



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis de los elementos en *cis* del promotor de  
*ABI4* involucrados en la regulación por azúcares**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ALEJANDRA DAGMARA RIVERA LÓPEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. PATRICIA LEÓN MEJÍA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018**



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.

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Patricia León Mejía y financiado por PAPIIT IN204617 y CONACYT 220534.**

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Ciencias por todo el aprendizaje adquirido durante la carrera y al Instituto de Biotecnología por la preparación práctica y sus excelentes instalaciones.

Gracias al Dr. José Luis Puente por haber hecho posible mi estancia de investigación en el Instituto de Biotecnología y a la Dra. Patricia León Mejía por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura en su laboratorio y por su invariable disposición a asesorarme.

Agradecimientos especiales a la Dra. Nidia Luz Sánchez León y a la M. en C. Alma Fabiola Hernández por su asesoramiento y apoyo en los aspectos técnicos del proyecto, así como su amistad.

A mi comité tutorial, a la Dra. Helena Porta Ducoing, a la Dra. Elizabeth Cordoba Martínez, a la Dra. Ángela Victoria Forero Forero, a la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky y al Dr. Luis Felipe Jiménez García, les agradezco el tiempo dedicado a la revisión y contribuciones de esta tesis.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 23, en especial al M. en C. Julio Sierra Camarena, al M. en C. Luis de Luna, a la M. en C. Marel Chenge Espinosa, a la M. en C. María Isabel López, a la Dra. Lina Escobar, por toda su ayuda y enseñanzas.

A mis amigos de la facultad, Roberto Rebollo Hernández, Thelma Arenas, Ragdé Gutiérrez, Arturo Coyotécatl y Yorgui Santiago por su amistad y compañerismo.

## **Dedicatoria**

A mi madre Ma. de Lourdes López Ramírez, que me ha apoyado incondicionalmente durante mi preparación académica, me ha llenado de amor y que, con su ejemplo, me ha enseñado a luchar para alcanzar todas mis metas.

A mis abuelos, María Elena Ramírez Alvarado y Mario López Sánchez que con todo su amor y paciencia me inculcaron los valores con los que vivo hoy en día.

A mi familia; mis tíos: Mario, Arturo, Rafael y Beatriz que siempre están conmigo. A mis primos: Ixchel, César, Ariadna, Mario que son mis modelos a seguir; a Sabrina, Joshua y Pablo que me dan esperanza en las futuras generaciones. A Leslye, mi hermana del alma, mi confidente, mi defensora y mi conciencia.

A mi compañera de vida Karen de León Barrera, que me apoya totalmente y me motiva a seguir adelante día a día.

A todos mis amigos que son como mi segunda familia, Emmanuel Escamilla, Jesús Galván, Alejandro Aguilar, David Garcias, Diana Elisa Velázquez, Julio Sierra Camarena, Luis de Luna, Roberto Rebollo Hernández, Valentín Torres Corona, Maribel; a toda la Comuna: Victoria, José, Yameli, Josafat y Diego quienes, a pesar del poco tiempo juntos, se han vuelto una parte importante de mi vida.

# ÍNDICE

<b>1.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.2 Generalidades de la señalización por azúcares .....	2
1.2 Características de los azúcares como moléculas señalizadoras de plantas.....	4
1.2.1 Hexosas.....	5
1.2.2 Sacarosa .....	7
1.2.3 Trehalosa .....	8
1.3 Vías de señalización por azúcares .....	9
1.4 Elementos de la vía de señalización por azúcares.....	11
1.3.1 Receptores .....	13
1.3.2 Elementos involucrados en la cascada de transducción de señales de azúcares .....	16
1.3.3 Elementos finales de la señalización por azúcares .....	18
1.5 La percepción de azúcares interacciona con vías de fitohormonas .....	20
1.6 Los azúcares modulan las respuestas de las vías de señalización a través de diferentes mecanismos moleculares .....	21
1.6.1 Regulación transcripcional.....	22
1.6.2 Regulación post-transcripcional .....	26
1.6.3 Regulación traduccional.....	26
1.6.4 Regulación post-traduccional .....	27
<b>2.ANTECEDENTES.....</b>	<b>29</b>
2.1 El factor ABI4, elemento fundamental de la señalización por azúcares.....	29
2.2 ABI4 es un regulador versátil en múltiples vías de señalización .....	30
2.3 ABI4 es un regulador de la expresión genética nuclear .....	32
2.4 Factores que regulan a ABI4 .....	33
2.5 Antecedentes directos .....	34
<b>3.JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>4.HIPÓTESIS.....</b>	<b>36</b>
<b>5.OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>37</b>
5.1 Objetivos particulares .....	37
<b>6.MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
6.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	38
6.2 Generación de las construcciones.....	38
6.3 Reacción de PCR .....	41
6.4 Transformación de bacterias .....	41
6.5 Transformación vegetal con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	42

6.6 Selección de líneas homocigotas.....	42
6.7 Análisis histoquímicos de GUS .....	44
6.8 Análisis fluorimétricos de la actividad de $\beta$ -glucoronidasa .....	44
6.9 Cuantificación de proteína .....	45
6.10 Obtención de plásmido a pequeña escala a partir de <i>E.coli</i> (Miniprep) .....	46
6.11 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa .....	46
6.12 Extracción de DNA genómico .....	47
6.13 Análisis por PCR.....	47
<b>7.RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
7.1 Generación de las construcciones de 2kb, 2.5kb y 3kb del <i>pABI4</i> .....	49
7.2 Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> .....	55
7.3 Selección de líneas transgénicas homóclgas.....	59
7.4 Análisis histoquímico de $\beta$ -glucoronidasa .....	61
7.4.1 Patrón de expresión durante la embriogénesis .....	61
7.4.2 Determinación del patrón de expresión de plántulas de las diferentes construcciones .....	63
7.5 Regulación por glucosa del promotor de <i>ABI4</i> .....	67
7.6 Cuantificación de la expresión de GUS en las líneas crecidas en ausencia y presencia de glucosa .....	70
7.7 Análisis de los elementos en <i>cis</i> reportados en la región acotada del promotor del gen <i>ABI4</i> .....	73
<b>8.DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
8.1 Patrón de expresión de <i>ABI4</i> en embriones de <i>A. thaliana</i> .....	75
8.2 Patrón de expresión de <i>ABI4</i> en plántulas de <i>A. thaliana</i> .....	76
8.3 Delimitación de la región regulada por glucosa en el promotor de <i>ABI4</i> .....	80
8.4 Análisis de los elementos en <i>cis</i> reportados en la región acotada del promotor de <i>ABI4</i> .....	80
8.4.1 Factor de transcripción RAV1 .....	81
8.4.2 Caja G .....	82
8.4.3 Elemento CE1 .....	82
8.4.4 Elemento RY.....	83
<b>9.CONCLUSIÓN .....</b>	<b>84</b>
<b>10.REFERENCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>11.INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....</b>	<b>100</b>

## TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Movilización de nutrientes en plantas. ....	3
Figura 2. Tres vías principales de transducción de señales en la regulación por glucosa en plantas. ....	9
Figura 3. Modelo de la señalización por azúcares en plantas. ....	12
Figura 4. La HXK de <i>A. thaliana</i> tiene un papel importante en la vía de señalización de la glucosa. ....	13
Figura 5. Niveles de regulación de la expresión genética. ....	21
Figura 6. ABI4 participa en muchos procesos del desarrollo de las plantas y respuesta a estrés. ....	31
Figura 7. ABI4 se requiere para la señalización de ABA y azúcares. ....	31
Figura 8. Regulación de la expresión de ABI4 por glucosa y su patrón de expresión. ....	35
Figura 9. Sistema de recombinación Gateway. ....	40
Figura 11. Diferentes fragmentos del promotor de <i>ABI4</i> analizados en este estudio. ....	49
Figura 12. Generación de la construcción de 2.5kb pABI4. ....	50
Figura 13. Generación de la construcción de 2.5kb pABI4. ....	51
Figura 14. Mapa del vector de expresión y esquema de las construcciones generadas. ....	52
Figura 16. Comprobación por PCR de la inserción del fragmento de 2.5kb en el vector destino pMDC163. ....	54
Figura 17. Comprobación de la presencia del vector de expresión en las colonias de <i>A. tumefaciens</i> ....	56
Figura 18. Plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 transformadas. ....	57
Figura 19. Comprobación por PCR de la presencia de los transgenes, a partir de DNA genómico de las plantas de la generación T1. ....	58
Figura 20. Tinción de GUS en embriones de plantas de una línea representativa con la construcción de 3kb pABI4::GUS. ....	61
Figura 21. Patrón de expresión de embriones de plantas de líneas representativas transgénicas -2kb y -2.5kb pABI4::GUS. ....	62
Figura 22. Patrón de expresión de plantas de 11 días de edad de líneas representativas transgénicas -3kb pABI4::GUS de la generación T2 (heterocigotas) y T3 (homocigotas). ....	64
Figura 23. Patrón de expresión de plántulas de diferentes edades (3 días, 6 días, 9 días, 11 días), crecidas en medio GM1X de la línea representativa L5-7 con 3kb pABI4::GUS y la línea A4. ....	65
Figura 24. Patrón de expresión de plántulas de diferentes edades (3, 6, 9 y 11 días), crecidas en medio GM1X de la línea representativa L3-5 con 2kb pABI4::GUS. ....	66
Figura 25. Patrón de expresión de plántulas de diferentes edades (3 días, 6 días, 9 días, 11 días), crecidas en medio GM1X de la línea representativa L2 (generación T2) con 2.5kb pABI4::GUS. ....	67
Figura 26. Patrón de expresión de plántulas de líneas homocigotas representativas de 3kb pABI4::GUS de 11 días de edad, crecidas en medio GM1X y MS1X adicionado con glucosa al 4%. ....	68
Figura 27. Patrón de expresión de plántulas de 11 días de edad de líneas homocigotas representativas con -2kb pABI4::GUS, crecidas en medio GM1X y MS1X adicionado con glucosa al 4%. ....	69
Figura 28. Patrón de expresión de plántulas de 11 días de edad de líneas heterocigotas representativas de -2.5 kb pABI4::GUS, crecidas en medio GM1X y MS1X adicionado con glucosa al 4%. ....	70
Figura 29. Niveles de expresión del gen GUS obtenidos por ensayos fluorimétricos con plántulas de 5 días de edad de líneas independientes (L1-4, L4-7 y L5-7) con -3kb pABI4::GUS, crecidas en medio GM0.5X y MS0.5X adicionado con glucosa al 4% (en morado). ....	71
Figura 30. Niveles de expresión del gen GUS obtenidos por ensayos fluorimétricos con plántulas de 5 días de edad de líneas independientes (L1-4, L4-7 y L5-7) con -2kb pABI4::GUS, crecidas en medio GM0.5X y GM0.5X adicionado con glucosa al 4% ....	72
Figura 31. Localización de elementos en <i>cis</i> que son sitios de unión de diferentes factores que se unen al promotor de <i>ABI4</i> . ....	73
Figura 32. Esquema comparativo entre la construcción de la línea 4A con un tamaño de 3413 pb (3.4 kb) en azul, la construcción de Shkolnik-Inbar (2kb) en color vino y nuestra construcción con 3089pb (3.1kb) en color naranja. ....	77



## Resumen

Los azúcares además de ser requeridos como fuentes primarias de carbono y energía, poseen funciones regulatorias que los seres vivos han adquirido temprano en la evolución, como la capacidad de regular la expresión de una variedad de genes nucleares. De esta forma los niveles de azúcares controlan diversos procesos metabólicos, de resistencia a estrés, de crecimiento y de desarrollo en todos los organismos desde bacterias y levaduras hasta plantas y animales.

Durante su ciclo de vida, las plantas perciben los cambios en los niveles de azúcares y regulan en consecuencia la expresión de distintos genes involucrados en su crecimiento y desarrollo para adaptarse a las condiciones nutricionales. A través de enfoques genéticos utilizando mutantes de *Arabidopsis thaliana* con una sensibilidad alterada a altas condiciones de azúcar, se han aislado y caracterizado a nivel molecular componentes de la señalización y percepción de azúcares. Entre estos componentes se ha identificado la participación de algunos factores de transcripción como elementos fundamentales en la señalización por azúcares; uno de ellos es el factor transcripcional ABI4; caracterizado gracias a que mutantes de este gen han sido aisladas de la mayoría de escrutinios por azúcares. Se ha demostrado que el factor ABI4 junto con hormonas como el ABA y el etileno tienen un papel esencial para la percepción de azúcares durante el desarrollo temprano de las plántulas y la raíz primaria.

El transcrito de ABI4 se acumula poco después de exposición a glucosa y esta respuesta depende de secuencias en *cis*, localizadas en la región 5' río arriba del inicio de la transcripción, por lo que en este proyecto nos enfocamos en acotar la región regulatoria del promotor ABI4 que está involucrada con la respuesta a azúcares y analizar dentro de dicha región en búsqueda de elementos regulatorios para la respuesta a azúcar.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.2 Generalidades de la señalización por azúcares

Los azúcares tienen funciones esenciales en el crecimiento y desarrollo de los organismos como elementos estructurales; por ejemplo, los componentes de las paredes celulares como la quitina y la celulosa. Los azúcares simples son también usados como la principal fuente de energía en la célula y su exceso es transformado en moléculas complejas formadas de polímeros de azúcares, los cuales sirven de reserva energética como el almidón en las plantas. Algunos otros polímeros de glúcidos se unen covalentemente a proteínas o lípidos y funcionan como epítopes que determinan la localización intracelular de estas moléculas o su destino metabólico. Finalmente, los azúcares, además de ser usados como fuentes primarias de carbono y energía, tienen funciones regulatorias que los seres vivos han adquirido temprano en la evolución; controlan procesos metabólicos, resistencia a estrés, crecimiento y desarrollo en bacterias, levaduras, plantas y animales.

Las plantas son organismos fotoautótrofos, capaces de transformar el CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en azúcares y otros productos orgánicos (Nelson *et al.*, 2005) y llevan a cabo dicho proceso a través de fotosíntesis en los cloroplastos, fijando el carbono atmosférico para la síntesis de moléculas carbonadas que son fuente de energía indispensables para la vida en la Tierra. En los organismos multicelulares como las plantas es de vital importancia el mantenimiento de la homeostasis de energía y nutrientes dentro de las células y tejidos, para lo que es necesario un constante monitoreo y ajuste de su disponibilidad. El mantenimiento de la homeostasis energética requiere mecanismos regulatorios flexibles para lograr la asombrosa fisiología y plasticidad del desarrollo que caracteriza a las plantas (Rolland *et al.*, 2006).

La mayoría de las etapas del desarrollo de las plantas como la embriogénesis, la germinación, el crecimiento, la morfología, el metabolismo y la senescencia, se ven afectadas por cambios en los niveles o concentraciones de azúcares y en particular de glucosa. (Rolland et al., 2006). Las plantas producen azúcares como resultado de la fotosíntesis en las hojas maduras, los cuales son transportados a través del floema abasteciendo a todos los tejidos de la planta (Figura 1). Esta movilización de nutrientes se lleva a cabo gracias a un complejo sistema que permite integrar diferentes señales metabólicas, fisiológicas y ambientales que incluyen varias vías de señalización y que se describen más adelante (Koch 1996; Smeekens *et al.*, 2000; Smeekens *et al.*, 2010).

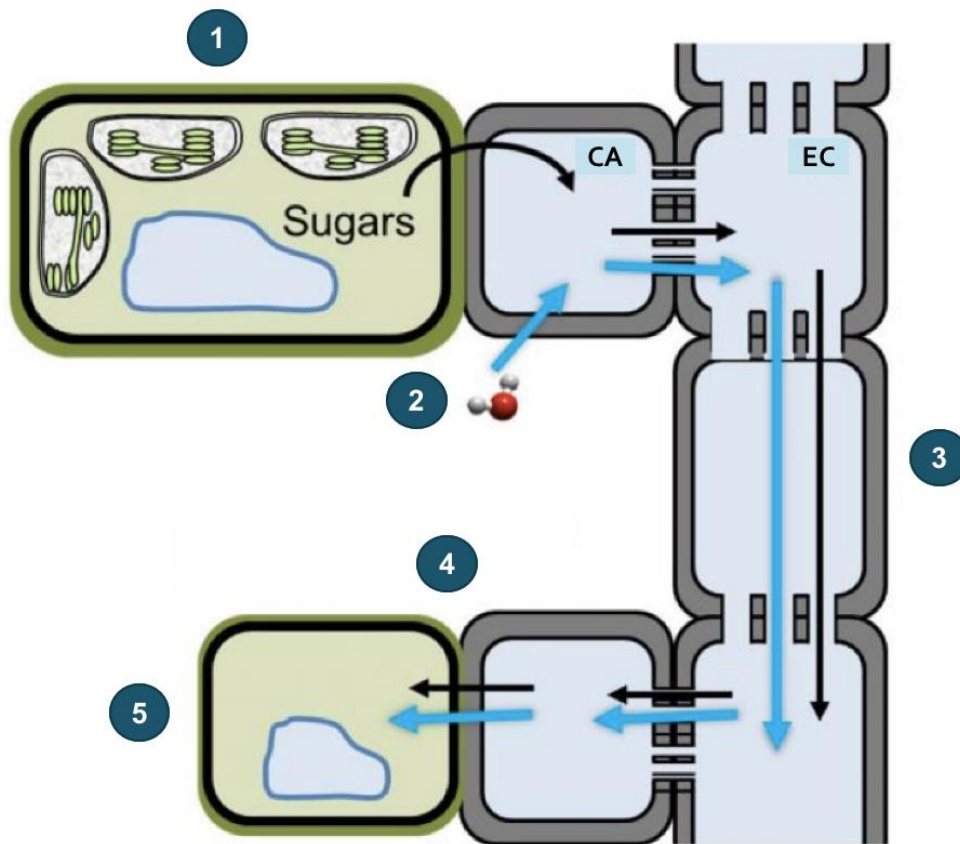


Figura 1. Movilización de nutrientes en plantas. 1) Los azúcares producidos en la fotosíntesis son enviados al floema por transporte activo (flechas negras), 2) El agua se mueve por ósmosis hacia el floema (flechas azules), 3) El fluido se mueve a través de los elementos cribosos bajo presión (EC, elementos cribosos, CA, células acompañantes), 4) Los azúcares son liberados a los tejidos vertedero, 5) El agua entra a las células de los tejidos vertedero por ósmosis (Modificado de [www.community.plantae.org](http://www.community.plantae.org))

Los azúcares incluyen una multitud de compuestos, pero una de estas moléculas con una clara función señalizadora en diferentes organismos, incluyendo las plantas, es la glucosa. Se ha demostrado que sus niveles afectan la expresión de diversos genes nucleares tanto de manera positiva como negativa (Rolland *et al.*, 2006; Hanson y Smeekens, 2009; Ramon *et al.*, 2008; Gringston *et al.*, 2008). Sin embargo, otros azúcares neutros e incluso algunos de sus intermediarios metabólicos, son también percibidos como señales, probablemente a través de receptores y vías de señalización específicas, la mayoría de los cuales aún no se han identificado (Rolland *et al.*, 2006; Hanson y Smeekens, 2009).

## **1.2 Características de los azúcares como moléculas señalizadoras de plantas**

Cualquier vía de señalización que modifique la expresión génica o la actividad metabólica debe estar compuesta de la generación de una señal que debe ser percibida de manera específica, a través de un receptor que a su vez desencadenará una vía de señalización. Los azúcares son una parte muy importante de esta señalización, funcionando como vínculo con la disponibilidad para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Los azúcares como la sacarosa, glucosa y fructosa pueden promover alteraciones en la expresión genética, mediante un mecanismo de acción que se ha comparado con el de las hormonas, sin embargo, éstas últimas son moléculas funcionales en el rango nano a micromolar, mientras que los azúcares generan señales en un rango milimolar (Smeekens, 2000).

La percepción de azúcares puede ser definida como la interacción entre una molécula de azúcar y una proteína sensora, generando así una señal, misma que inicia una cascada de transducción de señales que resulta en respuestas celulares como la alteración de la expresión genética y de las actividades enzimáticas (Smeekens; 2000).

Entre los azúcares que se ha reportado que participan en señalización se encuentran los siguientes:

### 1.2.1 Hexosas

Las hexosas son moléculas claves que entran al metabolismo. Existen claras evidencias de que la mayoría de los organismos tiene la capacidad de percibir hexosas (principalmente glucosa y fructosa). Por ejemplo, en levaduras, se han identificado proteínas homólogas a transportadores de hexosas que funcionan como sensores de los niveles de glucosa, estas proteínas como SNF3 y RGT2 captan bajos o altos niveles de glucosa, respectivamente y desencadenan una cascada de respuesta (Özcan *et al.*, 1998; Özcan *et al.*, 1996).

En 1995 se reportó que análogos de glucosa como la 3-O-metil glucosa (3-O-mGlc) y la 6-deoxi glucosa (6-dGlc) pueden iniciar vías de señalización, por ejemplo; en una suspensión de cultivo celular de *Chenopodium rubrum*, la adición de glucosa o 6dGlc induce la expresión de genes que codifican para invertasas extracelulares y sacarosa sintasas (Godt *et al.*, 1995; Roitsch *et al.*, 1995). A partir de estos resultados, se dedujo que las plantas también debían poseer proteínas que perciben hexosas, aunque su naturaleza molecular aún se desconocía (Smeekens, 2000).

La glucosa es una de las principales hexosas con función señalizadora y la que más se ha estudiado. Altos niveles de glucosa resultan en una inhibición de la fotosíntesis para muchas especies; anulando la regulación por luz, por el tipo de tejido y por el estadio de desarrollo (Jang y Sheen, 1994; Krapp *et al.*, 1993; Sheen J, 1990). Se ha observado que el aumento en los niveles de glucosa conduce a la disminución de la proteína ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (Rubisco), de otras proteínas del ciclo de Calvin y de clorofila (Krapp *et al.*, 1993). Esta inhibición también se refleja en la represión de muchos genes que codifican proteínas involucradas en la fotosíntesis.

Las HXKs son proteínas conservadas en todos los seres vivos, forman una familia génica con varios miembros y se clasifican en cuatro grupos (A-D) de acuerdo al dominio amino terminal, que determina su localización específica dentro de la célula. Las HXKs se han estudiado en organismos fotoautótrofos, desde musgos hasta plantas superiores y por ejemplo en angiospermas todas las HXKs pertenecen a los grupos A, B o C, ya que no

existe el tipo D (Granot, David-Schwartz y Kelly, 2013). La enzima Hexocinasa 1 (HXK1) fue identificada como el sensor de glucosa, función independiente a la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato (Rolland, *et al.*, 2006; Ramon, *et al.*, 2008). La señalización de la HXK1 parece implicar una extensa comunicación con la señalización hormonal y depende de su interacción con la F actina (Rolland, *et al.*, 2006; Ramon, *et al.*, 2008; Balasubramanian, *et al.*, 2008). Debido a que fue el primer sensor de azúcares identificado, las vías de señalización posteriormente caracterizadas se clasificaron con base en la participación de la HXK1; más adelante en este trabajo se tratará a profundidad la función de esta enzima.

Aunque la señalización por glucosa ha recibido más atención, la fructosa también es una hexosa abundante y tiene un papel en la señalización durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin embargo, su mecanismo de acción no se ha dilucidado de forma clara y sistemática hasta la fecha. La fructosa es producida a partir de sacarosa por invertasas y sacarosa sintasas y al igual que la glucosa, la fructosa puede reprimir la expresión de genes fotosintéticos (Jang y Sheen., 1994).

La fructosa es fosforilada principalmente por fructocinasas (FRKs), un miembro de esa familia de genes está presente en *A. thaliana*. El papel regulatorio de las FRKs en la señalización por fructosa fue por primera vez investigado en tomate (Pego y Smeekens., 2000; Odanaka *et al.*, 2002) en donde se ha observado que la inhibición de la FRK2 (*LeFRK2*) interfiere con el desarrollo de floema y xilema, reduciendo el transporte de azúcares y agua. De esta manera la ausencia de la *LeFRK2* afecta el crecimiento del tallo y la raíz y el desarrollo normal de flores, frutos y semillas (Damari-Weissler, *et al.*, 2009).

Se han propuesto vías de señalización específicas de fructosa, por ejemplo, por la identificación de *loci* de rasgo cuantitativo (QTL) en la población de la línea endogámica recombinante *Landsberg erecta* (Ler)/*Cape Verde Islands* (Cvi) que presenta una sensibilidad alterada a fructosa. Esta vía de señalización es independiente de HXK1, aunque, la señal de fructosa participa en la misma vía de señalización de ABA río abajo de la señal de glucosa / HXK (Li *et al.*, 2011).

En otro trabajo de investigación, se identificó al gen *INSENSIBLE A FRUCTOSA* (FINS1) que codifica para la Fructosa-1,6-bisfosfatasa que tiene un papel crucial en esta vía de señalización. La función de FINS1 en la señalización por fructosa es independiente de su actividad catalítica en el metabolismo de azúcares (Cho y Yoo., 2011).

### 1.2.2 Sacarosa

Ha sido difícil obtener evidencia experimental sobre el papel de la sacarosa como molécula señalizadora, debido a que la sacarosa es hidrolizada en glucosa y fructosa, por lo que para su identificación y caracterización se han usado análogos no hidrolizables como la turanosa. Una serie de estudios ha proporcionado evidencia de la regulación específica de la sacarosa de la expresión génica y el crecimiento de las plantas, por ejemplo, se ha reportado que la sacarosa induce la expresión de genes que codifican para la UDP-glucosa pirofosforilasa, para enzimas de la biosíntesis de antocianinas y para un translocador de glucosa-6-fosfato / fosfato de cloroplastos putativo (Wenzler *et al.*, 1989; Yokoyama *et al.*, 1994; Ciereszko *et al.*, 2001; Teng *et al.*, 2005; Gonzali *et al.*, 2006; Solfanelli *et al.*, 2006).

Además, se ha reportado la inducción de la expresión de genes específica por sacarosa para el promotor del gen de la patatina y el promotor *rol C*, específico de floema (Jefferson *et al.*, 1990; Wenzler *et al.*, 1989; Yokoyama *et al.*, 1994). También se ha determinado que la expresión del gen de betabel que codifica para un simportador de protón-sacarosa es regulada exclusivamente por disacáridos (Vaughn *et al.*, 2002), y que la inhibición a nivel traduccional del factor de transcripción *bZIP11* está mediada por sacarosa, mientras que no se observó en tratamientos con hexosas (Wiese *et al.*, 2004). Además, se describió que el factor de transcripción ATB2 en *A. thaliana* es controlado por luz y sacarosa a nivel transcripcional y traduccional, respectivamente (Rook *et al.*, 1998; Rook *et al.*, 1998 b).

### 1.2.3 Trehalosa

La trehalosa es un disacárido de glucosa presente en diversos seres vivos que es usado como fuente de energía, para almacenamiento y transporte de glucosa y como un compuesto de respuesta a estrés importante para la protección celular. Se ha reportado que añadir trehalosa al medio de crecimiento de plántulas de *A. thaliana* resulta en una inhibición severa del crecimiento (Paul *et al.*, 2008; Smeekens *et al.*, 2010). Otros estudios han mostrado que la trehalosa 6-fosfato (T6P), un intermediario en la síntesis de la trehalosa, funciona como molécula señalizadora regulando el desarrollo embrionario y vegetativo, la floración, la determinación del meristemo y el destino celular en plantas (Schluepmann y Paul, 2009; Ponnu *et al.*, 2011; Schluepmann *et al.*, 2012; O'Hara *et al.*, 2013).

La T6P actúa como un regulador global del metabolismo y la transcripción, promoviendo el crecimiento de la planta y desencadenando transiciones de la fase de desarrollo en respuesta a la disponibilidad de azúcares (Schluepmann *et al.*, 2004; Lunn *et al.*, 2006; Martínez-Barajas *et al.*, 2011; Wingler *et al.*, 2012). Entre los sensores de T6P se encuentran los miembros de la familia SnRK1 (Cinasa relacionada con la sacarosa no fermentativa 1), que son sensores de disponibilidad energética, inhibición del crecimiento vegetal y el desarrollo durante el estrés metabólico para mantener la homeostasis (Zhang *et al.*, 2009; Debast *et al.*, 2011; Martínez-Barajas *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2013). La SnRK1 es activada bajo condiciones de baja concentración de azúcar para inhibir el crecimiento y conservar la energía, mientras que la T6P actúa como un reportero del estatus energético, promoviendo el crecimiento y el desarrollo en respuesta al aumento en los niveles de azúcares (Baena-González *et al.*, 2007). Se sabe que la acción de la T6P ocurre en parte mediante la inhibición de la cinasa SnRK1, pero el mecanismo de inhibición completo aún se desconoce. A su vez, SnRK1 modula la expresión de genes de trehalosa fosfato sintetasa (Baena-González *et al.*, 2007; Usadel *et al.*, 2008), lo que sugiere una posible retroalimentación entre T6P y SnRK1. Se requiere una futura caracterización del papel de todas las proteínas en la vía de T6P para lograr separar las



funciones metabólicas de las de señalización y para comprenderla en su totalidad (Smeekens, 2010).

### 1.3 Vías de señalización por azúcares

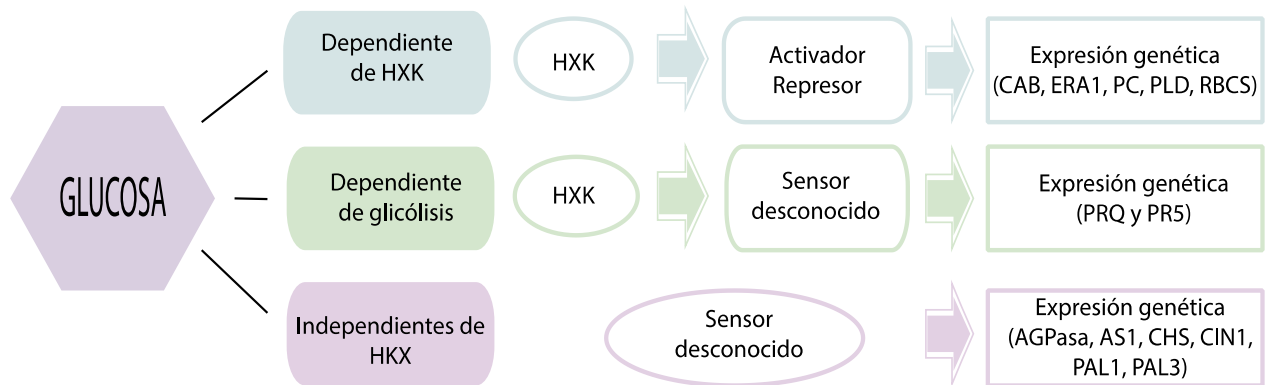


Figura 2. Tres vías principales de transducción de señales en la regulación por glucosa en plantas (Esquema modificado de Xiao *et al.*, 2000)

A pesar de la gran importancia de la regulación por azúcares en plantas y en la mayoría de los organismos, aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares de su señalización. En el caso de plantas, diversos estudios iniciales a través del uso de análogos de azúcares, como la 6-dGlc, la 2-deoxi glucosa (2-dGlc) y la 3-O-mGlc, permitieron definir tres vías de transducción de la regulación por glucosa (Figura 2), todas ellas basadas en el papel que juega la HXK1 (Jang y Sheen 1997, Sheen *et al.*, 1999; Smeekens, 2000).

La enzima HXK1 fue el primer receptor de azúcares identificado en levaduras y posteriormente en plantas. Esta proteína además de ser un sensor de glucosa, cataliza el primer paso de la glicólisis, fosforilando a las hexosas (Figura 3). A través del estudio de plantas con una versión de la proteína HXK1 enzimáticamente inactiva, pero que conservaba su función señalizadora, se comprobó que en presencia de glucosa estas

plantas sufren un arresto en el desarrollo, así como el paro en la acumulación de clorofila y la expresión de genes fotosintéticos, de manera similar a la que se observa en plantas silvestres; demostrando que su función de percepción no depende de su función enzimática (Smeekens *et al.*, 2010; Rolland *et al.*, 2006; Ramon *et al.*, 2008).

Basados en la participación de la HXK las vías de señalización de azúcares se clasificaron en:

A) **Vía dependiente de HXK1.** En esta vía la regulación de la expresión genética de los genes regulados por ella depende de la función señalizadora, mediada por HXK1. La afectación de esta vía resulta en la falta de represión de genes como la proteína de unión a clorofila a/b (*CAB*) y la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (*RBCS*) (Sheen, 1990; Xiao *et al.*, 2000) y en la activación de genes relacionados a la síntesis de almidón (Tetlow *et al.*, 2004; Bossi *et al.*, 2009; Figura 2). La vía dependiente de HXK1 parece estar primordialmente relacionada con la represión de genes involucrados en el anabolismo, como genes fotosintéticos, y la inducción de genes involucrados con el catabolismo como almacenamiento de carbono, crecimiento vegetativo y genes de respuesta a patógenos.

Además de la HXK1, podemos encontrar en plantas muchas otras cinasas de azúcares, como fructocinasas, galactocinasas y arabinosa cinasa (Kaplan *et al.*, 1997; Sherson *et al.*, 1999).

B) **Vía dependiente de la glicólisis.** Esta vía requiere de la participación de la actividad enzimática de la hexocinasa, pero la señal primaria se genera a partir de un intermediario de la glucólisis. Un ejemplo de los genes regulados es la inducción de la expresión de los genes *PR1* y *PR5*, relacionados con la patogénesis (Xiao *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2006; Figura 2). Se observó que plantas sobreexpresoras de *AtHXK1* aumentan la expresión de *PR1* y *PR5*, sin embargo, este aumento también se detectó en plantas que sobreexpresan a la Hxk2 de levadura, la cual se demostró que no tiene la actividad señalizadora en plantas. Por lo tanto, estos datos demuestran que para que los genes *PR* sean inducidos por glucosa, requieren la función catalítica de las hexocinasas, pero no la función señalizadora y que debe existir un intermediario río abajo de la hexocinasa,

dentro de la vía glucolítica, capaz de transmitir la señal para la expresión de estos genes (Xiao *et al.*, 2000).

Aún falta por identificar la función de señalización de productos intermediarios del metabolismo; por ejemplo, en el sistema de protoplastos de maíz se encontró que al igual que la glucosa, el acetato también inhibe la expresión de genes fotosintéticos (Jang y Sheen, 1994). Sin embargo, se ha argumentado que esta inhibición ocurre debido a la represión de los genes fotosintéticos causada por la acidificación intracelular (Ehness *et al.*, 1997).

**C) Vías de señalización independientes de HXK1.** En estas vías se observa la regulación de una variedad de genes al adicionar análogos de glucosa, que no son sustratos de fosforilación de la hexocinasa, como la 6-dGlc y la 3-O-mGlc lo que demuestra su independencia de la HXK1. Los resultados acumulados hasta el momento apoyan que dentro de esta categoría se incluyen múltiples vías como aquellas que responden exclusivamente a sacarosa (Figura 3b). Ejemplos que sustentan la existencia de estas vías son la inducción de los genes *CHS* y *PAL1* y genes que codifican para la AGPasa, así como la represión de *ASN1*, ambas regulaciones se observan independientemente de la sobreexpresión de HXK1 de *A. thaliana* o de Hxk2 de levadura (Xiao *et al.*, 2000; Figura 2).

#### **1.4 Elementos de la vía de señalización por azúcares**

La cascada de señalización empieza con la percepción del azúcar, al recibir esta señal del medio ambiente se dispara un proceso de trasducción que finaliza con la respuesta primaria que se lleva a cabo por moléculas efectoras. En las cascadas de señalización en respuesta a azúcares en plantas existen identificados aún pocos elementos. Entre los elementos mejor caracterizados se encuentran:

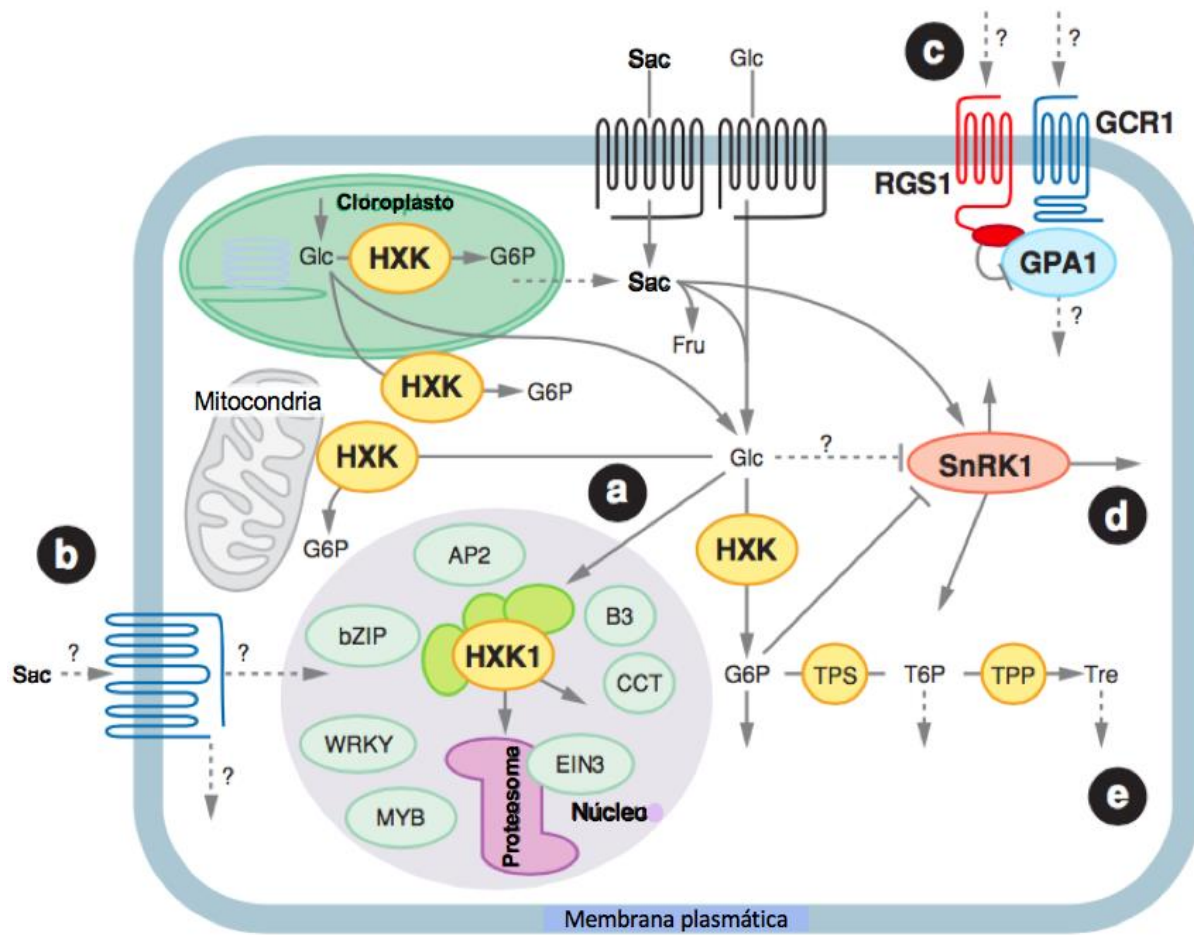


Figura 3. Modelo de la señalización por azúcares en plantas. (a) El sensor de glucosa HXK1 está principalmente asociado con la mitocondria, posiblemente como parte de un metabolón glicolítico, la HXK1 también se encuentra en complejos de alto peso molecular en el núcleo, donde controla la transcripción y la degradación del factor de transcripción EIN3, mediada por proteosoma. Otras proteínas HXK y HKL se encuentran asociadas con las membranas externas de los plastidos, incluyendo al cloroplasto, o citosol y en el estroma del cloroplasto. (b) Sacarosa (y otros disacáridos) parece que son percibidos en la membrana plasmática, posiblemente por transportadores homólogos (c) La señalización del receptor acoplado a proteína G por RGS1 y GPA1 está involucrado en el control de glucosa para la germinación de la semilla y el desarrollo de las plántulas, posiblemente por medio de una vía independiente de HXK1. (d) Las proteínas SnRK1 juegan un papel importante en la señalización de azúcares e inanición, aunque la regulación de estas proteínas por sacarosa (Suc) y G6P aún no se conoce con claridad. (e) Se ha reportado que la trehalosa (Tre) y la trehalosa-6-fosfato (T6P) poseen efectos regulatorios importantes, aparentemente río debajo de la SnRK1. En el núcleo, diferentes tipos de factores de transcripción están involucrados en la transcripción regulada por azúcares (AP2, B3, CCT, MYB, WRKY, bZIP) (tomado de Rolland *et al.*, 2006).

### 1.3.1 Receptores

#### a) El sensor HXK1

Las hexocinasas son enzimas que catalizan la fosforilación de hexosas, mediante la transferencia del grupo fosforilo terminal del ATP a un aceptor nucleófilo que es una hexosa. Esta reacción es irreversible y tiene gran importancia a nivel celular, ya que los productos hexosas-fosfato son las moléculas que entran al metabolismo (Nelson *et al.*, 2005).

Múltiples estudios corroboraron la participación de la HXK1 como sensor primario de azúcar tanto en plantas como en levaduras (Rolland *et al.*, 2006; Hanson y Smeekens., 2009; Ramon *et al.*, 2008). Plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen de la HXK1 tienen afectada la respuesta a azúcares de múltiples genes. En condiciones de alta glucosa esta vía reprime a la mayoría de los genes fotosintéticos; se ha observado que semillas silvestres de *A. thaliana* en un medio con 6% de glucosa presentan una inhibición de la elongación del hipocótilo y el enverdecimiento de las plántulas. Los genes blanco en esta ruta se pudieron definir genéticamente con ayuda de plantas mutantes *gin2* (insensibles a glucosa) y sus alelos catalíticamente inactivos (Moore *et al.*, 2003; Wiese *et al.*, 2004; Figura 4).

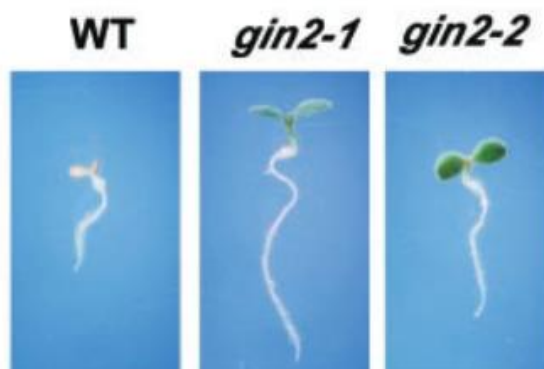


Figura 4. La HXK de *A. thaliana* tiene un papel importante en la vía de señalización de la glucosa. Plantas en medio de crecimiento con glucosa al 6%, la planta silvestre (WT) detiene su

desarrollo, mientras que la mutante *gin2* crecen, expanden y enverdecen sus cotiledones en presencia de altas concentraciones de glucosa (Figura tomada de Moore *et al.*, 2003)

Por otro lado, plantas transgénicas con expresión reducida de *AtHXK1* y *AtHXK2* son menos sensibles a estos efectos de glucosa que las plantas silvestres, mientras que en plantas sobreexpresoras de *HXK* se observa una mayor sensibilidad a glucosa (Dai *et al.*, 1999).

Posteriormente durante la caracterización de una mutante del gen *HXK1* de *A. thaliana*, que presenta una mutación puntual afectando su actividad catalítica, se observó que retiene la función de señalización, con lo cual se demostró que la actividad catalítica de la HXK puede ser separada de su función receptora y señalizadora (Xiao *et al.* 2000; Moore *et al.* 2003; Cho *et al.*, 2006; Sheen, 2010).

La señalización de azúcares a través de la HXK1 está en estrecha relación con la señalización por hormonas y depende de su interacción con la actina F (Rolland *et al.*, 2006; Ramon *et al.*, 2008; Balasubramanian *et al.*, 2008). La *AtHXK1* ha sido localizada, asociada con la mitocondria, posiblemente como parte de un metabolón glicolítico (complejo estructural-funcional temporal formado entre enzimas secuenciales de la vía glicolítica) pero también puede ser encontrada en un complejo nuclear que incluye la H+ATPasa VHA-B1 y la partícula regulatoria del proteosoma RPT5B, que regula directamente genes blanco específicos (Cho *et al.*, 2006).

Además, la HXK1 se ha encontrado en complejos de alto peso molecular en el núcleo donde controla la transcripción y la degradación mediada por proteosoma de EIN3 (Yanagisawa, *et al.*, 2003; Figura 3a) Otras proteínas de la familia de hexocinasas (HXK y HKL), también se han asociado con la membrana externa de los plástidos, incluyendo los cloroplastos, además, se ha encontrado en el estroma del cloroplasto y en el citosol (Wiese, *et al.*, 1999; Figura 3a).

## **b) Regulador de la señalización de proteínas G 1 (*RGS1*)**

Otro receptor que se ha propuesto es capaz de detectar azúcares externos es el regulador acoplado a proteínas G denominado RGS1 (“Regulator of G-protein signaling 1”) localizado en la membrana (Figura 3c). Las proteínas G están conformadas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  unidas a un receptor acoplado a la proteína G llamado GPCR; en mamíferos, existen varias isoformas para cada una de las subunidades pero en plantas sólo se han identificado una subunidad  $\alpha$ , una  $\beta$  y dos  $\delta$  (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2004). Mutantes en *RGS1* son incapaces de percibir la glucosa (Chen y Jones, 2004; Chen *et al.*, 2003).

Las tres subunidades que componen a las proteínas G están implicadas en una gran variedad de procesos del desarrollo en plantas, como elongación del hipocótilo, formación de raíces laterales, desarrollo de las silicuas, expansión de la hoja y en procesos de respuesta a patógenos (Perfus-Barbeoch, *et al.*, 2004)

Uno de los elementos más estudiados en plantas es GPA1, que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica. Mutantes del gen *GPA1* poseen una hipersensibilidad a la glucosa (Huang *et al.*, 2006), por lo que se propuso que RGS1 podría funcionar como un receptor transmembranal de D-glucosa extracelular y que modula la expresión genética por medio de proteínas G heterodiméricas, independientemente de su función moduladora de GTPasa (Figura 3c).

El gen *RGS1* de *A. thaliana* codifica para una proteína con dominios trans-membranales que tiene como función la regulación de la subunidad  $\alpha$  (GPA1) que es la subunidad catalítica encargada de la hidrólisis de GTP a GDP (Chen *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 2007). AtRGS1 mantiene el complejo de proteína G central en su estado inactivo, unido a GDP, posteriormente ocurre el desacoplamiento de AtRGS1 y AtGPA1 permitiendo la auto-activación de la proteína G por unión espontánea a GTP. Para que se mantenga la activación de la señalización de glucosa, se requiere en parte la remoción de la proteína inhibidora AtRGS1 por endocitosis de este sensor de glucosa anclado a la membrana plasmática (Urano *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2014). La proteína G, AGB1, posee una subunidad de repetición WD40 que recluta a las cinasas WNK, que fosforilan a AtRGS1,

desencadenando los eventos de endocitosis. AtRGS1 y AtHXK1 se comunican por medio de retroalimentación para determinar la respuesta final a glucosa. Esto ocurre después del proceso de endocitosis de AtRGS1. Recientemente se comprobó que la unión de RGS1 con la proteína 1 de interacción con HXK1 sirve como un andamio para estos dos sensores (Huang *et al.*, 2015).

### **c) Receptores de disacáridos**

Se ha propuesto al transportador SUT2 de disacáridos en plantas como un sensor de sacarosa, debido a que, al igual que algunos transportadores de monosacáridos, éste posee un dominio de bucle citoplásmico extendido en su parte central (Lalonde *et al.*, 1999; Barker *et al.*, 2000; (Kleinow *et al.*, 2000) por lo que se piensa que pueden tener funciones similares como sensores membranales.

## **1.3.2 Elementos involucrados en la cascada de transducción de señales de azúcares**

La transducción de señales consiste en el manejo y transmisión de información mediada por moléculas, es decir, los elementos que participan en este proceso se encargan de la transmisión y procesamiento de una señal extracelular. Algunos componentes involucrados en la transducción de azúcares que han sido identificados hasta el momento se describen a continuación.

### **a) La proteína cinasa (SnRK1)**

La proteína cinasa SnRK1 es el ortólogo en plantas de la cinasa Snf1 (Sacarosa no fermentante 1) de levadura y de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) de mamíferos. Estas cinasas heterotriméricas son reguladoras cruciales del metabolismo y de la homeostasis energética en diversos organismos (Hardie, 2007; Hedbacker y



Carlson, 2008; Bright *et al.*, 2009) ya que salvaguardan los niveles energéticos celulares, regulando la producción y consumo de ATP y, por lo tanto, el crecimiento. Condiciones de estrés como la inanición o hipoxia resultan en un bajo estado energético y activan a estas proteínas cinasas, llevando a una adaptación de procesos anabólicos y catabólicos en la célula (Smeekens, 2010).

En plantas, la SnRK1 controla el metabolismo a diferentes niveles, tanto transcripcional como post-transcripcionalmente. La SnRK1 fosforila e inactiva enzimas centrales involucradas en el metabolismo primario y esta fosforilación tiene como consecuencia la unión de dichas proteínas fosforiladas con chaperonas como las proteínas 14-3-3, quienes inhiben su función y promueven su degradación vía proteosoma. Éste es el caso de la nitrato reductasa, la HMGR y la trehalosa fosfato sintasa TPS (Polge *et al.*, 2008; Polge y Thomas, 2007; Halford y Hey, 2009; Glinski y Weckwerth; 2005; Harthill *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que la SnRK1 funciona como un integrador central de la señalización de estrés y energía en plantas, ocasionando la reprogramación de la transcripción genética y controlando el crecimiento vegetal (Thelander *et al.*, 2004; Radchuk *et al.*, 2006; Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Baena-Gonzalez y Sheen, 2008; Figura 3d)

La regulación de la actividad señalizadora de la SnRK1 parece ser un mecanismo complejo (Fragoso *et al.*, 2009), con procesos específicos para plantas que involucran proteínas regulatorias como cinasas/fosfatasa adicionales, modificaciones postraduccionales como la N-miristoilación, en la que el ácido mirístico se une a un residuo N-terminal de glicina (Pierre *et al.*, 2007) y la regulación por metabolitos como T6P y otros azúcares fosforilados (Zhang *et al.*, 2009). También se piensa que esta regulación está íntimamente asociada con señalización de hormonas vegetales como auxinas y ABA (Radchuck *et al.*, 2009). Dado que la regulación de varios de los genes blanco de la SnRK1 es independiente de HXK1, se ha sugerido que las dos vías funcionan de manera independiente (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007). Sin embargo, hacen falta estudios para entender a nivel molecular la función de SnRK1 tanto en los tejidos fuente (productores) como en los sumidero (consumidores) de plantas (Halford y Hey, 2009; Ananieva *et al.*, 2008; Jossier *et al.*, 2009).

## **b) Proteínas G**

Otros de los elementos importantes en la señalización de azúcares son las proteínas G heterotriméricas, anteriormente mencionadas, que además de funcionar como receptores, funcionan como transductoras de señales en todos los mecanismos eucariontes (Rolland, *et al.*, 2006)

A diferencia de los animales, las plantas contienen sólo una subunidad  $\alpha$  de proteína G canónica, codificada por *GPA1* (“*Arabidopsis* G protein  $\alpha$  subunit 1”) y *RGA1* (“rice G protein  $\alpha$  subunit 1”). Estas proteínas, junto con las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  asociadas, están implicadas en una amplia variedad de respuestas, como a la luz, a fosfolípidos y a hormonas (Perfus-Barbeoch, *et al.*, 2004).

La *GPA1* interactúa con dos proteínas receptoras; el receptor acoplado a proteínas G (*GCR1*) y con la *RGS1*. El desacoplamiento de la *RGS1* y la *GPA1*, permite la autoactivación de la proteína por unión a GTP (Huang *et al.*, 2015), constituyendo un mecanismo de control novedoso para el funcionamiento de las proteínas G en plantas (Chen *et al.*, 2003; Johnston *et al.* 2007).

### **1.3.3 Elementos finales de la señalización por azúcares**

La transducción de señales finaliza con la respuesta primaria que se lleva a cabo por moléculas efectoras generalmente asociadas al control de la expresión genética, algunos de estos elementos se tratarán a continuación.

#### **a) La hexocinasa 1**

Como ya se mencionó, la hexocinasa 1 es un receptor intracelular de glucosa en *A. thaliana*, sin embargo, también se puede considerar un elemento final de la señalización.

Estudios posteriores, dirigidos a entender su mecanismo de acción, demostraron que su localización subcelular podía ser importante para su función (Rolland et al., 2006). Se ha reportado que la HXK1 se asocia a complejos proteicos de alto peso molecular en diferentes localizaciones subcelulares como las membranas de mitocondrias, el citoesqueleto de actina y el núcleo (Cho *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006) (Balasubramanian *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2009). En el trabajo de Cho *et al.* (2006) observaron que la HXK1 interactúa con otras dos proteínas en el núcleo, formando un complejo heterotrimérico que regula directamente la represión del gen *CAB2* por glucosa.

## **b) Factores de transcripción**

Se piensa que algunos factores de transcripción podrían participar en la regulación de la expresión genética por azúcares, como efectores finales de la señalización. Algunos de los factores de transcripción involucrados en la respuesta a azúcares pertenecen a familias con dominios de unión al DNA exclusivos de plantas como son los dominios AP2, WRY, B3, CCT y ACGT (Li *et al.*, 2006; Deppmann *et al.*, 2006).

Por ejemplo, se ha reportado que el factor de transcripción AtbZIP1 a pesar de ser regulado por azúcares, puede mediar la señalización por azúcares y controlar la expresión genética, crecimiento vegetativo y desarrollo de las plantas (Kang *et al.*, 2010).

Análisis fenotípicos indican que AtbZIP1 actúa como un regulador negativo del desarrollo temprano de plántulas. Además, en un análisis de micro-arreglos de plantas con ganancia y pérdida de función de la proteína ZIP1, en la que se buscaba identificar supuestos genes blanco de AtbZIP1, se encontraron genes de respuesta a azúcares sobre-expresados, lo que sugiere que el factor AtbZIP1 participa en la expresión genética regulada por azúcares (Kang *et al.*, 2010).

Estos resultados contribuye a confirmar el papel de los factores de transcripción como efectores finales de la señalización por azúcares, sin embargo, aún se necesitan más estudios tanto bioinformáticos como experimentales para identificar nuevos elementos regulatorios y para entender las funciones de los factores de transcripción durante la

regulación por azúcares en plantas.

## 1.5 La percepción de azúcares interacciona con vías de fitohormonas

Para un desarrollo normal, las plantas, además de depender de la interacción con factores externos como la luz, nutrientes, agua y temperatura, también dependen de factores internos como hormonas y compuestos naturales que regulan procesos fisiológicos, en concentraciones muy pequeñas. Para llevar a cabo una rápida integración de señales del medio ambiente con el metabolismo y desarrollo, existe una estrecha interacción entre la señalización de azúcares y hormonas vegetales como son las auxinas, giberelinas y citocininas y aquellas que participan en las respuestas a estrés como son el ácido abscísico (ABA), etileno, jasmónico, brasinosteroides y estrigolactonas (Gibson, 2005; León y Sheen, 2003; Rolland *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2006).

Durante el desarrollo temprano de las plántulas se ha observado que existen interacciones positivas entre la señalización de ácido abscísico (ABA) y la señalización por azúcares; de hecho, un gran número de las mutantes aisladas por ser insensibles o hipersensibles a azúcares han resultado ser alélicas a mutantes de la síntesis (*aba*) o percepción (*abi*) de ABA, lo que sugiere que la acumulación de ABA es requerida para la señalización correcta de la glucosa durante el desarrollo temprano. Sin embargo, no todas las mutantes *abi* son sensibles a glucosa durante el desarrollo temprano de las plántulas, lo cual muestra la compleja interacción entre estas vías (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2006).

Se ha visto que tanto el metabolismo como el transporte de auxinas, procesos centrales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, son modulados por los niveles de azúcares (Ljung, 2013). En hipocótilos de *A. thaliana* la sacarosa induce un incremento en los niveles de auxinas a través de una vía dependiente de PIFs (factores que interactúan con fitocromos) (Lilley *et al.*, 2012; Sairanen *et al.*, 2012), aumentando su transporte y la transducción de señales (Stokes *et al.*, 2013).

Otra hormona que interactúa con la señalización por azúcares es el etileno, controlando también el desarrollo de las plántulas. Una prueba de ello es que las mutantes insensibles a etileno *etr1-1* y *ein2* muestran una hipersensibilidad a glucosa, además se sabe que el etileno y la glucosa son antagonistas en la regulación de la estabilidad del factor de transcripción EIN3 (Yanagisawa *et al.*, 2003).

### 1.6 Los azúcares modulan las respuestas de las vías de señalización a través de diferentes mecanismos moleculares

Durante su ciclo de vida, las plantas perciben los cambios en los niveles de azúcares y regulan la expresión de distintos genes involucrados en su crecimiento y desarrollo para adaptarse a las condiciones nutricionales (Smeekens, 2000; Gibson, 2005; Rolland *et al.*, 2006; Ramon *et al.*, 2008). El control de la expresión genética por azúcares puede ocurrir a varios niveles (Figura 5), que van desde la transcripción hasta la degradación de proteínas.

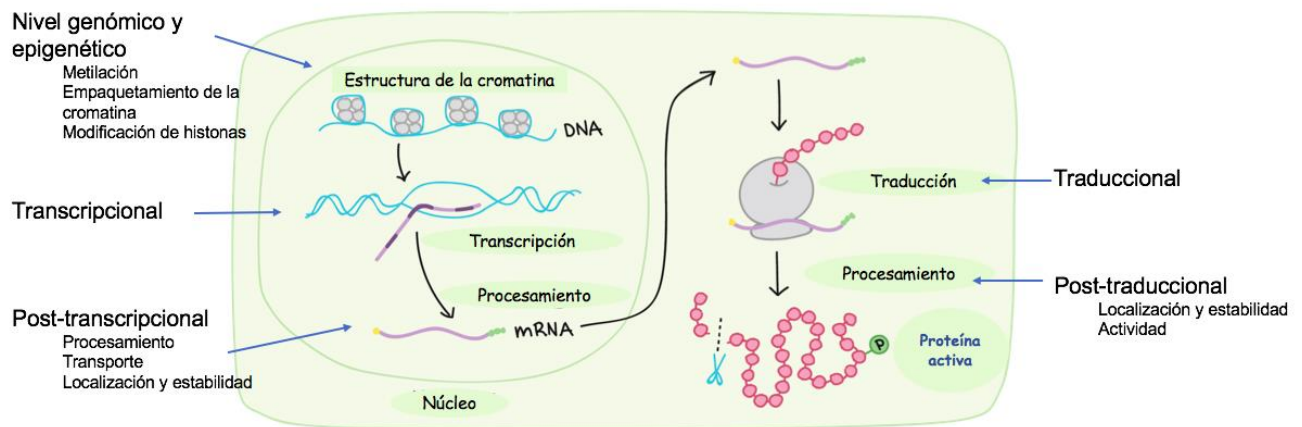


Figura 5. Niveles de regulación de la expresión genética.

## 1.6.1 Regulación transcripcional

La regulación por azúcares a nivel transcripcional parece ser uno de los mecanismos más importantes en la señalización por azúcares en plantas. Un análisis de la expresión global del genoma en respuesta a cambios en la concentración de azúcar exógena, corroboró que los azúcares regulan los niveles de entre un 4% al 11% de genes totales de *A. thaliana* (Sheen, 1990; Koch, 1996; Price *et al.*, 2004). Estos estudios también confirmaron que existe una interconexión compleja entre la señal de carbono con las señales de nitrógeno, luz y hormonas para regular la transcripción de genes en *A. thaliana* (Palenchar *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2004; Thum *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2007; Osuna *et al.*, 2007), dicha regulación se ha demostrado que involucra factores transcripcionales.

### 1.6.1.1 Factores de transcripción involucrados en la regulación por azúcares

Se han realizado análisis que han revelado entre 20 a 50 familias de factores de transcripción anotadas en la base de datos DATF (La base de datos de los factores de transcripción de *Arabidopsis*; Guo *et al.*, 2008), cuya expresión es regulada en respuesta a glucosa. Algunas de las familias con mayores respuestas son las familias AP2, MYB, bZIP, NAC, WRY, MADS, Aux/IAA, C2C2(Zn) tipo CO, homeodominio, tipo NAM y de choque térmico (Price *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Osuna *et al.*, 2007).

Tratamientos con glucosa conducen a un incremento rápido y transitorio en la expresión de diversos factores de transcripción, incluyendo miembros de las familias MYB, bZIP, AP2, homeodominio, como el zipper de leucina (HD-Zip), tipo NAM y de choque térmico (Li *et al.*, 2006); mientras que se ha reportado que otros disminuyen su abundancia en presencia de carbono (Li *et al.*, 2006). Otros genes son regulados negativamente, entre los genes que se reprimen con mayor rapidez por glucosa se incluyen factores de transcripción asociados a la regulación por luz, como GT2, GT1, GBF1, MYBST1 (Li *et al.*, 2006). En la tabla 1 se presentan algunos factores de transcripción que se han

asociado a la vía de señalización por azúcares en *A. thaliana*.

Tabla1. Factores de transcripción que participan en la vía de señalización por azúcares en *A. thaliana*. (Adaptada de Bossi F., 2009 (Tesis doctoral))

Familia	Factores	Expresión	Función	Referencias
ABI3/VP1	ABI3	Semillas y plántulas	-Participa en el desarrollo del embrión, maduración de las semillas, la inducción a la desecación y la dormancia -Elemento de la vía de señalización de ABA y por glucosa durante las etapas tempranas del desarrollo de las plántulas -Implicado en procesos relacionados a la respuesta a ABA en plantas adultas, el desarrollo del cloroplasto, la modulación de la distribución de recursos, la floración y el crecimiento de raíces laterales en respuesta a auxinas. -Activador transcripcional	Lopez-Molina et al., 2002 Brocard-Gifford et al., 2003 Dekkers et al., 2008
	HSI2	Tallo, raíz, hojas y flores Inducible por sacarosa	-Elemento de la vía de la señalización por azúcares -Represor transcripcional	Tsukagoshi et al., 2005 Tsukagoshi et al., 2007
AP2/ERF	WR11/ ASML1	Silicuas Inducible por sacarosa	-Regulación del metabolismo de almacenamiento durante la maduración de las semillas -Participa durante la germinación y establecimiento de la plántula -Activador transcripcional	Focks y Benning 1998 Ruuska et al., 2002 Cernac y Benning, 2004 Masaki et al., 2005a Cernac et al., 2006
	ABI4	Embrión, plántulas Inducible por azúcares, osmolitos y ABA	-Elemento de la vía de señalización por glucosa y ABA durante el establecimiento temprano de la plántula -Punto de control durante el desarrollo postgerminativo -Regulador dual de la transcripción (activador y represor)	Finkelstein et al., 1998 Acevedo-Hernandez et al., 2005 Rook et al., 2006b Koussevitzky et al., 2007 Bossi et al., 2009 Niu et al., 2002
bZIP	ABI5	Semillas, plántulas Inducible por glucosa y ABA	-Elemento de la vía de señalización por glucosa y ABA durante la germinación y el establecimiento temprano de la plántula -Punto de control durante el desarrollo postgerminativo -Activador transcripcional	Lopez-Molina et al., 2001 Finkelstein y Lynch 2000 Brocard et al., 2009 Carles et al., 2002
	ABF2	Plántulas Hojas, raíz, flores y silicuas inmaduras en plantas adultas Inducible por ABA, sal y sacarosa	-Elemento de la vía de señalización por ABA, azúcares y estrés durante el crecimiento post-germinación -Posible activador transcripcional	Kim et al., 2004
	ATB2/ bZIP11	Tejido vascular de plantas jóvenes Tejidos vegetativos jóvenes en plantas adultas Expresión controlada en respuesta a sacarosa a nivel transcripcional y post-transcripcional	-Supuesta participación en la partición de asimilados y la coordinación de procesos metabólicos en tejidos demandantes recién establecidos durante el desarrollo de las plantas. -Implicado en la regulación del metabolismo de carbono en respuesta a azúcares -Activador transcripcional	Rook et al., 1998 Stach et al., 2004 Wiese et al., 2004 Wiese et al., 2005 Hanson et al., 2008
C2C2-CO-like F	ASML2	Flores, semillas en desarrollo (silicuas) Inducible por azúcares	-Modula genes del metabolismo de carbono en respuesta a azúcares -Activador transcripcional	Masaki et al., 2005b

C2C2 GATA	GNC	Hipocótilo Tallo Inducible por nitrógeno	-Regula la síntesis de clorofila. -Participa en la vía de señalización por glucosa, donde se especula que contrao la retro-alimentación de la señal de carbono. -Posible punto molecular de convergencia entre las señalizaciones por carbono y nitrógeno. -Activador transcripcional.	Bi et al., 2005
HDZip	ATHB1 3	Semillas y hojas Receptáculo y estigma (flores) Tejido vascular de la porción basal de los peciolo (hojas de roseta y cotiledones) Base de hojas caulinas	-Participa en el desarrollo de hojas y cotiledones. -Regula la expresión de genes en respuesta a azúcares.	Hanson et al., 2001 Johannesson et al., 2001 Hanson et al., 2002

### 1.6.1.2 Elementos regulatorios que participan en la regulación por azúcares

Los factores de transcripción interactúan con secuencias en *cis* específicas, que están presentes en la región regulatoria de diversos genes. Diversos estudios en protoplastos del mesófilo y plántulas transgénicas han demostrado que la represión de la expresión de diversos genes depende de secuencias en *cis* presentes en sus promotores (Koch, 2004). También se han identificado secuencias involucradas en la inducción de genes por azúcares como es el caso del gen que codifica para la AGPasa involucrada en la síntesis de almidón (Crevillén *et al.*, 2005).

A continuación, se describen algunos de los elementos regulatorios que participan en la regulación por azúcares caracterizados en plantas hasta la fecha.

Las regiones regulatorias 5' de genes regulados por azúcares unidas a genes reporteros, como el de la  $\beta$ -glucoronidasa (GUS), se han utilizado para identificar mutantes de *A. thaliana* con defectos en la respuesta a azúcares. Por ejemplo, una construcción que contiene la secuencia regulatoria del gen que codifica para la subunidad grande de la AGPasa (*APL3*) que es inducible por azúcares fusionado al gen de GUS, permitió identificar mutantes en la respuesta a sacarosa (*isi*, *impaired sucrose induction*) (Rolland *et al.*, 2006). Con la ayuda del gen reportero luciferasa (*LUC*) bajo el control del promotor



del gen *APL3*, también se han encontrado mutantes con una mayor respuesta a azúcares (*hsr*, *high sugar-response*). Estas mutantes exhiben una alta expresión de *LUC* y del gen endógeno *APL3* en bajas concentraciones de azúcares (Rolland *et al.*, 2006). En otro estudio se aislaron mutantes con una baja (*lba*, *low beta amylase*) o alta (*hba*, *high beta amylase*) expresión del gen reportero de *GUS*, expresado a partir de la región regulatoria del gen de la  $\beta$ -amilasa ( $\beta$ -amy) en respuesta a azúcares (Gibson, 2005; Rolland *et al.*, 2006). Asimismo, mutantes con una respuesta a azúcares reducida (*rsr*, *reduced sugar response*) fueron seleccionados usando el promotor de la patatina, una proteína de almacenamiento de camote que se activa con sacarosa (Gibson, 2005; Rolland *et al.*, 2006).

También se han realizado estudios con las secuencias regulatorias que participan en las respuestas a azúcares y que han permitido identificar secuencias en *cis* que median dicha regulación. Por ejemplo, el análisis de las regiones regulatorias de los genes de la *patatina* clase I, la *sacarosa sintasa* (*SUS*), la *esporamina* (*SPO*) y la  $\beta$ -*amilasa* ( $\beta$ *AMY*), permitió identificar varios elementos en *cis* involucrados en la respuesta a sacarosa, incluyendo al motivo de respuesta a sacarosa (SURE) (Grierson, *et al.*, 1994; Sun, *et al.*, 2003; Rolland, *et al.*, 2006 ) las cajas A y B (Grierson C. *et al.*, 1994; Zourelidou M. *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2006), el elemento TGGACGG, y los motivos SP8 (Liu, *et al.*, 1990; Ishiguro y Nakamura, 1992, 1994; Grierson, *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994; Rolland *et al.*, 2002) y SPF1 ((Ishiguro y Nakamura, 1994; Rolland *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2006).

Análisis posteriores del promotor del gen de esporamina A (*SPO*) de camote en líneas transgénicas de tabaco, inducido por azúcares y ABA, permitió la identificación del elemento CMSRE1 [TGGACGG(CC)], que actúa como regulador negativo; así como dos elementos de respuesta a metabolitos de carbohidratos: CMSRE-1 (TGGACGG) y CMSRE-2, que son esenciales para la adecuada respuesta a azúcares de este gen (Morikami *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2006). Por otra parte, se sabe que los elementos S31 y CE-1 se potencian entre ellos para regular la expresión del promotor de *APL3* en respuesta a sacarosa (Rook *et al.*, 2006).

Por otro lado, una caja G (CACGTG), una caja GC y la secuencia TATCCA fueron identificados en la secuencia responsiva a sacarosa SRS. Estos elementos actúan juntos para regular la expresión del gen de la  $\alpha$ -amilasa de arroz en respuesta a azúcar. Interesantemente, tres proteínas MYB con un único dominio de unión a DNA (OsMYBS1, 2 y 3) se unen específicamente al elemento TATCCA para regular la expresión del gen  $\alpha$ AMY (Lu *et al.*, 2002).

Finalmente, se reportó que los motivos TER1 y TELO3, originalmente identificados en promotores de genes que codifican componentes de la maquinaria traduccional (Tremousaygue, *et al.* 1999), trabajan juntos induciendo la expresión del gen reportero de *GUS* en raíces de *A. thaliana* tratadas con glucosa (Li, *et al.*, 2006).

### **1.6.2 Regulación post-transcripcional**

La abundancia del mensajero no sólo es el resultado del control de su transcripción, sino también de efectos regulatorios a nivel post-transcripcional. Un ejemplo es la represión por azúcares del gen de  $\alpha$ AMY3 de arroz que involucra una regulación tanto transcripcional como a nivel de la estabilidad de su mensajero. Existen secuencias específicas en la región 3' no codificante (UTR) del transcrito de  $\alpha$ AMY3 de arroz, que controlan la estabilidad del mRNA dependiendo de los niveles de azúcares (Chan *et al.*, 1998). Con ayuda del inhibidor de la transcripción actinomicina D, se ha estudiado la vida media de mRNAs y se ha demostrado que muchos genes relacionados al crecimiento o estrés son controlados por azúcares, a nivel de la estabilidad de sus mensajeros (Ho *et al.*, 2001).

### **1.6.3 Regulación traduccional**

Otro nivel de regulación de la expresión genética es la traducción selectiva del mRNA. Se ha encontrado que este mecanismo de regulación involucra la presencia de pequeños

marcos de lectura abiertos ( $\mu$ ORFs) presentes en la región 5'UTR de los genes (Rook *et al.*, 1998). Estos  $\mu$ ORFs afectan positiva o negativamente la eficiencia de la traducción de las proteínas codificadas río abajo (Wiese *et al.*, 2004). Un ejemplo de esta regulación es lo que ocurre con el factor de transcripción ATB2/bZIP11 de *A. thaliana*. Este factor es inducido por luz y azúcares a nivel transcripcional, pero es reprimido traduccionalmente por niveles altos de sacarosa. Esta represión depende de la región 5'UTR del transcrito de ATB2/bZIP11, que es inusualmente larga (Rook *et al.*, 1998). Análisis detallados han identificado cuatro  $\mu$ ORFs en el 5'UTR de dicho gen, una de ellas es necesaria y suficiente para la regulación traduccional ( $\mu$ ORF2) (Wiese *et al.*, 2004). La represión de los factores de transcripción bZIP clase-C, provoca cambios en su abundancia y lleva también a cambios en la composición de los heterodímeros que se forman. Esta regulación es el resultado de la interacción de diferentes mecanismos de control que permiten que los genes regulatorios bZIP respondan de una manera flexible a estímulos rápidos y cambiantes que afectan los niveles de sacarosa en las células o tejidos (Wiese *et al.*, 2005).

#### **1.6.4 Regulación post-traduccional**

Finalmente, otro tipo de regulación que se ha descrito en respuesta a azúcares es a nivel de la estabilidad de las proteínas. Una vez que la proteína es sintetizada, su actividad puede ser regulada de muchas maneras. Análisis bioinformáticos sugieren que más del 5% del proteoma de *A. thaliana* está involucrado en la degradación de proteínas mediada por el proteosoma 26S y ubiquitina. La estabilidad de la proteína y la proteólisis selectiva han emergido como mecanismos regulatorios importantes en la señalización y desarrollo de plantas (Smalle *et al.*, 2004). Este tipo de regulación se ha encontrado en las mutantes insensibles a etileno (*etr1*, *ein2* and *ein3*), que presentan un fenotipo hipersensible a glucosa (*glo*) y en las mutantes con señalización constitutiva de etileno (*ctr1/gin4*), con un fenotipo insensible a glucosa (*gin*). La glucosa antagoniza la señalización de etileno potenciando la degradación dependiente de proteosoma del regulador transcripcional clave EIN3 en el núcleo, mientras que el etileno potencia la estabilidad de EIN3

(Yanagisawa *et al.*, 2003).

En conclusión, los niveles de azúcares son capaces de regular un número importante de genes y proteínas a través de diversos procesos y a diferentes niveles. A pesar del progreso para entender este mecanismo central de regulación todavía ahora existen muchas preguntas tanto en la percepción como en la señalización y respuesta.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El factor ABI4, elemento fundamental de la señalización por azúcares

A través de enfoques genéticos, utilizando mutantes de *A. thaliana* con sensibilidad alterada a altas condiciones de azúcar, se han aislado y caracterizado a nivel molecular componentes de la señalización por azúcares (Smeekens, 2000; Rook y Bevan, 2003; Gibson, 2005; Rolland *et al.*, 2006; Ramon *et al.*, 2008). A partir de estos análisis se ha dilucidado la participación de algunos factores de transcripción como elementos fundamentales de la señalización por azúcares. Entre los primeros factores de transcripción identificados se encuentran los factores ABI3, ABI4 y ABI5 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3, 4 y 5), que también participan en la señalización de ABA (Giraudat, *et al.*, 1992; Finkelstein, *et al.*, 1998; Arenas-Huertero, *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Choi, *et al.*, 2000; Uno, 2000; Rook, *et al.*, 2001; Finkelstein, *et al.*, 2002). En este estudio nos centramos en el factor ABI4, cuya mutante insensible a glucosa, se ha aislado en diversos escrutinios por azúcares (Finkelstein, *et al.*, 1998; Arenas-Huertero, *et al.*, 2000; Huijser, *et al.*, 2000; Laby, *et al.*, 2000; Rook, *et al.*, 2001).

ABI4 posee un dominio APETALA2 (AP2) (a veces también llamado el dominio del factor de unión al elemento AP2 / sensible al etileno (ERF) o dominio ERF/AP2) que define una extensa familia de genes que codifican para proteínas de unión a DNA llamada AP2/ERF. Estos genes están divididos en clases dependiendo del número de dominios AP2 que contienen. Una de las clases codifica proteínas que contienen dos dominios AP2 (AP2-like) e incluye *AP2* (Jofuku *et al.*, 1994), *AINTEGUMENTA (ANT)* (Elliott *et al.*, 1996; Klucher *et al.*, 1996), y *Glossy15 (GL15)* (Moose y Sisco, 1996). La segunda clase codifica proteínas con un solo dominio AP2 (ERF-like) que incluye a *ERFs* (Ohmetakagi y Shinshi 1995), *TINY* (Wilson *et al.*, 1996), *AtEBP* (Buttner y Singh, 1997), y *ABI4* (Finkelstein *et al.*, 1998). Y la tercera clase de genes AP2/ERF(RAV) incluye a *RAV1* y *RAV2* (Kagaya, *et al.*, 1999) que codifican proteínas que tienen dos dominios de unión a DNA diferentes, AP2 y B3 (Giraudat *et al.*, 1992).

Dentro de la clase AP2 (ERF-like) encontramos a *ABI4* como un miembro único del subgrupo A3, de la subfamilia DREB (subgrupos A1-A6) (Mizoi *et al.*, 2012). Esta familia de factores transcripcionales está involucrada en muchos procesos de señalización y respuestas a estrés (Mizoi *et al.*, 2012). *ABI4* codifica un factor de transcripción de 328 residuos, único en plantas, cuyos ortólogos en maíz y arroz se ha demostrado que pueden rescatar la sensibilidad a ABA y glucosa de las mutantes *abi4* de *A. thaliana* por medio de complementaciones heterólogas (Niu *et al.*, 2002).

## **2.2 ABI4 es un regulador versátil en múltiples vías de señalización**

Durante la última década, *ABI4* ha sobresalido por tener un papel central en diversos procesos de señalización durante el desarrollo de las plantas (Figura 4). El gen *ABI4* se identificó inicialmente por el estudio de una mutante insensible a ABA (*abi4*) y fue la evidencia inicial que vinculó este factor con la señalización de esta hormona (Finkelstein *et al.*, 1998; Söderman *et al.*, 2000; Penfield *et al.*, 2006; Kerchev *et al.*, 2011).

A diferencia de las plantas silvestres, las mutantes *abi4* presentan resistencia al efecto inhibitorio de ABA durante la germinación y el desarrollo de plántulas y de los cloroplastos (Figura 7A). De esta manera se identificó a *ABI4* como un activador en la vía de señalización del ABA durante el desarrollo de la semilla, la latencia y en la regulación de la germinación (Finkelstein *et al.*, 1998; Söderman *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2013).

Posteriormente se demostró que *ABI4* juega un papel importante en respuesta a azúcares, ya que mutaciones en este gen resultan en plantas insensibles a altas concentraciones de glucosa (fenotipo *gin*; Figura 7B), que en plantas silvestres provocan un arresto post-germinativo de las plántulas silvestres (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2009; Söderman *et al.*, 2000).

Más recientemente se ha reportado que este factor participa en otros aspectos del desarrollo de las plantas como la movilización de lípidos al embrión (Penfield *et al.*, 2006),

en la señalización retrógrada del cloroplasto y de la mitocondria al núcleo (Koussevitzky *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011), en esterilidad de las plantas (Shu *et al.*, 2014) y en el crecimiento de la raíz primaria (Cui *et al.*, 2012). Finalmente se ha encontrado que ABI4 está involucrado en la señalización cruzada dependiente de ABA y jasmonato (Kerchev *et al.*, 2011) y en las vías cruzadas de ABA y ácido giberélico (Shu *et al.*, 2013).



Figura 6. ABI4 participa en muchos procesos del desarrollo de las plantas y respuesta a estrés. (Adaptada de León, *et al.*, 2014)

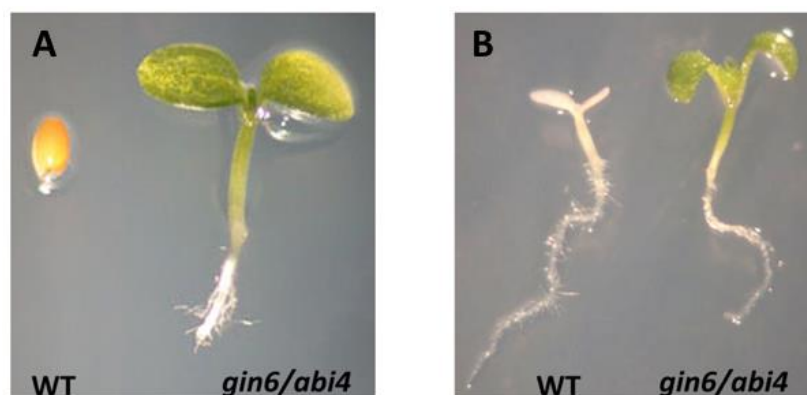


Figura 7. ABI4 se requiere para la señalización de ABA y azúcares. A) La planta silvestre

(WT) no germina en un medio con ABA 5 $\mu$ M (izquierda) mientras que la mutante *abi4* (derecha) es insensible al ABA y puede germinar B) La planta silvestre (WT) muestra un arresto post-germinativo en un medio con 6.5% de glucosa mientras que las mutante *abi4/gin6* continúa creciendo y muestran un fenotipo con cotiledones verdes extendidos.

### 2.3 ABI4 es un regulador de la expresión genética nuclear

ABI4 funciona como represor y como activador de la expresión genética, regulando la expresión de diversos genes que codifican tanto para otros factores transcripcionales como para proteínas que participan en diferentes procesos biológicos. Se ha reportado que ABI4 induce la expresión del gen *DGAT1*, que codifica para la enzima diacilglicerol acetiltransferasa, limitante en la biosíntesis de triacilglicéridos (Yang *et al.*, 2011) y para los genes *SBE2.2* (que codifica para la enzima de ramificación 1,4-alfa-glucano 2-2) y SSI (que codifica para la almidón sintasa), centrales en el metabolismo del almidón (Bossi *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2012). También ABI4 induce la expresión del factor transcripcional ABI5, que es un regulador de la transición a la autotrofía en el desarrollo temprano de la plántula.

Por otro lado, ABI4 reprime la expresión de genes fotosintéticos, como el de la subunidad pequeña de la Rubisco (*RBCS*) y el *LHCB* (que codifica la proteína de captación de luz de la proteína de unión a la clorofila a / b) (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005; Koussevitzky, *et al.*, 2007). En todos los casos mencionados, *ABI4* interacciona con elementos en *cis* a través del elemento llamado CE1 (elemento de acoplamiento 1), cuya secuencia es CACCG, presente en las regiones promotoras de estos genes (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005; Bossi *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2002; Koussevitzky *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012).

La regulación por el factor ABI4 suele ser difícil de identificar debido a su dualidad como represor o activador, la cual depende del contexto de su sitio de unión y del sitio de unión de otros activadores. Los genes que son activados por ABI4 generalmente contienen una



secuencia tipo CE1 (CACCG); mientras que en los genes reprimidos como *LHCB* y *RBCS*, el sitio de unión de ABI4 se superpone con un elemento activador conocido como caja G (CACGTG). La caja G es el sitio de unión de diferentes activadores denominados GBF (factores de unión G), que son esenciales para mantener los niveles de expresión de muchos genes regulados por luz (Acevedo-Hernandez *et al.*, 2005; Koussevitzky *et al.*, 2007). Por lo tanto, la competencia entre ABI4 y los activadores GBFs resulta en una reducción de la expresión genética mediada por ABI4 (Acevedo-Hernandez *et al.*, 2005; Rook *et al.*, 2006).

## 2.4 Factores que regulan a ABI4

Se ha demostrado que la expresión de ABI4 es regulada por diversos factores, incluyendo al mismo ABI4, que es un activador esencial de su propia expresión durante el desarrollo temprano de las plántulas (Arroyo *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2009). La expresión de ABI4 es reprimida en raíces (Cui *et al.*, 2012) por el regulador transcripcional específico de plantas SCARECROW (SCR), el cual es requerido en la especificación de la endodermis de las raíces y es un regulador importante en hojas (Dhondt *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que en ausencia de la hormona ABA, el regulador transcripcional WRKY40, implicado en las respuestas de defensa de las plantas, también reprime la expresión de *ABI4* (Shang *et al.*, 2010). En resumen, la transcripción de ABI4 es regulada por diferentes factores de transcripción.

ABI4 además de ser regulado transcripcionalmente, también se regula post-transcripcionalmente, se comprobó que la estabilidad de este factor de transcripción es controlada mediante degradación vía el proteosoma 26S en respuesta a cambios en los niveles de azúcares (Gregorio *et al.*, 2014). Recientemente se ha demostrado que ABI4 es activado por las enzimas MAP cinasas MAPK3/MAPK6, a través de su fosforilación. A su vez, el cloroplasto controla por medio de  $Ca^{2+}$  la vía MAPK para la activación de componentes críticos de la cadena de señalización retrógrada (Guo., 2016).

## 2.5 Antecedentes directos

Los estudios recientes apoyan la noción de que la señalización por azúcares durante el desarrollo temprano de las plántulas, involucra mecanismos complejos con diversas interacciones (Leon y Sheen, 2003). Para entender en detalle los mecanismos moleculares de la señalización por azúcares, es importante entender la función y la regulación que desempeñan los factores conocidos en las cascadas de señalización.

En un análisis detallado de la regulación por glucosa del gen *ABI4* realizado por Arroyo *et al.* (2003) se encontró que el transcrito de *ABI4* se acumula con exposición a glucosa durante el desarrollo temprano de plántulas (Fig 8, A y C). A través del uso de plantas transgénicas con una construcción con 3.4 kb del promotor de *ABI4* fusionado al gen reportero *GUS*, se determinó el patrón de expresión de plántulas mediante ensayos histoquímicos. Este análisis mostró que plántulas crecidas en baja concentración de azúcares (1% sacarosa) perdieron la expresión de *GUS* a los 10 días; mientras que, las plántulas crecidas en medio adicionado con glucosa 4% o al 7% siguen teniendo expresión del reportero en los cotiledones e hipocótilo hasta el día 10. Estos resultados muestran que la expresión del gen *ABI4* es regulada positivamente por azúcares a nivel transcripcional y que esta regulación depende de secuencias localizadas en la región 5' río arriba. Sin embargo, hasta el momento aún se desconocen tanto la(s) secuencia(s) específica(s) que median esta regulación, como los factores involucrados. Con el propósito de adentrarnos en los aspectos moleculares que median la regulación por azúcares, resulta de interés analizar con más detalle la región regulatoria del gen *ABI4* en búsqueda de las regiones involucradas en la regulación de este factor por azúcares.

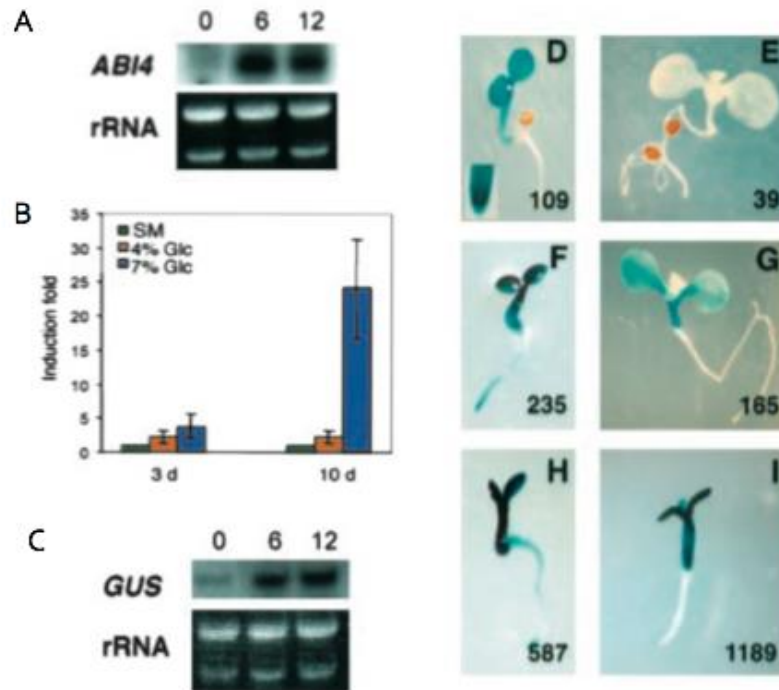


Figura 8. Regulación de la expresión de ABI4 por glucosa y su patrón de expresión. A) Northern blot de plantas silvestres crecidas por dos días en medio líquido estándar y luego expuestas a medio con glucosa 7% durante 0, 6 y 12 días. B) Actividad de GUS de plántulas tratadas con glucosa relativa a su nivel de GUS en los medios estándar de crecimiento, normalizadas a 1. C) Plantas transgénicas con el vector de expresión *pABI4::GUS* crecidas en medio líquido estándar por dos días y después expuestas a medio con glucosa 7% durante 0, 6 y 12 horas. D-E) Tinción con GUS de *pABI4::GUS* crecidas en medio estándar por 3, D) o 10 días, E), crecidas en medio con glucosa 4% por 3, F) y 10 días, G) y crecidas en medio con glucosa 7% por 3, H) y 10 días, I) (Arroyo et al., 2003)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

ABI4 es un factor esencial para la regulación por azúcares durante el desarrollo temprano de las plántulas. Se sabe que el gen *ABI4* es regulado también por glucosa a nivel transcripcional, pero se desconocen las regiones del promotor que actúan como elementos de regulación por glucosa. Para adentrarnos en los procesos moleculares de la regulación por azúcares resulta importante analizar la región regulatoria de este gen y poder localizar las secuencias en *cis* y los factores transcripcionales involucradas en dicha regulación.

### **4. HIPÓTESIS**

El análisis de deleciones del promotor de *ABI4* nos permitirá determinar la región donde se localizan las secuencias en *cis* importantes para la respuesta a azúcares del gen *ABI4*.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la región del promotor de *ABI4* que participa en la regulación de su expresión por glucosa.

### 5.1 Objetivos particulares

1. Obtener plantas transgénicas que porten fusiones transcripcionales de fragmentos de 2, 2.5 y 3kb de la región regulatoria del gen *ABI4*, con el gen reportero de *GUS* (*pABI4::GUS*).
2. Seleccionar líneas transgénicas homocigotas para cada una de las respectivas construcciones.
3. Determinar el patrón de expresión de GUS por ensayos histoquímicos, en plantas de las líneas *pABI4::GUS*, en ausencia y presencia de glucosa.
4. Analizar por ensayos fluoriméticos el nivel de expresión de *pABI4::GUS* de las plantas transgénicas crecidas en ausencia y presencia de glucosa.
5. Realizar un análisis *in silico* de la región acotada del promotor de *ABI4*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este estudio se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Heynh Columbia (Col-0). Para condiciones de cultivo estériles, las semillas de *A. thaliana* fueron desinfectadas, siguiendo el protocolo estándar descrito en [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org). La esterilización de semillas se realizó tratando las semillas con etanol al 100% durante un minuto, después con una solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 8 minutos y finalmente, se realizaron 4 lavados con 1 mL de agua estéril. Para la germinación, las semillas se sembraron en medio GM1X sólido, conteniendo sales basales de Murashige y Skoog modificadas suplementado con vitaminas gamborg (4.44 g/L, Phytotechnology-USA), sacarosa (10 g/L, Sacarosa grado I, probado en cultivo de células vegetales, SIGMA; USA), MES (0.5 g/L, MES hidratado- SIGMA, USA), solidificado con agar (8 g/L, Agar en polvo para micropropagación tipo I, Caisson, USA) y en medio suplementado con 4% de glucosa, en lugar de sacarosa. Para romper la latencia, las semillas fueron estratificadas por cuatro días a 4°C en oscuridad. Para el crecimiento de plantas adultas en sustrato, se utilizó Metro-Mix 200 (Grace Sierra, Milpitas, CA, USA). Las plantas se crecieron bajo un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con  $120\mu\text{M m}^2 \text{ s}^{-1}$  a 22°C.

### 6.2 Generación de las construcciones

Para generar las fusiones de las regiones de 3kb y 2kb río arriba del codón de inicio del gen *ABI4* con el gen reportero de GUS, se partió de clonas con las que ya se contaba en el laboratorio, en el vector de entrada tipo Gateway pDONR/Zeo. Posteriormente, como parte de este trabajo, estos fragmentos fueron transferidas al vector Gateway pMDC163 a través de recombinación, para generar las fusiones transcripcionales con el gen reportero de GUS. Este vector binario contiene además del gen reportero de GUS, un cassette de resistencia a kanamicina y cloramfenicol para bacterias y a higromicina, para la selección de plantas transgénicas.

Para la construcción de 2.5kb del promotor del gen *ABI4*, primero se amplificó por PCR el fragmento deseado partiendo de la clona que contiene 3kb del promotor de *ABI4*, clonada en el vector de entrada Gateway pDONR/Zeo, la cual había sido previamente secuenciada. Usando los oligonucleótidos F, pABI4 2.5kb+B1(5´- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGT GAG AGT TCC AAG GCA ATT G -3´FW) y R, pABI4 2.5kb+B2 (5´-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CGA ATC AAG GAA GGG AAA C -3´RV), que son específicos del fragmento deseado y que contienen las secuencias attB (attB1 y attB2) necesarias para poder generar la clona de entrada usando el sistema de recombinación Gateway.

Con este fragmento se llevó a cabo la recombinación a un vector donador pDONR/Zeo, que contiene secuencias attP1 y attP2, con la enzima BP Clonasa II, dando origen a la clona de entrada pDONOR-*ABI4*. Para realizar la reacción de recombinación se añadieron los siguientes reactivos y se incubó durante 14 horas a 25°C:

### Reacción BP

Producto de PCR con attBs completos ( $\geq 10$ ng/ $\mu$ L; final ~15-150 ng)	1-7 $\mu$ L
pDONR/Zeo (150ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Clonasa BP	2 $\mu$ L
Agua, para completar 10 $\mu$ L del volumen fina de reacción	

Posteriormente, las diferentes clonas de entrada con 2kb, 2.5kb y 3kb del promotor de *ABI4* se recombinaron, con ayuda de la enzima LR clonasa, con el vector destino pMDC163, que contiene las secuencias attR1 y attR2 y así se obtuvieron los vectores de expresión 3kb *pABI4::GUS*, 2.5kb *pABI4::GUS* y 2kb *pABI4::GUS*.

Las reacciones de recombinación LR se realizaron con los siguientes componentes:

## Reacción LR

Clona de entrada (3kb, 2.5kb y 2kb pABI4, 50-150ng)	1-7μL
Vector destino (150ng/μL)	1μL
Agua	a 8μL
Clonasa LR	2μL

En la figura 9 se esquematiza el proceso de obtención de la clona de entrada y del vector de expresión.

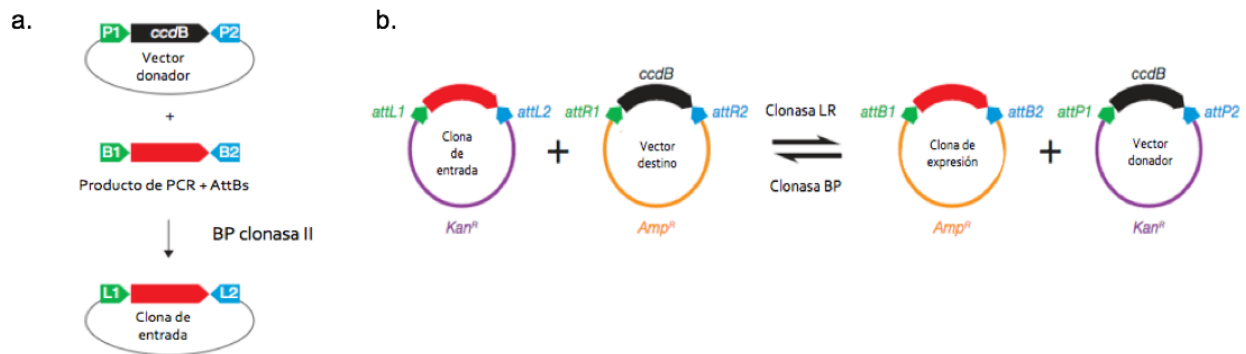


Figura 9. Sistema de recombinación Gateway. a) Proceso de obtención de la clona de entrada, se parte de un producto de PCR flanqueado por secuencias *attB* que se recombinan en un vector donador, que contiene un cassette *ccdB* de selección, flanqueado por secuencias compatibles *attP*; dando como resultado un plásmido llamado clona de entrada donde el fragmento de interés se encuentra flanqueado por sitios *attL*; las secuencias *attB* poseen solo 21 nucleótidos de largo y se pueden agregar a los oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR. b) Proceso de obtención del vector de expresión, a través de la mezcla de la clona de entrada (que contiene las secuencias *attL*) con un vector destino (que contiene las secuencias *attR*) y con proteínas de recombinación, la mezcla de recombinación de la enzima LR clonasa; teniendo como resultado la clona de expresión que contiene el DNA de interés (Tomado de Katzen, 2007).



### 6.3 Reacción de PCR

Para la amplificación de fragmentos a través del método de PCR se realizaron las reacciones conteniendo:

Agua	33.5 $\mu$ L
Buffer de KAPA HiFi (5X)	10 $\mu$ L
Mix de dNTPs KAPA (10 mM)	1.5 $\mu$ L
Oligonucleótido delantero (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ L
Oligonucleótido reverso (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ L
Templado de DNA (pENTR de 3kb pABI4(3ng/ $\mu$ l))	1 $\mu$ L
Polimerasa KAPA HiFi	1 $\mu$ L

Las condiciones de la reacción usadas fueron:

- |         |   |              |                 |
|---------|---|--------------|-----------------|
| 1) 95°C | - | 3 min        | } (X 29 ciclos) |
| 2) 98°C | - | 30 seg       |                 |
| 3) 60°C | - | 15 seg       |                 |
| 4) 72°C | - | 2 min 50 seg |                 |
| 5) 72°C | - | 2 min 50 seg |                 |

### 6.4 Transformación de bacterias

La transformación de *Escherichia coli* se realizó utilizando células competentes, de la cepa DH5  $\alpha$ , usando 5 $\mu$ L del producto de la reacción LR, por medio de electroporación en condiciones de esterilidad. Posteriormente a la electroporación, las células se recuperaron en medio de cultivo LB líquido a 37°C durante una hora. Después se plaquearon en medio de cultivo LB sólido adicionado con el antibiótico de selección

indicado para el plásmido de interés. Finalmente, las cajas se incubaron a 37°C toda la noche (14 horas) para obtener las colonias transformantes.

Para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* se utilizó el mismo procedimiento descrito previamente para *E.coil*, con la diferencia de que las células transformadas fueron recuperadas por tres horas en medio de cultivo LB líquido y después plaqueadas en medio LB sólido adicionado con el antibiótico indicado para el plásmido de interés más rifampicina (50 µg/ml) y ampicilina (50 µg/ml), e incubadas a 30°C durante aproximadamente 3 días.

### **6.5 Transformación vegetal con *Agrobacterium tumefaciens***

Las líneas de plantas transgénicas de *A. thaliana*, ecotipo Col-0, se generaron a través de la transformación con *A. tumefaciens* por el método de inmersión floral (Clough and Bent, 1998) con el ecotipo Col-0. Las plantas fueron crecidas hasta que desarrollaron el escape y un día antes de la transformación se cortaron las inflorescencias, dejando únicamente los botones florales. Para la transformación se creció un cultivo de 200 mL de *A. tumefaciens* que contenía cada una de las construcciones de expresión, en el pMDC163, en medio con rifampicina (50ng/µL), ampicilina (50ng/µL) y kanamicina (50ng/µL) por 14 horas a 30°C. El cultivo de *A. tumefaciens* se centrifugó y resuspendió en 1 litro de agua con sacarosa al 5% y 500µl del surfactante Silwet L-77. Se transformaron cinco plantas por construcción, sumergiéndolas en la solución de infiltración dentro de una cámara de vacío. Las plantas transformadas se crecieron en invernadero hasta colectar semillas.

### **6.6 Selección de líneas homocigotas**

Las líneas transgénicas fueron seleccionadas en medio GM1X sólido, suplementado con 50 µg/mL de higromicina (que es la resistencia que le confiere el cassette de higomicina a las plantas transgénicas, contenido en el vector pMDC163), y que les proporciona la capacidad de germinar y desarrollarse normalmente, mientras que las plantas que no contienen el transgén germinan, pero se detiene su desarrollo. Al menos tres líneas

independientes fueron seleccionadas para cada construcción.

En la figura 10 se presenta un esquema detallado del proceso de selección seguido en este trabajo.

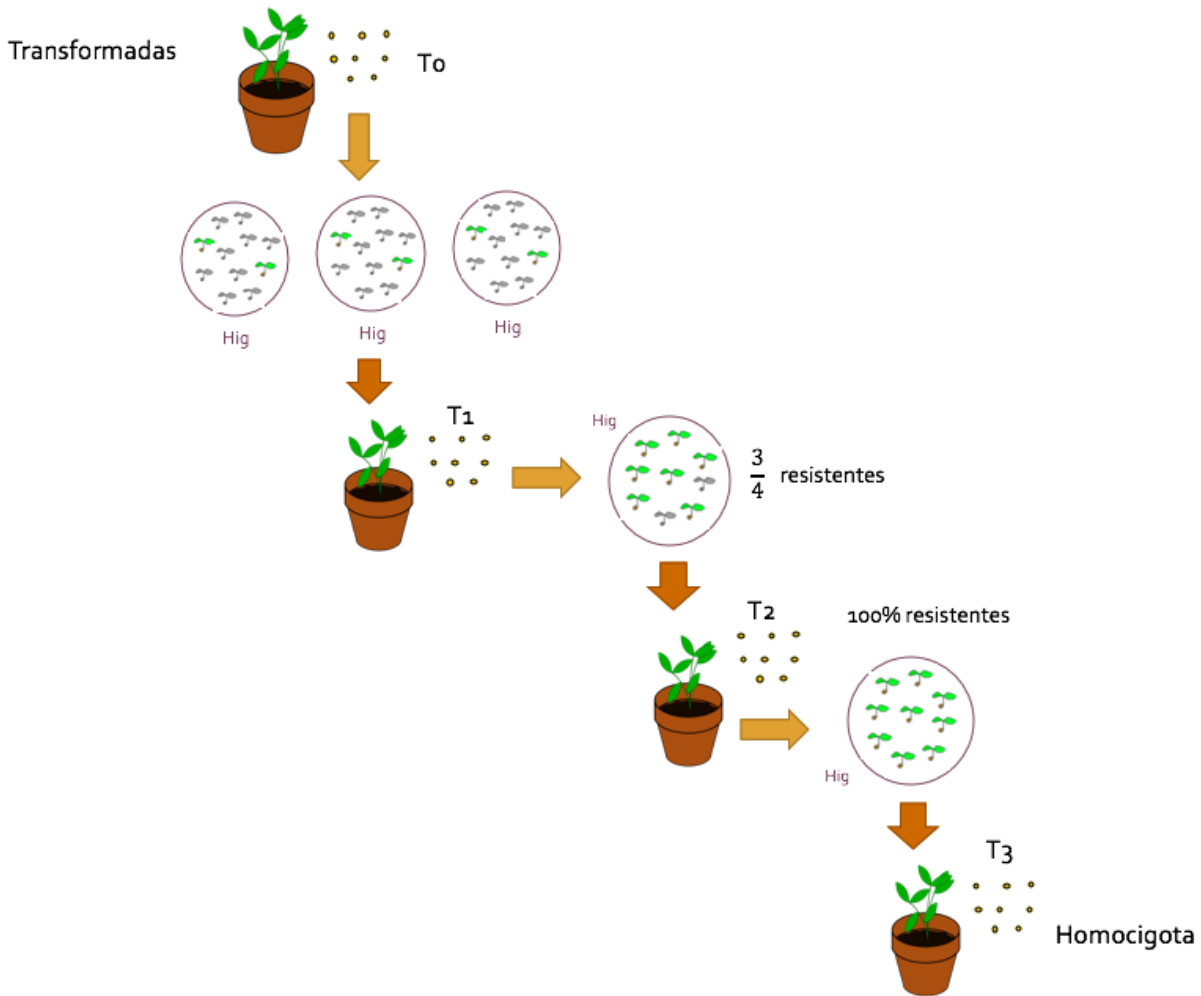


Figura 10. Proceso de selección por resistencias a higromicina de las plantas transformadas. Se obtuvieron semillas de las plantas transformadas por inmersión floral (generación T0), y se sembraron en medio GM1X adicionado con higromicina. Las plántulas que lograron germinar y enverdecer fueron trasplantadas a tierra aproximadamente a los 10 días de edad (generación T1). De la misma manera, se llevó a cabo el proceso de selección para producir las generaciones T2 (obteniendo alrededor de  $\frac{3}{4}$  de plántulas resistentes) y T3 (obteniendo un 100% de plántulas resistentes).

## 6.7 Análisis histoquímicos de GUS

La detección de la actividad histoquímica de GUS se realizó usando el protocolo de Jefferson (1987), con algunas modificaciones. Plántulas de 3, 6, 9 y 11 días de edad crecidas en medio GM1X o en medio MS1X suplementado con 4% de glucosa, se incubaron con la solución de tinción (1 mg/ml de X-Gluc, 100mM de buffer de fosfatos (pH 7), 5mM de ferrocianuro de potasio, 5mM de ferricianuro de potasio, EDTA 500mM y 1% Tritón X-100), a 37°C durante 16 horas. Para asegurar que la solución llegara a todos los tejidos de la planta, se les aplicó vacío por 2 minutos a las plantas y posteriormente se incubaron toda la noche.

Para remover los pigmentos, clorofila y carotenos, de las plantas teñidas se utilizaron incubaciones repetidas con etanol al 70%, añadiendo la cantidad necesaria para cubrir las plántulas o silicuas por completo. Estos pasos se repitieron hasta observar los tejidos totalmente libres de pigmentos.

## 6.8 Análisis fluorimétricos de la actividad de $\beta$ -glucoronidasa

El ensayo fluorimétrico se realizó a partir de plántulas de 5 días de edad siguiendo el método publicado por Hull y Devic (1995), con algunas modificaciones. Se homogenizaron 10 plántulas en tubos de microcentrifuga de 1.5mL usando micropistilos, con 50 $\mu$ L de buffer de extracción de GUS (NaHPO<sub>4</sub> pH 7.0, Na<sub>2</sub>EDTA, Tritón 1%, N-sarcosil,  $\beta$ -mercaptoetanol). Una vez homogenizado el tejido, se centrifugó para obtener el sobrenadante. Para la reacción enzimática se utilizaron 20 $\mu$ L de 4- metilumbeliferil $\beta$ -D-glucoronide (4-MUG, 2mM), 5 $\mu$ L del extracto de los tejidos y se llevó a 50  $\mu$ L totales de reacción utilizando 15 $\mu$ L del buffer de extracción de GUS. La reacción se incubó durante 15', 30' y 1 hr a 37° C y la reacción se detuvo adicionando 950 $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.2M).

Para la cuantificación fluorimétrica de GUS se utilizó el fluorómetro modelo TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments) y su calibración se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante: con 1mL de solución  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.2M) se llevó a un valor de 0, posteriormente con 1mL de una solución 1 $\mu\text{M}$  MU el aparato se llevó a un valor relativo de 1000. El valor obtenido en el fluorómetro de cada muestra se interpreta como la fluorescencia relativa directamente en nmoles de MU. Para obtener la actividad específica de cada muestra, los valores obtenidos se convirtieron en nmoles de MU producidos/ $\mu\text{g}$  de proteína/minuto.

## 6.9 Cuantificación de proteína

Para realizar la cuantificación de las proteínas totales primero se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de BSA para después extrapolar los valores de proteína de los extractos de interés y obtener su concentración.

### Curva estándar

- 1) A partir de una solución stock de BSA al 0.4 mg/mL, se realizaron las siguientes diluciones:
  - 12.5  $\mu\text{L}$  de BSA + 787.5  $\mu\text{L}$  de agua (5  $\mu\text{g}$ )
  - 25  $\mu\text{L}$  de BSA + 775  $\mu\text{L}$  de agua (10  $\mu\text{g}$ )
  - 37.5  $\mu\text{L}$  de BSA + 762.5  $\mu\text{L}$  de agua (15  $\mu\text{g}$ )
  - 50  $\mu\text{L}$  de BSA + 750  $\mu\text{L}$  de agua (20  $\mu\text{g}$ )
  - Blanco: 800  $\mu\text{L}$  de agua
- 2) Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (Bio Rad)

Las muestras se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 595nm.

## 6.10 Obtención de plásmido a pequeña escala a partir de *E.coli* (Miniprep)

Para purificar los plásmidos obtenidos se siguió el siguiente protocolo:

- 1) Centrifugar 1.5 mL de un cultivo (crecido por ~18hrs) por 10 segundos, para sedimentar las células, a 10 000 r.p.m. por un minuto.
- 2) Decantar el sobrenadante con cuidado, dejando 50-100  $\mu$ L con la pastilla y resuspender ésta con un vortex.
- 3) Agregar 300  $\mu$ L de TENS (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.1N NaOH y 0.5% SDS) y agitar con un vortex de 2-5 segundos hasta que la mezcla se vuelva viscosa.
- 4) Añadir 150  $\mu$ L de acetato de sodio 3M pH 5.2 y agitar con un vortex de 2-5 segundos para mezclar completamente.
- 5) Centrifugar 10 minutos en una microcentrífuga a 14 000 r.p.m. para sedimentar los restos celulares y el DNA cromosómico.
- 6) Transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo, mezclarlo bien con 0.9 mL de etanol absoluto (al 100%) enfriado a -20°C.
- 7) Centrifugar 10 minutos para sedimentar el DNA plasmídico y el RNA, se observa una pastilla blanca.
- 8) Descartar el sobrenadante, enjuagar la pastilla una vez con 1 mL de etanol al 70%, centrifugar 3 minutos a máxima velocidad y secar la pastilla.
- 9) Diluir la pastilla seca en 50  $\mu$ L de agua destilada.
- 10) Agregar 3  $\mu$ L de RNAasa a las muestras.

El DNA purificado se almacena a una temperatura menor a 4°C.

## 6.11 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, el DNA o el producto de PCR se corrió en un gel de agarosa, la banda deseada se recortó a partir del gel y se pesó. Posteriormente se siguió el protocolo del Kit de Thermo Scientific que utiliza columnas de membrana de sílica para capturar y purificar fragmentos de DNA.

## 6.12 Extracción de DNA genómico

Para verificar si las líneas transgénicas generadas contienen el transgén de interés, se extrajo DNA genómico a partir de hojas de roseta siguiendo el protocolo de extracción por CTAB (Murray yThompson,1980), con algunas modificaciones:

- Macerar el tejido vegetal (aproximadamente 2 hojas) en un tubo para microcentrifuga.
- Agregar 300µL de buffer 2X CTAB (ver apéndice) y se incuba a 65°C por al menos 10 minutos.
- Dejar enfriar.
- Agregar 300 µL de cloroformo y se mezcla con ayuda de un vortex.
- Centrifugar durante 10 minutos a 13 000 rpm para separar las fases.
- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- Agregar 300 µL de 2-propanol y se mezcla por inversión.
- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos para obtener una pastilla de DNA.
- Remover el sobrenadante y se lava la pastilla con 500µl de etanol al 70%.
- Centrifugar durante 5 minutos a 13 000rpm.
- Con cuidado retirar el etanol y dejar secar la pastilla.
- Adicionar 100µL de agua para disolver la pastilla.

Posterior a la obtención de DNA genómico, se realizó un análisis por PCR para corroborar la presencia del transgén.

## 6.13 Análisis por PCR

Para todas las corroboraciones por PCR, se utilizaron los siguientes reactivos para reacciones de 25µL:

<b>Buffer PCR 10X</b>	<b>2.5 <math>\mu</math>L</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM</b>	1.25 $\mu$ L
<b>dNTPs 2.5mM</b>	0.5 $\mu$ L
<b>Oligo FW (60 ng/<math>\mu</math>L)</b>	0.5 $\mu$ L
<b>Oligo RV (60 ng/<math>\mu</math>L)</b>	0.5 $\mu$ L

Programa general para las reacciones de PCR

<b>Paso</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	30
Alineamiento	55	30 seg	
Extensión	72	1min/kb	
Extensión final	72	5 min	1



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Generación de las construcciones de 2kb, 2.5kb y 3kb del *pABI4*

Previamente se había demostrado que una construcción con 3089 pb de la región regulatoria 5' de *ABI4* fusionada a GUS (denominada A4), presenta una expresión en momentos muy específicos durante el desarrollo de las plántulas de *A. thaliana*, desde el desarrollo de la semilla (Söderman *et al.*, 2000) hasta los primeros estadios de la plántula (Arroyo *et al.*, 2003). Este patrón de expresión concuerda con el patrón del gen endógeno por lo que se concluyó que dentro de este fragmento se encuentran contenidos la mayoría de los elementos para la regulación de este gen.

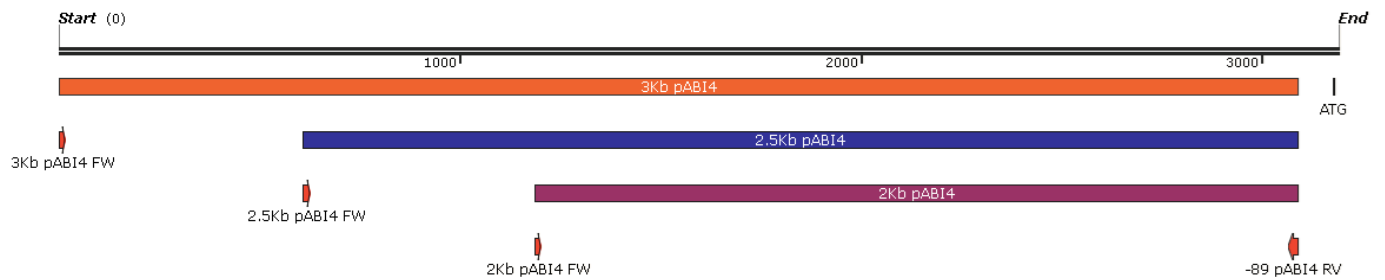


Figura 11. Diferentes fragmentos del promotor de *ABI4* analizados en este estudio.

Con la idea de realizar un análisis más detallado de los elementos y factores que regulan la expresión del gen *ABI4*, se generaron construcciones conteniendo diferentes fragmentos de la región regulatoria del gen *ABI4*. Un fragmento, parecido a la clona A4, que incluye 3089 pb (-3kb) y que contiene hasta el -89 pb antes del ATG, dentro del 5' UTR. Adicionalmente se obtuvieron dos fragmentos que incluyen 2481pb (-2.5kb) y 1901pb (-2kb), ambos hasta -89pb antes del ATG (Figura 11). Cabe mencionar que cuando se inició este trabajo ya se contaba con la clonación de los fragmentos de 3kb y 2kb en el vector de entrada pENTR/D-TOPO. Por otro lado, la construcción de 2.5kb se generó en su totalidad en este trabajo, iniciando por la amplificación del fragmento mediante PCR, usando como templado la construcción de 3kb en el pENTER y utilizando los oligonucleótidos *pABI4* 2.5kb +attB1c FW y *pABI4* -89 +attB2c RV (Tabla

suplementaria 1). Estos oligonucleótidos incluyen los sitios attB1 y attB2 necesarios para su posterior recombinación en un vector donador.

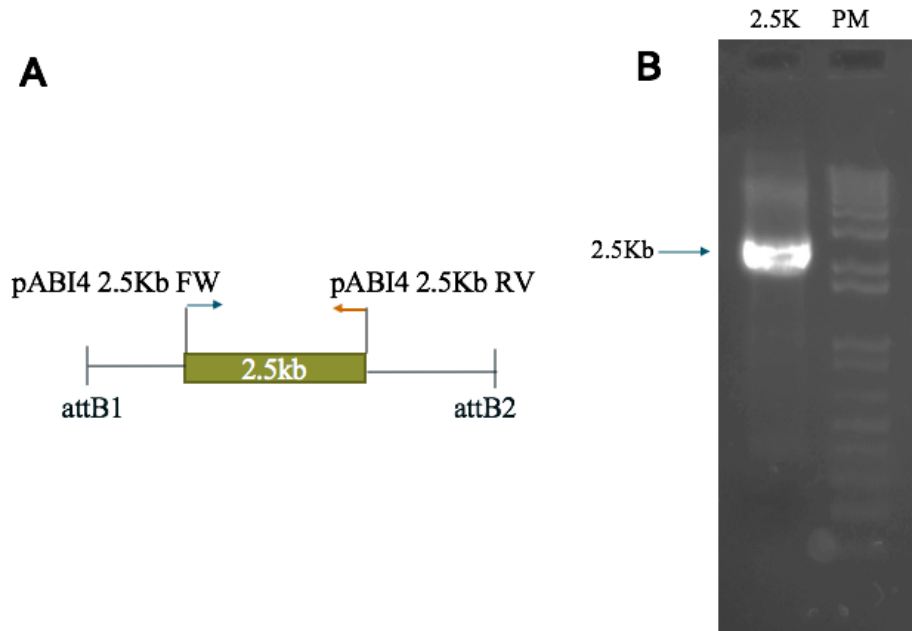


Figura 12. Generación de la construcción de 2.5kb pABI4. A) Se muestra el esquema del fragmento del promotor de *ABI4* de 2.5kb, amplificado a partir del fragmento de 3kb de pABI4 clonado en el vector pENTR/D-TOPO. Se indica dónde se posicionan los oligonucleótidos pABI4 2.5kb FW y pABI4 2.5kb RV que contienen los sitios attB1 y attB2. B) Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, donde se muestra el producto correspondiente a la amplificación por PCR del fragmento de 2.5kb del pABI4.

Una vez amplificado el fragmento de 2.5kb, éste se purificó a través de un gel de agarosa al 1% en TAE 1X (Figura 12). Posteriormente, el fragmento se extrajo de la agarosa y se purificó utilizando el kit de purificación de ROCHE y se cuantificó.

La clonación de dicho fragmento se llevó a cabo a través de una recombinación mediada por la recombinasa BP entre el vector donador pDONR/Zeo y el fragmento de interés en una relación 1:1 (fragmento:vector). La recombinación se realizó durante toda la noche a 24°C y posteriormente 2µL de dicha reacción de recombinación se transformaron en la cepa DH5α de *E. coli* por electroporación (Materiales y métodos). Las células transformantes fueron seleccionadas en medio en presencia de zeocina (50µg/mL) y las

colonias resistentes, fueron analizadas a través de una amplificación del fragmento por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos pABI4 1kb FW y el M13 RV (éste último se posiciona sobre el vector pDONR/Zeo) (Figura 13), los cuales amplifican un fragmento de 1120pb.

De las clonas positivas identificadas se escogió una y el plásmido correspondiente se purificó utilizando un kit de ROCHE de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante. Posteriormente, la presencia e integridad del inserto fue confirmada por secuenciación.

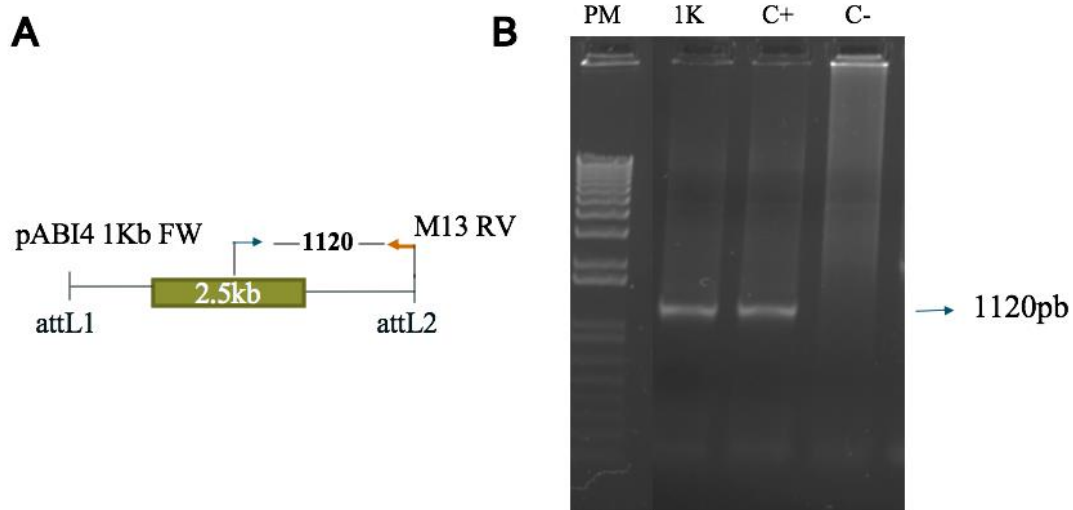


Figura 13. Generación de la construcción de 2.5kb pABI4. Comprobación de inserción del fragmento de 2.5kb en el vector de entrada pDONR/Zeo. A) Se muestra el esquema del fragmento del promotor de *ABI4* de 2.5kb, clonado en el vector pDONR/Zeo, bordeado por los sitios attL1 y attL2. Se indica dónde se posicionan los oligonucleótidos pABI4 1KbFW y M13RV, para la comprobación de la clonación del inserto de 2.5 kb. B) Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, donde se muestra el producto correspondiente a la amplificación del fragmento de 1120 pb por PCR, a partir de una colonia seleccionada. Para el control positivo se utilizó DNA plasmídico con la construcción 3kb pABI4 en el pENTR/D-TOPO. Para el control negativo no se agregó templado a la reacción.

A partir de las clonas de entrada obtenidas para cada fragmento, se procedió a transferir cada una de ellas al vector destino pMDC163, para transformación y expresión en

plantas (Figura 14A). El vector pMDC163 contiene al gen reportero de GUS expresado, el cual se encontrará bajo la regulación de cada uno de los fragmentos del promotor de *ABI4*. Para generar estas construcciones los plásmidos de entrada (las construcciones de 2 y 3kb, en el pENTR/D-TOPO y la de 2.5kb, en el pDONR/Zeo), se recombinaron con el vector destino pMDC163 por una reacción LR (Fig.14B).

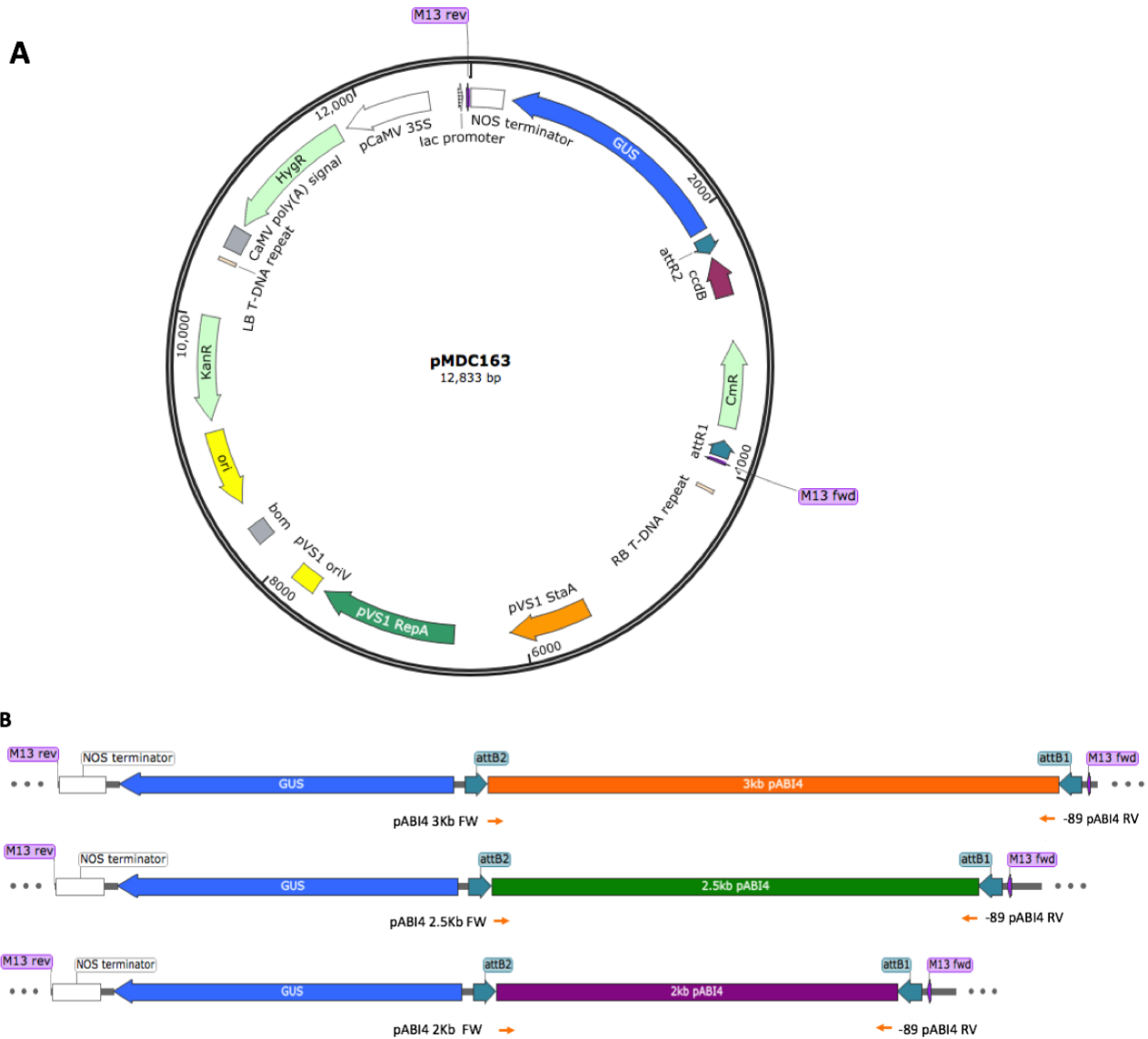


Figura14. Mapa del vector de expresión y esquema de las construcciones generadas. A) Mapa del vector de expresión pMDC163 usado para los análisis con el gen reportero de GUS B) Construcciones generadas en este estudio, fragmento de 3kb del *pABI4* (en color naranja), de 2.5kb del *pABI4* (en color verde) y de 2kb del *pABI4* (en color morado) clonados en el vector pMDC163. Se muestra con flechas de color naranja dónde se posicionan los oligonucleótidos

pABI4 3kb FW, pABI4 2.5kb FW, pABI4 2kb FW y -89 pABI4 RV con los que se amplificaron los diferentes fragmentos del promotor de *ABI4*.

Debido a que el vector de entrada (pENTR), de las construcciones de 2kb y 3kb, posee una resistencia igual que el vector destino pMDC163, para la selección de recombinantes fue necesario digerir previamente los vectores de entrada con la enzima de restricción *NruI*. El sitio de corte de la enzima *NruI* se encuentra en el pENTR por lo que de esta manera se evitó la selección de este vector con kanamicina. Una vez digeridos los vectores pENTR, se procedió a realizar la recombinación LR al vector pMDC163. Para el caso del fragmento de 2.5kb, la recombinación se hizo directamente con los plásmidos sin digerir.

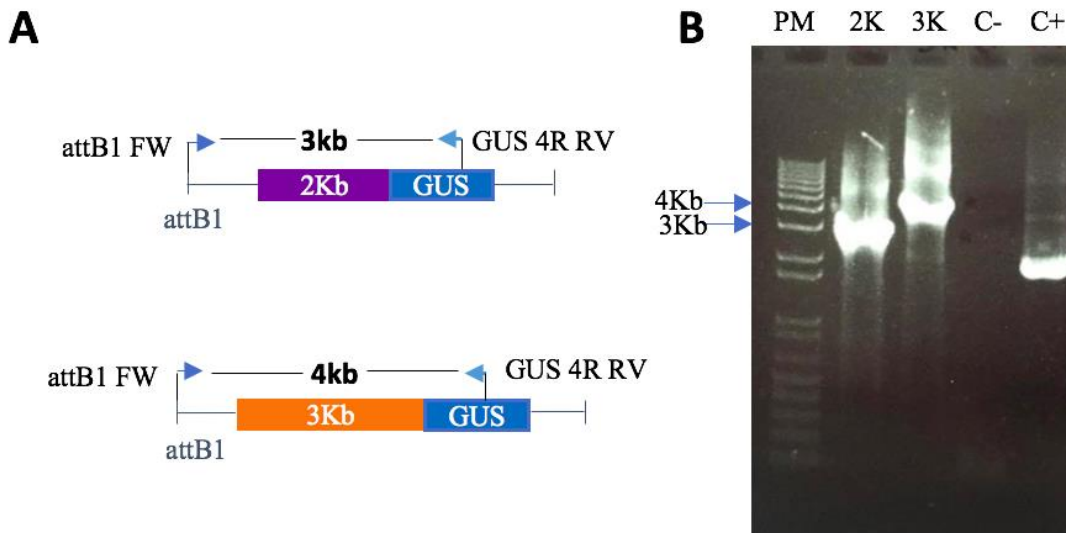


Figura 15. Comprobación por PCR de la inserción del fragmento deseado en el vector pMDC163. A) Se muestra el esquema de los fragmentos de 2kb y 3kb del promotor de *ABI4* clonados en el vector pMDC163. Se indica dónde se posicionan los oligonucleótidos attB1 FW y GUS 4R RV, para la comprobación de la clonación de los insertos. B) Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los productos correspondientes a las amplificaciones de los fragmentos de 3 y 4 kb por PCR, a partir de una colonia seleccionada. Para el control positivo se utilizó DNA plasmídico con una construcción pMCK6::GUS en el pMDC163. Para el control negativo no se agregó templado a la reacción.

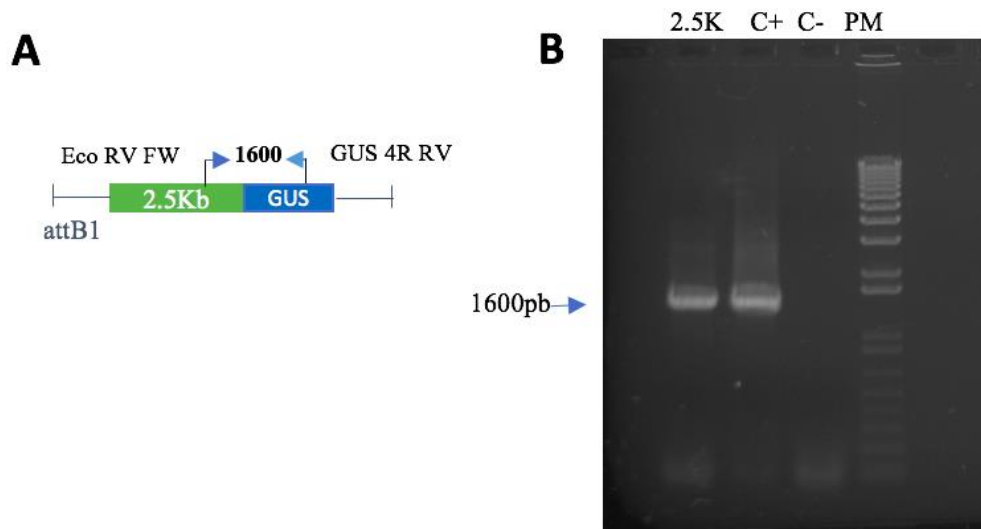


Figura16. Comprobación por PCR de la inserción del fragmento de 2.5kb en el vector destino pMDC163. A) Se muestra el esquema del fragmento de 2.5kb del promotor de *ABI4* clonado en el vector pMDC163. Se indica dónde se posicionan los oligonucleótidos Eco RV FW y GUS 4R RV, para la comprobación de la clonación del inserto. B) Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los productos correspondientes a la amplificación del fragmento de 2.5kb por PCR, a partir de una colonia seleccionada. Para el control positivo se utilizó DNA plasmídico de la construcción de 3kb p*ABI4* en el pMDC163. Para el control negativo no se agregó templado a la reacción.

Una alícuota de cada una de las diferentes reacciones de recombinación LR se transformaron en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* y las colonias resistentes a kanamicina fueron seleccionadas. Para corroborar cada una de las construcciones se extrajo el plásmido de cada construcción y se amplificó por PCR un fragmento que incluía el fragmento de interés fusionado al gen reportero de GUS. Para el caso de las construcciones con fragmentos de 2kb y 3kb se utilizaron los oligonucleótidos attB1 FW y GUS 4R RV, donde se esperaba un fragmento de 3kb y 4kb respectivamente (Figura15) y los oligonucleótidos Eco RV FW y GUS 4R RV para la construcción con el fragmento de 2.5kb (Figura16).

Como se muestra en las figuras 15 y 16 con el análisis a través de PCRs pudo corroborarse la presencia de los fragmentos de interés en el vector pMDC163 para las construcciones de 2kb, 3kb y 2.5kb, lo que demostró que correspondían a la fusión de los fragmentos del promotor de *ABI4* con el gen reportero de GUS. Finalmente se eligió

una colonia de cada construcción de la cual se purificó el plásmido destino utilizando un Kit de purificación (ROCHE) y finalmente, se corroboró la ausencia de cualquier mutación en los fragmentos, por secuenciación utilizando los oligonucleótidos M13 FW y M13 RV que bordean a los insertos.

## **7.2 Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana***

Una vez que se verificó por secuenciación cada una de las construcciones, se procedió a transferir los vectores purificados a *A. tumefaciens* para su posterior transformación en plantas. La transformación de *A. tumefaciens* se realizó a través de electroporación, y las colonias resistentes se seleccionaron en medio suplementado con ampicilina (50ng/mL) kanamicina (50µg/ml) y rifampicina (50µg/ml).

Cada una de las transformantes de *A. tumefaciens* en se corroboraron por PCR de colonia. Para la construcción de 2kb de pABI4 se utilizaron los oligonucleótidos pABI4 1kb FW y -89 pABI4 RV, donde se esperaba un fragmento de 1000pb (Figura17A). Para las construcciones con los fragmentos de 3kb y 2.5kb de pABI4 se usaron los oligonucleótidos EcoRV FW y GUS 4R RV, donde se esperaban fragmentos de aproximadamente 1500pb para ambos casos (Figura 17, B y C). De esta manera se corroboró la presencia del vector de expresión correcto para cada una de las construcciones en *A. tumefaciens* antes de ser usadas para su transformación en planta.

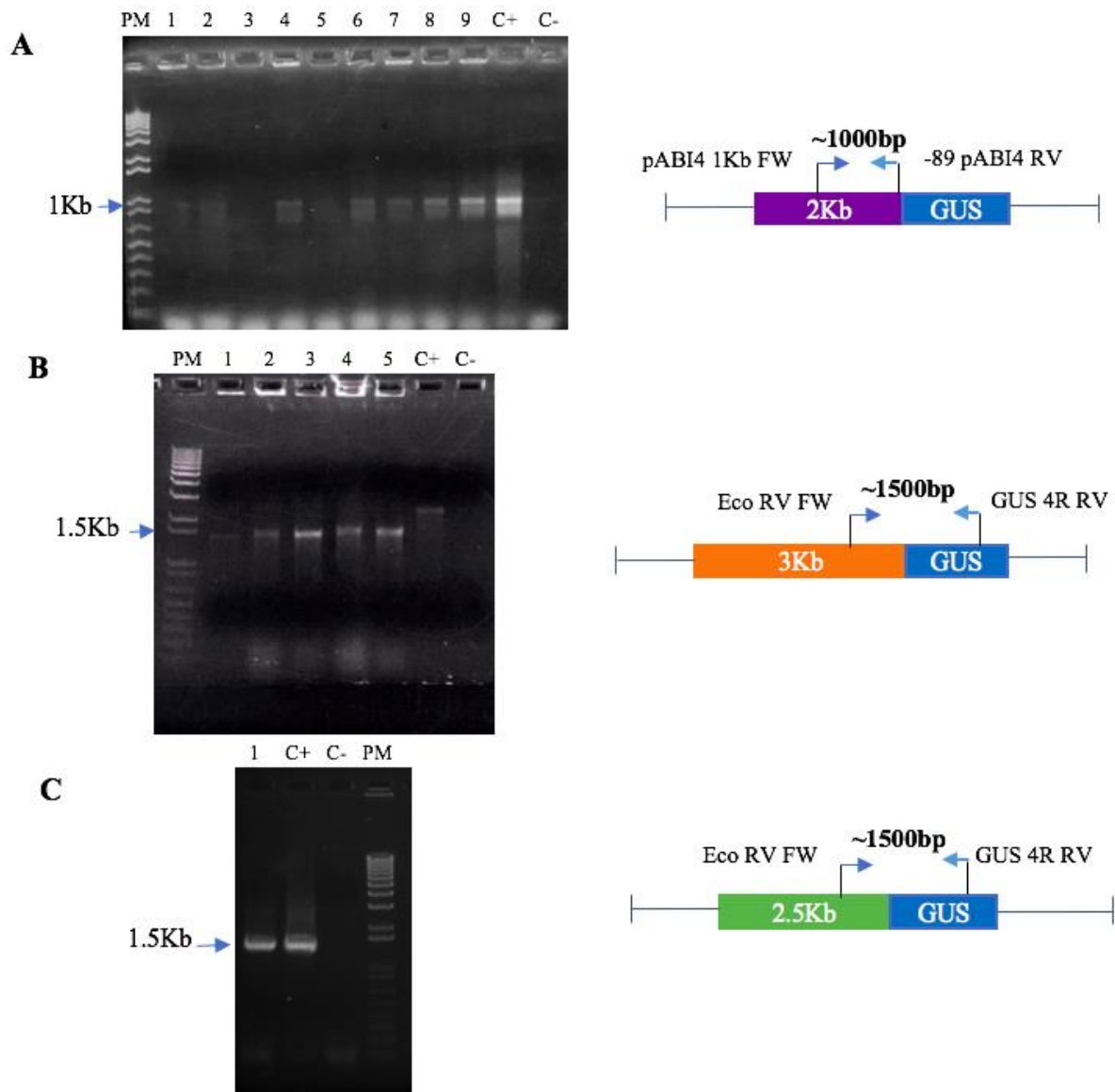


Figura 17. Comprobación de la presencia del vector de expresión en las colonias de *A. tumefaciens*. Del lado derecho se muestran los esquemas de los fragmentos de 2, 2.5 y 3kb del promotor de *ABI4* clonado en el vector pMDC163. Se indica dónde se posicionan los oligonucleótidos Eco RV FW, pABI4 1kb FW, -89 pABI4 RV y GUS 4R RV, para la comprobación de la clonación de los insertos en *A. tumefaciens* A-C) Geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, donde se muestran los productos correspondientes a la amplificación por PCR de los fragmentos de 1kb (A) y de 1.5kb (B y C), a partir de diferentes colonias seleccionadas. Para el control positivo se utilizó DNA plasmídico con la construcción de 3kb pABI4 en el pENTR/D-TOPO (A), con la construcción pMKK6::GUS en el pMDC163 (B) y con la construcción de 3kb pABI4 en el pMDC163. Para los controles negativos no se agregó templado a la reacción.



Plantas silvestres de *A. thaliana* del ecotipo Col-0 fueron crecidas en sustrato MetroMix en fotoperiodo 16 h luz:8 h oscuridad a 22°C, hasta que formaran inflorescencias. A cada planta se le cortaron las flores abiertas, dejando únicamente los botones florales. La transformación se realizó mediante el método de inmersión floral (Materiales y métodos); se transformaron 5 plantas de *A. thaliana* por cada construcción (Figura 18).

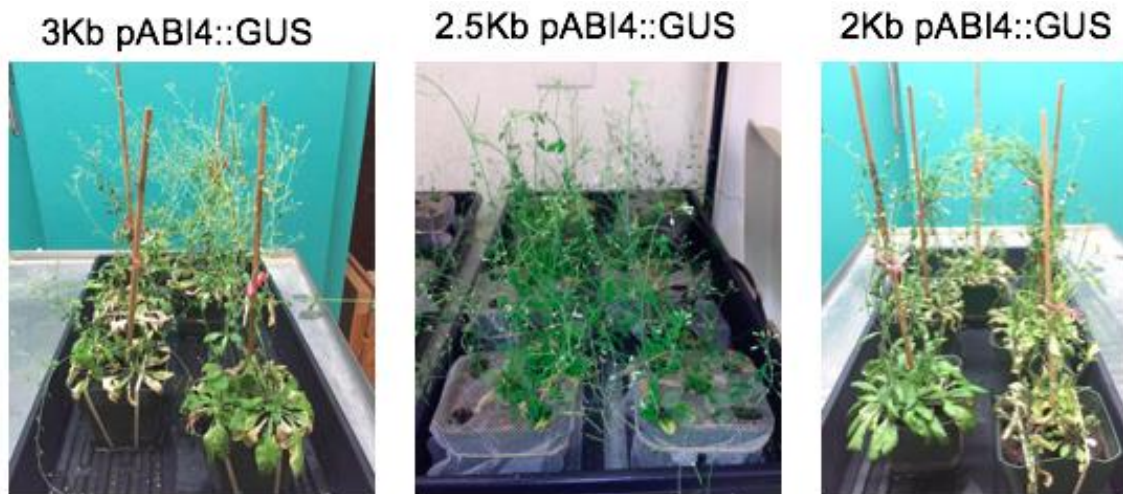


Figura 18. Plantas de *A. thaliana* Col-0 transformadas. Fotos de las plantas que fueron sometidas al proceso de transformación por el método de inmersión floral con *A. tumefaciens* con las construcciones generadas de 3, 2.5 y 2 kb del promotor de *ABI4*.

De las plantas transformadas (T0) se obtuvo semilla (T1), a partir de la cual se realizó una selección de las plantas transformadas (T1) en medio GM1X (Métodos), suplementados con higromicina 50µg/mL. Las plántulas T1 resistentes, se transfirieron a sustrato, respresentando cada una de ellas una línea independiente. Por cada construcción se seleccionaron un mínimo de 5 plantas, que utilizaron para generar líneas independientes (Tabla 1).

Para corroborar la presencia del transgén en las plantas seleccionadas T1, se purificó DNA genómico de hojas caulinares de diferentes plantas y se comprobó por PCR la presencia del transgén de interés. Para realizar dicho análisis se usaron los oligonucleótidos pABI4 1kb FW y GUS 3R RV, que amplifican un fragmento de 1.5 kb, que corresponde a la fusión del promotor de *ABI4* con el gen reportero de GUS. Los

oligonucleótidos permiten la amplificación de un fragmento que abarca 1 kb de la región regulatoria del promotor de *ABI4* hasta 500 pb del gen reportero de GUS. Como se observa en la Figura 19 se comprobó la amplificación de un producto de 1.5 kb que corresponde al esperado, en las plantas transformadas con las de 2 y 3 kb.

Las líneas con la construcción de 2.5kb fueron sometidas a análisis histoquímicos en la generación T1 directamente para comprobar la presencia del transgén, mediante la observación de la tinción correspondiente a la actividad de GUS en las plántulas.

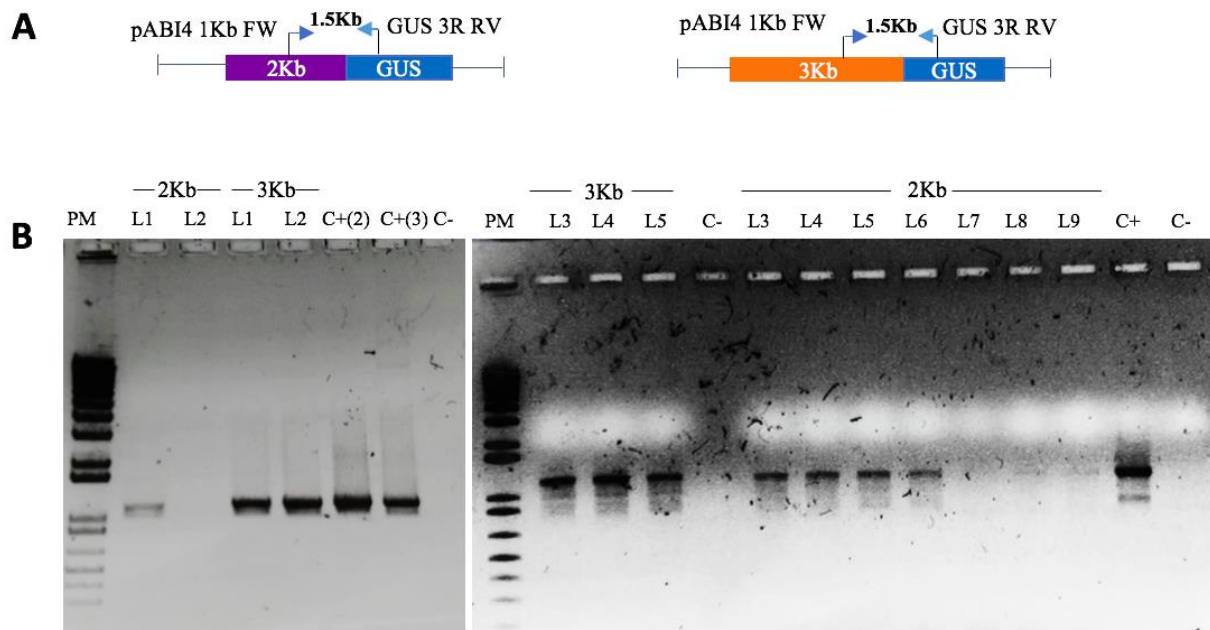


Figura 19. Comprobación por PCR de la presencia de los transgenes, a partir de DNA genómico de las plantas de la generación T1. A) Se muestran los esquemas de los fragmentos de 2 y 3kb del promotor de *ABI4* clonados en el vector pMDC163. Se indica dónde se posicionan los oligonucleótidos p*ABI4* 1kb FW y GUS 3R RV, para la comprobación de la presencia de los transgenes en las plantas de la generación T1. B) Geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, donde se muestran los productos correspondientes a la amplificación del fragmento de 1.5kb por PCR, a partir de DNA genómico extraído de las plantas de la generación T1. Para el control positivo se utilizó DNA plasmídico con la construcción de 3kb p*ABI4* en el pMDC163. Para el control negativo no se agregó templado a la reacción.

### 7.3 Selección de líneas transgénicas homocigas

Una vez seleccionadas las líneas T1, éstas fueron transferidas a sustrato para generar la T2. A partir de semillas de la T2 se evaluaron las proporciones de plantas resistentes al agente selectivo, por cada línea independiente, correspondientes a cada una de las tres construcciones de interés. Se buscaban las líneas con una sola inserción del transgén, que presentaran una segregación de 3:1 en la generación T2, es decir 75% de las plantas deberían ser resistentes al antibiótico, mientras que las líneas con más de una inserción segregarían desviadas de esta proporción. Como se muestra en la Tabla 2, se cuantificó la segregación de cada línea y se utilizó la prueba de la  $\chi^2$  para corroborar que las proporciones obtenidas eran significativas.

Para el caso de la construcción de 3 kb se seleccionaron las líneas 2, 3 y 5 con base en sus proporciones y el patrón de expresión tras realizar análisis histoquímicos preliminares (Figura 1 suplementarias). Posteriormente en la generación T3 se seleccionaron las líneas L5-7, L2-8 y L3-7 para llevar a cabo los ensayos histoquímicos y fluorimétricos. De igual manera, para la construcción de 2 Kb las líneas que se seleccionaron fueron la 1, 3 y 9 (Figura 2, suplementarias), posteriormente, en la generación T3 se seleccionaron las líneas L1-3, L3-5, L9-4. En el caso de la construcción de 2.5kb, las líneas que presentaron una segregación 3:1 fueron la 1, 2, 5, 6 y 9, mismas que se seleccionaron para seguir su segregación y con los análisis histoquímicos preliminares (Figura 3, suplementarias).

Alrededor de 10 plántulas de cada una de las líneas de la generación T2 seleccionadas fueron sembradas para obtener la siguiente generación (T3) de manera independiente. Las semillas de la T3 fueron sembradas en medio con higromicina (50 $\mu$ g/ml), para identificar las líneas homocigotas de plantas de cada línea independiente, en la que el 100% de las plántulas presentaron resistencia al agente selectivo.

Tabla 2. Proporción de segregación de resistencia al agente selectivo (higromicina) de plantas transgénicas (T2) con las diferentes construcciones de pABI4::GUS (P.value  $\geq 0.05$ ). En color se muestran las líneas que se seleccionaron para seguir con la generación de las líneas homocigotas para las diferentes construcciones.

	Líneas	Total	Resistentes	No resistentes	Resistentes (%)	P.value
3Kb pABI4::GUS	Línea 1	60	35	25	59%	0.003
	Línea 2	75	48	27	64%	0.028
	Línea 3	72	47	25	65%	0.057
	Línea 4	68	48	20	70%	0.401
	Línea 5	74	51	23	67%	0.227
	2.5Kb pABI4::GUS	Línea 1	57	41	16	72%
Línea 2		54	38	16	70%	0.432
Línea 3		56	42	14	75%	1.000
Línea 5		54	45	9	83%	0.157
Línea 6		58	47	11	81%	0.289
Línea 7		56	44	12	78%	0.537
Línea 8		57	49	8	86%	0.056
Línea 9		54	39	15	72%	0.637
Línea 10		P59	43	16	73%	0.707
2Kb pABI4::GUS		Línea 1	96	76	20	79%
	Línea 2	87	64	23	74%	0.757
	Línea 3	100	79	21	79%	0.356
	Línea 4	110	64	46	58%	0.000
	Línea 5	99	71	28	71%	0.451
	Línea 6	96	75	21	78%	0.480
	Línea 7	103	84	19	82%	0.125
	Línea 8	102	76	26	75%	0.909
	Línea 9	62	50	12	81%	0.305

## 7.4 Análisis histoquímico de $\beta$ -glucoronidasa

### 7.4.1 Patrón de expresión durante la embriogénesis

Plantas homocigotas de tres líneas independientes para cada construcción fueron seleccionadas, a partir de las cuales se procedió a determinar el patrón de expresión durante el desarrollo de la semilla, mediante ensayos histoquímicos de la actividad de GUS (Métodos). Con este propósito se tiñeron silicuas de las diferentes líneas de plantas transgénicas. Este análisis se llevó a cabo en por lo menos tres líneas de cada construcción (Figuras suplementarias), sin embargo, para fines de la presentación de los resultados sólo se muestra una línea representativa.

De manera consistente con reportes previos de la construcción A4 (Arroyo *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2009), se observó tinción por actividad de GUS en los embriones de las plantas 3kb pABI4::GUS a lo largo de múltiples fases del desarrollo, desde la fase globular (Figura 20 A), pasando por la de transición (Figura 20 B), de corazón (Figura 20 C), de torpedo (Figura 20 D) hasta el embrión maduro (Figura 20 E, F y G). Sin embargo, en la semilla madura no se observó tinción, de manera idéntica a la construcción previamente reportada (Bossi *et al.*, 2009).

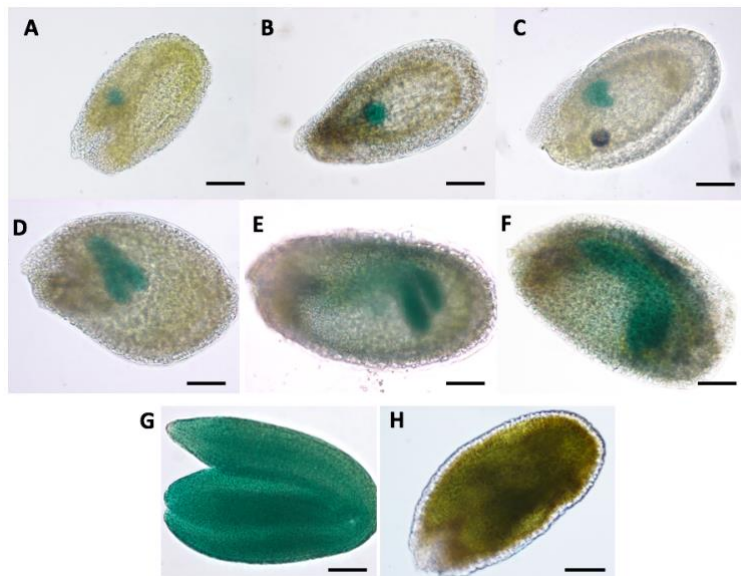


Figura 20. Tinción de GUS en embriones de plantas de una línea representativa con la

construcción de 3kb pABI4::GUS. Se presenta actividad de GUS en los embriones de las etapas A) globular, B) triangular, C) corazón D) torpedo, E) y F) embriones maduros, G) embrión maduro disectado y H) semilla madura. Barras = 100  $\mu$ m

En contraste, al realizar los ensayos histoquímicos en las semillas de las líneas homocigotas (T3) con la construcción de 2kb pABI4::GUS, no se observó tinción en los embriones (Figura 21 A y B). La falta de expresión de GUS en embriones se observó también en las líneas heterocigotas (T2) con la construcción de 2.5kb pABI4::GUS (Figura 21 C y D). Debido al tiempo de duración de este proyecto no fue posible llegar hasta generar las plantas homocigotas de ésta construcción por el tiempo generacional de *A. thaliana*; aunque este patrón no debería ser diferente en líneas homocigotas.

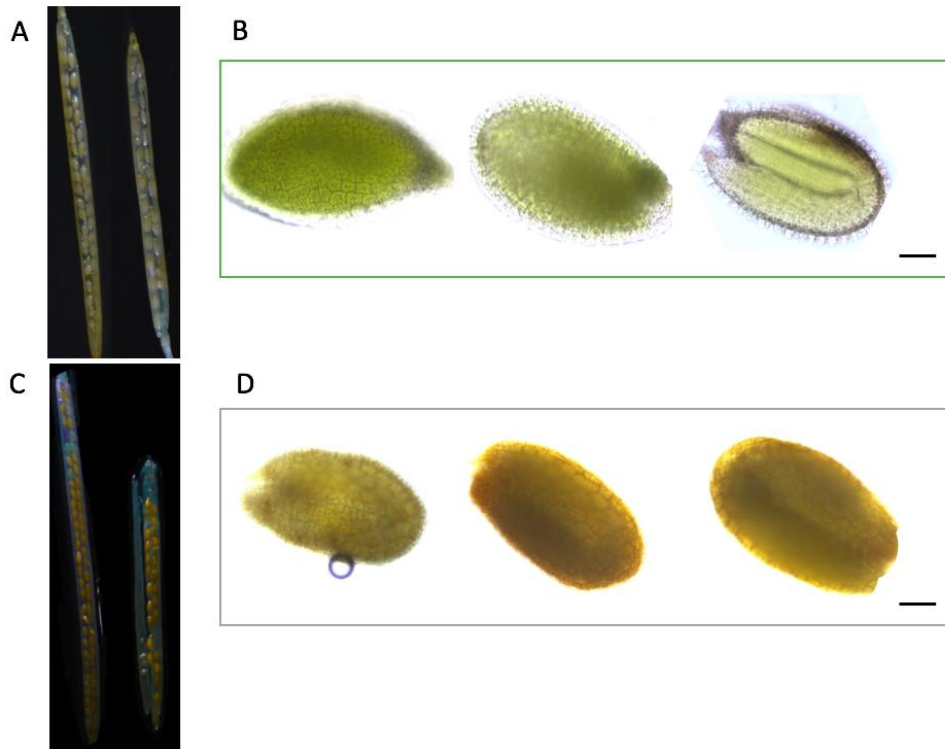


Figura 21. Patrón de expresión de embriones de plantas de líneas representativas transgénicas -2kb y -2.5kb pABI4::GUS. Se muestra la ausencia de actividad de GUS en las silicuas, A) y C) y embriones de diferentes estados de desarrollo, B) y D); a partir de líneas homocigotas para la construcción de 2 kb, A) y B) y de 2.5 kb C) y D). Barras = 100  $\mu$ m

Por lo tanto, se puede concluir que las semillas de la construcción de 3kb presentan expresión del gen reportero GUS durante todo su desarrollo, excepto cuando llegan a la maduración, mientras que las de las construcciones de 2kb y 2.5kb no presentan expresión durante el desarrollo de las semillas. Por lo tanto, al parecer la región del promotor de *ABI4* río arriba de las 2.5kb contiene las secuencias requeridas para la expresión del gen *ABI4* durante la embriogénesis y desarrollo de la semilla.

## **7.4.2 Determinación del patrón de expresión de plántulas de las diferentes construcciones**

### **Patrón de expresión de plántulas con 3 kb de *pABI4***

Se realizaron análisis histoquímicos para detectar la actividad del reportero de GUS y determinar el patrón de expresión del transcrito de *ABI4*, en plántulas crecidas en medio GM1X o en presencia de azúcar (medio MS1X con 4% de glucosa).

Para la construcción de -3kb *pABI4::GUS* se analizaron plántulas de 11 días después de la germinación de cinco líneas independientes, tanto pertenecientes a la generación T2 (heterocigotas) como de sus hijas homocigotas de la generación T3 crecidas en medio GM1X. Sorprendentemente, se observó que los patrones de expresión de GUS eran diferentes entre las dos generaciones (Figura 22).

Mientras que en 5 líneas independientes T2 se observa una expresión de GUS en el epicótilo, en los cotiledones y en las hojas primarias, en la generación subsecuente (T3), este patrón se mantiene sólo en tres líneas (L5-7, L2-8, L3-7), mientras que en dos de ellas (L1 y L4) no se detecta expresión en las hojas primarias. Interesantemente, este último patrón de expresión es idéntico al reportado para la línea 4A que contiene 3.4 kb *pABI4*, que ha sido usada de referencia en varios estudios y en la que se ha concluido que guarda un patrón de expresión semejante al del transcrito endógeno (Soderman *et al.*, 2000). Aunque, las plántulas de la 4A después del día 6 disminuyen significativamente

su expresión hasta ser casi imperceptible a los 11 días mientras que en las líneas analizadas en este trabajo se observa expresión alta hasta el día 11. Una posible explicación de este cambio generacional del patrón de expresión podría deberse a procesos epigenéticos.

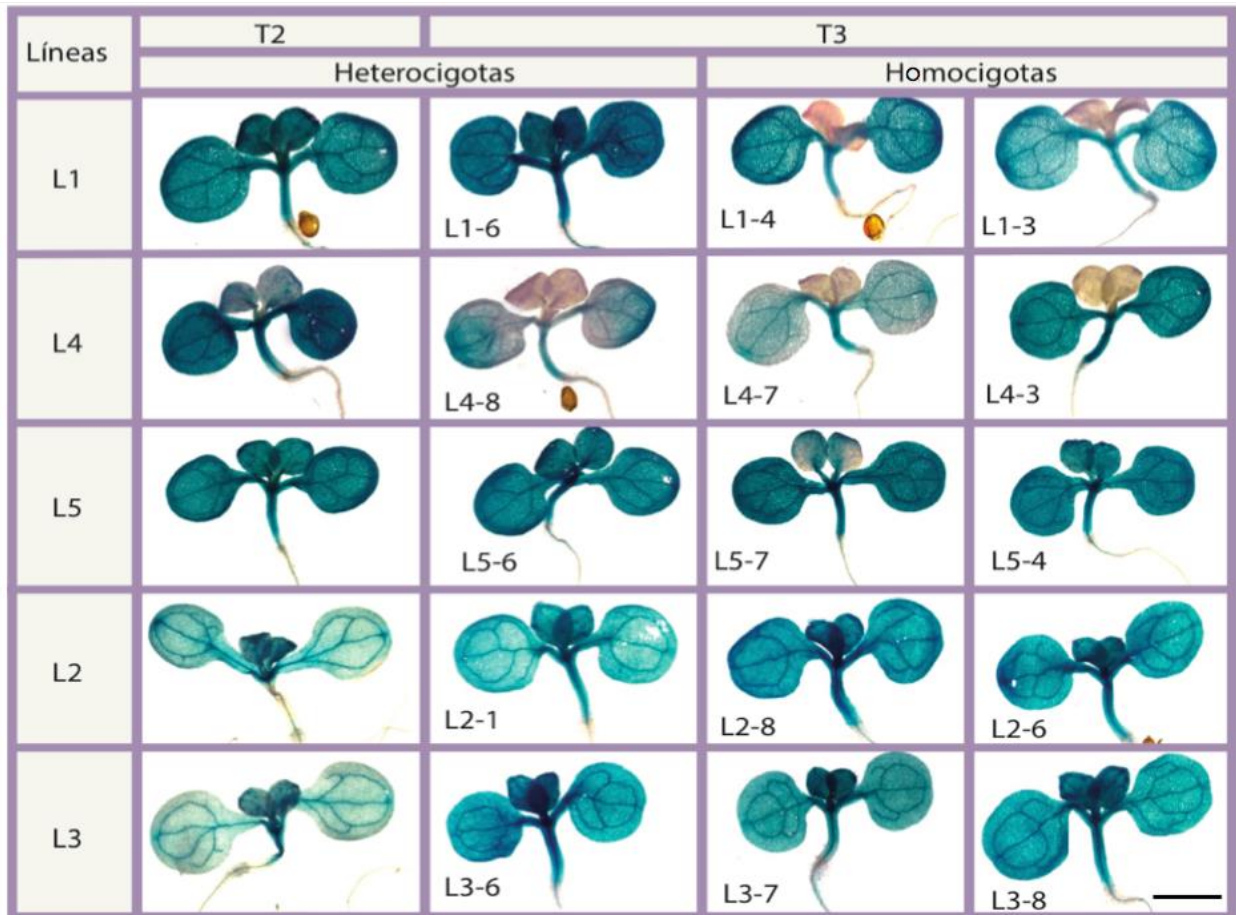


Figura 22. Patrón de expresión de plantas de 11 días de edad de líneas representativas transgénicas -3kb *pABI4::GUS* de la generación T2 (heterocigotas) y T3 (homocigotas). De la generación T2 se muestran plántulas de las líneas 1,4,5,2 y 3. De la generación T3 se muestran plántulas de líneas independientes provenientes de una población heterocigota (L1-6, L4-8, L5-6, L2-1, L3-6) y líneas independientes de poblaciones homocigotas (L1-4, L1-3, L4-7, L4-3, L5-7, L5-4, L2-8, L2-6, L3-7, L3-8). Barra= 5 mm

Posteriormente, se determinó que el patrón de expresión de GUS representativo (3 de 5 líneas) observado en plántulas de las líneas homocigotas de -3kb *pABI4::GUS* es el que



se resume en la figura 23, en la que se observa una alta expresión en el epicótilo, cotiledones y hojas primarias que se mantiene aún a los 11 días. Por otro lado, al igual que la línea 4A, todas nuestras líneas de -3kb *pABI4::GUS* expresan GUS en la cofia de la raíz durante los primeros 6 días después de la germinación (Fig. 8D) y en los siguientes estadios ésta se pierde (Figura 23).

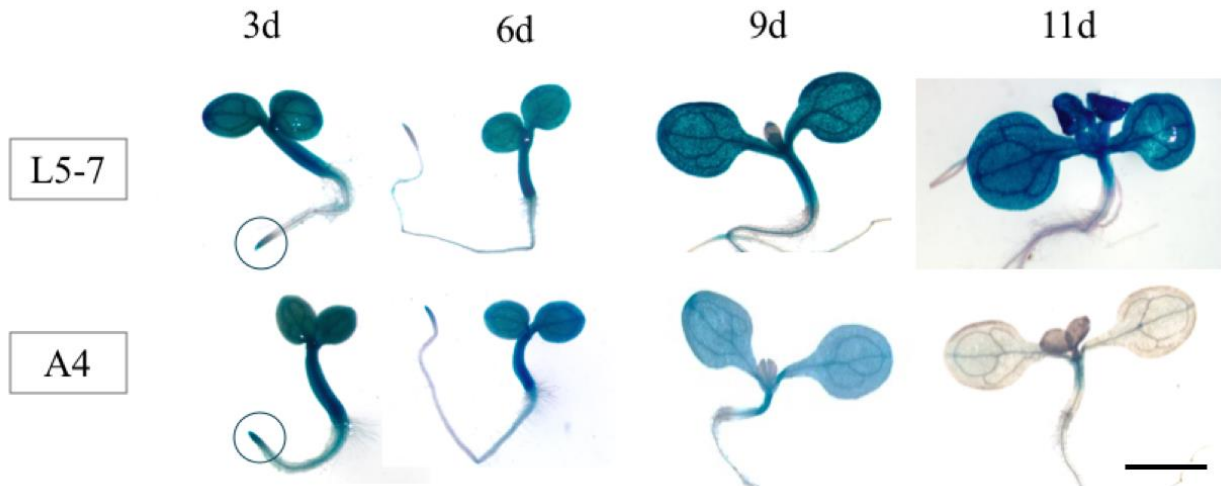


Figura 23. Patrón de expresión de plántulas de diferentes edades (3 días, 6 días, 9 días, 11 días), crecidas en medio GM1X de la línea representativa L5-7 con 3kb *pABI4::GUS* y la línea A4 de referencia. Barra= 5 mm

### Patrón de expresión de plántulas de líneas de 2 kb *pABI4*

Para determinar el patrón de expresión de las líneas con la construcción de 2kb del promotor de *ABI4* (*pABI4::GUS*) se realizaron los ensayos histoquímicos con plántulas de las diferentes líneas independientes crecidas en medio GM1X, tanto de la generación T2 (Anexo) como posteriormente con tres líneas homocigotas (L1-3, L3-5 y L9-4). Estas líneas fueron seleccionadas debido a que la segregación se ajustaba a un solo transgén (75% kan<sup>r</sup>) y se realizó el análisis del patrón de expresión representativo de esta construcción.

Como se muestra en la figura 24, se observa tinción en el epicótilo, cotiledones y sólo una leve expresión en el ápice de las hojas primarias, no se observa expresión de GUS en la raíz en ningún momento. A diferencia de las plántulas con la construcción de -3kb *pABI4::GUS*, no observamos diferencias significativas en el patrón de expresión de las diferentes líneas analizadas.

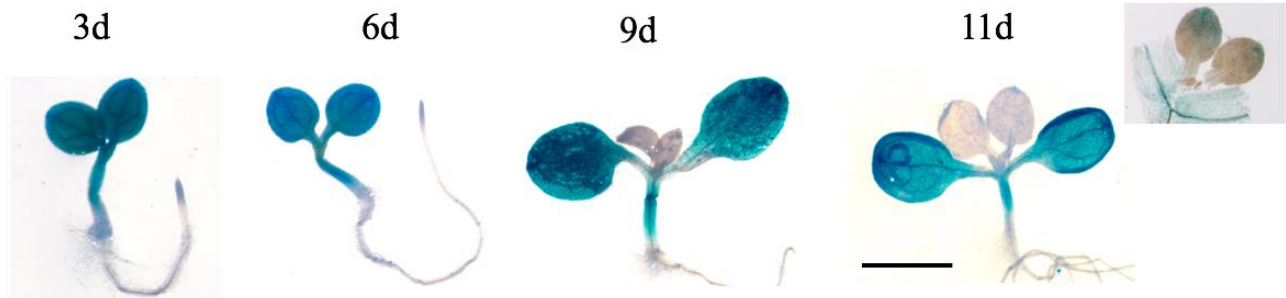


Figura 24. Patrón de expresión de plántulas de diferentes edades (3 ,6, 9 y 11 días), crecidas en medio GM1X de la línea representativa L3-5 con 2kb *pABI4::GUS*. Barra= 5 mm

### **Patrón de expresión de plántulas de líneas de 2.5 kb *pABI4***

Para el caso de las líneas de -2.5kb del promotor *ABI4* (*pABI4::GUS*) los ensayos histoquímicos se realizaron únicamente en las plantas heterocigotas de la generación T2, ya que no se pudo analizar la generación homocigota debido al tiempo que se requiere para la generación de este material. Sin embargo, debe de enfatizarse que dicho patrón teóricamente debe ser el mismo que en la condición heterocigota. Al igual que para el caso de las líneas con -2kb *pABI4::GUS*, las cinco líneas con -2.5 kb *pABI4::GUS* analizadas presentaron un patrón de expresión idéntico. Se observó expresión del reportero GUS en el epicótilo, cotiledones y en las hojas primarias donde en estadios tempranos (9 días) ésta se detecta en el ápice de las hojas y posteriormente a los 11 días se expande a toda la hoja. Además, se observó tinción en el tejido vascular de la raíz durante los estadios tempranos, la cual se pierde y vuelve a expresarse en el día 9 y el día 11 de desarrollo, en estas plántulas no se observa tinción en la cofia de la raíz

en los estadios tempranos a diferencia de las líneas con -3kb *pABI4::GUS* y la 4A de referencia (3.4 kb *pABI4::GUS*) (Fig.25).

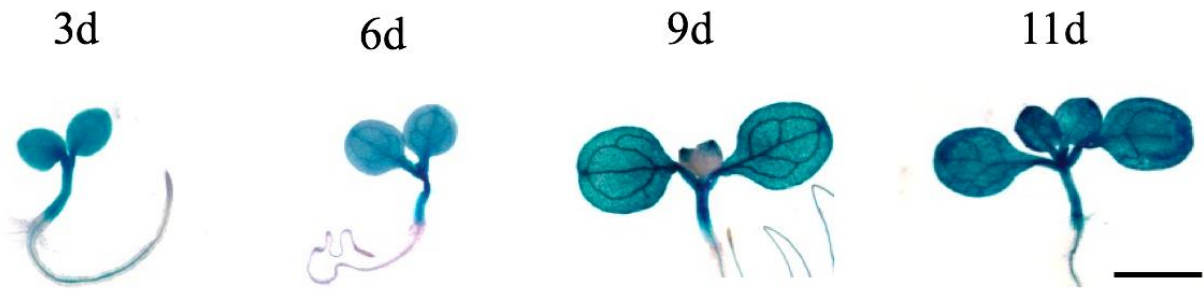


Figura 25. Patrón de expresión de plántulas de diferentes edades (3 días,6 días, 9 días, 11 días), crecidas en medio GM1X de la línea representativa L2 (generación T2) con 2.5kb *pABI4::GUS*. Barra= 5 mm

## 7.5 Regulación por glucosa del promotor de *ABI4*

Como se mencionó anteriormente, estudios iniciales habían mostrado que la expresión del gen *ABI4* se induce por glucosa y que dicha inducción se observa en una construcción que lleva 3.4 kb del promotor de *ABI4* y la región 5'UTR (Arroyo et al., 2003). Con la idea de poder delimitar la región que media dicha regulación, se realizaron ensayos histoquímicos con los diferentes fragmentos del promotor de *ABI4* en ausencia y en presencia de glucosa.

Como se observa en las figuras 26 y 27, plántulas de tres líneas homocigotas para la construcción de -3kb *pABI4::GUS* (L1-4, L4-7 y L5-7) y para la construcción de -2kb *pABI4::GUS* (L1-2, L3-5 y L9-4) fueron crecidas en medio GM1X adicionado con 1% de sacarosa o medio MS1X con 4% de glucosa. En estos ensayos se observó una inducción clara de la tinción de GUS en las líneas de 3kb *pABI4::GUS* L1-4 y L5-7 cuando son crecidas en glucosa en contraste de aquellas crecidas en 1% Sac. En el caso de las plántulas de la línea L5-7 fue más difícil observar alguna diferencia de tinción ya que el nivel de expresión en esta línea es bajo en comparación con las otras líneas (Figura 26).

Se puede inferir con estos análisis que existe una inducción de la expresión de *ABI4* en las líneas con -3kb *pABI4::GUS*, no obstante; estos análisis, al ser cualitativos, no nos permiten concluir nada al respecto.

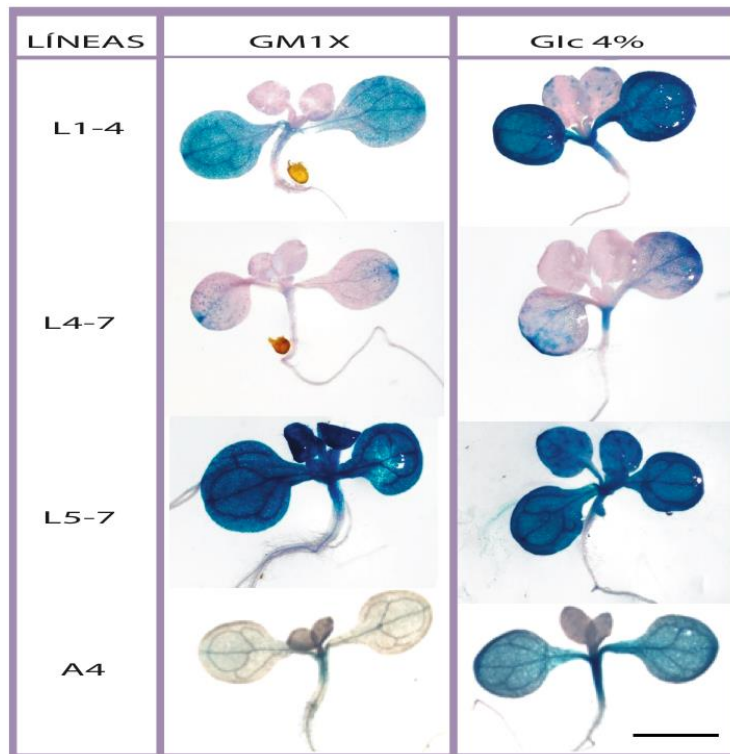


Figura 26. Patrón de expresión de plántulas de líneas homocigotas representativas de 3kb *pABI4::GUS* de 11 días de edad, crecidas en medio GM1X (columna izquierda) y MS1X adicionado con glucosa al 4%(columna derecha). Barra= 5 mm

En contraste, en las líneas con la construcción de -2kb *pABI4::GUS* no parecen haber diferencias de expresión entre las plántulas crecidas en medio sin glucosa y las crecidas en medio suplementado con glucosa al 4% (Figura 27), únicamente con base en los niveles de tinción observados.

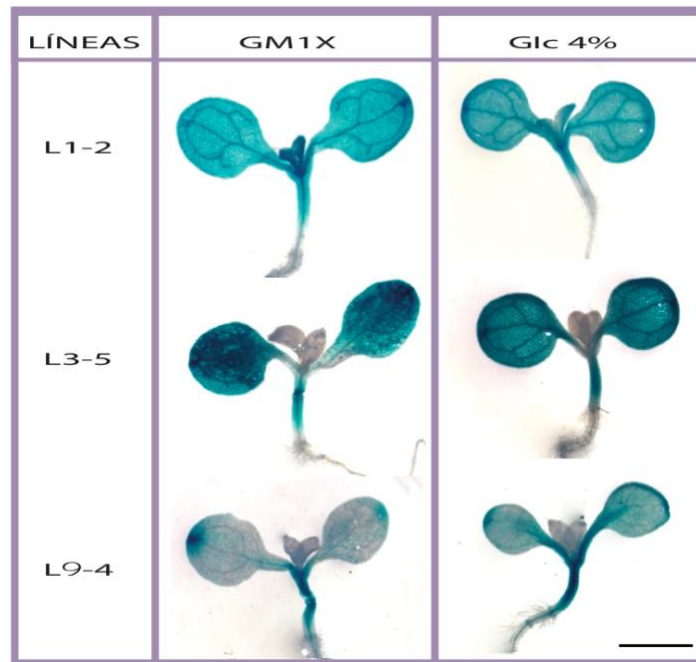


Figura 27. Patrón de expresión de plántulas de 11 días de edad de líneas homocigotas representativas con -2kb *pABI4::GUS*, crecidas en medio GM1X (columna izquierda) y MS1X adicionado con glucosa al 4%(columna derecha). Barra= 5 mm

Finalmente, para el caso de las plántulas con la construcción de -2.5kb *pABI4::GUS*, al igual que las de 2kb *pABI4::GUS*, tampoco se observan diferencias significativas entre los tratamientos con glucosa, y con sacarosa, ya que en todas las líneas la expresión es muy fuerte, tanto en las plántulas crecidas en medio GM1X como en las crecidas en medio adicionado con glucosa 4% (Figura 28). Por lo tanto, este análisis sugiere que en las líneas con la construcción de -2.5kb y -2kb *pABI4::GUS* no hay una inducción del gen *ABI4* en presencia de glucosa.

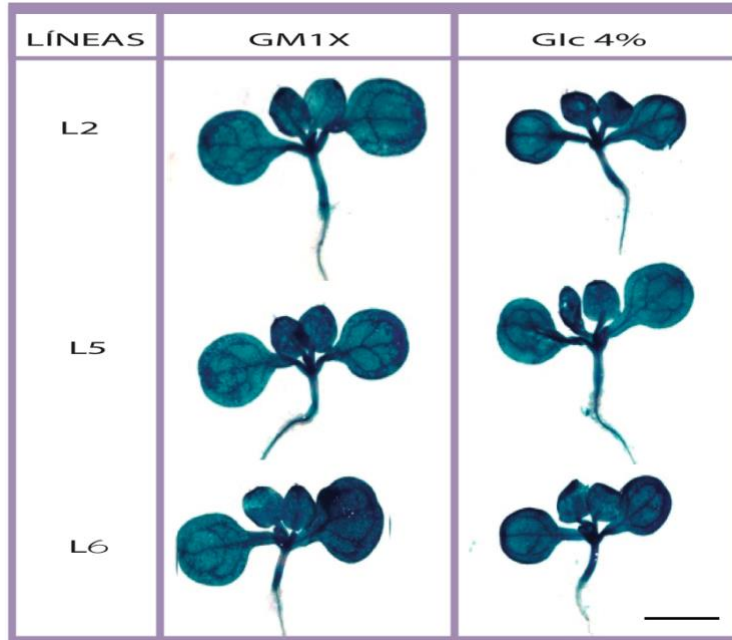


Figura 28. Patrón de expresión de plántulas de 11 días de edad de líneas heterocigotas representativas de -2.5 kb *pABI4::GUS*, crecidas en medio GM1X (columna izquierda) y MS1X adicionado con glucosa al 4%(columna derecha). Barra= 5 mm

## 7.6 Cuantificación de la expresión de GUS en las líneas crecidas en ausencia y presencia de glucosa

Ya que el análisis histoquímico de GUS es una técnica cualitativa, para poder obtener datos cuantitativos de los niveles de expresión de *pABI4::GUS* en las líneas con las construcciones de -2kb *pABI4::GUS* y de -3kb *pABI4::GUS* en respuesta a glucosa, se llevaron a cabo ensayos fluorimétricos. Este tipo de análisis permite medir la actividad enzimática de GUS, usando la diferencia en la fluorescencia entre el producto y el sustrato, por lo que se puede inferir la concentración de la enzima presente y por lo tanto su nivel de expresión. Para dicho análisis se utilizaron las líneas homocigotas de cada construcción que habían sido anteriormente caracterizadas en los ensayos histoquímicos. Con este propósito se colectaron diez plántulas de 5 días de edad crecidas en medio GM 0.5X con 1% de sacarosa o bien en presencia de glucosa 4%. En este análisis se usó la línea 4A que porta 3.4 kb de *pABI4* como referencia, ya que

previamente se había reportado la inducción del reportero *GUS* en plántulas de esta línea en presencia de glucosa (Arroyo *et al.*, 2003).

Como se ve en la figura 29, las tres líneas con -3kb *pABI4::GUS* analizadas mostraron una mayor actividad enzimática de *GUS* cuando las plántulas se crecieron en medio con glucosa 4% que en ausencia de glucosa. Los niveles de inducción por glucosa observados oscilan entre 1.5 a 3 veces en presencia de 4% de glucosa. Esta inducción también es parecida a la que se observa con la línea de referencia 4A. Con este ensayo se corrobora que las secuencias en *cis* para dicha respuesta están incluidas en la región de -3 kb *pABI4* arriba del ATG (arriba del sitio de inicio de la traducción).

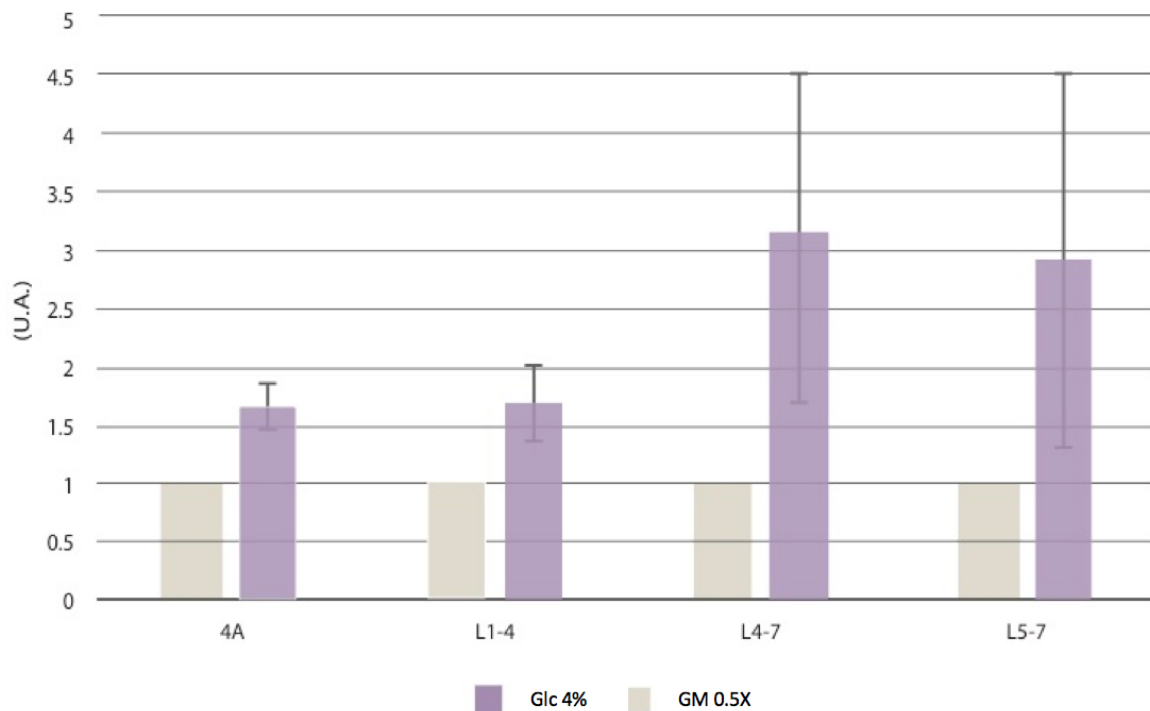


Figura 29. Niveles de expresión del gen *GUS* obtenidos por ensayos fluorimétricos con plántulas de 5 días de edad de líneas independientes (L1-4, L4-7 y L5-7) con -3kb *pABI4::GUS*, crecidas en medio GM0.5X (en gris) y MS0.5X adicionado con glucosa al 4% (en morado). Los niveles de expresión de las plántulas crecidas en medio GM0.5X fueron normalizados a 1 U.A. (Unidades Arbitrarias).

Se realizaron experimentos idénticos para las líneas con la construcción -2kb *pABI4::GUS*. A diferencia de las líneas con la construcción de -3kb *pABI4::GUS*, estas líneas no presentan diferencias significativas en los niveles de expresión de GUS entre los diferentes tratamientos. Por lo tanto con este resultado concluimos que en estas líneas no hay inducción de la expresión de *pABI4::GUS* en respuesta a glucosa (Figura 30) y que los elementos en *cis* involucrados en la respuesta a glucosa no están presentes en dicha construcción. Estos resultados permiten inferir que las secuencias en *cis* involucradas en la respuesta a glucosa se encuentran en la región promotora entre 2kb y 3 kb río arriba del gen *ABI4*.

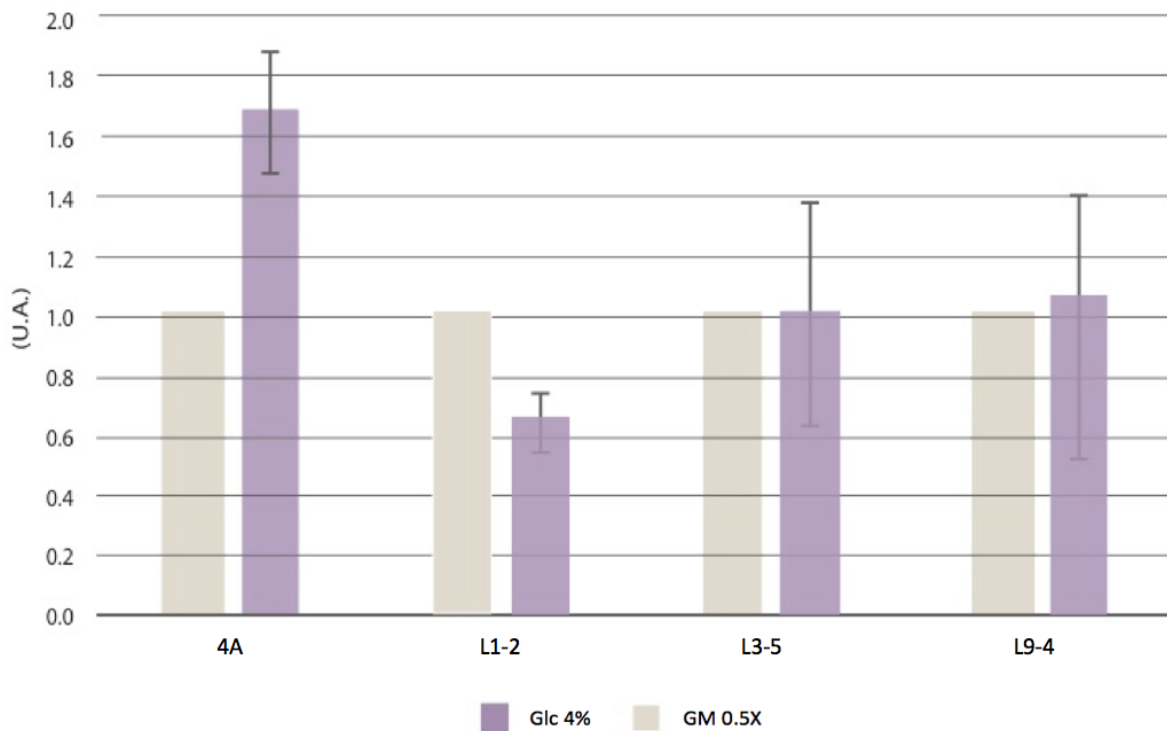


Figura 30. Niveles de expresión del gen GUS obtenidos por ensayos fluorimétricos con plántulas de 5 días de edad de líneas independientes (L1-4, L4-7 y L5-7) con -2kb *pABI4::GUS*, crecidas en medio GM0.5X (en gris) y GM0.5X adicionado con glucosa al 4% (en morado). Los niveles de expresión de las plántulas crecidas en medio GM0.5X fueron normalizados a 1 U.A. (Unidades Arbitrarias).



En el caso de las líneas con la construcción 2.5kb pABI4::GUS el ensayo fluorimétrico no pudo ser realizado debido a que no se tuvieron las líneas homocigotas a tiempo.

## 7.7 Análisis de los elementos en *cis* reportados en la región acotada del promotor del gen *ABI4*

Una vez delimitada la región de respuesta a azúcares a 1000pb, se realizó un análisis *in silico*, con ayuda de la base de datos Arabidopsis Gene Regulatory Information Server (*AGRIS*) con el fin de encontrar motivos conservados que se hayan relacionado a la regulación por azúcares anteriormente. Además, se realizó una extensa búsqueda en la literatura de los elementos en *cis* dentro del promotor de *ABI4* reportados, a los que se unen diferentes factores. Estos se muestran marcados en la secuencia del promotor *ABI4* en la figura 31.



Figura 31. Localización de elementos en *cis* que son sitios de unión de diferentes factores que se unen al promotor de *ABI4*.

Dentro de la región de 1000pb delimitada en este estudio encontramos cinco elementos en *cis* que previamente se han identificado en la regulación por azúcares:

La caja CAACA de unión al factor RAV1 (Feng, C.-Z., 2014), una caja G, que de acuerdo con el modelo de acoplamiento propuesto por Wind et al., 2012 es parte de la interacción entre DNA y el dominio AP2, un elemento CE1 de unión a *ABI4* (Reeves, W.M. et al. 2011) y un elemento RY al que se une el factor LEC2 (Suzuki and McCarty, 2008; Junker et al., 2010).

## 8. DISCUSIÓN

En diversos estudios con *A. thaliana* se ha determinado que *ABI4* se expresa en ventanas discretas del desarrollo, se ha reportado expresión durante la maduración de la semilla y en plántulas poco después de la germinación (Soderman *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2009). En las plántulas, el patrón de expresión coincide con el establecimiento del crecimiento autotrófico (López-Molina *et al.*, 2001; Brocard *et al.*, 2002); en etapas del desarrollo posteriores, *ABI4* se expresa a niveles bajos, pero aún detectables (Soderman *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2003) hasta que su expresión ya no se detecta en las plantas adultas (Arroyo *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2009).

La expresión de *ABI4* está regulada por muchos factores como ABA, glucosa y trehalosa (Arenas-Huerta *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2003; Ramon *et al.*, 2007; Bossi *et al.*, 2009), además mutantes *abi4* presentan fenotipos como la tolerancia aumentada al estrés osmótico y salino durante la germinación y el desarrollo temprano de las plántulas (Quesada *et al.*, 2000). Entonces el factor *ABI4*, al estar tan regulado durante el desarrollo temprano, parece tener un papel importante durante el momento de la germinación y el establecimiento de la plántula, por lo que en este trabajo se enfocó en el análisis a la expresión de *ABI4* durante los primeros días del desarrollo de todas las plántulas analizadas.

### 8.1 Patrón de expresión de *ABI4* en embriones de *A. thaliana*

Mediante los ensayos histoquímicos de GUS, se observó que los embriones encontrados en las silicuas de las plantas con la construcción -3kb *pABI4::GUS* presentan expresión del gen reportero *GUS* durante todo su desarrollo, desde la fase globular hasta tener el embrión maduro; cuando la semilla madura totalmente, deja de observarse expresión, como se ha reportado previamente (Soderman *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2009). Por el contrario, los embriones de las plantas con la construcción de 2kb *pABI4::GUS* no presentan expresión de GUS durante ninguna etapa del desarrollo de la

semilla. Con base en estos resultados podemos inferir que la secuencia del promotor de *ABI4* río arriba de 2.5kb contiene elementos en *cis* importantes que regulan positivamente su expresión durante la embriogénesis y el desarrollo de la semilla, por lo tanto, acotamos a una región de 500pb el o los sitios de unión de elementos involucrados en la regulación por azúcares durante el desarrollo de la semilla.

En los embriones de diferentes líneas heterocigotas, de la generación T2 con la construcción -2.5kb *pABI4::GUS*, tampoco se observó expresión de GUS durante ninguna etapa del desarrollo del embrión, esto es hasta cierta forma inesperado ya que esta construcción contiene un elemento RY que se sabe que funciona como el sitio de unión del regulador del desarrollo embrionario LEC2 (Harada J., 2001) y que por datos del laboratorio este factor participa con un regulador positivo de la expresión de *ABI4* (Hernández *et al.*, no publicado). Por lo tanto, consideramos importante realizar los estudios de expresión en las líneas homocigotas de la generación T3 y repetir el experimento con las líneas de la generación T2 para descartar posibles errores técnicos.

## **8.2 Patrón de expresión de *ABI4* en plántulas de *A. thaliana***

Al analizar el patrón de expresión de las líneas con la construcción -3kb *pABI4::GUS* generadas en este trabajo mediante los ensayos histoquímicos, se encontraron resultados diferentes a los esperados. En primer lugar, se esperaba observar un patrón de expresión idéntico o muy parecido a la línea 4A que se usó de referencia en este estudio, ya que las dos construcciones poseen un fragmento de la región 5' del gen *ABI4* muy parecida, de aproximadamente 3kb, pero observamos un patrón diferente. Es decir, se esperaba ver tinción en los cotiledones y en el epicótilo de la plántula y no en las hojas primarias; sin embargo, se observó que en varias líneas independientes había expresión en las hojas primarias. Esta diferencia podría deberse a que la construcción de la línea 4A tiene un tamaño de 3 413 pb mientras que la nuestra uno de 3089; es decir, la línea de referencia, posee 324 pb más que nuestra construcción, empezando 220 pb río arriba del inicio de la nuestra y terminando 104 pb río abajo del término de la nuestra, que corresponde a la región no codificante (UTR) completa (Söderman *et al.*, 2000; Fig.31).

Por lo tanto, es posible que dentro de esas 324 pb faltantes en nuestra construcción, se encuentren algún(os) sitio(s) de unión a un factor que reprima la expresión de *ABI4*, específicamente en las hojas primarias y es por esta razón que en nuestro estudio observamos expresión de *ABI4* en las hojas primarias, a diferencia de las plántulas de la línea 4A.

Cabe mencionar que en un estudio realizado por Shkolnik-Inbar y Dudy Bar-Zv en 2011 donde se analizaron plantas que contenían una construcción con un fragmento de 2kb del promotor de *ABI4* río arriba del sitio de inicio de la transcripción (conteniendo la UTR completa) fusionado al gen reportero *GUS* se encontró el patrón de expresión de *ABI4* previamente reportado (Arroyo *et al.*, 2003), es decir, nada de expresión en las hojas primarias.

En resumen; las construcciones 4A (-3.4 kb *pABI4::GUS*) y la del grupo de Shkolnik-Inbar y Dudy Bar-Zv (-2kb *pABI4::GUS*) se ha reportado que presentan el mismo patrón de expresión; es decir, fuerte expresión en los cotiledones y epicótilo, nunca en las hojas primarias mientras que las construcciones analizadas en este trabajo muestran expresión en las hojas primarias, lo que sugiere que las 104 pb de la UTR faltantes en nuestras construcciones pueden jugar un papel importante en la regulación negativa de la expresión de *ABI4* en las hojas primarias.

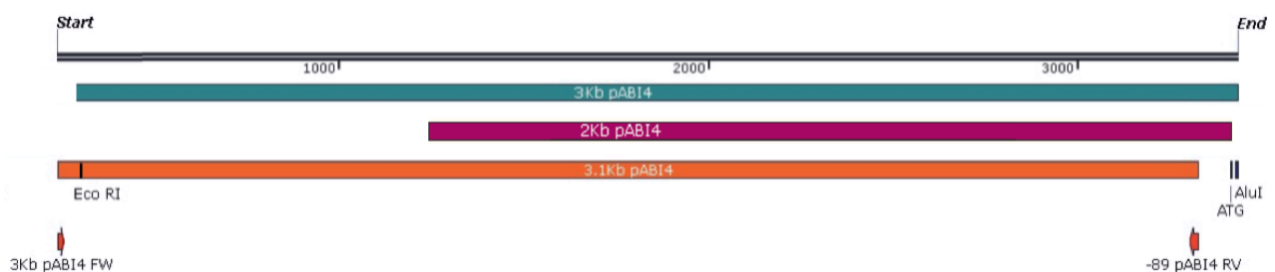


Figura 32. Esquema comparativo entre la construcción de la línea 4A con un tamaño de 3413 pb (3.4 kb) en azul, la construcción de Shkolnik-Inbar (2kb) en color vino y nuestra construcción con 3089pb (3.1kb) en color naranja.

Otro resultado inesperado de este trabajo fue el cambio generacional de patrón de expresión observado en las plántulas con la construcción de -3kb *pABI4::GUS*, mientras que en la generación T2 se observó una expresión clara en hojas primarias, la generación T3 presentó un patrón heterogéneo entre las líneas analizadas, ya que tres de las líneas mantenían la expresión en hojas mientras que las otras dos líneas no presentaban expresión en las hojas verdaderas pero si en los cotiledones y en el epicótilo, similar al de las otras líneas y a la línea 4A de referencia. Esta diferencia de patrones en las generaciones subsecuentes se piensa que puede ser producto de un proceso de silenciamiento epigenético; este silenciamiento es un fenómeno natural en el cual la expresión de genes es regulada mediante modificaciones de DNA, RNA o proteínas histonas y tiene una función de defensa del genoma del hospedero contra los efectos de elementos transponibles e infecciones virales. Los mecanismos moleculares del silenciamiento epigenético son muy complicados y aún no se han entendido por completo. Se han propuesto dos rutas moleculares, una de ellas es el silenciamiento genético transcripcional (TGS), asociado con la metilación de regiones promotoras que bloquean la transcripción de los transgenes y la otra es el silenciamiento genético a nivel post-transcripcional (Rajeevkumar *et al.*, 2015).

En plantas, los transgenes se integran al genoma en posiciones azarosas por recombinación ilegítima, por consiguiente, el número de copias, el sitio de integración y el arreglo local difieren en cada evento de transformación. También, se ha encontrado una relación inversa entre el número de copias del transgén y su expresión, lo cual sugiere que una integración multicopia puede conducir al silenciamiento. Como se muestra en la Tabla 2, en este estudio al seleccionar las líneas de la generación T2 en medio con higromicina, encontramos proporciones de plantas resistentes cercanas al 75%, pero siempre menores (en todas las líneas analizadas) con la construcción de -3kb *pABI4::GUS*, lo cual podría sugerir la inserción de más de una copia del transgén. Se ha observado que la integración de genes foráneos puede resultar en un TGS en *cis* cuando una multicopia de T-DNA es integrada en un locus adyacente a regiones hipermetiladas del genoma del hospedero (Mishiba *et al.*, 2005). Incluso si no fuera el caso, se ha observado que la integración de una sola copia del transgén en un locus hipometilado

también puede llevar a la inactivación en *cis* (Meyer y Heidmann, 1994; Elmayan y Vaucheret, 1996). Sin embargo, si se tratara de TGS, se observaría silenciamiento en toda la plántula, no sólo en las hojas primarias, como se observó en este trabajo.

Al ser GUS un gen reportero alta y ampliamente utilizado en estudios moleculares, parece poco probable que ocasione este tipo de mecanismos de silenciamiento; sin embargo, se ha reportado silenciamiento epigenético en este gen, por ejemplo, la reintroducción del gen GUS en plantas de arroz transformadas anteriormente con GUS produjo la supresión de su expresión debida a silenciamiento genético post-transcripcional (Kanno *et al.*, 2000).

El caso más cercano a lo observado en este estudio encontrado en la literatura es un análisis de la variabilidad de la expresión de transgenes en plantas en el que usaron recombinación mediada por el sistema *Cre-lox* para insertar el gen reportero *GUS* de forma precisa y reproducible en diferentes loci específicos, de modo que cada línea independiente en el análisis poseía una copia única del transgén en el sitio designado (Day *et al.*, 2000). Interesantemente, la progenie de plántulas de algunas líneas transformadas en un mismo evento de transformación presentaron patrones de expresión heterogéneos. Entre la progenie de la cruce de las plantas transformantes y silvestres, el patrón de tinción fue altamente consistente, las plántulas hermanas presentaban el mismo patrón de expresión, sin embargo, los patrones de las plántulas de líneas independientes diferían considerablemente. Aunado a que, en otras líneas independientes, las plántulas presentaban tinción solamente en algunos tejidos. Este silenciamiento específico de ciertos tejidos se asemeja a lo observado en este estudio, por lo que sería importante tomar en cuenta esta perspectiva de estudio para entender el fenómeno observado en estas plantas.

Asimismo, sería interesante seguir analizando las siguientes generaciones de las diferentes líneas obtenidas en este trabajo. A pesar de que se obtuvieron resultados heterogéneos en esta parte del estudio, se logró identificar el patrón de expresión predominante para la construcción de -3kb *pABI4::GUS*, en el que observamos tinción en los cotiledones, el epicótilo y las hojas primarias. Para las construcciones de -2.5kb y

-2kb *pABI4::GUS* no se observó heterogeneidad en los patrones de expresión de *ABI4* de las diferentes líneas.

### **8.3 Delimitación de la región regulada por glucosa en el promotor de *ABI4***

Basados en los ensayos histoquímicos y fluorimétricos de GUS, corroboramos que las plántulas con la construcción de -3kb *pABI4::GUS* responden a la presencia de glucosa. Por el contrario, en las plántulas con la construcción de -2kb *pABI4::GUS* no se observó diferencia ni en la tinción durante los ensayos histoquímicos ni en los niveles de expresión en los ensayos fluorimétricos, lo que muestra que esta región carece de los elementos en *cis* involucrados en la regulación por azúcares.

Hasta el momento para la construcción de 2.5kb solamente se pudieron analizar las líneas de la generación T2 por tinción histoquímica, en los cuales no observamos diferencias aparentes entre las plantas crecidas en los diferentes tratamientos; sin embargo, estos ensayos no son cuantitativos por lo que no podemos aseverar si se induce o no la expresión del gen *ABI4* en esta construcción. Entonces, en este estudio, se ubicó que la regulación por azúcares del gen ocurre dentro de una región de 1000pb en el promotor de *ABI4*, región entre la construcción de -3kb *pABI4::GUS* y la de -2kb *pBAI4::GUS*.

### **8.4 Análisis de los elementos en *cis* reportados en la región acotada del promotor de *ABI4***

En los últimos años, se han generado extensas bases de datos genómicas por medio de experimentos con microarreglos que han permitido la identificación de genes regulados por azúcares. A partir del análisis de dichos genes, se identificaron elementos de DNA conservados involucrados en la señalización por azúcares de diversos genes. También estudios con diversos promotores, por ejemplo, de los genes fotosintéticos de maíz, se han identificado elementos en *cis* involucrados tanto en la represión como en la activación de la respuesta a azúcares (Sheen J., 1990; Sheen J., 1999 y Rolland *et al.*,



2006).

Como se mencionó anteriormente, dentro de la región de 1000pb delimitada en este estudio encontramos cinco elementos en *cis* que previamente se han identificado en la regulación por azúcares:

La caja CAACA de unión al factor RAV1 (Feng, 2014), una caja G, que de acuerdo con el modelo de acoplamiento propuesto por Wind *et al.*, 2012 es parte de la interacción entre DNA y el dominio AP2, un elemento CE1 de unión a *ABI4* (Reeves, W.M. *et al.* 2011) y un elemento RY al que se une el factor LEC2 (Suzuki and McCarty, 2008; Junker *et al.*, 2010).

En un futuro sería importante una investigación más exhaustiva de estos elementos para determinar si están involucrados en la regulación por azúcares del gen *ABI4*. A continuación, expondré los motivos por lo que esto podría ser factible.

#### **8.4.1 Factor de transcripción RAV1**

Se ha comprobado que el factor de transcripción RAV1 es un regulador negativo de la señalización de ABA, reprimiendo la expresión de genes que responden a esta hormona como *ABI3*, *ABI4*, *ABI5*, *Em1* y *Em6*. Se demostró que RAV1 se une a los motivos 5'-CAACA-3' en el promotor de *ABI4*, regulando negativamente su expresión (Feng, C.-Z., 2014). Se ha concluido que RAV1, además de participar en procesos de germinación de la semilla y la senescencia de las hojas, también tiene un papel importante en la señalización de ABA. Debido a que se ha observado previamente que los componentes de la cascada de señalización de ABA funcionan también en la vía de señalización en respuesta a azúcares, sería interesante determinar si este motivo participa en la regulación por azúcares del gen *ABI4*.

### 8.4.2 Caja G

Se han realizado muchos estudios de represión por azúcares e inducción de la transcripción por inanición con promotores de genes de arroz que codifican  $\alpha$ -amilasas ( $\alpha$ AMY) involucradas en la degradación de almidón en semillas. Específicamente, en un estudio con el promotor de  $\alpha$ AMY3 se identificó una secuencia responsiva a azúcares (SRS) con tres elementos esenciales para la inducción de la expresión por inanición, el primero es la caja GC; el segundo, la caja G y el último, el elemento TATCCA (Lu, C.A., *et al.*, 2002).

También las cajas G median la conexión entre el estrés por falta de nutrientes y otras respuestas de estrés ambientales. Por ejemplo, se identificó una caja G (CACGTG) involucrada en el control de la expresión genética en respuesta a la luz mediada por fitocromos que es muy similar al motivo ABRE (CCACGTGG), en los factores de unión a ABRE ABF2, ABF3 y ABF4 que han sido implicados en respuestas a ABA y estrés y el factor ABF2, al ser sobreexpresado, promueve la inhibición del desarrollo de las plántulas inducida por glucosa, además su mutación inhabilitó la respuesta a azúcares, demostrando que ABF2 es necesario para una respuesta normal a glucosa (Kang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004 ). Con esto podemos asumir que la caja G en el promotor de ABI4 podría ser el elemento en *cis* que media la regulación por azúcares de este gen.

### 8.4.3 Elemento CE1

Con ayuda de ensayos *in vitro* y transitorios, se ha demostrado que ABI4 se une a un elemento tipo CE1 (CACCG) presente en promotores de sus genes blanco en *A. thaliana* (Finkelstein *et al.*, 1998; Niu *et al.*, 2002; Sakuma *et al.*, 2002; Acevedo-Hernandez *et al.*, 2005; Koussevitzky *et al.*, 2007; Bossi *et al.*, 2009; Giraud *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; León *et al.*, 2013). Debido a la dualidad de función del factor ABI4, la unión a esta secuencia puede activar o reprimir la expresión de sus genes blanco, así como a sí mismo (Acevedo-Hernandez *et al.*, 2005; Rook *et al.*, 2006b; Bossi *et al.*, 2009; León P. *et al.*, 2013). Podría ser que el factor ABI4 se autorregule en presencia de glucosa, uniéndose a este elemento CE1 y aumentando su expresión.

#### 8.4.4 Elemento RY

Este elemento es el sitio de unión del gen LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) que es un regulador central de la embriogénesis que tiene un papel crítico en el desarrollo tanto temprano como tardío del embrión (Harada J., 2001). A diferencia de la mayoría de los reguladores embrionarios que funcionan en etapas específicas de la embriogénesis, los genes LEC son requeridos para la especificación del destino de las células del suspensor y la identidad de los cotiledones (Lotan *et al.*, 1998; Keith *et al.*, 1994; Meinke *et al.*, 1994; West *et al.*, 1994; Baumlein *et al.*, 1994). Además, durante la embriogénesis tardía, éstos son requeridos durante la fase de maduración para la adquisición de tolerancia a desecación y la expresión de muchos genes específicos de la maduración (Keith *et al.*, 1994; Meinke *et al.*, 1994; West *et al.*, 1994; Baumlein *et al.*, 1994). Se ha reportado que LEC2 promueve la expresión de *ABI4*, *ABI3* y *ABI5* además de promover el crecimiento embrionario junto con *FUS3* (Suzuki and McCarty, 2008; Junker *et al.*, 2010) y se ha relacionado con el metabolismo de sacarosa-almidón (Angeles-Núñez y Tiessen 2011), sin embargo, no se le ha asociado con la vía de señalización de azúcares.

Por otro lado, el elemento RY es crucial para la transactivación mediante proteínas con dominio tipo B3, como *ABI3* (Ezcurra *et al.*, 2000; Reidt *et al.*, 2000). Este elemento predomina en promotores regulados positivamente por expresión ectópica de *ABI3* (Suzuki *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el dominio B3 de *ABI3* y el de su ortólogo en maíz, VP1, se une al elemento RY en experimentos *in vitro* (Suzuki *et al.*, 1997; Mönke *et al.*, 2004); sin embargo, *ABI3* no se une a DNA en ensayos de un híbrido con levaduras (Y1H), por lo que se ha sugerido que, *in vivo*, *ABI3* interactúa con el elemento RY indirectamente por interacción proteína-proteína con *FUS3* y/o *LEC2* (Kroj *et al.*, 2003). La identificación de estos elemento(s) en *cis* posiblemente involucrados en la regulación por azúcares se realizó de manera preliminar, por lo que se requiere realizar un análisis *in silico* más extenso y detallado para el reconocimiento de todos los elementos conservados en la secuencia del promotor de *ABI4*. Una vez que se identifiquen los candidatos más factibles en un futuro podrían estudiarse con mayor detalle.

## 9. CONCLUSIÓN

Mediante el análisis de diferentes fragmentos del promotor de ABI4 fusionados al gen reportero para beta glucoronidasa (*GUS*), se logró acotar la región regulatoria en donde se localizan las secuencias en *cis* importantes para la regulación por glucosa de este gen.

Aunque quedaron algunos análisis pendientes, este trabajo es un paso hacia la mejor comprensión de los procesos moleculares involucrados en la respuesta a azúcares del gen ABI4. Como perspectivas futuras se debe continuar con el análisis de las líneas de plantas homocigotas con la construcción -2.5kb *pABI4::GUS* para acotar más la región regulatoria, así como el análisis *in silico* de la región acotada para la identificación y comprobación del o los elemento(s) importantes en la regulación por azúcares.

## 10. REFERENCIAS

- Acevedo-Hernández, G.J., Leon, P.G., & Herrera-Estrella, L.R. (2005). Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 43 4, 506-19.
- Ananieva, E. A., Gillaspay, G. E., Ely, A., Burnette, R. N., & Erickson, F. Les. (2008). Interaction of the WD40 Domain of a Myoinositol Polyphosphate 5-Phosphatase with SnRK1 Links Inositol, Sugar, and Stress Signaling. *Plant Physiology*, 148(4), 1868 LP – 1882. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/148/4/1868.abstract>.
- Angeles-Nunez J.G., Tiessen A. (2011). Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of Arabidopsis seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds. *Journal of Plant Physiology*, 168 (16) , pp. 1891-1900.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., & León, P. (2000). Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development*, 14(16), 2085–2096.
- Arroyo, A., Bossi, F., Finkelstein, R. R., & León, P. (2003). Three Genes That Affect Sugar Sensing (*Abscisic Acid Insensitive 4*, *Abscisic Acid Insensitive 5*, and *Constitutive Triple Response 1*) Are Differentially Regulated by Glucose in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(1), 231–242. <http://doi.org/10.1104/pp.103.021089>
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448, 938.
- Balasubramanian, R., Karve, A., & Moore, B. d. (2008). Actin-based cellular framework for glucose signaling by Arabidopsis hexokinase1. *Plant Signaling & Behavior*, 3(5), 322–324.
- Bäumllein, H., Miséra, S., Luerßen, H., Kölle, K., Horstmann, C., Wobus, U., & Müller, A. J. (1994). The FUS3 gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *The Plant Journal*, 6(3), 379-387.
- Bi, Y.-M., Zhang, Y., Signorelli, T., Zhao, R., Zhu, T., & Rothstein, S. (2005). Genetic analysis of Arabidopsis GATA transcription factor gene family reveals a nitrae-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 44, 680–692.
- Bi, Y.-M., Zhang, Y., Signorelli, T., Zhao, R., Zhu, T., & Rothstein, S. (2005). Genetic analysis of Arabidopsis GATA transcription factor gene family reveals a nitrae-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 44, 680–692.
- Bosssi F. (2009) Caracterización funcional de una proteína implicada en la vía de señalización por glucosa en *Arabidopsis thaliana* (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca Morelos.
- Bright, N. J., Thornton, C., & Carling, D. (2009). The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases. *Acta Physiologica*, 196(1), 15–26. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01971.x>

- Brocard, I. M., Lynch, T. J., & Finkelstein, R. R. (2002). Regulation and Role of the Arabidopsis *Abscisic Acid-Insensitive 5* Gene in Abscisic Acid, Sugar, and Stress Response. *Plant Physiology*, 129(4), 1533–1543. <http://doi.org/10.1104/pp.005793>
- Brocard-Gifford, I. M., Lynch, T. J., & Finkelstein, R. R. (2003). Regulatory Networks in Seeds Integrating Developmental, Abscisic Acid, Sugar, and Light Signaling. *Plant Physiology*, 131(1), 78–92. <http://doi.org/10.1104/pp.011916>
- Carles, C.C., Bies-Ethève, N., Aspart, L., Léon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., Echeverria, M., & Delseny, M. (2002). Regulation of Arabidopsis thaliana *Em* genes: role of *ABI5*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 30 3, 373-83.
- Cernac, A., Benning, C. (2004). Wrinkled1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis .*PlantJ* 40: 575–585
- Cernac, A., Andre, C., Hoffmann-Benning, S., & Benning, C. (2006). *WRI1* Is Required for Seed Germination and Seedling Establishment. *Plant Physiology*, 141(2), 745–757. <http://doi.org/10.1104/pp.106.079574>
- Chan, M.-T., & Yu, S.-M. (1998). The 3' untranslated region of a rice  $\alpha$ -amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6543–6547.
- Chary, S. N., Hicks, G. R., Choi, Y. G., Carter, D., & Raikhel, N. V. (2008). Trehalose-6-Phosphate Synthase/Phosphatase Regulates Cell Shape and Plant Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(1), 97–107. <http://doi.org/10.1104/pp.107.107441>
- Chen, J.-G., Willard, F. S., Huang, J., Liang, J., Chasse, S. A., Jones, A. M., & Siderovski, D. P. (2003). A Seven-Transmembrane RGS Protein That Modulates Plant Cell Proliferation. *Science*, 301(5640), 1728 LP – 1731. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/301/5640/1728.abstract>
- Chen, J.-G., & Jones, A. M. (2004). *AtRGS1* Function in Arabidopsis thaliana. In *Regulators of G-Protein Signaling, Part A* (Vol. 389, pp. 338–350). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)89020-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)89020-7)
- Cho, Y.-H., Yoo, S.-D., & Sheen, J. (2006). Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in Glucose Signaling. *Cell*, 127(3), 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.028>
- Cho, Y.-H., & Yoo, S.-D. (2011). Signaling Role of Fructose Mediated by *FINS1*/*FBP* in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, 7(1), e1001263. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001263>
- Choi, H. I., Hong, J. H., Ha, J. O., Kang, J.-Y., & Kim, S. Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive Element Binding Factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 1723–1730.
- Crevillén, P., Ventriglia, T., Pinto, F., Orea, A., Merida, A., Romero, J.M. (2005). Differential pattern of expression and sugar regulation of Arabidopsis thaliana ADP-glucose pyrophosphorylase-encoding genes. *The Journal of Biological Chemistry* 280:8143–49
- Cui, H., Hao, Y., & Kong, D. (2012). SCARECROW Has a SHORT-ROOT-Independent Role in Modulating the Sugar Response<sup>1</sup>. *Plant Physiology*, 158(4), 1769–1778. <http://doi.org/10.1104/pp.111.191502>

- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., ... Granot, D. (1999). Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell*, 11(7), 1253–1266.
- Day, C. D., Lee, E., Kobayashi, J., Holappa, L. D., Albert, H., & Ow, D. W. (2000). Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes & Development*, 14(22), 2869–2880.
- Debast, S., Nunes-Nesi, A., Hajirezaei, M.R., Hofmann, J., Sonnewald, U., Fernie, A.R., Börnke, F. (2011). Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. *Plant Physiology*, 156(4):1754-71.
- Dekkers, B. J. W., Schuurmans, J. A. M. J., & Smeekens, S. C. M. (2008). Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 67(1-2), 151–167. <http://doi.org/10.1007/s11103-008-9308-6>
- Deppmann, C. D., Acharya, A., Rishi, V., Wobbes, B., Smeekens, S., Taparowsky, E. J., & Vinson, C. (2004). Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in Arabidopsis thaliana : a comparison to Homo sapiens B-ZIP motifs . *Nucleic Acids Research*, 32(11), 3435–3445. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh653>
- Dhondt, S., Coppens, F., De Winter, F., Swarup, K., Merks, R. M. H., Inzé, D., Beemster, G. T. S. (2010). SHORT-ROOT and SCARECROW Regulate Leaf Growth in Arabidopsis by Stimulating S-Phase Progression of the Cell Cycle. *Plant Physiology*, 154(3), 1183 LP – 1195. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/154/3/1183.abstract>
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D. E., & Roitsch, T. (1997). Glucose and Stress Independently Regulate Source and Sink Metabolism and Defense Mechanisms via Signal Transduction Pathways Involving Protein Phosphorylation. *The Plant Cell*, 9(10), 1825 LP – 1841. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/9/10/1825.abstract>
- Elliott, R. C., Betzner, A. S., Huttner, E., Oakes, M. P., Tucker, W. Q., Gerentes, D., ... Smyth, D. R. (1996). AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *The Plant Cell*, 8(2), 155–168.
- Elmayan, T., & Vaucheret, H. (1996). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *The Plant Journal*, 9(6), 787–797. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9060787.x>
- Feng, C., Chen, Y., Wang, C., Kong, Y., Wu, W., & Chen, Y. (2014). The Arabidopsis RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expressions of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination and early seedling development. *The Plant Journal*, 80.
- Finkelstein, R. R., Wang, M. L., Lynch, T. J., Rao, S., & Goodman, H. M. (1998). The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *The Plant Cell*, 10(6), 1043–1054.
- Finkelstein, R. R. y Lynch, T. J. (2000). The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12(4): 599-609.

- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L., & Rock, C. D. (2002). Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S15 LP – S45. Retrieved from [http://www.plantcell.org/content/14/suppl\\_1/S15.abstract](http://www.plantcell.org/content/14/suppl_1/S15.abstract)
- Focks, N. y C. Benning (1998). Wrinkled1: A novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol* 118(1): 91-101.
- Fragoso, S., Espíndola, L., Páez-Valencia, J., Gamboa, A., Camacho, Y., Martínez-Barajas, E., & Coello, P. (2009). SnRK1 Isoforms AKIN10 and AKIN11 Are Differentially Regulated in Arabidopsis Plants under Phosphate Starvation. *Plant Physiology*, 149(4), 1906–1916. <http://doi.org/10.1104/pp.108.133298>.
- Fu, Y., Lim, S., Urano, D., Tunc-Ozdemir, M., Phan, N. G., Elston, T. C., & Jones, A. M. (2014). Reciprocal encoding of signal intensity and duration in a glucose-sensing circuit. *Cell*, 156(5), 1084–1095. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.013>
- Gibson, S. I. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(1), 93–102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.11.003>
- Giraudat, J., Hauge, B. M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., & Goodman, H. M. (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *The Plant Cell*, 4(10), 1251–1261.
- Glinski, M., & Weckwerth, W. (2005). Differential Multisite Phosphorylation of the Trehalose-6-phosphate Synthase Gene Family in *Arabidopsis thaliana*; *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(10), 1614 LP –1625.
- Retrieved from <http://www.mcponline.org/content/4/10/1614.abstract>
- Godt, D. E., Riegel, A., & Roitsch, T. (1995). Regulation of Sucrose Synthase Expression in *Chenopodium rubrum*: Characterization of Sugar Induced Expression in Photoautotrophic Suspension Cultures and Sink Tissue Specific Expression in Plants. *Journal of Plant Physiology*, 146(3), 231–238. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82046-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82046-8)
- Gregorio, J., Hernández-Bernal, A. F., Cordoba, E., & León, P. (2014). Characterization of Evolutionarily Conserved Motifs Involved in Activity and Regulation of the ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 Transcription Factor. *Molecular Plant*, 7(2), 422–436. <http://doi.org/10.1093/mp/sst132>
- Grierson, C., Du, J., Zabala, M., Beggs, K., Smith, C., Holdsworth, M. and Bevan, M. (1994). Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *The Plant Journal*, 5: 815-826. [doi:10.1046/j.1365-3113X.1994.5060815.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1994.5060815.x)
- Grigston, J. C., Osuna, D., Scheible, W.-R., Liu, C., Stitt, M., & Jones, A. M. (2008). D-glucose sensing by a plasma membrane regulator of G signaling protein, *AtRGS1*. *FEBS Letters*, 582(25-26), 3577–3584. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.038>
- Halford, N. G., & Hey, S. J. (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochemical Journal*, 419(2), 247 LP – 259. Retrieved from <http://www.biochemj.org/content/419/2/247.abstract>
- Hanson, J., Johannesson, H., & Engström, P. (2001). Sugar-dependent alterations in cotyledon and leaf development in transgenic plants expressing the HDZhdp gene



- ATHB13. *Plant Molecular Biology*, 45(3), 247–262. <https://doi.org/10.1023/A:1006464907710>
- Hanson, J., Regan, S., & Engström, P. (2002). The expression pattern of the homeobox gene ATHB13 reveals a conservation of transcriptional regulatory mechanisms between *Arabidopsis* and hybrid aspen. *Plant Cell Reports*, 21(1), 81–89. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0476-6>
  - Hanson, J., Hanssen, M., Wiese, A., Hendriks, M. and Smeekens, S. (2008), The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*. *The Plant Journal*, 53: 935-949. doi:[10.1111/j.1365-313X.2007.03385.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03385.x)
  - Hanson, J., & Smeekens, S. (2009). Sugar perception and signaling—an update. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 562–567. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.014>
  - Harada, J. (2001). Phytoene Desaturase, Crtl, of the Purple Photosynthetic Bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, Produces both Neurosporene and Lycopene. *Plant and Cell Physiology*, 42, 1112–1118.
  - Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 774. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2249>
  - Harthill, J. E., Meek, S. E., Morrice, N., Peggie, M. W., Borch, J., Wong, B. H. and MacKintosh, C. (2006), Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *The Plant Journal*, 47: 211-223. doi:[10.1111/j.1365-313X.2006.02780.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02780.x)
  - Hedbacker, K., & Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 13, 2408–2420.
  - Ho, S.-L., Chao, Y.-C., Tong, W.-F., & Yu, S.-M. (2001). Sugar Coordinately and Differentially Regulates Growth- and Stress-Related Gene Expression via a Complex Signal Transduction Network and Multiple Control Mechanisms. *Plant Physiology*, 125(2), 877 LP – 890. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/125/2/877.abstract>
  - Huang, J., Taylor, J. P., Chen, J.-G., Uhrig, J. F., Schnell, D. J., Nakagawa, T., ... Jones, A. M. (2006). The Plastid Protein THYLAKOID FORMATION1 and the Plasma Membrane G-Protein GPA1 Interact in a Novel Sugar-Signaling Mechanism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18(5), 1226–1238. <http://doi.org/10.1105/tpc.105.037259>
  - Huang, J.-P., Tunc-Ozdemir, M., Chang, Y., & Jones, A. M. (2015). Cooperative control between AtRGS1 and AtHXK1 in a WD40-repeat protein pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 851. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00851>
  - Huijser, C., Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E., & Smeekens, S. (2000). The *Arabidopsis* SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses. *The Plant Journal*, 23(5), 577–585. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00822.x>
  - Hull, G. A., & Devic, M. (1995). The  $\beta$ -Glucuronidase (gus) Reporter Gene System. In H. Jones (Ed.), *Plant Gene Transfer and Expression Protocols* (pp. 125–141). Totowa, NJ: Springer New York. <https://doi.org/10.1385/0-89603-321-X:125>

- Ishiguro, S., & Nakamura, K. (1992). The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots. *Plant Molecular Biology*, 18, 97–108.
- J Bright, N., Thornton, C., & Carling, D. (2009). The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases. *Acta Physiol (Oxf)* 196: 15-26. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 196, 15–26.
- Jang, J. C., & Sheen, J. (1994). Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell*, 6(11), 1665–1679. <http://doi.org/10.1105/tpc.6.11.1665>
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5(4), 387–405. <https://doi.org/10.1007/BF02667740>
- Jefferson, R., Goldsbrough, A., & Bevan, M. (1990). Transcriptional regulation of a patatin-1 gene in potato. *Plant Molecular Biology*, 14(6), 995–1006. <https://doi.org/10.1007/BF00019396>
- Jin, J., He, K., Tang, X., Li, Z., Lv, L., Zhao, Y., Gao, G. (2015). An *Arabidopsis* Transcriptional Regulatory Map Reveals Distinct Functional and Evolutionary Features of Novel Transcription Factors. *Molecular Biology and Evolution*, 32(7), 1767–1773. <http://doi.org/10.1093/molbev/msv058>
- Jofuku, K. D., den Boer, B. G., Van Montagu, M., & Okamoto, J. K. (1994). Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *The Plant Cell*, 6(9), 1211 LP – 1225. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/6/9/1211.abstract>
- Johannesson, H., Wang, Y., & Engström, P. (2001). DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. *Plant Molecular Biology*, 45(1), 63–73. <https://doi.org/10.1023/A:1006423324025>
- Johnston, C. A., Taylor, J. P., Gao, Y., Kimple, A. J., Grigston, J. C., Chen, J.-G., Willard, F. S. (2007). GTPase acceleration as the rate-limiting step in *Arabidopsis* G protein-coupled sugar signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), 17317–17322. <http://doi.org/10.1073/pnas.0704751104>
- Jossier, M., Bouly, J., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D. and Thomas, M. (2009), SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 59: 316-328. [doi:10.1111/j.1365-3113.2009.03871.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.03871.x)
- Junker, A., Hartmann, A., Schreiber, F., & Bäumllein, H. (2010). An engineer's view on regulation of seed development. *Trends in Plant Science*, 15(6), 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.03.005>
- Kagaya, Y., Ohmiya, K., & Hattori, T. (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Research*, 27(2), 470–478.
- Kang, J., Choi, H., Im, M., & Kim, S. Y. (2002). *Arabidopsis* Basic Leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell*, 14(2), 343–357. <http://doi.org/10.1105/tpc.010362>
- Kang, S. G., Price, J., Lin, P.-C., Hong, J. C., & Jang, J.-C. (2010). The *Arabidopsis* bZIP1 Transcription Factor Is Involved in Sugar Signaling, Protein Networking, and DNA Binding. *Molecular Plant*, 3(2), 361–373. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp115>

- Kaplan, C. P., Bülent Tugal, H., & Baker, A. (1997). Isolation of a cDNA encoding an Arabidopsis galactokinase by functional expression in yeast. *Plant Molecular Biology*, 34(3), 497–506. <https://doi.org/10.1023/A:1005816104743>
- Keith, K., Kraml, M., Dengler, N. G., & McCourt, P. (1994). Fusca3: A Heterochronic Mutation Affecting Late Embryo Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 6(5), 589 LP – 600. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/6/5/589.abstract>
- Kerchev, P. I., Pellny, T. K., Vivancos, P. D., Kiddle, G., Hedden, P., Driscoll, S., ... Foyer, C. H. (2011). The Transcription Factor ABI4 Is Required for the Ascorbic Acid–Dependent Regulation of Growth and Regulation of Jasmonate-Dependent Defense Signaling Pathways in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(9), 3319 LP – 3334. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/23/9/3319.abstract>
- Kim, S. Y., May, G. D., & Park, W. D. (1994). Nuclear protein factors binding to a class I patatin promoter region are tuber-specific and sucrose-inducible. *Plant Molecular Biology*, 26(2), 603–615. <https://doi.org/10.1007/BF00013747>
- Kim, S. Y., May, G. D., & Park, W. D. (1994). Nuclear protein factors binding to a class I patatin promoter region are tuber-specific and sucrose-inducible. *Plant Molecular Biology*, 26(2), 603–615. <https://doi.org/10.1007/BF00013747>
- Kim, S., Kang, J., Cho, D.-I., Park, J. H., & Kim, S. Y. (2004). ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *The Plant Journal*, 40(1), 75–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02192.x>
- Klucher, K. M., Chow, H., Reiser, L., & Fischer, R. L. (1996). The AINTEGUMENTA gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene APETALA2. *The Plant Cell*, 8(2), 137–153. <http://doi.org/10.1105/tpc.8.2.137>
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Chory, J. (2007). Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression. *Science*, 316(5825), 715 LP – 719. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/316/5825/715.abstract>
- Krapp, A., Hofmann, B., Schäfer, C., & Stitt, M. (2005). Regulation of the expression of rbcS and other photosynthetic genes by carbohydrates: A mechanism for the “sink regulation” of photosynthesis? *The Plant Journal*, 3, 817–828.
- Laby, R. J., Kincaid, M. S., Kim, D., & Gibson, S. I. (2000). The Arabidopsis sugar-insensitive mutants sis4 and sis5 are defective in abscisic acid synthesis and response. *The Plant Journal*, 23(5), 587–596. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00833.x>
- León, P., & Sheen, J. (2003). Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science*, 8(3), 110–116. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00011-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00011-6)
- León, P., Gregorio, J., & Cordoba, E. (2012). ABI4 and its role in chloroplast retrograde communication. *Frontiers in Plant Science*, 3, 304. <http://doi.org/10.3389/fpls.2012.00304>
- Li, Y., Lee, K. K., Walsh, S., Smith, C., Hadingham, S., Sorefan, K., Bevan, M. W. (2006). Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by

- microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Research*, 16(3), 414–427. <http://doi.org/10.1101/gr.4237406>
- Lilley, J. L. S., Gee, C. W., Sairanen, I., Ljung, K., & Nemhauser, J. L. (2012). An Endogenous Carbon-Sensing Pathway Triggers Increased Auxin Flux and Hypocotyl Elongation. *Plant Physiology*, 160(4), 2261 LP – 2270. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/160/4/2261.abstract>
  - Liu, X. J., Prat, S., Willmitzer, L., & Frommer, W. B. (1990). Cis regulatory elements directing tuber-specific and sucrose-inducible expression of a chimeric class I patatin promoter/GUS-gene fusion. *Molecular and General Genetics MGG*, 223(3), 401–406. <https://doi.org/10.1007/BF00264446>
  - Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140(5), 943 LP – 950. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/140/5/943.abstract>
  - Lopez-Molina, L., Mongrand, S., & Chua, N.-H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4782–4787. <http://doi.org/10.1073/pnas.081594298>
  - Lotan, T., Ohto, M., Yee, K. M., West, M. A. L., Lo, R., Kwong, R. W., ... Harada, J. J. (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 Is Sufficient to Induce Embryo Development in Vegetative Cells. *Cell*, 93(7), 1195–1205. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81463-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81463-4)
  - Lu, C.-A., Ho, T. D., Ho, S.-L., & Yu, S.-M. (2002). Three Novel MYB Proteins with One DNA Binding Repeat Mediate Sugar and Hormone Regulation of  $\alpha$ -Amylase Gene Expression. *The Plant Cell*, 14(8), 1963–1980. <http://doi.org/10.1105/tpc.001735>
  - Lunn, J. E., Feil, R., Hendriks, J. H. M., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., ... Stitt, M. (2006). Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 397(Pt1), 139–148. <http://doi.org/10.1042/BJ20060083>
  - Martínez-Barajas, E., Delatte, T., Schluepmann, H., de Jong, G. J., Somsen, G. W., Nunes, C., ... Paul, M. J. (2011). Wheat Grain Development Is Characterized by Remarkable Trehalose 6-Phosphate Accumulation Pregrain Filling: Tissue Distribution and Relationship to SNF1-Related Protein Kinase1 Activity. *Plant Physiology*, 156(1), 373–381. <http://doi.org/10.1104/pp.111.174524>
  - Masaki, T., Mitsui, N., Tsukagoshi, H., Nishii, T., Morikami, A., & Nakamura, K. (2005a). ACTIVATOR of Spomin::LUC1/WRINKLED1 of *Arabidopsis thaliana* Transactivates Sugar-inducible Promoters. *Plant and Cell Physiology*, 46(4), 547–556. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pci072>
  - Masaki, T., Tsukagoshi, H., Mitsui, N., Nishii, T., Hattori, T., Morikami, A., & Nakamura, K. (2005b). Activation tagging of a gene for a protein with novel class of CCT-domain activates expression of a subset of sugar-inducible genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 43(1), 142–152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02439.x>
  - Meinke, D. W., Franzmann, L. H., Nickle, T. C., & Yeung, E. C. (1994). Leafy Cotyledon Mutants of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 6(8), 1049 LP – 1064. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/6/8/1049.abstract>

- Meyer, P., Niedenhof, I., & ten Lohuis, M. (1994). Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. *The EMBO Journal*, 13(9), 2084–2088.
- Mishiba, K., Nishihara, M., Nakatsuka, T., Abe, Y., Hirano, H., Yokoi, T., Yamamura, S. (2005). Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. *The Plant Journal*, 44(4), 541–556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02556.x>
- Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.08.004>
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., Sheen, J. (2003). Role of the *Arabidopsis*; Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling. *Science*, 300(5617), 332 LP – 336. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/300/5617/332.abstract>
- Moose, S.P., & Sisco, P.H. (1996). *Glossy15*, an *APETALA2*-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes & development*, 10 23, 3018-27.
- Morikami, A., Matsunaga, R., Tanaka, Y., Suzuki, S., Mano, S., & Nakamura, K. (2005). Two cis-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(6), 690–699. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1100-y>
- Nakamura, S., Lynch, T. J., & Finkelstein, R. R. (2001). Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 26(6), 627–635. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01069.x>
- Niu, X., Helentjaris, T., & Bate, N. J. (2002). Maize ABI4 Binds Coupling Element1 in Abscisic Acid and Sugar Response Genes. *The Plant Cell*, 14(10), 2565 LP – 2575. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/14/10/2565.abstract>
- Nunes, C., Primavesi, L. F., Patel, M. K., Martinez-Barajas, E., Powers, S. J., Sagar, R., ... Paul, M. J. (2013). Inhibition of SnRK1 by metabolites: Tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.011>
- O'Hara, L. E., Paul, M. J., & Wingler, A. (2013). How Do Sugars Regulate Plant Growth and Development? New Insight into the Role of Trehalose-6-Phosphate. *Molecular Plant*, 6(2), 261–274. <https://doi.org/10.1093/mp/sss120>
- Ohme-Takagi, M., & Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell*, 7(2), 173–182. <http://doi.org/10.1105/tpc.7.2.173>
- Okamoto, J. K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M., & Jofuku, K. D. (1997). The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 7076–7081.
- Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Blaesing, O., Höhne, M., Stitt, M. (2007). Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 49, 463–491.

- Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wölfl, S., & Johnston, M. (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12428–12432.
- Ozcan, S., Dover, J., & Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 17(9), 2566–2573. <http://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2566>
- Palenchar, P. M., Kouranov, A., Lejay, L. V., & Coruzzi, G. M. (2004). Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants. *Genome Biology*, 5(11), R91. <http://doi.org/10.1186/gb-2004-5-11-r91>
- Paul, M. (2007). Trehalose 6-phosphate. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 303–309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.001>
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose Metabolism and Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 417–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092945>
- Penfield, S., Li, Y., Gilday, A. D., Graham, S., & Graham, I. A. (2006). <em>Arabidopsis</em> ABA INSENSITIVE4 Regulates Lipid Mobilization in the Embryo and Reveals Repression of Seed Germination by the Endosperm. *The Plant Cell*, 18(8), 1887 LP – 1899. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/18/8/1887.abstract>
- Perfus-Barbeoch, L., Jones, A. M., & Assmann, S. M. (2004). Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(6), 719–731. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.09.013>
- Pierre, M., Traverso, J. A., Boisson, B., Domenichini, S., Bouchez, D., Giglione, C., & Meinel, T. (2007). N-Myristoylation Regulates the SnRK1 Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(9), 2804–2821. <http://doi.org/10.1105/tpc.107.051870>
- Polge, C., & Thomas, M. (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends in Plant Science*, 12(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.005>
- Polge, C., Jossier, M., Crozet, P., Gissot, L., & Thomas, M. (2008).  $\beta$ -Subunits of the SnRK1 Complexes Share a Common Ancestral Function Together with Expression and Function Specificities; Physical Interaction with Nitrate Reductase Specifically Occurs via AKIN $\beta$ 1-Subunit. *Plant Physiology*, 148(3), 1570–1582. <http://doi.org/10.1104/pp.108.123026>
- Ponnu, J., Wahl, V., & Schmid, M. (2011). Trehalose-6-Phosphate: Connecting Plant Metabolism and Development. *Frontiers in Plant Science*, 2, 70. <http://doi.org/10.3389/fpls.2011.00070>
- Price, J., Laxmi, A., St. Martin, S. K., & Jang, J.-C. (2004). Global Transcription Profiling Reveals Multiple Sugar Signal Transduction Mechanisms in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2128–2150. <http://doi.org/10.1105/tpc.104.022616>
- Radchuk, R.I., Emery, R.J., Weier, D., Vigeolas, H., Geigenberger, P., Lunn, J.E., Feil, R., Weschke, W., & Weber, H. (2010). Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 61 2, 324-38.

- Rajeevkumar, S., Anunanthini, P., & Sathishkumar, R. (2015). Epigenetic silencing in transgenic plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 693. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>
- Ramon, M., Rolland, F., & Sheen, J. (2008). Sugar Sensing and Signaling. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 6, e0117. <http://doi.org/10.1199/tab.0117>
- Reeves, W. M., Lynch, T. J., Mobin, R., & Finkelstein, R. R. (2011). Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive (ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant Molecular Biology*, 75(4-5), 347–363. <http://doi.org/10.1007/s11103-011-9733-9>
- Roitsch, T., Bittner, M., & Godt, D. E. (1995). Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology*, 108(1), 285–294.
- Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. (2002). Sugar Sensing and Signaling in Plants. *The Plant Cell*, 14(Suppl), s185–s205. <http://doi.org/10.1105/tpc.010455>
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006). SUGAR SENSING AND SIGNALING IN PLANTS: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 675–709. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>
- Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., Van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeek, P., & Smeekens, S. (1998a). Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal*, 15(2), 253–263. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00205.x>
- Rook, F., Weisbeek, P., & Smeekens, S. (1998b). The light-regulated Arabidopsis bZIP transcription factor gene ATB2 encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain. *Plant Molecular Biology*, 37(1), 171–178. <https://doi.org/10.1023/A:1005964327725>
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C., & Bevan, M. W. (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *The Plant Journal*, 26(4), 421–433. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.2641043.x>
- Rook, F., Hadingham, S. A., Li, Y., & Bevan, M. W. (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell & Environment*, 29(3), 426–434. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01477.x>
- Ruuska, S. A., Girke, T., Benning, C., & Ohlrogge, J. B. (2002). Contrapuntal Networks of Gene Expression during Arabidopsis Seed Filling. *The Plant Cell*, 14(6), 1191 LP – 1206. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/14/6/1191.abstract>
- Sairanen, I., Novák, O., Pěnčík, A., Ikeda, Y., Jones, B., Sandberg, G., & Ljung, K. (2012). Soluble Carbohydrates Regulate Auxin Biosynthesis via PIF Proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(12), 4907 LP – 4916. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/24/12/4907.abstract>
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). A Novel Subgroup of bZIP Proteins Functions as Transcriptional Activators in Hypoosmolarity-Responsive Expression of the ProDH Gene in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology*, 45, 309–317.

- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., & Paul, M. (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), 6849–6854. <http://doi.org/10.1073/pnas.1132018100>
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M., & Smeekens, S. (2004). Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. *Plant Physiology*, 135(2), 879 LP – 890. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/135/2/879.abstract>
- Schluepmann, H., & Paul, M. (2009). Trehalose Metabolites in Arabidopsis—elusive, active and central. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 7, e0122. <http://doi.org/10.1199/tab.0122>
- Schluepmann, H., Berke, L., & Sanchez-Perez, G. F. (2012). Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3379–3390. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/err311>
- Shang, Y., Yan, L., Liu, Z.-Q., Cao, Z., Mei, C., Xin, Q., Zhang, D.-P. (2010). The Mg-Chelatase H Subunit of Arabidopsis Antagonizes a Group of WRKY Transcription Repressors to Relieve ABA-Responsive Genes of Inhibition. *The Plant Cell*, 22(6), 1909–1935. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.073874>
- Sheen, J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell*, 2(10), 1027 LP – 1038. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/2/10/1027.abstract>
- Sheen, J. (1999). C4 GENE EXPRESSION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 187–217. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.187>
- Sherson, S., Gy, I., Medd, J., Schmidt, R., Dean, C., Kreis, M., ... Cobbett, C. (1999). The arabinose kinase, ARA1, gene of Arabidopsis is a novel member of the galactose kinase gene family. *Plant Molecular Biology*, 39(5), 1003–1012. <https://doi.org/10.1023/A:1006181908753>
- Shigyo, M., Hasebe, M., & Ito, M. (2006). Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene*, 366(2), 256–265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.08.009>
- Shkolnik-Inbar, D., & Bar-Zvi, D. (2010). ABI4 Mediates Abscisic Acid and Cytokinin Inhibition of Lateral Root Formation by Reducing Polar Auxin Transport in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(11), 3560–3573. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074641>
- Shkolnik-Inbar, D., & Bar-Zvi, D. (2011). Expression of *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4 (ABI4)* in developing Arabidopsis seedlings. *Plant Signaling & Behavior*, 6(5), 694–696. <http://doi.org/10.4161/psb.6.5.14978>
- Shu, K., Zhang, H., Wang, S., Chen, M., Wu, Y., Tang, S., Xie, Q. (2013). ABI4 Regulates Primary Seed Dormancy by Regulating the Biogenesis of Abscisic Acid and Gibberellins in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 9(6), e1003577. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003577>
- Smalle, J., & Vierstra, R. D. (2004). The Ubiquitin 26s Proteasome Proteolytic Pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 555–590. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141801>



- Smeekens, S. (2000). Sugar-Induced Signal Transduction In Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51(1), 49–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.49>
- Söderman, E. M., Brocard, I. M., Lynch, T. J., & Finkelstein, R. R. (2000). Regulation and Function of the Arabidopsis *ABA-insensitive4* Gene in Seed and Abscisic Acid Response Signaling Networks. *Plant Physiology*, 124(4), 1752–1765.
- Stokes, M. E., Chattopadhyay, A., Wilkins, O., Nambara, E., & Campbell, M. M. (2013). Interplay between Sucrose and Folate Modulates Auxin Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 162(3), 1552–1565. <http://doi.org/10.1104/pp.113.215095>
- Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Borén, M., Ahlandsberg, S., & Jansson, C. (2003). A Novel WRKY Transcription Factor, SUSIBA2, Participates in Sugar Signaling in Barley by Binding to the Sugar-Responsive Elements of the *iso1* Promoter. *The Plant Cell*, 15(9), 2076–2092. <http://doi.org/10.1105/tpc.014597>
- Suzuki, M., & McCarty, D. R. (2008). Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5), 548–553. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.015>
- Tetlow, I. J., Morell, M. K., & Emes, M. J. (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), 2131–2145. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erh248>
- Thelander, M., Olsson, T., & Ronne, H. (2004). Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day–night light cycle. *The EMBO Journal*, 23(8), 1900–1910. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600182>
- Tremousaygue, D., Manevski, A., Bardet, C., Lescure, N., & Lescure, B. (1999). Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *The Plant Journal*, 20(5), 553–561. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00627.x>
- Tsukagoshi, H., Saijo, T., Shibata, D., Morikami, A., & Nakamura, K. (2005). Analysis of a Sugar Response Mutant of Arabidopsis Identified a Novel B3 Domain Protein That Functions as an Active Transcriptional Repressor. *Plant Physiology*, 138(2), 675–685. <http://doi.org/10.1104/pp.104.057752>
- Tsukagoshi, H., Morikami, A., & Nakamura, K. (2007). Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2543–2547. <http://doi.org/10.1073/pnas.0607940104>
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11632–11637.
- Urano, D., Phan, N., Jones, J. C., Yang, J., Huang, J., Grigston, J., Jones, A. M. (2012). Endocytosis of Seven-Transmembrane RGS Protein Activates G- protein Coupled Signaling in Arabidopsis. *Nature Cell Biology*, 14(10), 1079–1088. <http://doi.org/10.1038/ncb2568>
- Usadel, B., Bläsing, O. E., Gibon, Y., Retzlaff, K., Höhne, M., Günther, M., & Stitt, M. (2008). Global Transcript Levels Respond to Small Changes of the Carbon Status during

Progressive Exhaustion of Carbohydrates in Arabidopsis Rosettes. *Plant Physiology*, 146(4), 1834–1861. <http://doi.org/10.1104/pp.107.115592>

- Vaughn, M. W., Harrington, G. N., & Bush, D. R. (2002). Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10876 LP – 10880. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/99/16/10876.abstract>
- Wenzler, H., Mignery, G., Fisher, L., & Park, W. (1989). Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology*, 13(4), 347–354. <https://doi.org/10.1007/BF00015546>
- West, M. A. L., Yee, K. M., Danao, J., Zimmerman, J. L., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., & Harada, J. J. (1994). LEAFY COTYLEDON1 Is an Essential Regulator of Late Embryogenesis and Cotyledon Identity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 6(12), 1731 LP – 1745.
- Wiese, A., Elzinga, N., Wobbes, B., & Smeeckens, S. (2004). A Conserved Upstream Open Reading Frame Mediates Sucrose-Induced Repression of Translation. *The Plant Cell*, 16(7), 1717 LP – 1729. Retrieved from
- Wiese, A., Elzinga, N., Wobbes, B., & Smeeckens, S. (2005). Sucrose-induced translational repression of plant bZIP-type transcription factors. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 272 LP – 275. Retrieved from
- Wilson, K., Long, D., Swinburne, J., & Coupland, G. (1996). A Dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an Arabidopsis gene related to APETALA2. *The Plant Cell*, 8(4), 659 LP – 671. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/8/4/659.abstract>
- Wind, J. J., Peviani, A., Snel, B., Hanson, J., & Smeeckens, S. C. (2013). ABI4: versatile activator and repressor. *Trends in Plant Science*, 18(3), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.004>
- Wingler, A., Delatte, T. L., O'Hara, L. E., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., Paul, M. J., & Schluepmann, H. (2012). Trehalose 6-Phosphate Is Required for the Onset of Leaf Senescence Associated with High Carbon Availability. *Plant Physiology*, 158(3), 1241 LP – 1251. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/158/3/1241.abstract>
- Xiao, W., Sheen, J., & Jang, J.-C. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology*, 44(4), 451–461. <https://doi.org/10.1023/A:1026501430422>
- Yanagisawa, S., Yoo, S.-D., & Sheen, J. (2003). Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*, 425, 521. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature01984>
- Yokoyama, R., Hirose, T., Fujii, N., Aspúria, E. T., Kato, A., & Uchimiya, H. (1994). The rolC promoter of Agrobacterium rhizogenes Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. *Molecular and General Genetics MGG*, 244(1), 15–22. <https://doi.org/10.1007/BF00280182>
- Zhang, Y., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Powers, S. J., ... Paul, M. J. (2009). Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. *Plant Physiology*, 149(4), 1860 LP – 1871. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/149/4/1860.abstract>

- Zourelidou, M., De Torres-Zabala, M., Smith, C., & Bevan, M. W. (2002). Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *The Plant Journal*, 30(4), 489–497. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01302.x>

## 11. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Soluciones que se usaron en este trabajo:

-TENS para 15 ml

Tris-Hcl pH 8 (10mM) 60  $\mu$ l

EDTA (1mM) 30  $\mu$ l

NaOH (0.1N) 300  $\mu$ l

SDS (0.5%) 750  $\mu$ l

-Solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 0.2M para 1L: 21.2g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y disolverlo en 1L de agua destilada (concentración final de 0.2M)

-Buffer de extracción de GUS para 100ml

	Final	10ml	Stock
NaHPO <sub>4</sub> pH 7.0	50mM	0.5ml	1M
Na <sub>2</sub> EDTA	10mM	0.2ml	0.5M
Tritón 1%	0.1%	1ml	1%
N-sarcosil	0.1%	1ml	1%
$\beta$ -Mercaptoetanol	10mM	7 $\mu$ l	98%

### **-Buffer de ensayo para fluorimétricos de GUS MUG 1mM**

0.0035g de MUG (PM=406.4g/mol) y se disuelve en un volumen de 1ml del buffer de extracción de GUS.

### **Solución de X-Gluc**

	<b>Concentración</b>	<b>Stock</b>	<b>Para 5ml</b>
<b>Amortiguador de fosfato de sodio pH 7.0</b>	100mM	1M	0.5ml
<b>EDTA (0.5M)</b>	10mM	0.5M	0.5ml
<b>Ferricianuro de Potasio</b>	0.5mM	5mM	0.5ml
<b>Ferrocianuro de Potasio</b>	0.5mM	5mM	0.5ml
<b>Tritón X-100</b>	0.5mM	1%	0.5ml
<b>X-Gluc en DMSO</b>	1mg/ml		5mg/30 $\mu$ l

**Figuras suplementarias:**

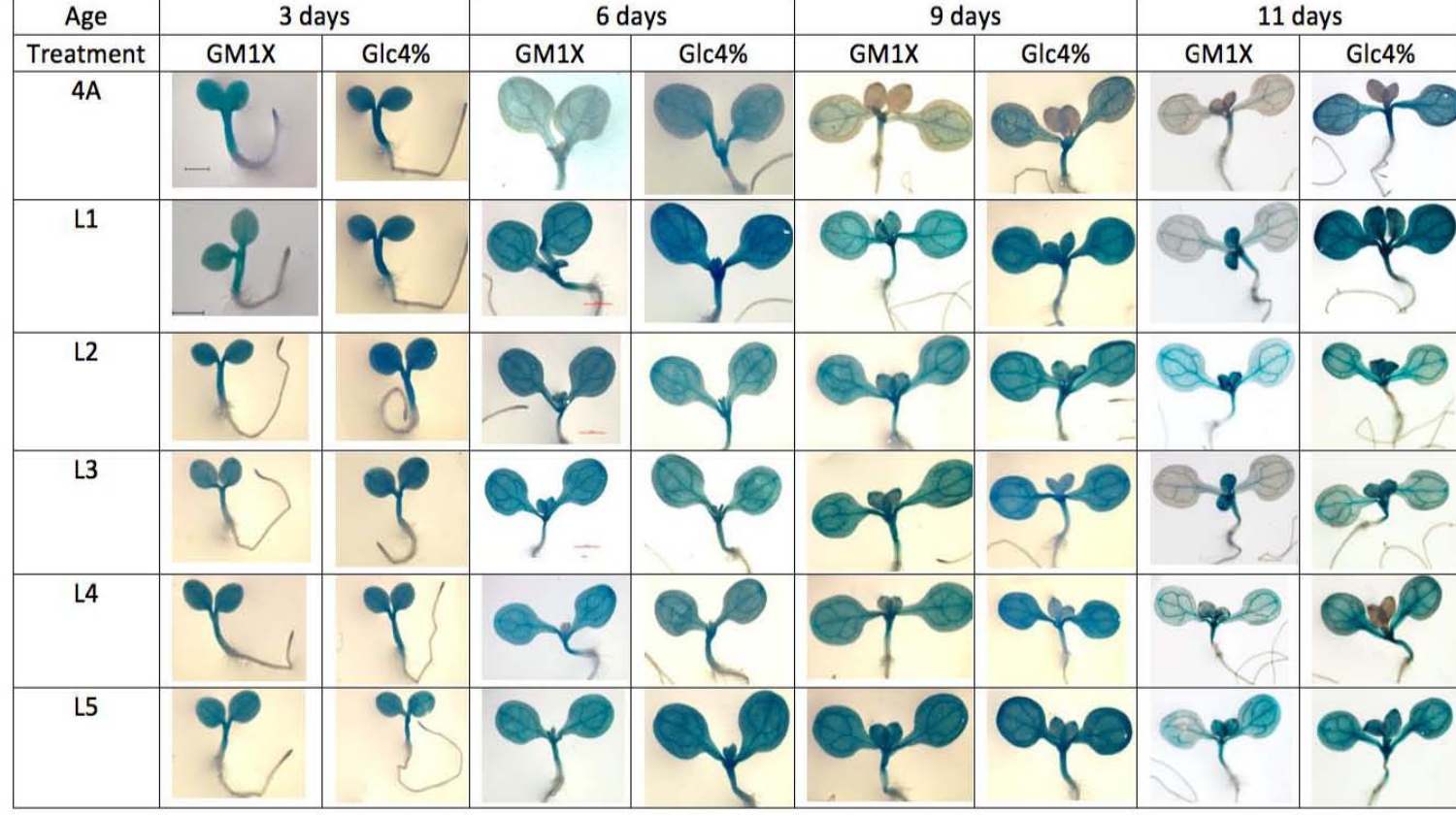


Fig. 1 Análisis histoquímico de plántulas de cinco líneas diferentes con la construcción de 3kb pABI4::GUS de la generación T2 de diferentes etapas de desarrollo, crecidas en medio con y sin glucosa. Compradas con la línea 4A de referencia.

Línea	3 días		6 días		9 días		11 días		15 días	
	GM1X	Glc 4%	GM1X	Glc 4%	GM1X	Glc 4%	GM1X	Glc 4%	GM1X	Glc 4%
L1										
L3										
L4										
L5										
L6										
L9										

Fig. 2 Análisis histoquímico de plántulas de seis líneas diferentes con la construcción de 2kb pABI4::GUS de la generación T2 de diferentes etapas de desarrollo, crecidas en medio con y sin glucosa.

Línea	3 días		6 días		9 días		11 días	
	GM1X	Glc 4%	GM1X	Glc 4%	GM1X	Glc 4%	GM1X	Glc 4%
L1								
L2								
L5								
L6								
L9								

Fig. 3 Análisis histoquímico de plántulas de cinco líneas diferentes con la construcción de 2.5kb pABI4::GUS de la generación T2 de diferentes etapas de desarrollo, crecidas en medio con y sin glucosa.



Tabla 1. Proporciones de plantas resistentes y patrones de expresión por análisis histoquímicos en las líneas de la generación T2 para la construcción de 3kb pABI4::GUS




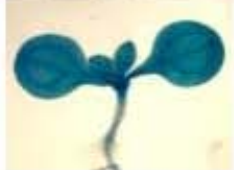




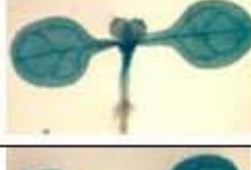
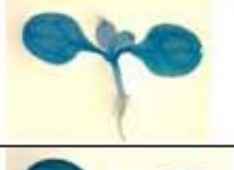











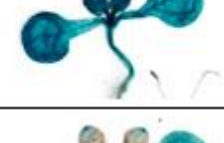


Edad	9 days		Proporciones
Tratamiento	GM1X	Glc4%	Resistentes T2
4A			
L1			58.3%
L2			64%
L3			65.3%
L4			70.5%
L5			69%

Tabla 2. Proporciones de plantas resistentes, patrones de expresión por análisis histoquímicos en las líneas de la generación T2 para la construcción de 2kb pABI4::GUS, y líneas de la generación T3 obtenidas en la selección.

Línea	9 días	11 días	Proporciones T2	Líneas T3
L1			79%	L1-2 L1-3 L1-4
L3			79%	L3-1 L3-2 L3-3 L3-4 L3-5 L3-6 L3-7 L3-8
L4			58%	L4-1 L4-2 L4-3 L4-4 L4-5 L4-6 L4-7
L5			71%	L5-1 L5-2 L5-4 L5-5 L5-6 L5-7
L6			78%	L6-1 L6-2 L6-5 L6-6 L6-7
L9			80.6%	L9-1 L9-2 L9-3 L9-4

- Lista de oligonucleótidos usados:

Nombre	Secuencia
pABI4 3kb-FW	5' - CAC CGC CCA GAG CAT TCA TTT CAC – 3'
pABI4 2kb-FW	5' - CAC CAA TGT CAG TTA TAT TTT G – 3'
pABI4 1kb-FW	5' - CAC CGA CCA TTT GAA CAT AAT G – 3'
EcoRV FW	5' - CAA TTT AAA TTG ACA AGT ACT TAG - 3'
pABI4 -89 RV	5' - CGA ATC AAG AAG GAA GGG AAA C - 3'
AttB1-adapter	5' - GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT- 3'
AttB2-adapter	5' - GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT- 3'
GUS 3 FW	5' - GAA AAC TGT GGA ATT GAT CAG C – 3'
GUS 4 RV	5' - ACC ATC AGC ACG TTA TCG AAT C – 3'
pABI4 2.5kb+attB1c FW	5' - GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGT GAG AGT TCC AAG GCA ATT G - 3'
pABI4 -89 +attB2c RV	5' - GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CGA ATC AAG AAG GAA GGG AAA C – 3'