regulador negativo y bloqueando la actividad señalizadora de HXK1 (Karve y Moore, 2009).

## Estudios filogenéticos de las hexocinasas

Se ha analizado la filogenia de las HXKs en plantas en diversos trabajos, tanto en monocotiledóneas (Cho *et al.*, 2006) como en dicotiledóneas (Karve *et al.*, 2008), pero quizá el trabajo más extenso fue realizado en el 2010 por Karve y colaboradores. Este trabajo reporta la reconstrucción de los árboles filogenéticos tomando en cuenta un extenso número de especies que incluyen desde musgos, licofitas y algunas plantas angiospermas, comparando los dominios conservados y excluyendo el dominio N-terminal de los genes de las HXKs (Karve *et al.*, 2010).

Estos análisis filogenéticos arrojaron 7 grupos de HXKs que están descritos en la Tabla 3. Las HXKs de diferentes especies de angiospermas están más conservadas entre sí, que entre isozimas de la misma especie. Esta especialización y conservación sugiere que proceden de un gen ancestral del musgo que subsecuentemente fue duplicado en plantas con semilla (Karve *et al.*, 2010). La hexocinasa más conservada es la HXK1 de *A. thaliana* la cual comparte el 36% de identidad con la HXK2 de levadura, 76% con la HXK1 de tabaco, 70% con la HXK2 de arroz y la HXK1 de tomate, 56% con la HXK1 de musgo y 36% con la HXK1 del alga *Volvox carteri*, por mencionar algunos ejemplos (Karve *et al.*, 2008, 2010).

Uno de los grupos filogenéticos (4°) está conformado por algunos miembros de HXKs que tienen una localización plastídica como HXK3 en *A. thaliana* y HXK4 en arroz. Algunas HXKs de este grupo filogenético aún no se ha comprobado *in vivo* que tengan una localización plastídica como: la PtHXK3 de *Populus trichocarpa*, RcHXK3 de *Ricinus communis*, VvHXK3 de *Vitis vinifera* y NtHXK3 de *Nicotiana tabacum* (Karve *et al.*, 2010). De manera interesante, dos HXKs corroboradas *in vivo* (la HXK2 de *N. tabacum* y la HXK1 de *P. patens*), no se encuentran en este grupo de la filogenia, lo que demuestra que no forzosamente la relación filogenética puede predecir el destino subcelular de las HXKs.

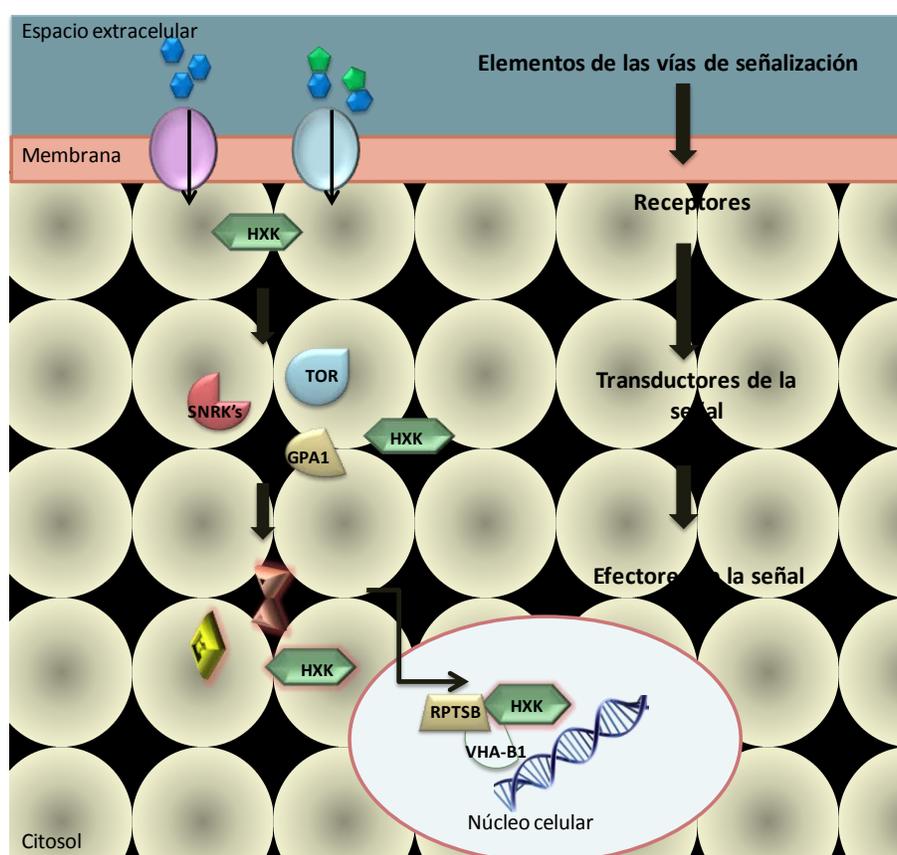
**Tabla 3. Grupos filogenéticos de las hexocinasas**

Grupos filogenéticos	Características	Miembros de HXKs
Grupo 1	Miembros pertenecientes al musgo <i>Physcomitrella patens</i>	PpHXK1*, PpHXK2, PpHXK3, PpHXK4, PpHXK5, PpHXK6, PpHXK7, PpHXK8, PpHXK9, PpHXK10.
Grupo 2	Miembros pertenecientes a la licofita <i>Selaginella moellendorffii</i>	SmHXK1, SmHXK2, SmHXK3, SmHXK4, SmHXK5.
Grupo 3	Algunas son hexocinasas sin función catalítica pero con capacidad de unirse a glucosa.	AtHKL1, AtHKL2, NtHKL1, OsHXK3, OsHXK10, PtHKL1, PtHKL2, RcHKL1, SbHXK10, SbHXK3, VvHKL1, ZmHXK3, ZmHXK10.
Grupo 4	Algunas son hexocinasas plastídicas.	AtHXK3*, NtHXK3, OsHXK4*, PtHXK3, RcHXK3, VvHXK3.
Grupo 5	Algunas son hexocinasas sin función catalítica, la cuales no conservan su sitio de unión a glucosa.	AtHXK3, PtHKL3, RcHKL2, VvHKL2.
Grupo 6	Se agrupan algunas hexocinasas que tienen función señalizadora de glucosa en dicotiledóneas.	AtHXK1, AtHXK2, NtHXK1, NtHXK2*, NtHXK4, NtHXK5, NtHXK6, PtHXK1, PtHXK2, RcHXK1, RcHXK2, VvHXK1, VvHXK2.
Grupo 7	En este grupo hay miembros de hexocinasas que pertenecen a las monocotiledóneas.	OsHXK1, OsHXK2, OsHXK5, OsHXK6, OsHXK7, OsHXK8, OsHXK9, SbHXK1, SbHXK2, SbHXK5, SbHXK7, SbHXK8, SbHXK9, ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6, ZmHXK7, ZmHXK8, ZmHXK9.

At, *Arabidopsis thaliana*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza sativa*; Pp, *Physcomitrella patens*; Pt, *Populus trichocarpa*; Rc, *Ricinus communis*; Sb, *Sorghum bicolor*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Vv, *Vitis vinifera*; Zm, *Zea mays*. Hexocinasas plastídicas indicadas en asterisco (\*).  
Modificada de Karve y colaboradores (2010).

## Elementos de las vías de señalización de azúcares en las plantas

Las vías de señalización generalmente comienzan con una molécula receptora, que actúa como sensor, la cual transmite la información a los transductores y posteriormente, a efectores de la señal que modulan blancos específicos a nivel de expresión (Figura 7). A continuación se describirán algunos de los elementos involucrados en la señalización de azúcares en las plantas, identificados hasta el momento. Muchos de estos componentes se encuentran conservados en la evolución desde levadura hasta plantas y animales, como se mencionó anteriormente.



**Figura 7.** Elementos de las vías de señalización en plantas. Las vías de señalización incluyen moléculas receptoras de la señal, hasta el momento solo se ha reportado el sensor citosólico HXK (hexokinase). Los receptores transmiten la señal a los transductores de la señal (GPA1, et erotrimeric  $\alpha$  s b ni t of G protein; SNRKs, [Snf1 s c rose non-fermenting-1)-related protein kinases]); TOR, Target-of-rapamycin; HXK) y finalmente los efectores de la señal de azúcar modulan la expresión de genes en el núcleo celular (HXK).

### ***Sensores de azúcar***

En las plantas se han estudiado genes que codifican para transportadores de hexosas y de sacarosa, los cuales poseen homología a los Snf3 y Rgt2 de levadura, sugiriendo que realizan una función similar como sensores de azúcares. Algunos transportadores de monosacáridos y disacáridos de plantas poseen un dominio C-terminal altamente conservado que sobresale del lado citosólico, se sugiere que este dominio confiere una participación en la señalización de azúcares como es el caso de SUT2 de tomate (Sauer y Stolz, 1994; Barker *et al.*, 2000). Sin embargo el único sensor que se ha corroborado en plantas en la HXK1 de *A. thaliana* (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003).

### ***Transductores de la señal de azúcar***

Se han identificado algunos transductores de la señal de azúcares en plantas que están conservados en levaduras, estos incluyen a las proteínas G heterotriméricas, a las proteínas cinasas SNRKs [Snf1 (sucrose non-fermenting-1)-related protein kinases)], otro más recientemente identificado es el complejo TOR (Target-of-rapamycin) y las HXKs que además de ser sensores de azúcar también son moléculas transductoras y efectoras de las señales de azúcar (Figura 7) (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2006; Smeekens *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2013).

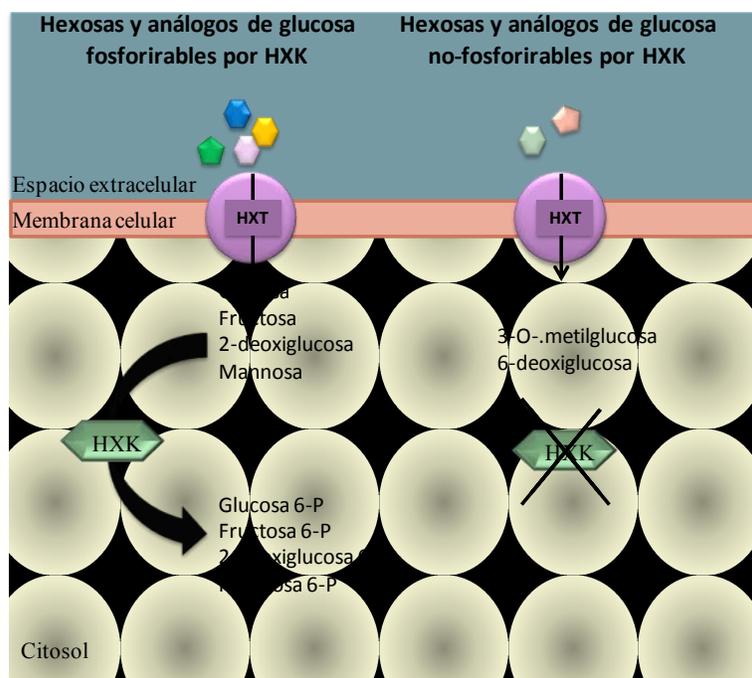
Las proteínas G son complejos heterotriméricos que están implicadas en una gran variedad de procesos del desarrollo en plantas como la formación de raíces laterales, elongación del hipocótilo, expansión de la hoja, desarrollo de la silicuas y en procesos de respuesta a patógenos. Uno de los elementos más estudiados en *A. thaliana* la GPA1 (subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica). Se ha determinado que la mutante de GPA1 (*gpa1*) tiene un fenotipo de hipersensibilidad a sacarosa y a ABA. De manera contraria, la mutante *gpa1* es menos sensible a las señales por giberelinas y brasinoesteroides; se ha demostrado que la señalización mediada por GPA1 es importante para la germinación de la semilla y el desarrollo en etapas tempranas de las plantas (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2004; Ullah *et al.*, 2014).

Las SnRKs son cinasas involucradas en la regulación del metabolismo del carbono y del estado energético en todos los organismos, particularmente en plantas se ha estudiado su participación en respuesta a estrés. El miembro más estudiado de esta familia de cinasas es SNF1/AMPK/SnRK1 para levadura, mamíferos y plantas respectivamente, el cual se ha visto que tiene un papel importante de respuesta a estrés energético. La SnRK1 fosforila e inactiva enzimas involucradas en diferentes vías biosintéticas, por ejemplo a la HMG-CoA reductasa que forma parte de la vía de síntesis de isoprenoides en plástidos (Dale *et al.*, 1995), a la sacarosa fosfato sintasa y a la nitrato reductasa que forma parte del primer paso en la adquisición de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos (Sugden *et al.*, 1999). Se ha descrito que SnRK1 regula el metabolismo de carbohidratos mediante diferentes mecanismos, por ejemplo: modulando la actividad de la ADP-glucosa pirofosfatasa en la síntesis de almidón (Tiessen *et al.*, 2003). Esta cinasa a su vez es regulada por azúcares como la trealosa 6-P, la cual inhibe al complejo SnRK1 (Halford *et al.*, 1999; Hanson y Smeekens, 2009; Smeekens *et al.*, 2010).

Otro componente de la vía de transducción de señales es el complejo TOR que actúa como un regulador maestro de integración de la señalización energética, de la proliferación celular y el crecimiento. Este complejo también se encuentra conservado en levaduras, plantas y mamíferos. La vía de señalización de TOR es independiente de la percepción de glucosa mediada por HXK1. TOR dirige la regulación transcripcional de vías metabólicas centrales, regula la biogénesis y proliferación de las células madre del meristemo y coordina el estado energético, vinculando señales de la fotosíntesis que repercuten directamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta regulación balancea el estado energético mediante la integración de señales de nutrientes provenientes de los metabolitos, la biomasa, la maquinaria del ciclo celular y de reguladores redox para la proliferación celular de células madre/progenitoras. Recientemente se identificó a E2Fa que activa genes de la fase S del ciclo celular en respuesta a azúcares como un sustrato de TOR (Smeekens *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2013).

## Vías de señalización de azúcares en las plantas

Una de las preguntas iniciales para la dilucidación de las vías de percepción de azúcares fue saber si la regulación y señalización de los azúcares está separada de sus funciones como moléculas energéticas. Para esto se probaron una variedad de análogos de glucosa, diferentes azúcares y otros nutrientes con el fin de estudiar la capacidad de inducción de señales regulatorias de genes blanco (Figura 8) (Jang y Sheen, 1994; Jang *et al.*, 1997; Weisbeek y Smeekens, 1999; Gibson, 2000; Pego *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2002; Wingler *et al.*, 2012). Gracias a estos estudios se han identificado distintas vías de señalización en plantas: La vía dependiente de la HXK, la vía dependiente de la HXK-dependiente del metabolismo y, finalmente vías independientes de la HXK.



**Figura 8.** Análogos de hexosas fosforilables y no fosforilables por la HXK. De lado izquierdo se muestran algunos ejemplos de hexosas y análogos de glucosa que son fosforilables por la HXK (glucosa, fructosa, 2-deoxiglucosa, manosa) generando productos (glucosa 6-P, fructosa 6-P, 2-deoxiglucosa 6-P y manosa 6-P). De lado derecho se muestran algunos ejemplos de hexosas que son incapaces de ser fosforilados por la HXK y no generan productos como 3-O-metilglucosa y 6-deoxiglucosa. HXT, transportador de hexosas.

### ***Vía dependiente de la HXK***

Existen múltiples estudios que han caracterizado la vía de señalización dependiente de la HXK en las plantas (Figura 9<sup>a</sup>); sin embargo, hasta la fecha el mecanismo de señalización es aún poco entendido. Gracias a estudios con análogos de glucosa que son capaces de ser fosforilados por la HXK pero que no pueden ser posteriormente metabolizados, se demostró que la fosforilación de azúcar por la HXK es suficiente para modular la expresión de varios genes.

Un ejemplo de ello es la adición del análogo 2-deoxyglucosa a plántulas silvestres. Este compuesto es fosforilado por la HXK pero su producto (2-deoxyglucosa-6-P) no es capaz de entrar al metabolismo; sin embargo, su presencia es suficiente para reprimir la expresión de genes fotosintéticos como la proteína de unión a clorofila a/b (*CAB*) y la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (*RBCS*) (Sheen, 1990; Xiao *et al.*, 2000). En contraste, la adición de azúcares fosforilados como la glucosa 6-P, fructosa 6-P, fructosa 1,6-difosfato o glucosa 1-fosfato son incapaces de reprimir a los mismos genes demostrando que el proceso de fosforilación por la HXK es esencial para desencadenar la represión genética (Jang y Sheen, 1994).

Por otra parte, a partir de análisis de plantas transgénicas que tienen aumentada o disminuida la expresión de *HXK1* en *A. thaliana* se comprobó que la expresión genética de algunos genes como la fosfolipasa-D (*PLD*) y el gen *ERA* que participa en la respuesta a ABA, tienen una inducción incrementada como consecuencia de la adición de glucosa en las plantas sobreexpresoras en comparación con la silvestre, mientras que esta expresión está disminuida en las plantas que expresan la construcción antisentido de *HXK1*. Sin embargo, estos cambios no se observan en las plántulas que sobreexpresan la hexocinasa de levadura, corroborando que la hexocinasa de levadura es incapaz de llevar a cabo la función señalizadora en plantas, conservando la actividad catalítica de cinasa (Dai *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2000). La vía dependiente de la HXK parece estar primordialmente relacionada con la represión de genes involucrados en el anabolismo y la inducción de genes involucrados con el catabolismo, almacenamiento de carbono, con el crecimiento vegetativo y con genes de respuesta a patógenos (Pego *et al.*, 2000).

### ***Vía dependiente de la HXK y del metabolismo***

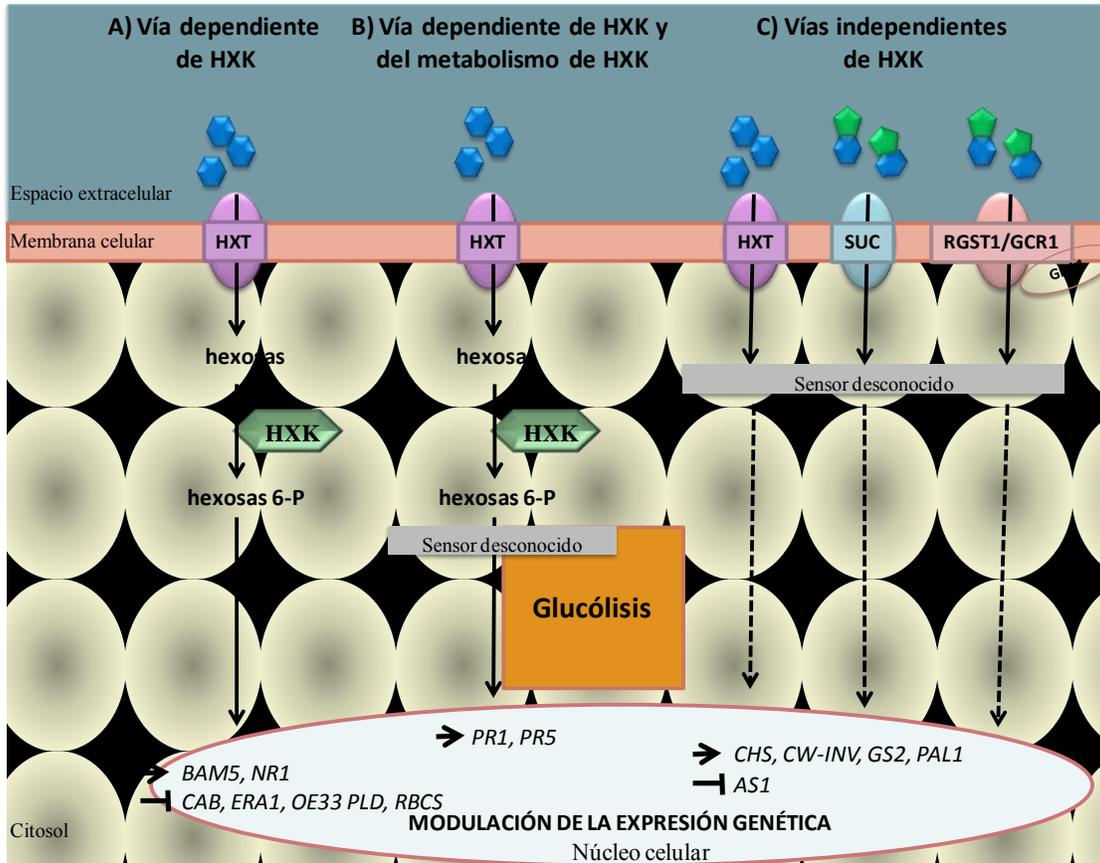
Se ha caracterizado una vía que no sólo requiere de la participación de la hexocinasa, sino que es necesario el metabolismo glucolítico posterior para generar una señal de azúcar (Figura 9<sup>b</sup>). Estudios iniciales demostraron que la sobreexpresión de una invertasa causa un aumento en la expresión de genes de respuesta a patógenos PR (Pathogens response) como consecuencia de la acumulación de hexosas (Xiao *et al.*, 2000).

Se confirmó que las plantas sobreexpresoras de la *HXK1* aumentan la expresión de genes relacionados con patógenos a diferencia de las plantas que expresan el gen antisentido, curiosamente este aumento en la expresión de genes de patógenos también se observó en las plantas que sobreexpresan la *YHXK2* de levadura. Estos datos sugirieron que los PR inducidos por glucosa requieren la función catalítica y no la función señalizadora de la *HXK1*. Por lo tanto, se hipotetiza que existe una señal río abajo de la hexocinasa dentro de la vía glucolítica capaz de modular la expresión de estos genes (Xiao *et al.*, 2000).

Hasta el momento no se sabe cuál es la señal necesaria para llevar a cabo esta respuesta ya que, al analizar algunos intermediarios de la glucólisis como el acetil-CoA, gliceraldehído 3-P, el fosfoenolpiruvato y la dihidroxiacetona fosfato, así como intermediarios del ciclo de calvin como el piruvato, el malato, el oxalacetato, no se observa que alguno de estos metabolitos sean capaces de modular una respuesta a nivel genético (Sheen, 1990; Jang y Sheen, 1994).

### ***Vías independientes de la HXK***

Al adicionar otros análogos de glucosa que no son fosforilados por la hexocinasa como 6-deoxy-glucosa y la 3-*O*-methyl-D-glucosa se encontró que existe una modulación de la expresión genética de diversos genes en respuesta a estos azúcares. Ya que estos azúcares no son blancos de la HXK estos datos indicaron la existencia de vías independientes de la HXK (Jang *et al.*, 1997<sup>b</sup>; Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2002). Se ha observado que hay una gran cantidad de genes cuya expresión se regula por azúcares de manera independiente de la HXK (Figura 9<sup>c</sup>) (Xiao *et al.*, 2000).



**Figura 9.** Vías de percepción y señalización de azúcares en plantas. A se muestra la vía dependiente de la HXK, B muestra la vía dependiente del metabolismo de la HXK y C muestra las vías independientes de la HXK. HXT, transportador de hexosas; SUC, transportador de sacarosa; RGST1/GCR1, receptor acoplado a proteínas G; GPA1; subunidad  $\alpha$  de proteínas G; HXK, hexocinasa; *BAM5*, beta-amylase 5; *NR1*, nitrate reductase 1; *CAB*, chlorophyll a-b binding protein; *ERA1*, farnesyltransferase subunit beta; *OE33*, oxygen evolving enhancer protein 33; *PLD*, phospholipase D; *RBCS*, ribulose biphosphate carboxylase small chain; *CHS*, chalcone synthase; *CW-INV*, cell wall invertase; *GS2*, glutamine synthetase 2; *PAL1*, phenylalanine ammonia-lyase 1; *ASI*, asparagine synthetase 1.

## **HIPÓTESIS**

Proponemos que la HXK3 plastídica de *A. thaliana* está involucrada en la percepción y señalización por glucosa.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo general***

Analizar la posible participación de la HXK3 en la señalización por glucosa en *A. thaliana*.

### ***Objetivos Particulares***

- 1.-Clonación del gen *HXK3* de *A. thaliana*.
- 2.-Generar líneas sobreexpresoras del gen *HXK3* en el sistema homólogo de *A. thaliana*.
- 3.-Analizar la mutante de *HXK3* en *A. thaliana* en respuesta a glucosa.
- 4.-Analizar líneas sobreexpresoras de *HXK3* en *A. thaliana* en respuesta a glucosa.

## METODOLOGÍA

### Construcciones de plásmidos y clonación

#### *Aislamiento del gen HXK3 y fusión al vector de clonación pENTR/D/TOPO<sup>TM</sup>*

Se diseñaron oligonucleótidos a partir de la secuencia genómica de *HXK3* (AT1G47840), obtenida de la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>). Para amplificar el gen *HXK3* se utilizaron los oligonucleótidos hxx3F y hxx3R, el primero está posicionado en 5' en el inicio de la traducción del gen *HXK3* y el segundo se encuentra en la secuencia no codificante 3' no traducida (UTR) (Figura 10). Un tercer oligonucleótido 5' x kS) está posicionado en la región codificante (aminoácido 627), el cual se utilizó para amplificar una secuencia (400pb) usada en los análisis por Northern-blot.

#### Mapa de oligonucleótidos para *HXK3*

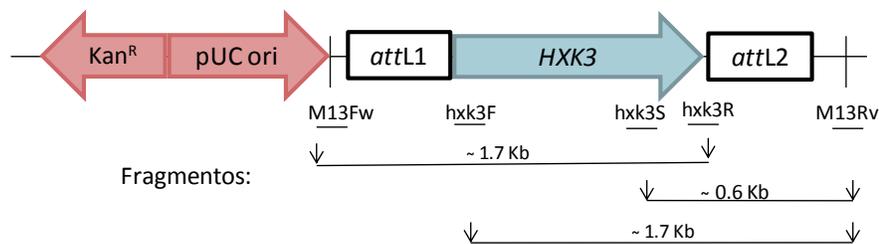
- ◆ hxx3F
- ◆ hxx3S
- ◆ hxx3R

```
tcttcggttcttacaaaacagaaccaaacttCACCgacaATGTCACACTCATGTTTTTCTTCCCCTGTGCGTACCCCCAGCACTCG  
GATCTTTCACCTTCTCATCTCGACCACGCTCCAATTACATCGTGATGTCCGCCGTCGATCTAACTCTGCTTCGACGTGTC  
CTATACTGACCAAGTTTCAGAAAGACTGCGCCACTCTACACCGTACCTACGCAACGTAGCCAACGCCATTGCTGATGACA  
TGCGAGATGGTCTAGCTGTTGAAGGAGGAGGAGATCTCGAGATGATCTTGACTTTTGTGACGCTTTGCCTTCTGGGAATG  
AGGAAGGTTGTTCTATGCATTGGATTAGGAGGTACAAATTTTCGGGTGCGTAGCGTGCAATTAGGAGGAAAAGAAAGAGC  
GAGTCTTAGCTACCGAATCTGAACAAATATCTATTTCTCAAAAGCTTATGATTGGTACAAGTGAGGAGCTTTTCGGGTTC  
TTGCTTCAAAGCTTGCAAATTTTGTGCAAAGGAGAAGCCAGGTCCGTTTCTTTTAGAAGAAGGGAGGAAAAGGGAGTTAG  
GGTTTACCTTTTTCATCCCTGTGAAGCAAACCTCTATTTGATTCAGGCACATTAAGCAAGTGGACTAAAGGCTTTAAAGTGT  
CTGGAATGGAAGGAAAAAATGTGGTTGCTTGTGTTAAATGAAGCTATGGAAGCACATGGACTCGATATGCGAGTTTCTGCTC  
TTGTAATGATGGAGTGGGAACATTAGCTGGAGCAAGGTATTGGGATGAGGATGTGATGGTCCGTTGATTCTTGGCACTG  
GGACCAATGCTTGTATGTAGAACAGAAACATGCAATTCCTAACTCCGAAGCAAATCTTCTTCTGGAACAACGATCATAA  
ACACTGAGTGGGGAGGTTCTCTAAGATTCTTCCGCAAACATTTTTCGACTAGAGATGGATGAGACAAGCCTGAATCCTG  
GTGAACATTTATATGAGAAGATGATCTCAGGGATGTACCTTGGTGAATGTAAAGGAGGGTTTTCCTCATATGTGTGAAA  
CTAGTGACTTGTGTTGGACTTCGCTCCTGCCAACTCTCCACTCCTTTGGCACTCAGGACCGAGCATCTATGCAAAATGC  
AAGAGGACAATACAGATGATCTTCCGGATGTTGGATCAATCCTATACGACTTTTTAGATGTAGAGGCGAATATGAATGCAA  
GGAGGAGAGTGGTGGAAAGTGTGTGACACAGTAGTGAACGCGGAGGGCGTCTAGCAGGAGCTGGTATAGTGGCAATTTCTGG  
AGAAGATTGAAAAAGATACCAAAAGAATGGGTTCAAGTAAAAGAACCCTTGTGGCTATGGACGGTGCCTGTATGAGAAGT  
ACCCACAATATCGACAGTATATGCAAGACGCACTAGTTCGAGCTTCTTGGCCATAAGCTTGCAAGTACGTTGCGATCAAC  
ATACCAAGACGTGCTGGGCTCGGTGCTGCTCTTTTGGCGGCCACTAACTCCATTTACTAGtacttgacctctacttca  
tgagtataggaggacttttgggtccatttgggtgtacatttatataagatatcatatcaatatcaataagattgtaaaga  
ggagcaacgaactagcagaagattatgtcttgacc
```

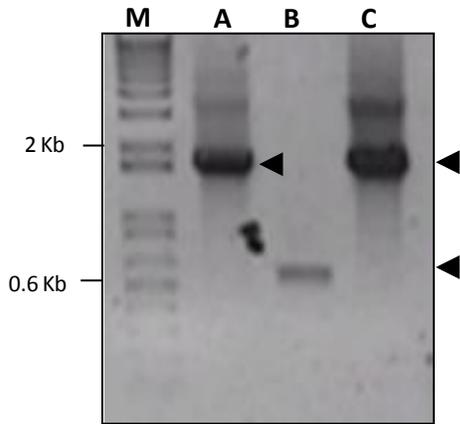
**Figura 10.** Posicionamiento de los oligonucleótidos. Se observa la localización de los oligonucleótidos diseñados en la secuencia del gen *HXK3*: hxx3F, azul; hxx3S, rojo; hxx3R, verde. Las letras mayúsculas corresponden a la región codificante del gen, las letras minúsculas corresponden a las regiones UTR del gen y los codones subrayados corresponden al inicio y final de la traducción. Secuencia CDS extraída de ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/841200>).

La construcción de entrada para la HXK3 en *A. thaliana* fue generada por el sistema GATEWAY de donación, en el cual se insertó el cDNA de *HXK3* al vector pENTR™/D/TOPO™ (2.6Kb). El vector de entrada es un vector de clonación para *E. coli* que contiene el sitio de inicio de la replicación bacteriana, las secuencias recombinatorias (*attL1* y *attL2*) que flanquean el sitio de inserción y un gen que confiere resistencia a kanamicina usado como marcador de selección en bacterias. Para la clonación de *HXK3* fue necesario añadir 4 pares de bases (CACC) al extremo 5' del oligonucleótido hxx3F para proporcionar direccionalidad en la clonación (Ver anexo). Posteriormente, con esta construcción se transformaron células de *E. coli* DH5α por electroporación, y las transformantes fueron seleccionadas en medio LB Kan (50 µg/µl) a 37°C.

Las colonias resistentes fueron analizadas por PCR y la construcción pENTR/D/TOPO::*HXK3* se purificó por el protocolo de minipreparación TENS (Ver anexo). Para corroborar la inserción y direccionalidad de *HXK3* se realizó un PCR utilizando tres pares de oligonucleótidos, a partir del plásmido purificado (Figura 11). Del primer par se amplificó un fragmento de 1.7Kb (*attL1/hxx3R*), del segundo par se amplificó un fragmento de 0.5Kb (*hxx3S/M13Rv*) y del tercer par se amplificó un fragmento de 1.7Kb (*hxx3F/M13Rv*) (Figura 12). Los oligonucleótidos M13 están posicionados fuera de los sitios de recombinación *attL* que bordean el gen *HXK3*. Las muestras posteriormente fueron analizadas por secuenciación, corroborando la ubicación y la direccionalidad se encontrara correcta en la construcción (Unidad de Secuencia IBT) (Ver anexo).



**Figura 11.** Estructura de la construcción pENTR/D/TOPO/*HXK3*. Se representan el sitio de replicación bacteriana (pUC ori), las secuencias de recombinación (*attL1* y *attL2*), el gen de resistencia a kanamicina (Kan<sup>R</sup>) y los sitios M13. Abajo se representan los fragmentos obtenidos por PCR para la corroboración de la construcción.

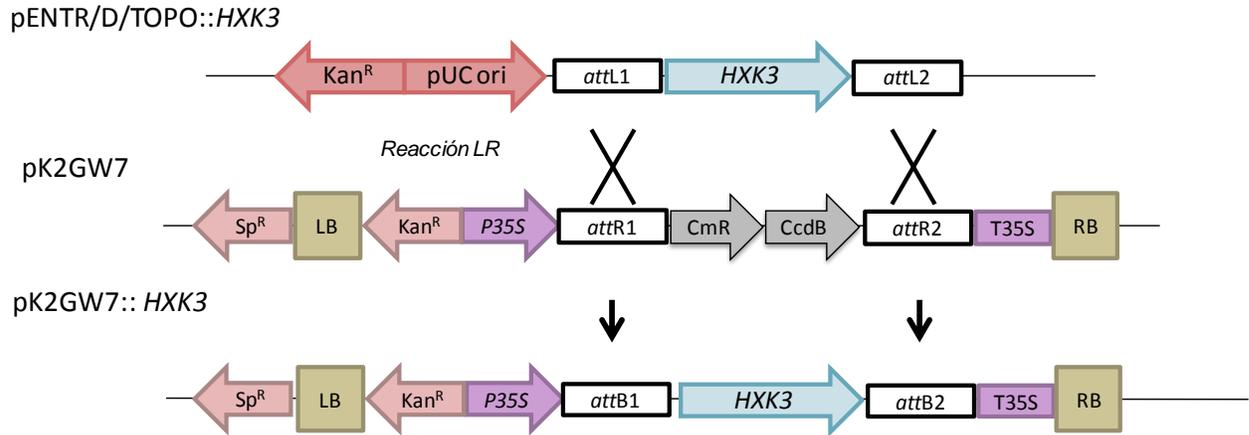


**Figura 12.** Electroforesis de productos de PCR a partir de plásmido purificado con la construcción pENTR/D/TOPO::*HXK3*. Los carriles A-C muestran los fragmentos obtenidos a partir de la amplificación utilizando los oligonucleótidos M13Fw/hxk3R (1.7Kb), hxk3S/M13Rv (0.6Kb) y hxk3F/M13Rv (1.7Kb), para el carril A, B, C, respectivamente (flechas). Carril M muestra el marcador de peso molecular. Gel de agarosa 1%.

### ***Incorporación del gen HXK3 a un sistema binario***

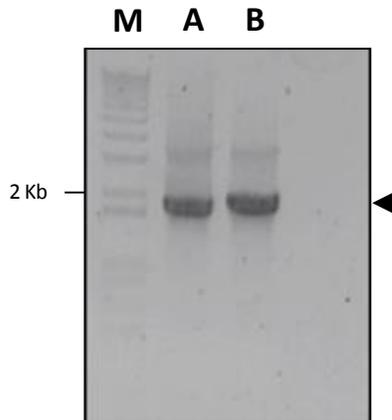
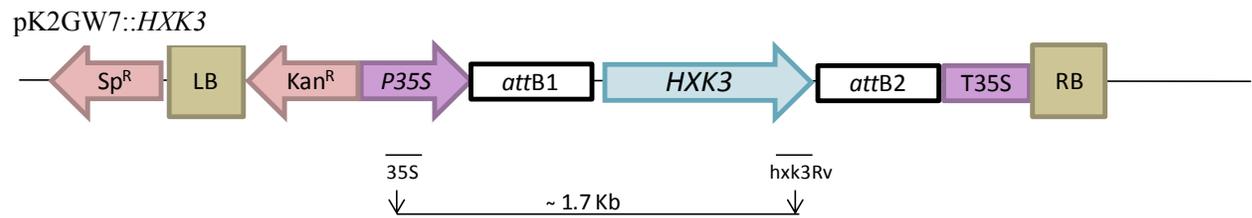
A partir de la construcción pENTR<sup>TM</sup>/D/TOPO::*HXK3*, el fragmento que corresponde a la región codificante del gen *HXK3* fue transferido al vector destino pK2GW7 por recombinación utilizando la recombinasa LR. La reacción de la LR utiliza los sitios de recombinación sitio-específico del fago  $\lambda$  y se lleva a cabo entre las secuencias *attL1* y *attL2* del vector pENTR con las secuencias *attR1* y *attR2* del vector destino. En esta reacción se generaron dos secuencias recombinadas *attB1* y *attB2* y la transferencia de nuestro gen de interés *HXK3* (Figura 13).

Por ser un vector binario, pK2GW7 contiene dos secuencias repetidas denominadas borde izquierdo y borde derecho que delimitan el T-DNA. Dentro de los bordes se encuentra posicionado un promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor, un marcador de selección en plantas (Kan) y una región “polylinker”. Fuera de los bordes, el plásmido, contiene un origen de replicación para su mantenimiento en bacterias (pUC ori) y una secuencia de resistencia a antibiótico para selección en bacterias (Sp).



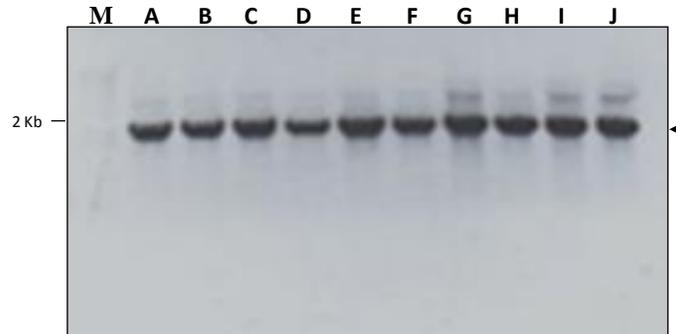
**Figura 13.** Esquema de la reacción de recombinación (LR). La recombinación LR, que como sus siglas lo indican se lleva a cabo entre los sitios de recombinación *attL* del pENTR y los sitios *attR* del vector destino pK2GW7. Esta recombinación desplaza los genes CmR-ccdB del vector destino e incorpora el gen de interés (*HXK3*) asegurando que las colonias que se obtuvieron fueran recombinantes, portadoras de la construcción de interés. Sp<sup>R</sup> y Kan<sup>R</sup> resistencia a espectinomicina y kanamicina respectivamente; LB y RB borde izquierdo y borde derecho respectivamente; *attB1* y *attB2* secuencias producto de la recombinación LR; P35S y T35S, promotor y terminador 35S.

Se transformaron células de *E. coli* por electroporación, y la presencia del plásmido en las bacterias fue seleccionado en medio LB con Kan 50 µg/µl) y Sp 50 µg/µl). Finalmente, se obtuvieron colonias resistentes y se confirmó por PCR la construcción pK2GW7::HXK3. En las muestras analizadas se corroboró el producto de PCR de dos colonias, para este análisis se usaron el par de oligonucleótidos 35Smin/ xk3R (1.7Kb) (Figura 14).



**Figura 14.** Electroforesis de los productos de la amplificación por PCR de las muestras obtenidas de la recombinación LR. Carriles A-B corresponden a muestras independientes de colonias seleccionadas en medio LB con Kan 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y Sp 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Se utilizaron los oligonucleótidos 35S/ x k3R que amplificaron un fragmento de 1.7Kb (Flecha). Carril M muestra el marcador de peso molecular. Gel de agarosa 1%.

La segunda parte del sistema binario consiste en un plásmido ayudante que se encuentra en *A. tumefaciens*, el cual contiene los genes *vir* necesarios para la transferencia del T-DNA al cromosoma de la planta. Los genes *vir* actúan en *trans* sobre las secuencias repetidas del borde derecho al borde izquierdo del vector binario, transfiriendo nuestro gen de interés *HXK3* al núcleo celular de *A. thaliana*. Para generar el sistema binario, se transformaron células de *A. tumefaciens* (PGV2260C5) por electroporación con la construcción pK2GW7::*HXK3*, posteriormente se seleccionó una colonia resistente en medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), rifampicina 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), espectinomicina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Figura 15) y finalmente se transformaron plantas de *A. thaliana* por el método “floral dip”.



**Figura 15.** Electroforesis de productos de PCR en colonia de transformantes de *A. tumefaciens*. Los carriles A-J muestran la amplificación por PCR de colonias independientes. El carril M muestra el marcador de peso molecular. Se usó el par de oligonucleótidos 35S/hxk3R que amplificó un fragmento de 1.7Kb (flecha). Gel de agarosa 1%.

### **Transformación de plantas *A. thaliana* y obtención de líneas sobreexpresoras de *HXK3***

Se generaron plantas transgénicas por el método de “floral dip” como está especificado en el protocolo (Clough y Bent, 1999). Para la realización de dicho procedimiento se sembraron semillas Col-0 en medio GM por 10 días en fotoperiodo normal, que fueron posteriormente trasplantadas a macetas con sustrato hasta que desarrollaron las primeras silicuas. A las plantas les fueron retiradas las silicuas, antes de ser sumergidas en la solución de transformación, dejando únicamente los brotes florales. Para la solución de transformación se creció un cultivo de *A. tumefaciens* que lleva el gen de interés en la construcción pK2GW7::*HXK3* corroborada por PCR. Las células de *A. tumefaciens* se colectaron por centrifugación y fueron resuspendidas en una solución con sacarosa (5%) y siluet L-77 (0.5%). Las plantas transformadas T<sub>0</sub> se mantuvieron en crecimiento normal hasta que desarrollaron semillas después de 1 mes y medio.

De la selección inicial se obtuvieron 13 plántulas independientes T<sub>1</sub> que fueron resistentes al antibiótico y se trasplantaron 11 al sustrato para la recolección de semilla por separado. La semilla T<sub>2</sub> fue sembrada en medio de selección GM con Kan 50μg/μl) teniendo un patrón de segregación 3:1. Posteriormente se seleccionaron 5 plántulas de cada una de las líneas independientes de la T<sub>2</sub>, las cuales fueron trasplantadas al sustrato para la obtención

de semilla de la generación 3 (T<sub>3</sub>). Finalmente, se seleccionaron líneas independientes que fueron 100% resistentes a Kan (50µg/µl), las cuales se usaron en los ensayos de sensibilidad a glucosa.

### **Análisis de la genotipificación de las mutantes *hxx3***

La mutante *hxx3* (SALK\_030722.55.75.X.) fue obtenida del banco de semillas de Arabidopsis ABRC (<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=germplasm&id=4633310>). Esta mutante contiene una inserción de T-DNA en el exón 4 del gen *HXX3*, para su genotipificación se sembraron semillas en medio GM sin antibiótico durante 10 días, de las cuales se extrajo DNA de una hoja para análisis por PCR.

Se corroboró la inserción de T-DNA por PCR de algunas plantas usando el par de oligonucleótidos LBa (5' TGG TCC ACG TAG TGG GCC ATC G 3') y *hxx3R* (5' CTT CTG CTA GTT CGT TGC TCC 3'); se siguieron únicamente las plantas que amplificaron dicho fragmento. Para determinar el estado homocigoto de las mutantes confirmadas, se decidió corroborar la presencia del transgén de plantas independientes hijas y la presencia del gen endógeno si es que estuviera presente fue amplificado con los oligonucleótidos *hxx3f* (5' CAC CGA CAA TGT CAC TCA TGT TTT C 3') y *hxx3R* (5' CTT CTG CTA GTT CGT TGC TCC 3'), las reacciones de PCR fueron realizadas siguiendo el protocolo de Fermentas, Life Sciences.

### **Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Todas las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas con etanol absoluto y 20% de hipoclorito de sodio, posteriormente las semillas se mantuvieron 4 días a 4°C en dormancia y subsecuentemente fueron crecidas en fotoperiodo normal (16h luz/8h oscuridad) durante 10 días. Finalmente algunas fueron trasplantadas al sustrato para obtención de semilla.

### ***Ensayos de sensibilidad a glucosa***

Para los ensayos de sensibilidad a glucosa se utilizaron plantas transgénicas sobreexpresoras de *HXX3* en estado homocigoto, líneas homocigotas de la mutante *hxx3*, el control silvestre Col-0 y líneas mutantes *gin2-1*, *ein2* almacenadas y propagadas en el

laboratorio. Se sembraron 50 semillas de cada línea en una caja de Petri para mantener las condiciones homogéneas. La germinación de las semillas fue monitoreada a las 12, 24, 36, 48, 72 h y cinco días después de ser transferidas al cuarto de crecimiento con fotoperiodo normal. Todas las semillas fueron sembradas en medio sólido Murashine and Skoog (MS 0.2X) con concentraciones variables de carbono de 1, 3, 4, 6 y 7% de glucosa y 1% de sacarosa. Para cada tratamiento se realizaron 3 experimentos independientes.

### ***Análisis estadísticos***

Se realizaron análisis estadísticos de varianza de un factor (ANOVA) para comparar los efectos de glucosa entre las diferentes líneas de plantas. Así mismo, se analizaron muestras duplicadas por medio de la prueba T para determinar el efecto de la glucosa entre dos líneas de plantas. La variabilidad fue descrita en términos de desviación estándar (SD). Los datos fueron analizados con 95% de significancia ( $P < 0.05$ ) usando el programa GraphPad, Inc., versión 6.05, ©1992-2014.

### **Análisis de expresión genética tipo Northern-blot**

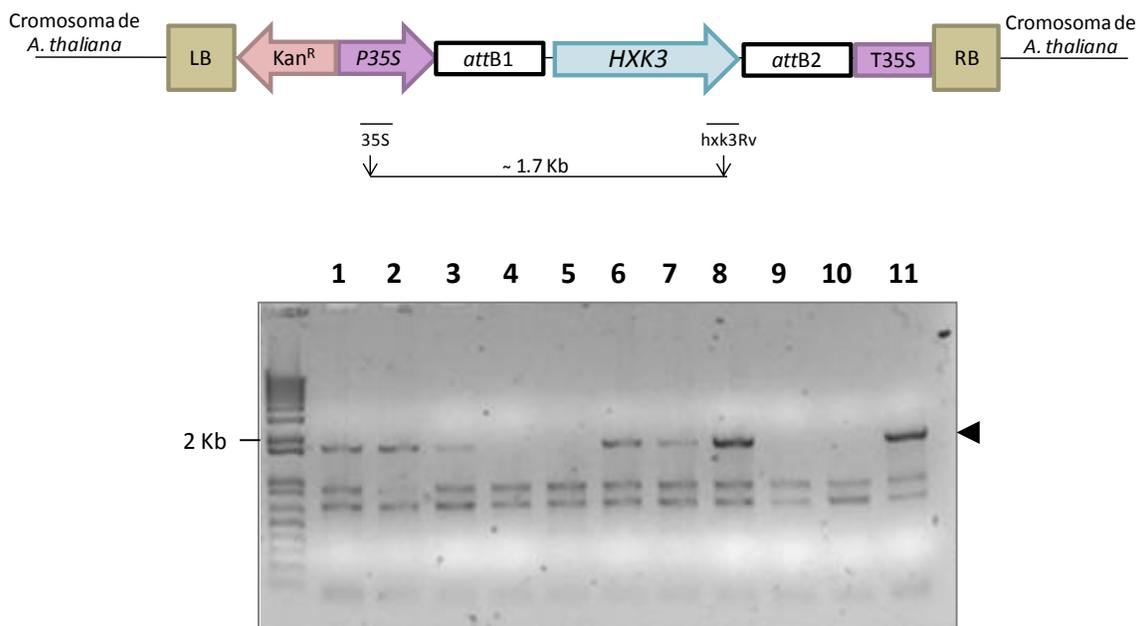
Para realizar el análisis de expresión genética tipo Northern-blot (DNA:RNA) se amplificó por PCR una sonda específica de DNA de una región codificante del gen *HXK3* usando el par de oligonucleótidos hXk3S (5' CTT CTG CTA GTT CGT TGC TCC 3') y hXk3R (5'CTT CTG CTA GTT CGT TGC TCC 3'). El oligonucleótido hXk3S se encuentra posicionado en el noveno exón del gen *HXK3* (aminoácido 627) (Figura 11). Para el diseño de hXk3S se realizó un alineamiento múltiple de secuencias incluyendo a los 6 miembros de la familia de hexocinasas de *A. thaliana* (CLUSTALW). Por medio de este análisis se seleccionó un fragmento de 400 pb poco conservado con otras HXKs de la familia y altamente específico para *HXK3* (Análisis de BLAST, NCBI). Se utilizaron 10 µg de RNA de cada muestra en un gel de agarosa (1.5%) elaborado para RNA [formaldehído (2.25%) y MOPS1X], el gel de RNA fue transferido por capilaridad a una membrana de celulosa (Amersham Hybond -N+). El marcaje de la membrana de RNA se realizó como está especificado en el kit de marcaje Amersham Megaprime DNA Labeling Systems, GE Healthcare, usando  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP y la membrana se dejó en exposición 4 días en una placa fotográfica a -70° C para posteriormente revelar el film.

## RESULTADOS

### Confirmación de líneas sobreexpresoras 35S::*HXK3*

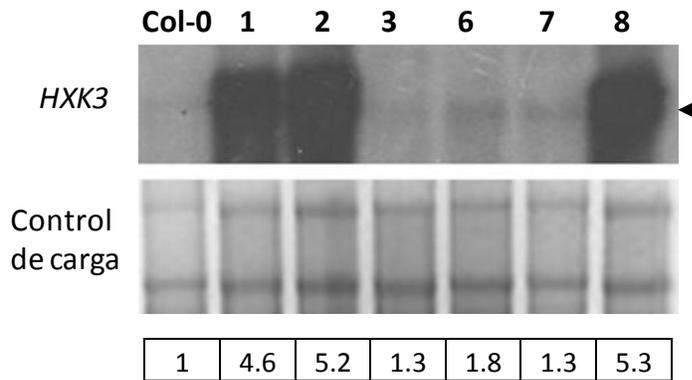
Como primer objetivo se generaron plantas que sobreexpresan el gen *HXK3* con el fin de evaluar si el aumento en los niveles de expresión provoca alguna diferencia en la sensibilidad a glucosa. De un análisis preliminar se confirmó la presencia del transgén de 11 líneas independientes de plantas de la T<sub>1</sub> resistentes a Kan 50 µg/µl). Las transformantes se distinguieron por sus cotiledones verdes bien desarrollados, mientras que las plantas no transformadas presentaron cotiledones despigmentados y poco desarrollados. Se obtuvieron siete líneas 35S::*HXK3* (1, 2, 3, 6, 7, 8 y 11) que presentaron amplificación del fragmento por PCR (Figura 16). Las líneas corroboradas fueron seguidas para la obtención de las siguientes generaciones de plantas.

#### *A. thaliana*//35S::*HXK3*



**Figura 16.** Electroforesis de productos de PCR de plantas resistentes al medio de selección GM con Kan 50 µg/µl). Se utilizó el par de oligonucleótidos 35S/hXk3Rv amplificando un fragmento de 1.7Kb (flecha). Los carriles 1, 2, 3, 6, 7, 8 y 11 presentaron amplificación positiva del fragmento esperado. Se observan dos bandas inespecíficas de menor tamaño. Gel de agarosa 1%.

Para corroborar que las plantas fueran sobreexpresoras de *HXX3* se analizaron los niveles de mRNA mediante hibridación de DNA:RNA tipo Northern-blot de las líneas independientes 1, 2, 3, 6, 7, 8 (T<sub>1</sub>) (Figura 17). A través de este análisis preliminar se corroboró que las líneas 35S::*HXX3* exhibieron diferentes niveles de acumulación de transcrito, siendo las líneas 1, 2 y 8 las que tenían una mayor acumulación (5 veces) respecto a la silvestre Col-0.

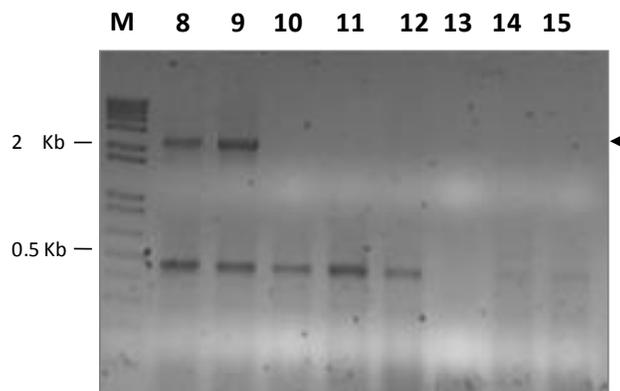


**Figura 17.** Análisis de los niveles de mRNA de *HXX3* por Northern-blot. Carriles 1, 2, 3, 6, 7 y 8 se muestran líneas transgénicas independientes 35S::*HXX3*. Carril Col-0 muestra el control silvestre. El film de arriba muestra el revelado de la hibridación DNA:RNA usando una sonda específica de *HXX3*. Abajo se muestra el control de carga de la membrana de RNA teñida con azul de metileno. La tabla muestra los niveles de expresión de mRNA normalizados a 1 (Col-0), a través de Image J.

## Genotipificación de la línea SALK\_030722.55.75.X mutante de inserción en el locus AT1G47840 (*HXX3*)

Con el fin de investigar el papel de la *HXX3* en *A. thaliana* se decidió evaluar una mutante nula del gen *HXX3* para determinar si la falta de este gen provoca alguna diferencia en la sensibilidad a glucosa en las plantas. Para lograr este objetivo se corroboró la inserción de T-DNA en el locus correspondiente a *HXX3* de la línea SALK\_030722.55.75.X obtenida del Centro de semillas ABRC.

Se sembraron 24 semillas provenientes del stock original en medio GM 1X sin antibiótico debido a que las plantas fueron sensibles a Kan. Las plantas fueron crecidas durante 10 días en un fotoperiodo normal (16:8, luz:oscuridad) y posteriormente transferidas de manera independiente a macetas con sustrato para la obtención de semilla. Para la corroboración de la presencia del transgén se realizó un PCR de 24 plántulas independientes a partir de DNA genómico obtenido de una hoja. En este análisis se confirmó la presencia del transgén de las líneas 8 y 9 (Figura 18). Posteriormente, se colectó semilla de las líneas independientes y se sembraron 5 plántulas hijas de cada línea para incrementar la población.



**Figura 18.** Electroforesis de productos de PCR de plántulas del stock de SALK\_030722.55.75.X. Carril 8-15 muestran productos de PCR de plantas independientes. Se usó el par de oligonucleótidos LBa/hxk3R que amplificaron un fragmento de 2.2 Kb (flecha). El PCR se realizó a partir de DNA genómico extraído de plántulas independientes. Gel de agarosa 1%.

En este estudio requeríamos trabajar con las mutantes homocigas para *HXK3*, con el fin de seleccionar dichas plantas se analizaron dos fragmentos amplificados por PCR. El primer fragmento corresponde a la amplificación del gen silvestre utilizando los oligonucleótidos *hvk3F/hvk3R* (Fragmento A). El segundo fragmento indicó la presencia del transgén usando el par de oligonucleótidos *LBa/hvk3R* (Fragmento B) (Figura 20).

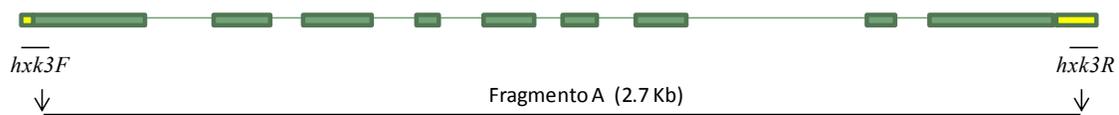
Se anotaron como plántulas plantas silvestres las que amplificaron únicamente el fragmento A (línea 8.2), como plantas homocigas aquellas que sólo amplificaron el fragmento B (líneas, 8.1, 8.3, 8.5 y 9.2) y como plantas heterocigas las que amplificaron ambos fragmentos; A y B, (línea 9.3). Sin embargo, cabe mencionar que hubo plántulas que no amplificaron ninguno de los fragmentos (líneas 9.4 y 9.5) (Figura 20).

Se obtuvo la siguiente progenie de las líneas homocigas 8.3, 8.5 y 9.2. Se realizó una comparación del fenotipo de las mutantes homocigas al transgén y se confirmó que la mutante *hvk3* no presentó un fenotipo diferente al de la silvestre en medio GM (Figura 19).

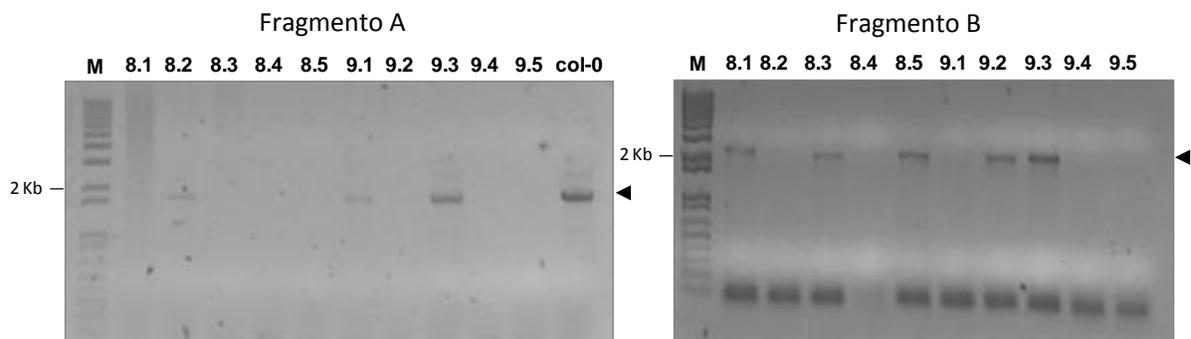
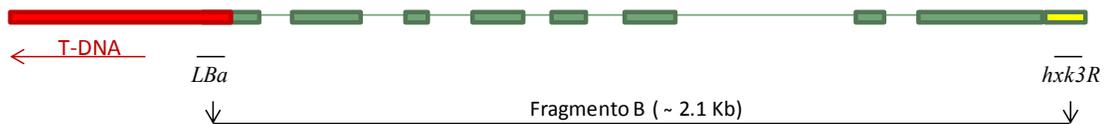


**Figura 19.** Análisis comparativo del fenotipo de dos líneas homocigas de *hvk3* (8.3 y 9.2) y la silvestre (Col-0). Plántulas de 3 días de edad crecidas en medio GM.

Locus AT1G47840



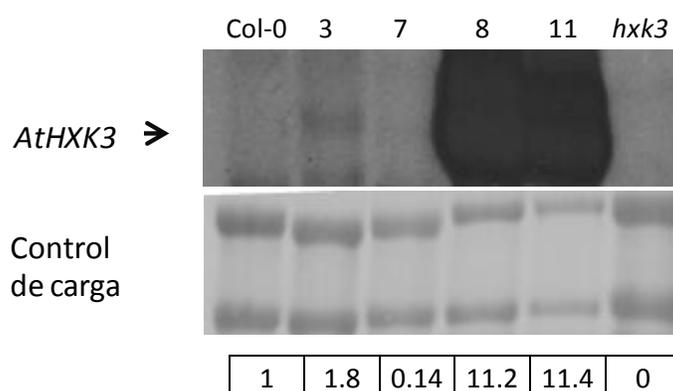
SALK\_030722.55.75.X



**Figura 20.** Electroforesis de productos de PCR para selección del estado homocigo de la mutante *hxx3*. En el gel de la izquierda se observa la amplificación del fragmento A usando los oligonucleótidos *hxx3F/hxx3R* que generaron un fragmento de 2.7 Kb (flecha). En el gel de la derecha se observa la amplificación del fragmento B, utilizando los oligonucleótidos *LBa/hxx3R* generando un fragmento de 2.1 Kb (flecha). Carriles 8.1-8.5 y 9.1-9.5 corresponden a líneas independientes del stock de mutantes *hxx3*. Col-0 corresponde al control silvestre de *A. thaliana*. Carril M, muestra el marcador de peso molecular para DNA. Como templado se utilizó DNA genómico extraído de una hoja de plántulas independientes de la mutante *hxx3*. Geles de agarosa 1%.

### Análisis de expresión de las líneas 35S::*HXK3* y la mutante *hvk3*

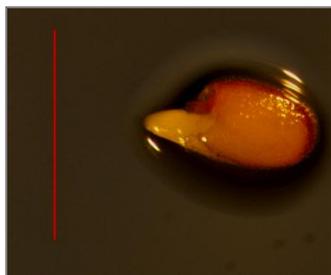
Se realizaron ensayos de hibridación tipo Northern-blot con el fin de comparar los niveles de expresión del gen *HXK3* en cada línea que será utilizada en los experimentos de sensibilidad a glucosa. Se corroboró que los niveles de expresión en las líneas sobreexpresoras 8 y 11 son más altos (11 veces), respecto al control silvestre. Mediante este análisis también se confirmó la expresión nula en la línea mutante *hvk3* (Figura 21).



**Figura 21.** Análisis de los niveles de mRNA de *HXK3* por Northern-blot. En el primer carril es una muestra de RNA de la silvestre (Col-0) en los cuatro carriles siguientes son muestras de RNA de cuatro líneas sobreexpresoras 35S::*HXK3* (3, 7, 8 y 11) y en el último carril es una muestra de RNA de la mutante *hvk3*. Arriba muestra la hibridación de RNA con una sonda específica de DNA correspondiente al gen *HXK3*. Abajo se muestra el control de carga de la membrana teñida con azul de metileno. La tabla muestra los niveles de expresión de mRNA normalizados a 1 (Col-0), a través de Image J.

## Evaluación de la germinación de plantas de *A. thaliana*

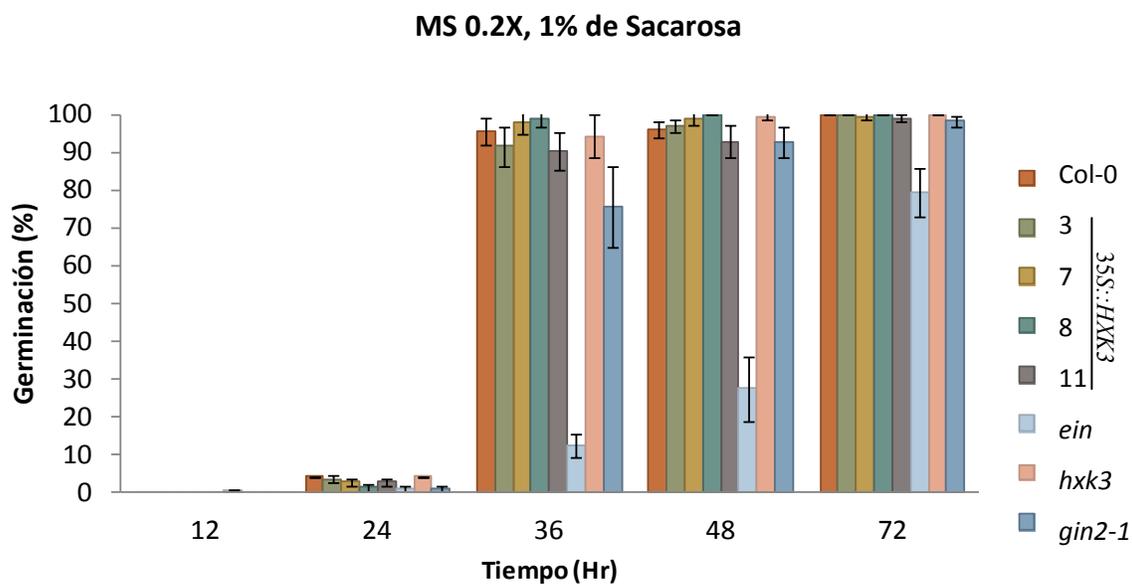
Uno de los objetivos de este proyecto es evaluar la sensibilidad a glucosa de las plantas sobreexpresoras y mutante del gen *HXK3* en *A. thaliana*. Con dicho propósito se realizaron cinéticas de germinación donde se compararon cuatro líneas independientes de las plantas sobreexpresoras *35S::HXK3* (líneas 3, 7, 8 y 11), la línea homocigota de la mutante nula *hvk3* (línea 9.2) y la línea silvestre de *A. thaliana* del ecotipo Columbia (Col-0). En este estudio como controles también, se incluyeron dos líneas mutantes, afectadas en la respuesta a azúcar que han sido previamente caracterizadas, la mutante *ein2* como control de plantas hipersensibles a glucosa y la mutante *gin2-1* como control de plantas insensibles a este mismo azúcar. Para realizar este análisis se sembraron 50 semillas de cada línea en presencia de diferentes concentraciones de glucosa y se registró el porcentaje de germinación en diferentes tiempos (Figura 22).



**Figura 22.** Germinación de las semillas de *A. thaliana*. Se cuantificó la germinación de semillas cuando la radícula del embrión estuvo completamente emergida de la testa.

En un primer análisis se cuantificó la germinación de cada una de las líneas en medio control MS 0.2X suplementado con 1% sacarosa. En la Figura 23 se muestra la cuantificación de la germinación a las 12, 24, 36 y 48 hrs. En este análisis se corroboró que la germinación de las semillas inició a partir de las 24 horas de las líneas sobreexpresoras, la mutante *hvk3* y la silvestre, las cuales se aproximaron a un 100% a las 36 horas. En este ensayo se observó germinación retardada en la línea mutante *gin2-1*, la cual alcanzó un porcentaje de germinación del 90% sólo hasta las 48 horas.

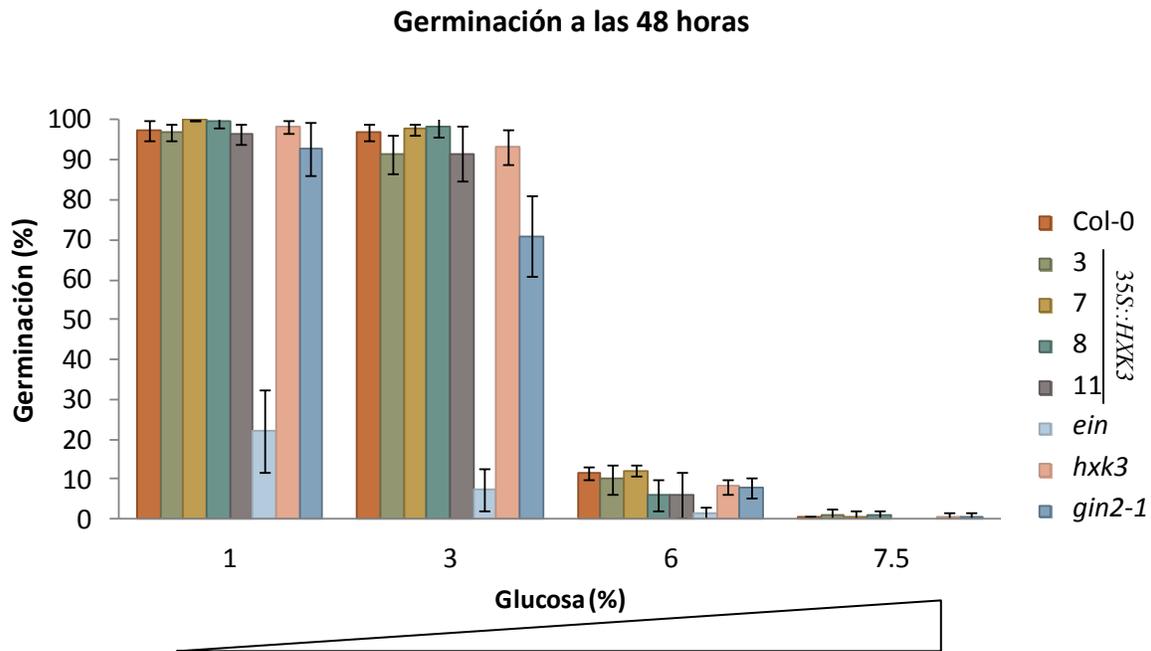
También nuestros resultados mostraron que la línea mutante *ein2* presentó una afectación en la germinación, la cual llegó sólo al 80% a las 72 horas. Resultados similares se obtuvieron en otro medio control 0.2X MS suplementado con 1% glucosa, lo que demostró que las semillas utilizadas de *ein2* no tienen viabilidad al 100%.



**Figura 23.** Evaluación de la germinación en medio MS2X, 1% de sacarosa. Se sembraron 50 semillas de cada línea (100%) y se cuantificó la germinación a las 12, 24, 36, 48 y 72 horas. Las líneas analizadas fueron: el control silvestre (Col-0), cuatro líneas sobreexpresoras 35S::HXK3 (3, 7, 8 y 11), la mutante del gen HXK3 (*hxx3*), una mutante hipersensible a glucosa (*ein2*) y una mutante insensible a glucosa *gin2-1*. Medio MS 0.2X suplementado con sacarosa 1%. Las barras indican la desviación estándar ( $\pm$ ).

La figura 24 muestra la cuantificación de la germinación a las 48 horas en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Se condujo una prueba de análisis de varianza de un factor (ANOVA) para comparar los efectos de la glucosa (6%) en las líneas de plantas sobreexpresoras *35S::HXK3* (3, 7, 8 y 11), las mutantes *hvk3* y *gin2-1*, y el control silvestre. No hubo diferencias significativas entre las líneas analizadas  $F(6, 308) = 0.7235$ ,  $P > 0.6309$ .

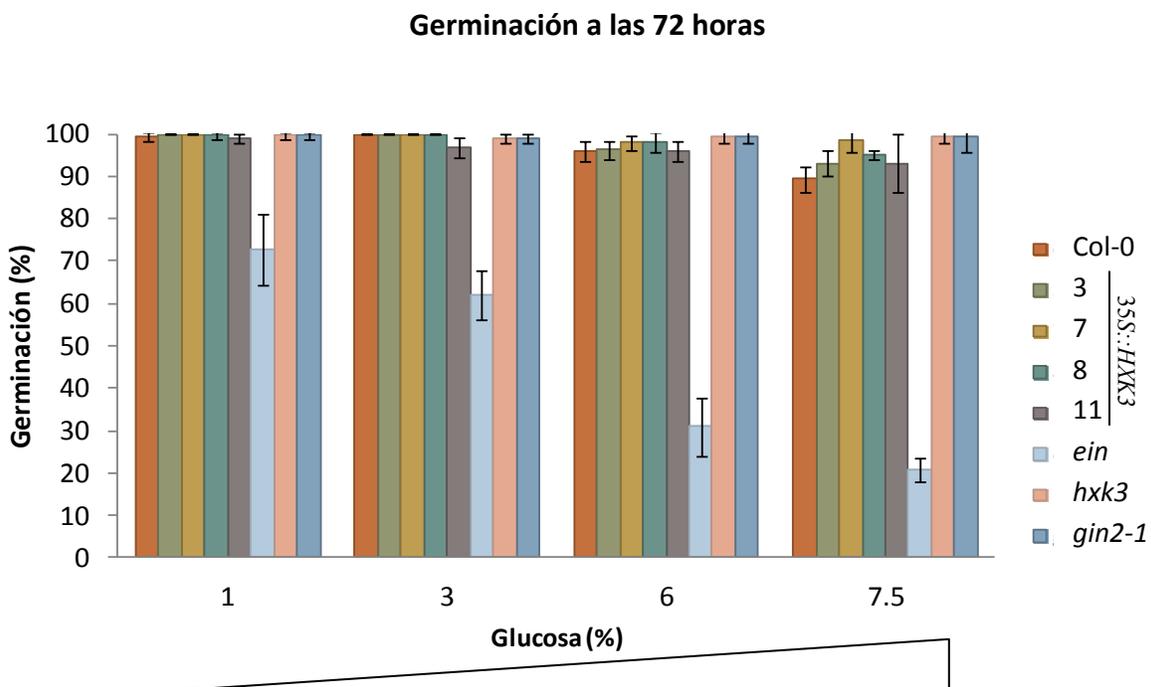
Sin embargo, la germinación está retrasada a esta concentración (6%) respecto al control (1%). Este resultado también muestra que en estas condiciones aún las líneas resistentes a glucosa, no son capaces de germinar y por lo tanto se decidió continuar con la cuantificación en tiempos más prolongados.



**Figura 24.** Evaluación de la germinación a las 48 horas. Las líneas analizadas fueron: La línea silvestre (Col-0), cuatro líneas sobreexpresoras *35S::HXK3* (3, 7, 8 y 11), una mutante hipersensible a glucosa (*ein2*), la mutante del gen *HVK3* (*hvk3*) y una mutante insensible a glucosa *gin2-1*. Medio MS 0.2X suplementado con 1, 3, 6 o 7.5% de glucosa. Las barras indican la desviación estándar ( $\pm$ ).

Se registró un porcentaje de germinación aproximado al 100% en todas las líneas analizadas a las 72 horas, a excepción de la mutante *ein2* que presentó un porcentaje de germinación de 72.6% en el medio control.

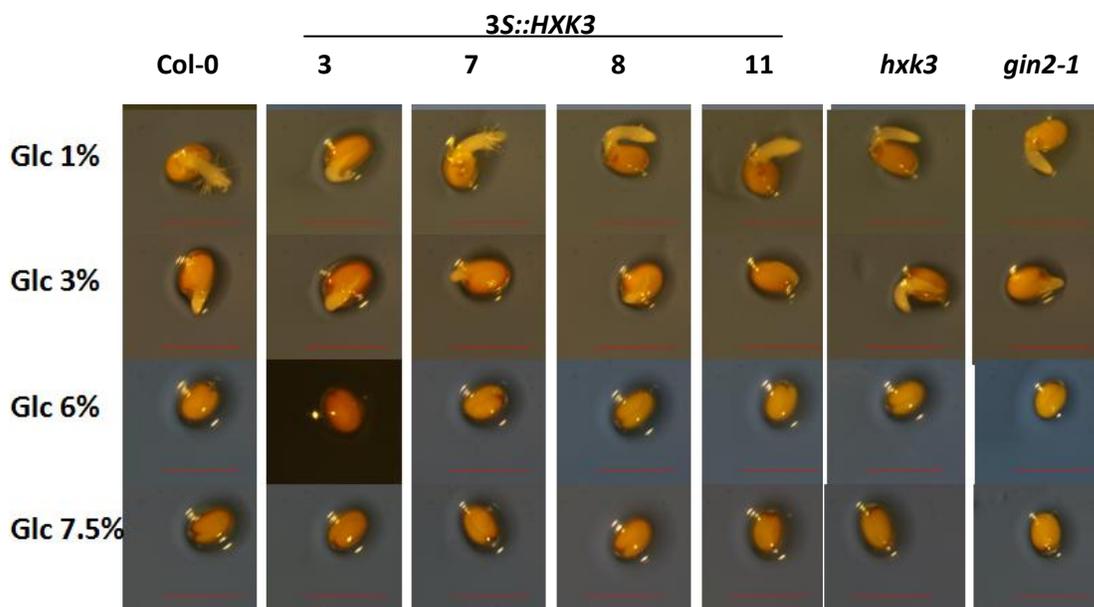
Con estos datos concluimos que no hubo diferencias significativas en el tratamiento con glucosa 1% entre las líneas sobreexpresoras *35S::HXK3*, las mutantes *hvk3* y *gin2-1* respecto a la silvestre  $F(6,35)=2.286$ ,  $P=0.0576$  (Figura 25). Sin embargo, en los tratamientos con 3%, los análisis de varianza indican que si hubo diferencias significativas entre las líneas comparadas que se debe principalmente a los tratamientos de glucosa y no al azar ( $F(6, 77) = 7.244$ ,  $P < 0.0001$ ), 6% ( $F(6, 119) = 3.047$ ,  $P = 0.0083$ ) y 7% ( $F(6, 161) = 3.729$ ,  $P = 0.0017$ ).



**Figura 25.** Evaluación de la germinación a las 72 horas después de la siembra. Las líneas analizadas fueron: La línea silvestre (Col-0), cuatro líneas sobreexpresoras *35S::HXK3* (3, 7, 8 y 11), una mutante hipersensible a glucosa (*ein2*), la mutante del gen *HVK3* (*hvk3*) y una mutante insensible a glucosa *gin2-1*. Medio MS 0.2X suplementado con 1, 3, 6 o 7.5% de glucosa.

### Análisis del fenotipo en la germinación de las líneas 35S:H XK3 y la mutante *h xk3*

Con el fin de investigar con mayor detalle el desarrollo temprano y la germinación, se examinaron los fenotipos de las plantas en diferentes tratamientos de glucosa. A las 36 horas, en el medio control (Glc 1%) se observó un fenotipo predominante en casi todas las líneas, caracterizado por presentar una radícula completamente emergida de la semilla con la presencia de pelos radicales. En este mismo tiempo de evaluación con baja glucosa (3%), se observó que tanto las plantas de las líneas sobreexpresoras, la mutante *h xk3*, la mutante *g in2-1* y la silvestre presentaron una radícula emergida sin pelos radicales. Sin embargo, en tratamientos con altos niveles de glucosa (>6%), las semillas de las diferentes plantas no germinaron aún en este tiempo (Figura 26). Estos datos demuestran que altas concentraciones de azúcar retrasan el proceso de germinación como ya se ha reportado con anterioridad (Jyan-Chyun *et al.*, 2006; Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2006).

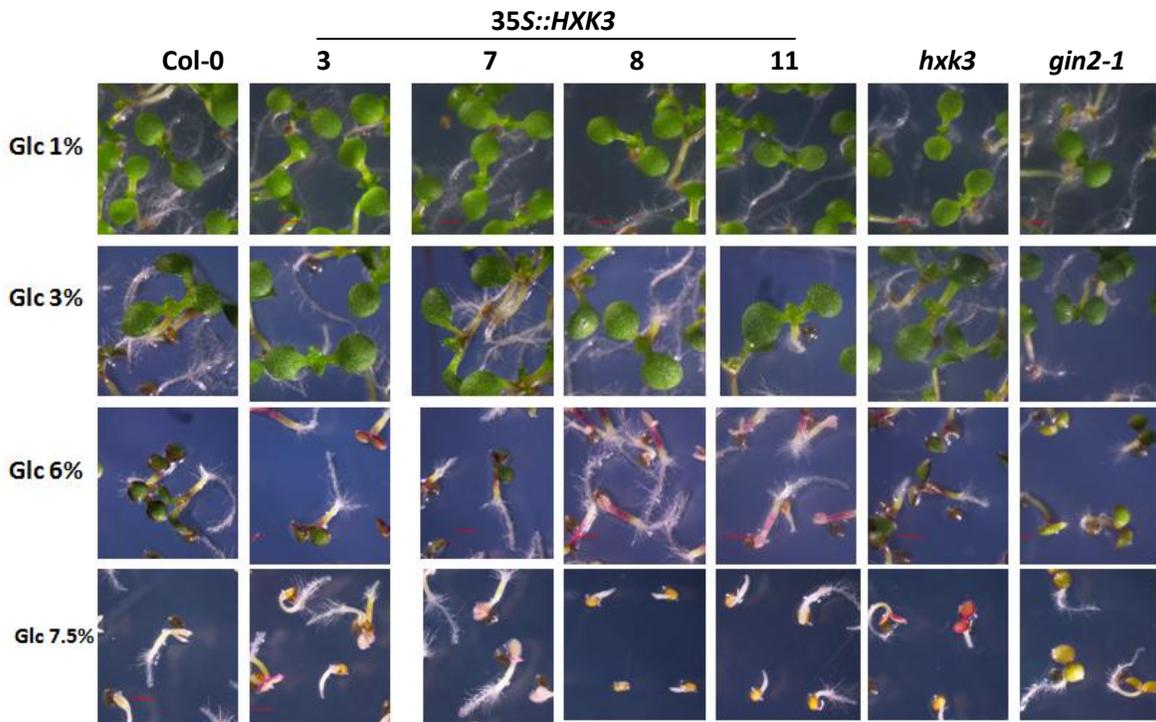


**Figura 26.** Análisis del fenotipo de las plantas a las 36 horas. Se observa tanto el fenotipo de plántulas silvestres (Col-0), líneas sobreexpresoras 35S:H XK3 T<sub>3</sub> (3, 7, 8 y 11), así como las mutantes *ein2*, *h xk3* y *g in2-1*. Medio MS 0.2X suplementado con glucosa 1, 3, 6 y 7.5% (Glc 1, 3, 5 y 7.5%). La línea roja representa la escala=1mm.

A las 72 horas en medio suplementado con baja azúcar (<3%) se corroboró que todas las líneas tuvieron un crecimiento aparentemente similar respecto a la silvestre; con cotiledones expandidos, verdes y bien desarrollados. Sin embargo, en los tratamientos con mayores niveles de glucosa (>6%) se observó que las líneas sobreexpresoras 8 y 11, presentaron desarrollo detenido y sus cotiledones no enverdecieron (Figura 27). Estos datos sugirieron que las sobreexpresoras 8 y 11 son más sensibles a altas concentraciones de azúcar.

Por otra parte, las líneas sobreexpresoras 3, 7 y la mutante *hvk3* mostraron un fenotipo similar al de las plantas silvestres; con cotiledones expandidos y con la presencia de pigmentos tipo antocianinas, que se distinguen por coloración morada al margen de los cotiledones, como se ha reportado en estudios anteriores en esta concentración de glucosa (Figura 27) (Jang y Sheen, 1997). Por otra parte, la mutante *hvk3* presentó un fenotipo similar a la silvestre, mientras que la mutante insensible a glucosa *gin2-1* se desarrolló enverdeciendo normalmente y sin la acumulación apreciable de antocianinas como también se ha reportado anteriormente (Moore *et al.*, 2003).

Finalmente, en el medio suplementado con 7.5% de glucosa todas las líneas presentaron un fenotipo de desarrollo detenido con plantas cloróticas. Sin embargo, el estado de desarrollo en las líneas 8 y 11 aparentemente se muestra en un estado más temprano, ya que estas plantas presentaron sólo la emergencia de la radícula y no se observó el desarrollo de los cotiledones. A diferencia de éstas, las plantas sobreexpresoras 3, 7 y la silvestre, presentaron emergencia de cotiledones sin pigmentación y poco desarrollados. De manera semejante a lo observado con concentraciones de 6% de glucosa, la mutante *gin2-1* tuvo cotiledones perfectamente expandidos. A pesar de que la línea mutante *hvk3* presentó un desarrollo detenido, sus cotiledones se desarrollaron expandidos y con presencia de antocianinas, estas plantas tuvieron menor afectación que las plantas silvestre. Estos datos sugieren una mayor sensibilidad a altas concentraciones de glucosa (7%) de las plantas sobreexpresoras 8 y 11 con respecto a las plantas silvestres y una ligera resistencia de la mutante *hvk3* (Figura 27).



**Figura 27.** Análisis del fenotipo de las plántulas a las 72 horas. Se muestra el fenotipo de las plantas de la línea silvestre (Col-0), líneas sobreexpresoras 35S::HXK3 T<sub>3</sub> (3, 7, 8 y 11), así como las mutantes *hvk3* y *gin2-1*. Medio MS 0.2X suplementado con glucosa 1, 3, 6 y 7.5% (Glc 1, 3, 5 y 7.5%).

Un análisis más detallado en tratamientos con 4% de glucosa demostró que la línea sobreexpresora 8 presentó un fenotipo de hipersensibilidad, ya que posee plantas detenidas en el desarrollo, como está reportado anteriormente para plantas hipersensibles a glucosa (*glo*) (Figura 28) (Sheen *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2002). En este análisis se utilizaron las plantas 35S::HXK3 T<sub>0</sub> (Figura 17).



**Figura 28.** Análisis del fenotipo de las plantas en medio MS 0.2X con 4% de glucosa a las 72 horas. Se muestra el fenotipo de las plantas de la línea silvestre (Col-0), líneas sobreexpresoras 35S::HXK3 T<sub>0</sub> (1, 3, 7 y 8), así como las mutantes *hvk3* y *gin2-1*.

### **Evaluación del desarrollo temprano en respuesta a glucosa de las líneas sobreexpresoras 35S::*HXK3* y la mutante *hvk3*.**

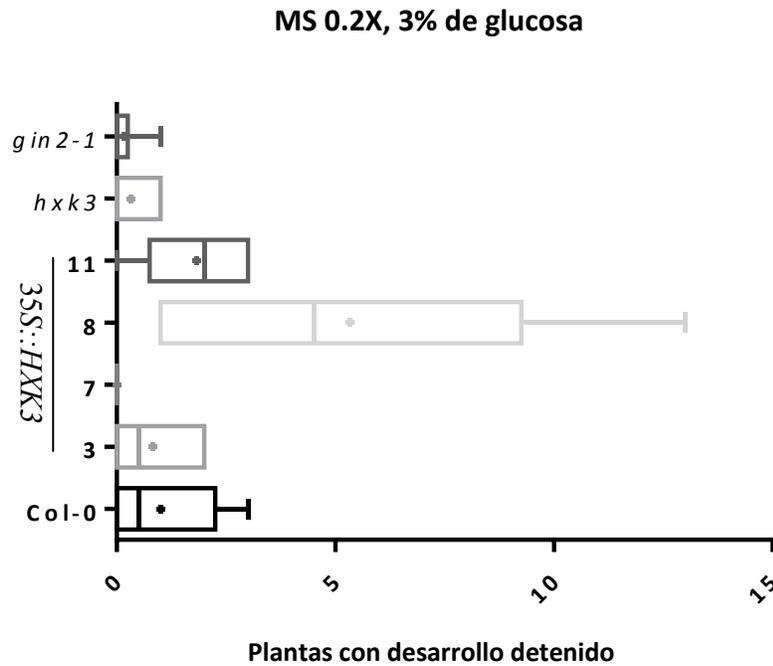
Con el fin de analizar con más precisión el desarrollo temprano de cada una de las líneas en respuesta a glucosa, se realizó una cuantificación de las plántulas que presentaron desarrollo detenido, principalmente evidenciado por el cese del crecimiento y por su carencia de pigmentación debido a la ausencia de clorofilas (Rolland *et al.*, 2002) (Figura 29).



**Figura 29.** Fenotipo de plantas con desarrollo detenido. Con un fenotipo sin pimientos y las plántulas no continúan su crecimiento. (5 días de crecimiento)

Se cuantificaron las plántulas con desarrollo detenido en medio con 3% de glucosa. Mediante la prueba de análisis de varianza de un factor se compararon los efectos de la glucosa (3%) en las diferentes líneas de plantas (Figura 30). Corroborando que hay diferencias significativas entre las líneas analizadas a esta concentración de glucosa  $F(7, 124) = 5.402$ ,  $P < 0.0001$ .

Estos análisis confirmaron que hay un mayor número de plantas con desarrollo detenido en las líneas 8 y 11 con un porcentaje de 10.6 ( $4.6 \pm SD$ ) y 3.6% ( $1.2 \pm SD$ ), respectivamente; mientras que el silvestre presentó 2% ( $1.1 \pm SD$ ) de plantas con desarrollo detenido. En este estudio se concluyó que las líneas sobreexpresoras responden a bajas concentraciones de glucosa, como es característico de plantas hipersensibles a azúcar.

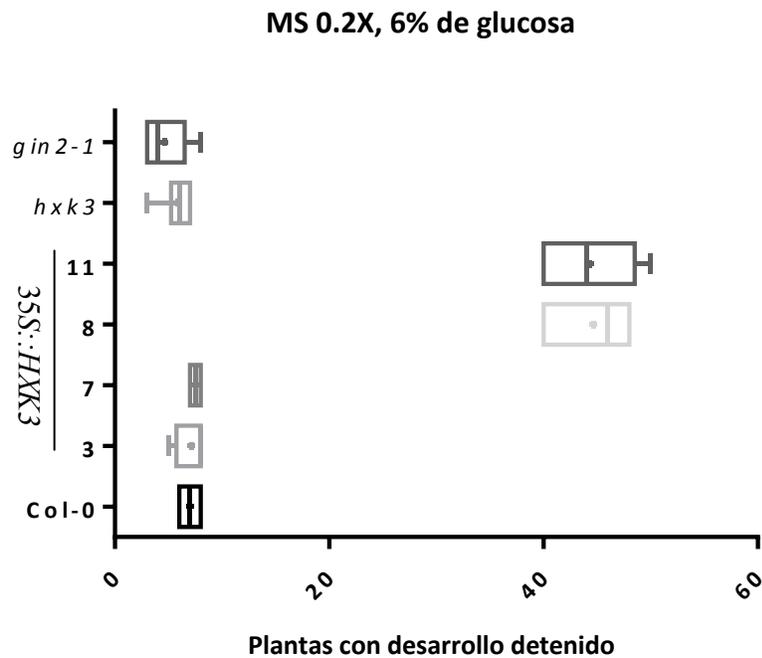


**Figura 30.** Evaluación del desarrollo en 3% de glucosa. Se muestran el número de plantas con desarrollo detenido a partir de 50 semillas. En este estudio se analizaron las líneas sobreexpresoras 35S::HXX3 T<sub>3</sub> (3, 7, 8 y 11), las mutantes *hxx3* y *gin2-1*, así como en la silvestre Col-0; en medio MS 0.2X adicionado con 3% de glucosa. Las barras de error indican la desviación estándar.

Posteriormente se evaluó el porcentaje de plántulas con desarrollo detenido en medio suplementado con 6% de glucosa (Figura 31), el análisis de varianza de un factor confirmó que hubo diferencias significativas entre las líneas analizadas a esta concentración de glucosa  $F(6, 35) = 308.9, P < 0.0001$ .

Las líneas sobreexpresoras 8 y 11 presentaron un porcentaje de 89.3 ( $3.4 \pm SD$ ) y 88.6% ( $4.3 \pm SD$ ) de plántulas con desarrollo detenido, respectivamente; mientras que la silvestre presentó un porcentaje de 14% ( $1 \pm SD$ ) (Figura 30). La línea mutante *gin2-1* mostró un fenotipo claro de insensibilidad a glucosa, ya que tuvo un 6% ( $1.8 \pm SD$ ) de plántulas con desarrollo detenido en esta concentración de glucosa como está reportado anteriormente (Moore *et al.*, 2003).

El cotejo de los fenotipos en 6% de glucosa sugirieron que la mutante *hxx3* podría tener una ligera insensibilidad a glucosa, por lo que en este estudio se evaluó con mayor precisión el desarrollo detenido de las plantas. Mediante un análisis de muestras duplicadas de la prueba T se determinó el efecto de la glucosa en la mutante *hxx3* respecto a la silvestre. Los datos indicaron que no hubo diferencias significativas entre la silvestre Col-0 (M = 7; SD ± 1) y la *hxx3* (M = 5.8 ; SD ± 1.3); t (0.07611), P = 0.9395.

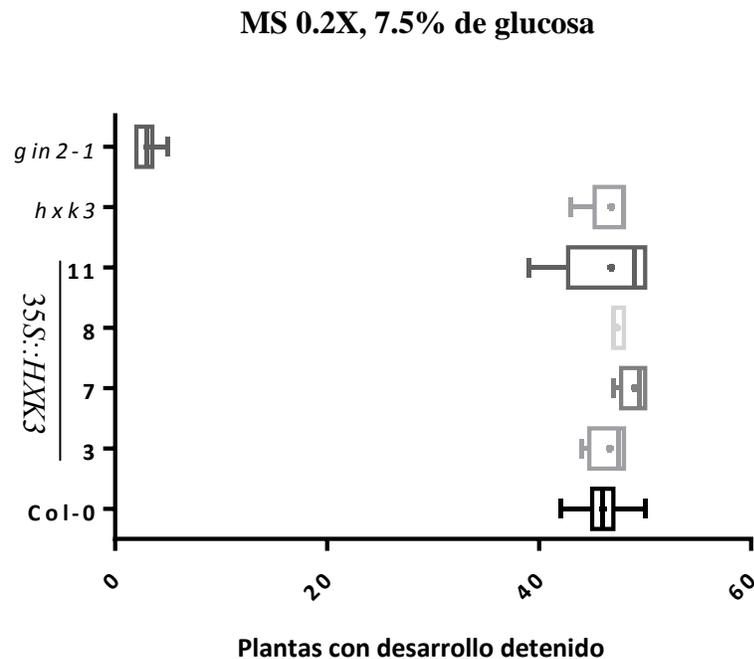


**Figura 31.** Evaluación del desarrollo en 6% de glucosa. Se muestran el número de plantas con desarrollo detenido a partir de 50 semillas. En este estudio se analizaron las líneas sobreexpresoras 35S::HXX3 T<sub>3</sub> (3, 7, 8 y 11), las mutantes *hxx3* y *gin2-1*, así como en la silvestre Col-0; en medio MS 0.2X adicionado con 6% de glucosa. Las barras de error indican la desviación estándar.

La evaluación del desarrollo en 7.5% de glucosa confirmó que no hubo diferencias significativas del desarrollo detenido entre las líneas sobreexpresoras 35S::*HXK3* (3, 7, 8 y 11) y la mutante *hvk3* respecto a la silvestre,  $F(5, 30) = 1.050$ ,  $P = 0.4069$  (Figura 32).

Sin embargo, en el análisis de varianza no fue incluido nuestro control de insensibilidad a glucosa *gin2-1*, el cual presentó 6% ( $1 \pm SD$ ) de plantas detenidas en el desarrollo que fue significativamente diferente a la silvestre, 96% ( $2.3 \pm SD$ );  $t = 38$ ,  $P < 0.0001$  (Figura 32).

Con este análisis se determinó que a esta concentración (7.5%) las plantas sobrepasan un umbral de sensibilidad y únicamente, las plantas insensibles a glucosa como *gin2-1* son capaces de crecer en este medio.



**Figura 31.** Evaluación del desarrollo en 7.5% de glucosa. Se muestran el número de plantas con desarrollo detenido a partir de 50 semillas. En este estudio se analizaron las líneas sobreexpresoras 35S::*HXK3* T<sub>3</sub> (3, 7, 8 y 11), las mutantes *hvk3* y *gin2-1*, así como en la silvestre Col-0; en medio MS 0.2X adicionado con 7.5% de glucosa. Las barras de error indican la desviación estándar.

## DISCUSIÓN

Diversos estudios han mostrado que las hexocinasas son enzimas con una actividad señalizadora además de poseer su función catalítica de cinasas. En las plantas, las HXKs constituyen una familia de estas enzimas con diferentes localizaciones subcelulares tanto citoplásmica como plastídicas, esta localización confiere funciones particulares en la célula. Una pregunta en el campo es la participación de los diversos miembros de la familia asociado a su localización.

La HXK3 de *A. thaliana* es una proteína localizada en el plástido, y nuestro interés es establecer si una de sus funciones está relacionada con la sensibilidad a azúcares. Con este objetivo se comparó la germinación de cuatro líneas sobreexpresoras 35S:*HXK3* (3, 7, 8 y 11) y la línea mutante nula *hvk3* (línea 9.2). Para efectos comparativos, en este estudio se incluyó como control de insensibilidad a azúcar la mutante nula de HXK1 (*gin2-1*) y como control de hipersensibilidad a azúcares la mutante *ein2*, que es también insensible a etileno (Roman *et al.*, 1995). Nuestros datos mostraron que las semillas de *ein2* tienen un problema intrínseco de germinación, independiente de los niveles de azúcar y que probablemente pudiera deberse al estado del lote de la semilla que fue usado en este trabajo, por lo tanto, esta línea no fue incluida para los diversos análisis comparativos realizados y las conclusiones de este trabajo (Figura 23).

Los niveles de azúcares alteran de manera diferencial diversos estados del desarrollo de las plantas. Por ejemplo, se ha confirmado que los azúcares en concentraciones reducidas (1-3%) inducen la germinación, pero a concentraciones mayores (5-7%) la retrasan (Jang y Sheen, 1997). En este análisis se corroboró que altos niveles de glucosa (>6%), provocan un retraso en la germinación consistente con lo reportado en estudios previos (Figura 24). Sin embargo, aún en presencia de 7.5% de glucosa todas las líneas se aproximaron al 100% de germinación a las 72 horas. Estos datos demostraron que altos niveles de glucosa retrasan pero no inhiben la germinación; no obstante, hubo diferencias significativas en altas concentraciones de glucosa entre las líneas analizadas que se deben principalmente a los tratamientos de glucosa y no al azar (Figura 25).

### **El desarrollo temprano está afectado en las plantas 35S:HXX3**

En diferentes concentraciones de glucosa (>4%) se observó un fenotipo de desarrollo detenido en las líneas sobreexpresoras 35S:HXX3 8 y 11, las cuales presentan un estado clorótico, acumulación de pigmentos tipo antocianinas, hojas curvadas y necróticas como está reportado anteriormente para plántulas hipersensibles a glucosa (Figura 27 y 29) (Jang y Sheen, 1997). Estos resultados apoyan la idea de que al aumentar los niveles de expresión de *HXX3* provocan hipersensibilidad a glucosa, similar a lo que se ha observado con la sobreexpresión de la HXX1 citoplásmica, la cual presenta hipersensibilidad a partir de 4% de glucosa similar a HXX3 (Figura 28) (Jang y Sheen, 1997).

La evaluación del desarrollo temprano (<5 días) confirmó que las líneas sobreexpresoras 35S:HXX3 presentan una afectación desde niveles bajos de glucosa (3%) (Figura 30) hasta niveles altos de glucosa (6%) (Figura 31) y esta respuesta es dependiente de la acumulación del mRNA de *HXX3* (Figura 21). Nuestros estudios sugieren que la HXX3 podría estar involucrada en la percepción de azúcares en el cloroplasto. En este trabajo se evaluó la germinación y el desarrollo temprano de las plantas sin embargo, la presencia de azúcares también tiene efectos importantes durante la diferenciación organelar, la floración, la formación de la raíz, la maduración de las hojas, la respuesta a patógenos, la senescencia de las hojas, entre otros (Schaeven *et al.*, 1990; Dickinson *et al.*, 1991; Ding *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1999; Dekkers *et al.*, 2004).

### **La mutante *hxx3* presenta un fenotipo similar a la silvestre Col-0**

Los análisis del fenotipo indicaron que la mutante nula *hxx3* presenta menor afectación que la silvestre en altas concentraciones de glucosa ( $\geq 6\%$ ). Sin embargo la evaluación del desarrollo temprano demostró que no hubo diferencias significativas entre la silvestre Col-0 (M = 7; SD  $\pm$  1) y la mutante *hxx3* (M = 5.8 ; SD  $\pm$  1.3); t (1.9), P = 0.9395 (Figura 31). En particular, cabe resaltar que nuestros datos obtenidos, contrastan con lo reportado por Zhang y colaboradores (2010), donde muestran que la mutante *hxx3* es insensible a glucosa a una concentración de 7% (Zhang *et al.*, 2010).

Sin embargo, bajo las condiciones utilizadas, el crecimiento de la mutante *hvk3* es más sensible a glucosa que la línea mutante *gin2-1*, que para este trabajo se utilizó como control insensible a glucosa. Cabe remarcar que se corroboró que la mutante *hvk3* es nula (Figura 21); sin embargo, su insensibilidad, antes reportada fue inconsistente con nuestros estudios.

### **La acumulación del transcrito de *HVK3* correlaciona con el fenotipo de hipersensibilidad a glucosa**

Los datos obtenidos en los análisis de fenotipo mostraron un comportamiento diferencial entre las líneas sobreexpresoras respecto a su sensibilidad a azúcares, sugiriendo que esta respuesta podría deberse a que las líneas sobreexpresoras presentan diferentes niveles del gen *HVK3*. Nuestros datos comprobaron que las líneas sobreexpresoras 8 y 11 presentaron mayor acumulación del transcrito de *HVK3* que las líneas sobreexpresoras 3 y 7, y esta acumulación correlaciona con su sensibilidad a glucosa (Figura 21 y 27).

Dado que en *A. thaliana* existen otros genes que codifican para hexocinasas se podría pensar que existe redundancia funcional entre diferentes miembros de la familia. Sin embargo, esta posibilidad no es tan fácil de ser explicada para el caso de la *HVK3*, ya que como se mencionó este miembro tiene una localización plastídica (Karve *et al.*, 2008), hasta el momento no se ha demostrado la existencia de otras hexocinasas en el plástido de *A. thaliana*.

Análisis previos han demostrado que *HVK1* es otra hexocinasa que participa en la percepción y señalización de glucosa en *A. thaliana* y su mutante *gin2-1* presenta un fenotipo de insensibilidad a glucosa (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003; Balasubramanian *et al.*, 2007). Esto demuestra que por lo menos en el caso de *HVK1* ninguno de los otros miembros de la familia es totalmente redundante. Por lo tanto, si *HVK3* tiene un papel en la percepción de azúcares, este papel creemos que sería en procesos diferentes al de la *HVK1*. Por ejemplo, la *HVK3* podría participar en la percepción de glucosa proveniente de la ruptura del almidón como se ha determinado para otras *HVKs* plastídicas en organismos fotosintéticos como *P. patens* y *N. tabacum* (Olsson *et al.*, 2003; Giese *et al.*, 2005; Thelander *et al.*, 2005).

Para establecer la participación de la HXK3 en la sensibilidad a azúcares, sería conveniente realizar una serie de estudios cuantitativos, por ejemplo a través de la cuantificación de clorofila y/o otros compuestos indicativos del fenotipo de las plantas que nos permitieran discernir efectos más tenues sobre el fenotipo.

### **Consideraciones finales**

La HXK3 tiene una localización plastídica; sin embargo, no se sabe contundentemente su función dentro de los plástidos, el análisis de otras hexocinasas plastídicas sugieren que ésta podría tener una función importante en otro tipo de plástidos más que en cloroplastos, por lo tanto sería interesante analizar tejidos de reserva como en la raíz o silicuas en la mutante y en las líneas sobreexpresoras. Además, en este trabajo no se incluyen análisis de las plántulas en respuesta a hormonas; se ha visto que otras hexocinasas de plantas tienen conexión con las vías de hormonas lo cual sería interesante abordar en estudios posteriores.

## CONCLUSIONES

- En este trabajo se clonó con éxito el gen *HXX3* y se sobreexpresó en plantas de *A. thaliana* mediante un sistema binario de *A. tumefaciens*.
- Hubo diferencias significativas en la germinación entre las diferentes líneas sobreexpresoras *35S:HXX3* y la mutante *hxx3*, producidas por los tratamientos de glucosa (>6%).
- Los niveles de expresión del gen *HXX3* están relacionados a la afectación del desarrollo temprano de plantas de *A. thaliana*. El aumento de la expresión generó fenotipos de hipersensibilidad a glucosa (>4%).
- La evaluación de la respuesta de la mutante nula *hxx3* en diferentes tratamientos con glucosa no mostró diferencias significativas respecto al control silvestre Col-0.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, y 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 and Development**. 14(16): 2085,9096.
- Balasubramanian R, Karve A, Kandasamy M, Meagher R B, y Moore B D. (2007). A role for F-actin in hexokinase-mediated glucose signaling. **Plant Physiol**. 145(4):1423,34.
- Barker L., Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C., Hirner, B, *et al.* (2000). SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. **Plant Cell**. 12(7):1153,64.
- Bennett W, y Steitz T. (1978). Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase. **PNAS**, 75(10):4848,4852.
- Cheng W, Zhang H, Zhou X, Liu H, Liu Y, y Li J. (2011). Subcellular localization of rice hexokinase (OsHXK) family members in the mesophyll protoplasts of tobacco. **Biologia Plantarum**. 55(1):173,177.
- Cho J, Ryoo N, Ko S, Lee S, Lee J, Jung K., *et al.* (2006). Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**. 224(3):598,611.
- Cho Y H, Yoo S D, y Sheen J. (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. **Cell**. 127(3):579,89.
- Claeysen E, y Rivoal J. (2007). Isozymes of plant hexokinase: occurrence, properties and functions. **Phytochemistry**. 68(6):709,31.
- Clough S J, y Bent A F (1999). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant J**. 16(6):735,743.
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner, K., *et al.* (1999). Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. **Plant Cell**. 11(7):1253,66.
- Dale S, Arró M, Becerra B, Morrice N G, Boronat A, Hardie D G, y Ferrer A. (1995). Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by Brassica oleracea 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. **FEBS**. 233(2):506,513.
- Damari-Weissler H, Ginzburg A, Gidoni D, Mett A, Krassovskaya I, Weber A P M, *et al.* (2007). Spinach SoHXK1 is a mitochondria-associated hexokinase. **Planta**. 226(4):1053,1058.
- Dekkers B J W, Schuurmans J A M. J. y Smeekens S. C. M. (2004). Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**. 218(4):579,88.
- Dickinson C D, Altabelia T, y Chrispeels M J (1991). Slow-Growth Phenotype of Transgenic Tomato Expressing. **Plant Physiol**. 95(2):420,425.

- Ding B, Haudenschild J S, Willmitzer L, y Lucas W J. (1993). Correlation between arrested secondary plasmodesmal development and onset of accelerated leaf senescence in yeast acid invertase transgenic tobacco plants. **Plant J.** 4(1):179,189.
- Dry I B, Nash D, y Wiskich J T. (1983). The mitochondrial localization of hexokinase in pea leaves. **Planta.** 158(2):152,6.
- Ehness R, Ecker M, y Godt D E. (1997). Glucose and Stress Independently Regulate Source and Sink Metabolism and Defense Mechanisms via Signal Transduction Pathways Involving Protein Phosphorylation. **Plant Cell.** 9(10):1825,1841.
- Entian K D, y Fröhlich K U. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. **J Bacteriol.** 158(1):29,35.
- Gancedo J M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. **MMBR.** 62(2):334,61.
- Gibson S I. (2000). Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol.* 124(4):132,1539.
- Gibson S. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Curr Opin Plant Biol.** 8(1):93,102.
- Giegé P, Heazlewood J L, Roessner-tunali U, Millar A H, Fernie A R, Leaver C J, y Sweetlove L J. (2003). Enzymes of Glycolysis Are Functionally Associated with the Mitochondrion in *Arabidopsis* Cells. **Plant Cell.** 15(9):2140,2151.
- Giese J-O, Herbers K, Hoffmann M, Klösgen R B, y Sonnewald U. (2005). Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*. **FEBS.** 579(3):827.31.
- Granot D, David-Schwartz R, y Kelly G. (2013). Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. **Front Plant Sci.** 4(3):44.
- Halford N G, Purcell P C, y Hardie D G. (1999). Is hexokinase really a sugar sensor in plants? **Trends Plant Sci.** 4(3):117,120.
- Hanson J, y Smeekens S. (2009). Sugar perception and signaling an update. **Curr Opin Plant Biol.** 12(5), 562–567.
- Herbers K, Meuwly P, Frommer W B, Metraux J P, y Sonnewald U. (1996). Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *Plant Cell.* 8(5):793,803.
- Heyer A G, Raap M, Schroeer B, Marty B, y Willmitzer L. (2004). Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 39(2):161,9.
- Jang J C, y Sheen J. (1994). Sugar sensing in higher plants. **Plant Cell.** 6(11):1665,79.

- Jang J-C, León P, Zhou L, y Sheen J. (1997<sup>a</sup>). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. **Plant Cell**, 9(1):5,19.
- Jang J-C. y Sheen J. (1997<sup>b</sup>). Sugar sensing in higher plants. **Trends Plant Sci.** 2: 208-214
- Jiang C-Z, Rodermel S R y Shibles R M. (1993). Photosynthesis , Rubisco Activity and Amount , and Their Regulation by Transcription in Senescing Soybean Leaves. **Plant Physiol.** 101:105,112.
- Kandel-Kfir M, Damari-Weissler H, German M A, Gidoni D, Mett A, Belausov E., *et al.* (2006). Two newly identified membrane-associated and plastidic tomato HXKs: characteristics, predicted structure and intracellular localization. **Planta.** 224(6):1341,52.
- Karve A, y Moore B D. (2009). Function of Arabidopsis hexokinase-like1 as a negative regulator of plant growth. **J Exp Bot.** 60(14):4137,49.
- Karve A, Rauh B L, Xia X, Kandasamy M, Meagher R B, y Sheen J. (2008). Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in Arabidopsis. **Planta.** 228(3):411,425.
- Karve R, Lauria M, Virnig A, Xia X, Rauh B L, y Moore B. (2010). Evolutionary Lineages and Functional Diversification of Plant Hexokinases. **J Exp Bot.** 60(14):1,13.
- Koch K E. (1996). Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. **Annu Rev Physiol.** 47:509,540.
- Kuser P R, Krauchenco S, Antunes O A C y Polikarpov I. (2000).The High Resolution Crystal Structure of Yeast Hexokinase PII with the Correct Primary Sequence Provides New Insights into Its Mechanism of Action. **Soc Bioch Mol Biol.** 275(27):14,21.
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Müller C, Krapp A, *et al.* (2003). Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. **Plant Cell.** 15(9):18-32.
- Martin T, Hellmann H, Schmidt R, Willmitzer L, y Frommer W B. (1997). Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. **Plant J.** 11(1):53,62.
- Miernyk J, y Dennis D. (1983). Mitochondrial, plastid and cytosolic isozymes of hexokinase from developing endosperm of *Ricinus communis*. **Arch Biochem Biophys.** 226(2):458,468.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W-H, Liu Y-X, *et al.* (2003). Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. **Science.** 300(5617):332,6.
- Moreno F, Ahuatzí D, Riera A, Palomino C A, y Herrero P. (2005). Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. **Biochem Soc Trans.** 33(1):265,8.
- Nelson D. L., Cox M. M. 2005. Lehninger Principles of Biochemistry (4a ED.). OMEGA. U. of Wisconsin-Madison. 1264pp.
- Neuhaus H, y Emes M. (2000). Nonphotosynthetic metabolism in plastids. **Annu Rev Plant Biol.** 52:111-40

- Olsson T, Thelander M, y Ronne H. (2003). A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. **J Biol Chem.** 278(45):44439,47.
- Özcan S, Dover J, y Johnston M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO.** 17(9):2566,2573.
- Özcan S, y Johnston M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. **MMBR.** 63(3):554,569.
- Paul M J, y Foyer C H. (2001). Sink regulation of photosynthesis. **J Exp Bot.** 52(360):1383,1400.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. **Ann Rev Plant Biol.** 59:417,41.
- Pego J V, Kortstee A J, Huijser C, y Smeekens S C. (2000). Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. **J Exp Bot.** 51(2):407,16.
- Perfus-Barbeoch L, Jones A M, y Assmann S M. (2004). Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. **Curr Opin Plant Biol.** 7(6):719,31.
- Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E. 2005. *Biology of Plants* (7th ED.). W.H. Freeman and Company Publishers. New York, NY 10010. 686pp.
- Roitsch T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. **Curr Opin Plant Biol.** 2(3):198-206.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, y Sheen J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annu Rev Plant Biol.** 57:675,709.
- Rolland F, Moore B, y Sheen J. (2002a). Sugar sensing and signaling in plants. **Plant Cell.** 14(05):185,205.
- Rolland F, Winderickx J, y Thevelein J M. (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. **Trends Biochem Sci.** 26(5):310,317.
- Rolland F, Winderickx J, y Thevelein J M. (2002b). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. **FEMS.** 2(2):183,201.
- Roman G, Lubarsky B, Kieber J J, Rothenberg M, y Ecker J R. (1995). Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. **Genetics.** 139(3), 1393,1409.
- Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonat R, González J A, Hilal M, y Prado F E. (2009). Soluble sugars--metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. **Plant Signaling & Behavior,** 4(5), 388,393.
- Schmid M, Davison T S, Henz S R, Pape U J, Demar M, Vingron M, *et al.* (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. **Nature genetics.** 37(5):501,6.

- Sauer N, y Stolz J. (1994). SUC1 and SUC2 : two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana* ; expression and characterization in baker ' s yeast and identification of t e i stidine- tagged protein. **Plant J.** 6(1):67,77.
- Schaewen V. (1990). Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants.**EMBO.** 9(10):3033,44.
- Sheen J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. **Plant Cell.** 2(10):1027,38.
- Sheen J. (2010). Discover and connect cellular signaling. **Plant Physiol.** 154(2):562,6.
- Sheen J, Zhou L, y Jang J C. (1999). Sugars as signaling molecules. **Curr Opin Plant Biol.** 2(5):410,8.
- Sherson S M, Alford H L, Forbes S M, Wallace G, y Smith S M. (2003). Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of Arabidopsis. **J Exp Bot.** 54(382):525,531.
- Shu K, Zhang H, Wang S, Chen M, Wu Y, Tang S., *et al.* (2013). ABI4 Regulates Primary Seed Dormancy by Regulating the Biogenesis of Abscisic Acid and Gibberellins in Arabidopsis. **PLoS Genetics.** 9(6):1003577.
- Smeekens S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. **Annu Rev Plant Biol.** 51:49,81.
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, y Rolland F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. **Curr Opin Plant Biol.** 13(3):274,9.
- Sugden C, Donaghy P G, Halford N G, y Hardie D G. (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(1):257,74.
- Tang G Q, Lüscher M, y Sturm A. (1999). Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning.**Plant Cell.** 11(2):177,89.
- Thelander M, Olsson T, y Ronne H. (2005). Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens*. **J Exp Bot.** 56(412):653,62.
- Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford N G, y Geigenberger P. (2003). Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. **Plant J.** 35(4):490,500.
- To J P C, Reiter W-D, y Gibson S I. (2002). Mobilization of seed storage lipid by Arabidopsis seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. **BMC.** 2(5):4.

- Ullah H, Chen J-G, Wang S, Jones A M. (2014). Role of a Heterotrimeric G Protein in Regulation of Arabidopsis Seed Germination. **Plant Physiol.** 129(06):897,907.
- Veramendi J, Roessner U, Renz A, Willmitzer L, y Trethewey R N. (1999). Antisense repression of hexokinase 1 leads to an overaccumulation of starch in leaves of transgenic potato plants but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism. **Plant Physiol.** 121(1):123,34.
- Weber H, Borisjuk, L, Wobus U. (1997). Sugar import and metabolism during seed development. **Trends Plant Sci.** 2:169,174.
- Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Manteuffel R, y Wobus U. (1998). Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. **Plant J.** 16(2):163,72.
- Weisbeek P J, y Smeekens S C M. (1999). Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. **Plant Physiol.** 119(03):1017,1023.
- Wiese A, Gröner F, Sonnewald U, Deppner H, Lerchl J, Hebbeker U, *et al.* (1999). Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids. **FEBS.** 461(2):13,18.
- Wingler A, Delatte T L, O'Hara L , Primavesi L F, Jhurrea D, Paul M J, y Schluempmann H. (2012). Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. **Plant Physiol.** 158(3):1241,51.
- Xiao W, Sheen J, y Jang J C. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. **Plant Mol Biol.** 44(4):451,61.
- Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, y Sheen J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. **Nature.** 496(7444):81,6.
- Zhang, Z-W, Yuan S, Xu F, Yang H, Zhang N-H, Cheng J, y Lin H-H. (2010). The plastid hexokinase pHXK: a node of convergence for sugar and plastid signals in Arabidopsis. **FEBS.** 584(16):3573,9.

## Tesis

- López Paz C. 2007. Caracterización molecular del complejo SnRK1 de maíz. Universidad de Barcelona. Barcelona. 187pp.

## ANEXO

**Tabla 4. Oligonucleótidos**

Oligo	Secuencia	Tamaño (pb)	Contenido de A-T, G-C (%)	Tm (°C)
hvk3F	5' <u>CAC CGA CAA TGT</u> CAC TCA TGT TTT C 3'	25	A+T= 56 C+G= 44	72.5
hvk3S	5' GAG AGT GGT GGA AGT GTG TG 3'	20	A+T= 45 C+G= 55	70.53
hvk3R	5' CTT CTG CTA GTT CGT TGC TCC	21	A+T= 47.62 C+G=52.48	70.8

**Oligonucleótidos para *HVK3*.** Se muestra la secuencia de los tres oligonucleótidos generados para el gen *HVK3*. La secuencia CACC fue añadida en el oligonucleótido hvk3F en el extremo 5'. Se usó una temperatura de alineamiento de 60° para amplificación por PCR. El codón de inicio de la traducción se muestra en negritas.

### Mapa de la secuenciación de la construcción pENTR/D/TOPO::*HVK3*

- A Not1
- A Att11
- A Oligo hvk3F

5' CACTCGTCTTAGCTCGGGCCCAAATAATGATTTTTATTTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCCCTT**CACCGACAATGTCACTCATGTTTTT**TTCCCTGTGCTCACCCAGCACTCGGATCTTTACCTTCTCATCTCGACCACGCTCCAATTACATCGTGATGTCCGCCGTCCGATCTAACTCTGCTTCGACGTGCTCTATACTGACCAAGTTTCAGAAAGACTGCGCCACTCCTACACCGTACCTACGCAACGTAGCCAACGCCATTGCTGATGACATGCGAGATGGTCTAGCTGTTGAAGGAGGAGGAGATCTCGAGATGATCTTGACTTTTGTGACGCTTTGCCTTCTGGGAATGAGGAAGGGTTGTTCTATGCATTGGATTTAGGAGGTACAAATTTTCGGGTGCGTAGCGTGCAATTAGGAGGAAAGAAAGAGCGAGTCTTAGCTACCGAATCTGAACAAATATCTATTTCTCAAAAGCTTATGATTGGTACAAGTGAGGAGCTTTTCGGGTTTCATTGCTTCAAAGCTTGCAAATTTTGTTGCAA... 3'

Fragmento obtenido por secuenciación de la construcción pENTR/D/TOPO::*HVK3*. El cual incluye la secuencia de recombinación *attL1* (en azul); la secuencia NOT1 (verde) y la secuencia del oligo hvk3F (rojo). Secuencia obtenida de la unidad de secuencia IBT y generada por el oligonucleótido M13. Se utilizó alineamiento múltiple de secuencias por CLUSTALW con el gen *HVK3* y las secuencias del vector pENTR. Unidad de secuencia, IBT.

## **Análisis molecular**

### ***Obtención de plásmido en pequeña escala por TENS.***

Para la obtención de plásmidos en pequeña escala se partió de 1.5 ml de cultivo bacteriano crecido 18 h en medio líquido Luria Broth (LB), el cual se centrifugó por 4 minutos a 7 000 rpm para sedimentar las células. La pastilla celular se resuspendió en 300 µl de TENS (Tabla 6). Posteriormente, se adicionó 150 µl de acetato de sodio 3M (pH 5.2) que fue mezclado vigorosamente y centrifugado para sedimentar los restos celulares y el DNA cromosómico. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y el plásmido se precipitó con 0.9 ml de etanol absoluto previamente enfriado a -20°C. Finalmente, el plásmido se obtuvo por centrifugación (10 000 rpm por 2 min), la pastilla de DNA se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se secó por 2-3 minutos. El DNA del plásmido aislado se resuspendió en agua ultrapura estéril.

### ***Transformación por electroporación***

Para transformar células de bacterias se mezcló el DNA de interés con una alícuota de las células electrocompetentes DH5α de *E. coli* o en células PGV2260C5 de *A. tumefaciens*. Esta mezcla se transfirió a una celda de electroporación de 0.1 cm (BioRad) enfriada previamente y se dio un pulso eléctrico de 2.5 V. Inmediatamente después se agregó 1ml de medio SOC (Tabla 6) y las células se transfirieron a tubos de ensaye estériles para su recuperación por incubación a 37°C con agitación durante 1 h. Posteriormente 0.2 L de ellas fueron sembradas en el medio de selección correspondiente (LB+ antibiótico), y se incubaron a 37°C durante 12 horas. Para la selección de células transformantes de *E. coli* con el vector pENTR se usó LB adicionado con Km (50 µg/µl), para la selección de células transformantes de *E. coli* con el producto de la recombinación LR se usó medio LB con Km (50 µg/µl) y Sp (50 µg/µl), para la selección de células transformantes de *A. tumefaciens* se usó medio LB con Amp (100 µg/µl), Rif (100 µg/µl) y Sp (50 µg/µl).

### ***Extracción de DNA genómico de plantas por CTAB***

Para la extracción de DNA genómico por medio de CTAB (Tabla 6) se pulverizó una hoja de plantas adultas con nitrógeno líquido al que se agregó 300 µl de Buffer CTAB 2X y se incubó a 65°C durante 1 h. Posteriormente se añadieron 300 µl de cloroformo y se centrifugó durante 10 min a 13 000 rpm. Subsecuentemente, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y el DNA se precipitó con 300 µl de isopropanol por 18 h a -20°C. Al día siguiente, se centrifugó durante 10 min a 13 000 rpm y se lavó la pastilla de DNA con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 13 000. La pastilla se secó al vacío y se resuspendió en agua ultrapura estéril. El DNA fue cuantificado por medio de un nanodrop y al momento de utilizar las muestras para PCR se calentaron a 65°C unos minutos.

### ***Extracción de RNA total de plantas por TRIZOL<sup>(R)</sup>***

La extracción de RNA se realizó a partir de material pulverizado en nitrógeno líquido de 50 plántulas de 10 días de edad a las cuales se les añadió 1 ml del reactivo TRIZOL. Las muestras se incubaron 5 min en TRIZOL a temperatura ambiente, y posteriormente, se les añadieron 200 µl de cloroformo, se agitaron vigorosamente con la mano y se incubaron a temperatura ambiente de 2-3 min. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 13 000 rpm a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y el RNA se precipitó con 600 µl de isopropanol por 18h a -20°C.

Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas 10 min a 13 000 rpm y la pastilla fue lavada con 1 ml de etanol al 75%, subsecuentemente se centrifugó a 7 500 rpm por 5 min a 4°C. Finalmente, las pastillas de RNA fueron secadas a temperatura ambiente y resuspendidas en 40 µl de agua ultrapura estéril.

### ***Obtención de cDNA***

Para generar el cDNA se utilizó la transcriptasa reversa del virus Moloney Murine (M-MLV-RT) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, CA). Para la reacción de obtención de cDNA se usó 3 µg de RNA y la incubación con la enzima M-MLV-RT<sup>o</sup> se realizó a 37°C por 50 min. La reacción fue inactivada por calentamiento a 70°C por 15 min.

**Tabla 5. Composición de soluciones y amortiguadores**

Nombre	Composición	Comentarios
TENS	Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM NaOH 0.1 M SDS 0.5 %	Esterilizar en autoclave 120°C por 20 min
CTAB 2X	Bromuro de cetil-trimetil-amonio, 2% NaCl, 1.4 M Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 20 mM	Esterilizar en autoclave 120°C por 20 min
Buffer de carga para RNA	Formamida 50% Formaldehído 7% MOPS 1X 0.5 µl de bromuro de etidio por cada muestra Azul de bromofenol	Se agrega 2 veces el vol men de 10 µg de RNA de cada muestra. Tomar el azul de bromofenol del buffer de carga para DNA, previamente esterilizado por autoclave
MOPS 10X	MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid], 200 mM Acetato de sodio 3H <sub>2</sub> O, 50 mM EDTA, 10 mM	Se esteriliza en autoclave y se ajusta pH 7.0 con NaOH
TAE 50X	Tris base, 2M Ácido acético glacial, 5.7% EDTA 0.5M pH 8, 50mM	Esterilizar en autoclave.
SSC 20X	NaCl, 3M Citrato de sodio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ), 350mM	Ajustar a pH 7.0 con NaOH 10M
SDS 20%	20g de SDS en 100 ml con agua destilada.	No esterilizar

**Tabla 6. Composición y elaboración de medios**

Nombre	Composición	Comentarios
MS líquido	Sales MS, 0.86 g/l MES, 0.5g/l Vitaminas, 0.04%	pH 5.8 Esterilizar en autoclave a 120°C.
GM	Medio MS con sacarosa 1%.	Esterilizar en autoclave a 110°C.
SOC	Bacto-Triptona, 20 g/l Extracto de levadura, 5 g/l NaCl, 0.5 g/l KCl, 0.186 g/l	pH 7.0 con NaOH y se esteriliza en autoclave a 120°C.
LB	Bacto-Triptona, 10 g/l Extracto de levadura, 5 g/l Nacl, g/l	pH a 7.0 con NaOH y esterilizar en autoclave a 120°C.
LB agar	Triptona, 10 g/l Extracto de levadura, 5 g/l NaCl, 1%	pH 7.0 Se esteriliza en autoclave y se deja enfriar 50°C y añadir, si procede, el antibiótico de selección. Distribuir en cajas petri y dejar solidificar. Conservar a 4°.
Sustrato	Metromix	Se mezcla con agua destilada