

03081  
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

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

"CARACTERIZACIÓN DE UNA MUTANTE DE  
*Arabidopsis thaliana* ALTERADA EN EL MECANISMO  
DE REPRESIÓN METABÓLICA"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA  
P R E S E N T A :  
M. en C. FRANCISCO JESUS ARENAS HUERTERO

291940

TUTOR: DRA. PATRICIA LEON MEJIA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DE LA  
DRA. PATRICIA LEON MEJÍA, EN EL DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS DEL  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA, DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Agradezco a los miembros del jurado, la lectura y corrección de la presente tesis:

<b>Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles</b>	<b>(Presidente)</b>
<b>Dra. Patricia León Mejía</b>	<b>(Secretario)</b>
<b>Dr. David R. Romero Camarena</b>	<b>(Vocal)</b>
<b>Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop</b>	<b>(Vocal)</b>
<b>Dr. Miguel Lara Flores</b>	<b>(Vocal)</b>
<b>Dr. Mario Rocha Sosa</b>	<b>(Suplente)</b>
<b>Dra. Elena Alvarez Buylla Roces</b>	<b>(Suplente)</b>

## AGRADECIMIENTOS

En especial a la **Dra. Patricia León Mejía**: por su paciencia, dedicación, entusiasmo y formación; por su compañía, su amistad y comprensión incondicional hacia mí, y por haber confiado cuando me cambié a su laboratorio, que finalmente se hizo realidad esta etapa de mi formación académica. Todo ese tiempo de convivencia tendrá un valor incalculable en mi vida, muchas gracias Pati!...

A todos mis compañeros del laboratorio: la Sra. Lourdes por mantener el lab funcional, a nuestra técnico Martha Trujillo por su responsabilidad en el trabajo y los sabrosos postres que preparó y pude disfrutarlos!

A los miembros del laboratorio de *Arabidopsis*: Lucero Gutiérrez por aconsejarme sabiamente trabajar con *Arabidopsis* y por ser una gran amiga, Analilia Arroyo por haber sido mi maestra en el manejo de *Arabidopsis* y por sus valiosas discusiones y ser una excelente compañera del lab. A Araceli Cantero por sus consejos en el trabajo y su gran compañía en todos los momentos. A Juan Manuel Estévez por contagiarme de su entusiasmo en los isoprenoides y de la importancia de CLA, ah! y de los caballos. A Cynthia Romero por recordarme el orden en los seminarios. A Aidé que llegó como una semillita de *Arabidopsis*, al lab. A Marcela Treviño y Stuart Reichler, aunque breve pero sustanciosa su compañía y discusiones en los seminarios.

A los miembros del laboratorio de Frijol: A Mario Rocha por sus discusiones en el laboratorio y en los seminarios, por su comprensión. A Berenice García, por su amistad, compañía y valiosos consejos en el lab. A Gabriela Sepúlveda, por su amistad y convivencia. A Helena Porta por sus consejos en el laboratorio, su comprensión y compañerismo. A Teresa Maldonado, por su carisma y grata compañía, por la buena persona que hay en ella y que siempre supo que la hacia salir. Por su compañía en el Congreso de Québec en el 2000. A Pati Rueda por ser la persona más imparcial, por ser gran amiga y por rescatarme siempre que tenía el antojo de comer algo, también por aguantarme estos 3 años.

### A MI FAMILIA:

A mi Madre, Catalina Huertero porque su recuerdo siempre será mi ejemplo.

A mi Padre, Alfredo Arenas Olmos por su gran ejemplo del padre único en el mundo: su amistad, comprensión, ayuda, preocupaciones, sabios consejos y por su amor y cariño hacia mí.

A todos mis hermanos: Evangelina, María Luisa, Alfredo, Cynthia y Luis Alfonso, que son la bendición más grande que Dios me ha dado, por su compañía, amor y cariño hacia mí.

En especial a mis hermanas Susana y Cati, cuyo lazo cada vez más se estrecha. A Cati por todo su apoyo en Junio del 99 en Nutrición y porque serás siempre una página en mi diario.

A mis sobrinos Guiguís, David Isai, Lluvecita, Alfredito, Ana Luisa, José María, Erikito y su hermanita que está por nacer, porque son mi recordatorio de no olvidar la otra parte de mi persona y mis compromisos por mejorar este mundo, para dejarles uno con mayores oportunidades.

A Ivonne, José Luis, David y Edmundo, por su convivencia, cariño y comprensión hacia mí. Por querer a mis hermanos y ser también los míos.

#### A MIGUEL ANGEL MENDEZ:

Por su entrega, cariño y amor incondicional; por su comprensión, amistad y apoyo. Por su convivencia y por ser compañeros incondicionales en esta etapa de nuestras vidas. Por recordarme lo importante que es el Francisco no científico, que puede querer también lo que no sale en el laboratorio, y por enseñarme a tener confianza en expandirme, con todo y los miedos, temores e incertidumbres. Por enseñarme a que los señalamientos o juicios no son las mejores maneras de cuestionar!. Por muchos años más!!!

#### A MIS COMPAÑEROS DEL IBT:

Noemí Flores, Bety, Georgina, Verónica, Janet, Meche, Chava del Laboratorio de Bolívar, por toda su comprensión, confianza, apoyo, cariño y paciencia.

A Lucía Perezgasga, Enrique Reynaud, Louis, Juan Castro, Miguel Corona y Carlos del Laboratorio de las moscas, así como a Mario Zurita. En especial a Lucía y Enrique por su amistad incondicional y apoyo.

A Félix Recillas, Diana, Verónica, Susana, Jesús, Enrique Salas, Denhi, Rodrigo, David y al Dr. Luis Covarrubias, por su apoyo en el primer año que estuve trabajando con ustedes en el IBT, persiguiendo el sueño de trabajar con cáncer cérvico-uterino.

A todos por las fiestas de celebración de examen de grado y por los torneos de voli: a los del laboratorio del Dr. Possani y al equipo "Toxanis".

## ÍNDICE GENERAL

### INTRODUCCIÓN

- La necesidad de regular las concentraciones de glucosa en los organismos	2
- Regulación metabólica por carbono en bacterias	3
Regulación en bacterias gram-negativas	3
Regulación en bacterias gram-positivas	6
- Regulación por carbono en levadura	9
- Efectos de la glucosa sobre los niveles de control	10
- Elementos que participan en la transducción de la señal	11
Inicio de la señal	12
Los activadores del sistema en ausencia de glucosa	14
Los represores del sistema en presencia de glucosa	16
Elementos intermediarios del sistema	18
Elementos que juegan un papel indirecto en el sistema	20
- Regulación por carbono en mamíferos	22
- Regulación por carbono en plantas	25
Elementos que participan en el sistema de regulación	26
Otros mecanismos que operan en la señalización	30
Participación del fosfato en la regulación por carbono	31
Participación del nitrógeno en la regulación por carbono	32
El estudio de las mutantes de regulación por carbono	33
El papel de las hormonas en la regulación por carbono	36
Participación de los diferentes estreses en la regulación por carbono	38
<b>OBJETIVO</b>	40
<b>RESULTADOS</b>	
<b>Artículo</b>	
<b>Resultados no incluidos en el artículo</b>	
- Caracterización molecular de <i>gin5</i>	42
- Caracterización genética de <i>gin5</i>	46
- Caracterización fisiológica de <i>gin5</i>	53
Respuesta a diferentes azúcares durante el desarrollo	53

Efecto de diferentes polioles durante el desarrollo	57
Efecto de diferentes azúcares en la elongación del hipocotilo	59
Efecto de la glucosa en el contenido de pigmentos	59
Respuesta a diferentes hormonas vegetales	61
Evaluación del estrés por riego	65
Respuesta frente a estrés salino	66
Efecto de la glucosa en la síntesis de prolina y en la activación del gen P5CS1	70

## **DISCUSIÓN**

- La glucosa como molécula señal	76
- Las plantas como modelo de estudio	76
- La regulación por carbono y la participación de la hormona ABA	77
- La participación del gen GIN5 en la regulación por carbono y la señalización por ABA	78
- La mutante <i>gin5</i> tiene afectadas las respuestas a otras hormonas vegetales	79
- La mutante <i>gin5</i> contiene mayores concentraciones de pigmentos	79
- La mutación de <i>gin5</i> está en la vía de la hexocinasa	81
- Los azúcares afectan en menor magnitud a <i>gin5</i>	82
- La mutante <i>gin5</i> tiene un mayor número de pelos radiculares	83
- La mutante <i>gin5</i> en presencia de etileno inicia más pronto la senescencia	83
- La mutación de <i>gin5</i> permite explicar otras vías de biosíntesis de ABA	84

<b>CONCLUSIONES</b>	88
---------------------	----

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	90
-----------------------------------	----



## RESUMEN

Los azúcares proporcionan energía a las células y además, son moléculas señal que regulan diferentes procesos celulares como la división celular, la diferenciación y la morfogénesis. Así como la asimilación de nutrientes como nitrógeno y fósforo. A pesar de que en los últimos años se han realizado avances importantes en el entendimiento de los mecanismos de regulación por azúcares en plantas, quedan muchos eventos por entender.

En plantas como *Arabidopsis*, la existencia de mutantes generadas por la inserción del T-DNA, representa una oportunidad para la clonación de los genes afectados en el proceso de regulación por carbono.

En este trabajo, se aisló una mutante glucosa insensible, denominada *gin5*, por un método de selección que consistió en obtener plantas capaces de germinar *in vitro*, y a desarrollarse en concentraciones elevadas de glucosa: 7%. Las plantas silvestres a ésta concentración de glucosa detienen su desarrollo. El objetivo del presente proyecto fue caracterizar molecular, genética y fisiológicamente a la mutante *gin5* de *Arabidopsis thaliana*.

Los resultados mostraron que la planta *gin5* contiene una mutación de tipo recesivo. Un aspecto interesante es que además del fenotipo insensible a alta glucosa, fue la presencia de marchitez en la planta. La mutación fue provocada por la inserción de un T-DNA, que se localizó hacia el extremo 3' de un gen cuya fase de lectura abierta muestra homología a enzimas con actividad de hidroximetiltransferasa. Físicamente la mutación se ubicó hacia el telómero superior del cromosoma 1, a 2.5 cM del marcador genético ABA3. Genéticamente se comprobó que *gin5* es alelo de *aba3-2*. En las plantas mutantes se encuentra afectada la regulación de varios genes fotosintéticos como *CAB1*, *PC* y *RBC-S*, que se sabe están regulados en la vía de la hexocinasa. Además, por primera vez se demostró la regulación en esta misma vía del gen *CLA1*, que participa en la ruta biosintética de isoprenoides en cloroplasto.

Se comprobó que otras mutantes afectadas en la biosíntesis de ABA como las mutantes *aba*, son insensibles a alta glucosa como *gin5*. Estos resultados sugirieron fuertemente que se requiere de ABA durante la regulación por carbono. Este hecho se corroboró al demostrar que plantas silvestres crecidas en alta glucosa, elevan los niveles de ABA hasta 9 veces que cuando las condiciones de glucosa son bajas, 2%. Este fenómeno no se observó durante el crecimiento de plántulas de *gin5* a 100 nM de ABA en alta glucosa. En estas condiciones se re-establece la sensibilidad del sistema percepción y regulación por carbono de *gin5* como sucede en plantas silvestres.

Bioquímicamente, se sabe que la mutante *aba3-2* tiene afectada la actividad de aldehído oxidasa, por la falta de modificación del cofactor de molibdeno para ésta enzima. La mutante *gin5* también está afectada en la actividad de ésta enzima, que se requiere en el último paso de la biosíntesis de ABA.

La respuesta fisiológica frente a diferentes hormonas vegetales solo mostró mayor desarrollo de pelos radiculares en presencia de altas concentraciones de auxinas, así como el inicio temprano de la senescencia en altas concentraciones de precursor de etileno.

La mutante *gin5* es insensible a altas concentraciones de sacarosa y fructosa; así como resistente a agentes osmóticos como manitol y polietilenglicol 8000. También es resistente a 200 mM de NaCl, concentración que es completamente tóxica para las plantas silvestres. No existen razones claras para explicar esta resistencia a estrese osmóticos y salinos. Sin embargo es posible que la concentración elevada de azúcares en *gin5*, funciones como osmolitos protectores.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que la mutante *gin5* está afectada en la vía de señalización por carbono, dependiente de la hexocinasa, y que requiere de la elevación endógena de ABA, para regular la concentración de carbono. El alto contenido de azúcares en *gin5*, permite su resistencia a estreses osmóticos y salinos; siendo un mecanismo descrito por primera vez, que le ofrece ventajas a ésta mutante para contender con diferentes estreses. Este es el primer reporte que documenta la interconexión entre las vías de señalización por glucosa, y la participación de la hormona ABA en la regulación por carbono en plantas.

## SUMMARY

Sugars act as energy sources and as signal molecules. Sugars control several processes in plants as cell division, differentiation, morphogenesis and nutrient assimilation. The study of sugar sensing and signaling is a central aspect in plants. In last years, important advances have been achieved in signal transduction pathways for sugar responses in plants. However, there is still a poor understanding of the process.

There is a T-DNA-mutagenized *Arabidopsis thaliana* collection, so we applied a genetic screen based on development arrest of wild-type plants in the presence of 7% of glucose. Thus, we isolated a glucose insensitive mutant, *gin5*. The *gin5* mutant develops green and expanded cotyledons in the presence of high glucose.

The aim of this study was to describe the molecular, genetic and physiologic characterization of *gin5*. Genetic studies showed that mutant phenotype behaves as a single recessive mutation, that co-segregated with a wilty phenotype. The insertion site of T-DNA on *gin5* DNA was 2 Kb downstream of a open reading frame for a gene with hydroxymethyltransferase activity. Genetic mapping indicates that the *gin5* mutation mapped to 2.5 cM from genetic marker ABA3, on chromosome 1. Genetic crosses between *gin5* and *aba3-2* revealed allelism between these mutants. In other ABA mutants such as *aba1-1* and *aba2-1* we found an insensitive phenotype to 7% glucose as *gin5* and *aba3-2*. These results suggested that low ABA levels present in these mutants decrease their glucose sensitivity. A dramatic increase (7-9 fold) in the ABA levels was observed in wild-type plants but not in *gin5* plants when grown with 7% glucose. When 100 nM ABA was exogenously applied to the medium, almost all *gin5* and *aba1-1* plants became sensitive to 7% glucose, similar to wild-type phenotype.

RNA blot analyses showed an altered regulation in *gin5* mutant of three photosynthetic genes that have been showed to be regulated by HXK-dependent pathway: *CAB1*, *PC AND RBC-S*. We proved the regulation of *CLA1* gene in the same HXK-pathway as photosynthesis genes.

Biochemical characterization demonstrated an absence of aldehyde-oxidase (AO) activity in *aba3-2* mutant. This lost of AO activity was demonstrated also in *gin5* plants. This enzyme participates in the last step of ABA biosynthesis.

The *gin5* plant is also insensitive to high concentrations of sucrose, fructose, mannitol and polyetilenglycol 8000. Also, *gin5* plants are resistant to 200 mM NaCl, when this salt concentration is toxic to wild-type plants. There are not clear reasons for to explain the osmotic and saline resistant phenotype in *gin5*, but we know that this mutant accumulates more sugars than wild-type plants. These sugars could participate as osmolites and protect the plants against osmotic and saline stresses.

The physiological response of *gin5* to several hormones revealed a higher growth of radicular hairs at high doses of auxins. Also, *gin5* showed an early senescence in high doses of ethylene.

These results provide the first direct evidence to support a novel and central rol of ABA in plant glucose regulation by high ABA levels by *GIN5* gene. The high content of sugars in *gin5* gives a resistant phenotype to osmotic and saline stresses. This is a novel mechanism described in *Arabidopsis* and is dependent of ABA action

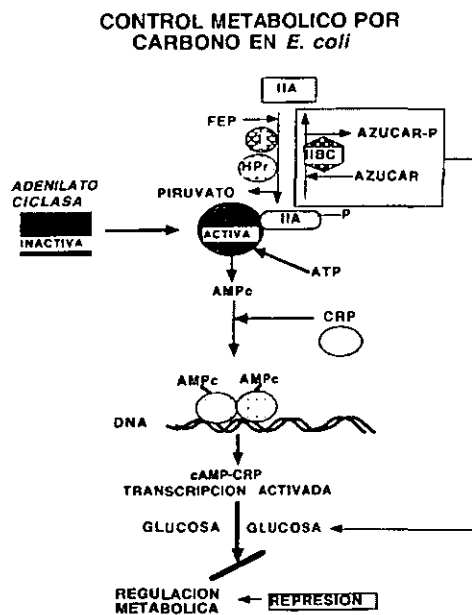
### *REGULACIÓN METABÓLICA POR CARBONO EN BACTERIAS.*

Los estudios de regulación por carbono en bacterias han llevado a la descripción del sistema conocido como PTS (del inglés "phosphotransferase system"), como uno de los elementos clave no sólo en la regulación por glucosa (Saier y cols, 1995; Stulke y cols, 1998), sino también con influencia en la generación de compuestos aromáticos heterocíclicos y no aromáticos de importancia industrial (Saier, 1992).

### *REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE CARBONO EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.*

*Escherichia coli* representa la bacteria modelo de estudio de sistemas procariontes. Como otros organismos, *E. coli* puede utilizar como fuentes de carbono varios azúcares y así obtener los intermediarios metabólicos necesarios para su ciclo de vida; pero la glucosa es la fuente de carbono preferencial. El metabolismo bacteriano es controlado por el sistema PTS, el cual se regula por la fosforilación de diferentes proteínas (Saier, 1995; Stulke, 1998; Saier, 1992). Este sistema parece ser el más importante en el transporte de azúcares. A su vez regula también las actividades de otras permeasas como los "simporters" de azúcar-H<sup>+</sup> y de azúcar-Na<sup>+</sup> y a los transportadores de azúcar dependientes de energía (Saier, 1995). El sistema PTS, además de regular directamente el transporte de azúcares, regula también indirectamente la expresión de genes, modulando la actividad de la adenilato ciclasa y en consecuencia los niveles de AMPc. La adenilato ciclasa es la enzima responsable de la biosíntesis de AMPc, a partir de ATP. La concentración de AMPc, así como de la proteína que lo une -denominada en inglés CRP- regulan la transcripción de un gran número de operones en la célula bacteriana (Saier, 1995; Harman y Botsford, 1992). Otros procesos que dependen de la concentración de AMPc son por ejemplo, la formación del flagelo, la producción de toxinas y el crecimiento en anaerobiosis entre otros (Harman y Botsford, 1992). La adenilato ciclasa en *E. coli* está codificada por el gen *cya*, que es a su vez es regulado negativamente por el complejo AMPc-CRP. En *E. coli* y en *S. typhimurium*, el complejo AMPc-CRP se une al promotor del gen *cya*, bloqueando su interacción con la RNA polimerasa (Harman y Botsford, 1992; Montminy, 1997). Por otro lado, el sistema PTS regula la adenilato ciclasa de manera

postraduccional, via la proteína IIA-fosforilada. A consecuencia de la reducción de la actividad de la adenilato ciclasa se reducen los niveles del AMPc, lo que provoca la inhibición de la transcripción de un gran número de genes involucrados en el metabolismo de fuentes alternas de carbono. fenómeno que se denominó inicialmente como "represión catabólica", ya que se generaba por el catabolismo de la glucosa. En ausencia de glucosa, la adenilato ciclasa se encuentra totalmente fosforilada, que es su estado activo. En presencia de glucosa, la adenilato ciclasa sufre desfosforilación y esta modificación la lleva a un estado inactivo, con la consecuente disminución en la síntesis de AMPc (Saier, 1995). El exceso de AMPc no sólo es regulado por la inhibición de la adenilato ciclasa. Las células pueden regular el exceso de éste excretándolo, o degradándolo via la acción de una fosfodiesterasa (Harman y Botsford, 1992; Montminy, 1997).



**Figura 1.** Control metabólico en *Escherichia coli* como bacteria gram-negativa modelo (tomado de Saier y cols, *Trends Plant Sci* 1995; 20: 267-271).

El sistema PTS en bacterias gram-negativas inicia la regulación de la siguiente manera: el fosfoenolpiruvato (FEP) cede su grupo fosfato a la subunidad más pequeña del sistema PTS, la proteína IIA en un residuo de histidina, vía la enzima I y la proteína HPr. La adenilato ciclasa es activada alostéricamente por la forma fosforilada de la subunidad IIA. Una vez activa, procede la síntesis del AMPc a partir de ATP. El AMPc se une a la proteína unidora del AMPc (en inglés CRP). Posteriormente, el complejo AMPc-CRP es capaz de unirse al DNA para activar (ó inhibir) la transcripción de múltiples genes. Algunos operones que son controlados por la interacción del AMPc-CRP son los de arabinosa, galactosa, maltosa y melibiosa (Harman y Botsford, 1992). La represión por glucosa se realiza al entrar ésta por la enzima IIC en la membrana, la proteína IIA es desfosforilada produciendo glucosa-6-fosfato como metabolito intermediario. La consecuente inactivación de la adenilato ciclasa, por ausencia de la subunidad IIA fosforilada, produce la disminución del AMPc en el citoplasma. Finalmente, se induce la separación del complejo AMPc-CRP pre-existente y no hay activación de genes, produciéndose represión catabólica (Saier y cols, 1995). La proteína IIA desfosforilada se une a varias proteínas blanco, modificándolas alostéricamente, tales como la permeasa tipo "simport" de lactosa-H<sup>+</sup> y la glicerol cinasa. De esta manera, al estar presente la glucosa como fuente de carbono inhibe su actividad y, en consecuencia, también inhibe el transporte y la utilización tanto de lactosa como de glicerol. Además, el sistema PTS puede controlar otros procesos fisiológicos en la célula bacteriana, tales como transporte, metabolismo y almacenamiento de fuentes de carbono; metabolismo oxidativo *versus* fermentativo; y la coordinación entre el metabolismo de nitrógeno y el de carbono. La regulación de estas funciones dependen de la capacidad del sistema para modificar por fosforilación las proteínas blanco correspondientes (Saier y cols, 1994).

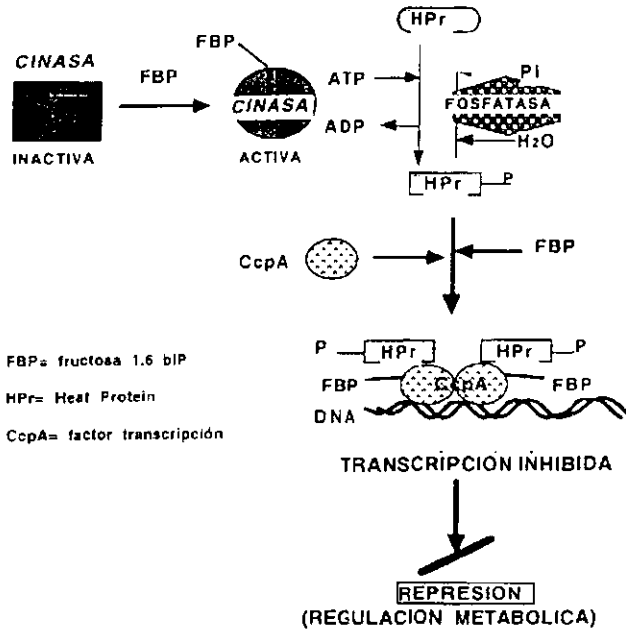
En algunos organismos como las levaduras, la presencia de glucosa induce una modificación de la estructura de la cromatina, impidiendo el acceso a la maquinaria transcripcional (Gancedo, 1998). Cuando las bacterias crecen en fuentes de carbono como acetato, se comprobó que la conformación del DNA de plásmidos se modifica hacia una más relajada, al menos de manera transitoria, después de la adición de glucosa al medio (Harman y Botsford, 1992). Estas alteraciones ponen de manifiesto

algunas de las similitudes en los procesos de regulación por fuentes de carbono entre diferentes organismos. y sugiere que éstos de alguna manera se han conservado.

#### *REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE CARBONO EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS.*

A diferencia de *E. coli*, las bacterias gram-positivas no sintetizan AMPc y carecen de la proteína receptora del AMPc (CRP). En *Bacillus subtilis* no se detecta AMPc, aún en condiciones aeróbicas (Mach y cols, 1988), y durante el crecimiento en presencia de glucosa, el agregar AMPc exógeno no afecta la respuesta de regulación de genes (Nihashi y Fuschita, 1984). Además, no se han identificado proteínas similares de unión a AMPc como en bacterias gram-negativas (Hueck y Hillen, 1995). De esta manera, la regulación metabólica en estas bacterias difiere del de las bacterias gram-negativas (Harman y cols, 1995). Los estudios en *B. subtilis* han hecho aportaciones importantes en el mecanismo de regulación metabólica. Existe un factor de transcripción, denominado en inglés CcpA, que guarda homología con otras proteínas reguladoras en *E. coli* como los represores de lactosa, galactosa y fructosa. CcpA pertenece a la familia de reguladores transcripcionales LacI (Weickert y Adhya, 1992). La represión de genes regulados por carbono en *B. subtilis*, depende de la presencia de regiones *cis* en dichos genes, denominadas elementos de represión catabólica (CRE en inglés) a los cuales la proteína CcpA al parecer se une y reprime la transcripción de los genes correspondientes. Se han descrito poco más de 85 genes con regiones CRE en varias especies de bacterias gram-positivas, incluyendo los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Las regiones CREs muestran una gran variación en cuanto a la posición en los genes, pueden estar tanto en regiones promotoras como dentro en las mismas regiones codificadoras (Hueck y Hillen, 1995). Las regiones CREs no sólo confieren represión transcripcional de los genes, sino también activación transcripcional de otros genes como el de la acetato cinasa en *B. subtilis* (Kolb y cols, 1993). Este mecanismo de regulación se ejemplifica en la Figura 2:

## CONTROL METABOLICO POR CARBONO EN *B. subtilis*



**Figura 2.** Control metabólico en *Bacillus subtilis* como modelo para bacterias gram-positivas (tomado de Saier y cols. *Trends Plant Sci* 1995; 20: 267-271).

La acumulación de azúcares en el citoplasma de una bacteria gram-positiva es regulada por los procesos de exclusión y expulsión a través de vesículas. Los principales organismos en los cuales se ha comprobado la formación de vesículas derivadas de la membrana celular son *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus brevis* (Saier y cols, 1995).

La HPr (Heat Protein en inglés) que forma parte del sistema PTS, es fosforilada en el residuo de serina 46 por una proteína cinasa; esta fosforilación es dependiente de ATP. La cinasa se activa cuando los metabolitos fosforilados como la fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) y gluconato-6-fosfato se acumulan y forman un complejo. Esta cinasa es inactivada por fosfato inorgánico (Hueck y Hillen, 1995). La primera fosfatasa activada por fosfato inorgánico se aisló de *Enterococcus faecalis* y puede catalizar la desfosforilación de otras HPr de varios organismos gram-positivos (Deutchser y cols, 1985). De esta manera, en condiciones de crecimiento en glucosa,



la forma fosforilada de la HPr es predominante en células con alta actividad glucolítica. En contraste, la forma desfosforilada es predominante en condiciones de crecimiento sin glucosa (Reizer y cols, 1993). La fosforilación en este residuo de serina representa un paso importante en la regulación de los genes de respuesta a glucosa en bacterias gram-positivas, además de regular la disponibilidad de energía (Hueck y Hillen, 1995). Una vez fosforilada esta proteína, puede formar un complejo con la proteína CcpA y FBP. Este complejo se une a los elementos de represión por catabolito en las regiones reguladoras de los operones sensibles a represión catabólica. De hecho se propone que la HPr fosforilada se une y activa a la proteína CcpA, induciendo un cambio de conformación que la hace más afin por las regiones CRE de los operones sensibles a regulación metabólica por carbono. Este complejo nucleoproteico, junto con otras moléculas efectoras, retardan o bloquean el inicio de la transcripción (Saier y cols. 1995). De esta manera, la FBP es la molécula señal en bacterias gram-positivas mientras que el AMPc es la correspondiente señal en bacterias gram-negativas. Mientras la fosforilación en el residuo de serina de la HPr en *B. subtilis* induce a la represión de los genes blanco en presencia de glucosa, la forma fosforilada de la proteína IIA activa la transcripción en *E. coli* (Hueck y Hillen, 1995).

### REGULACIÓN POR CARBONO EN LEVADURA.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema eucarionte mejor estudiado en varios aspectos fisiológicos, y en especial la regulación de su metabolismo. El hábitat de la levadura *S. cerevisiae* (incluyendo el hábitat natural así como el de laboratorio) es rico en nutrientes. Durante su crecimiento en estos hábitats, las levaduras se enfrentan a cambios drásticos en la composición del medio, producto del consumo de los nutrientes y de la acumulación de metabolitos de desecho, incluyendo el etanol. Al igual que otros organismos, las células de levadura están bien adaptadas para mantener su crecimiento ante las condiciones cambiantes de su medio. Una fase importante en esta adaptación reside en el control de la expresión de un conjunto de genes requeridos para diferentes condiciones de crecimiento, ya sea induciendo su represión o activación. La presencia predominante de algún nutriente condiciona la activación de ciertos genes, así como la estabilidad de RNA mensajeros y de ciertas proteínas. La manera en cómo las células de levadura pueden percibir los cambios de nutrientes y producir los ajustes necesarios para seguir su ciclo de vida todavía no se conoce en su totalidad; sin embargo, se han hecho importantes avances para el caso de nutrientes como carbono, fósforo y nitrógeno. (Kruckeberg y cols. 1998).

### REGULACIÓN POR GLUCOSA EN LEVADURA

Cuando *S. cerevisiae* crece en un medio enriquecido, el flujo de carbono excede el flujo de nitrógeno hasta en un orden de magnitud dado que la glucosa es la fuente preferencial de carbono, cuando se encuentra en abundancia en el medio, existe una represión de los genes involucrados en la degradación de otras fuentes de carbono como galactosa, maltosa o etanol. Además, la presencia de glucosa reprime la biogénesis de nuevas mitocondrias; así se produce un cambio en el balance de ATP, y del metabolismo oxidativo al fermentativo. Los cambios metabólicos se presentan, a partir de la represión de todos los genes responsables para la utilización de otras fuentes de carbono y, la inducción de los genes responsables para la utilización de la glucosa (Serrano, 1991). Entre el grupo de genes inducidos están los genes que codifican para los transportadores de azúcares. Los cambios rápidos en las células que se adaptan de una fuente de carbono a otra, implican modificaciones

postraduccionales. Por ejemplo, en presencia de glucosa se induce el recambio de los transportadores de maltosa y galactosa. Otros cambios que se inducen son la activación de la adenilato ciclasa y la acidificación del citoplasma (Kruckeberg y cols. 1998).

### **EFFECTOS DE LA GLUCOSA SOBRE LOS NIVELES DE CONTROL GENÉTICO.**

Se sabe que la glucosa afecta la expresión de genes a diferentes niveles: disminuyendo la transcripción, disminuyendo la tasa de traducción, degradando su mensajero, e incrementando la tasa de degradación de la proteína (Gancedo, 1998). Del primer nivel de control, se describirá más adelante su regulación. Se sabe que la glucosa reduce la estabilidad del RNAm de la subunidad de una ferro-proteína de la succinato deshidrogenasa y de hecho se induce su degradación muy rápido. Para las subunidades de la succinato deshidrogenasa, en presencia de glucosa los RNAm disminuyen en su tiempo de vida media de más de 1 h, a menos de 10 min. La glucosa reduce la estabilidad de RNAm de varias proteínas; algunos ejemplos lo representan las proteínas Cyc1, cuya vida media se reduce en presencia de glucosa (de 12 min a 2 min); el de la proteína Mal63, que disminuye de 25 min a 6 min. (Serrano, 1991). La glucosa induce de manera importante la inactivación y/o proteólisis de un gran número de proteínas, que van desde enzimas de la vía gluconeogénica hasta moléculas transportadoras, sin embargo no se conoce aún si estos son los mismos mecanismos que están operando en la regulación por glucosa de cualquier tipo de gen. El ejemplo mejor estudiado hasta ahora, es la fosforilación inducida por la glucosa, de la fructosa-1,6-bisfosfatasa y la proteólisis de la misma, ya sea vía ubiquitina o vía su degradación en el interior de la vacuola. Se sabe que la glucosa induce la síntesis de proteínas requeridas para la degradación de proteínas, ya sea por vía intravacuolar o por vía del proteosoma (Mazon y cols. 1982; Serrano, 1991).

## ELEMENTOS QUE PARTICIPAN DURANTE LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL POR GLUCOSA

### PERCEPCIÓN DE LA SEÑAL.

Para desencadenar el proceso de transducción, la célula debe primero registrar la presencia de la molécula señal y posteriormente transducir dicha señal para promover una respuesta bioquímica. Sin embargo, la interpretación de la señal depende de varios factores: qué respuesta es la que se está evaluando, el tiempo transcurrido entre la recepción de la señal y el momento de la medición, así como el estado fisiológico de la célula antes del proceso. Además, no hay que olvidar que existen varios puntos en una vía de transducción que podrían tocarse con otras vías, y pueden desencadenar efectos pleiotrópicos que afecten su interpretación (Serrano, 1991).

Uno de los genes que se propone, codifica para la molécula receptora de la señal de glucosa es el gen *SNF3*, que fue originalmente identificado en mutantes incapaces de llevar a cabo la fermentación en presencia de sacarosa (en inglés, *sucrose nonfermenting mutation*, *snf3*). Estas mutantes expresan constitutivamente el gen de la invertasa, el cual es reprimido en presencia de glucosa. Inicialmente, se postuló que el no fermentar sacarosa se debía a un efecto en el transporte de glucosa y fructosa (Neigeborn y Carlson, 1984). Posteriormente se confirmó que la secuencia del gen de *SNF3* codifica para una proteína que presenta la estructura básica de los transportadores de glucosa, pero además de poseer los 12 dominios transmembranales, tiene en su extremo carboxilo terminal una extensión de aminoácidos que se localiza hacia el citoplasma (Celenza y cols, 1998). Estudios de delección han demostrado la importancia de este dominio carboxilo-terminal, para que Snf3 pueda funcionar como molécula receptora de la señal de bajas concentraciones de glucosa, y de esta manera, inducir la transcripción de los transportadores de glucosa de alta afinidad. Además, este dominio es intercambiable e indispensable para la función receptora, ya que proteínas quiméricas compuestas por el transportador clásico de glucosa (Hxt-2) más el dominio carboxilo de Snf3, genera una molécula receptora de la señal, similar a la molécula Snf3 nativa, capaz de desencadenar una transducción de la señal (Vagnoli y cols, 1998). Posteriormente se aisló otra mutante denominada *rgt2* (Marshall-Carlson y cols, 1991). El gen *RGT2* codifica para una proteína con alta similitud con Snf3.

además de poseer también un dominio carboxilo-terminal hacia el citoplasma. Este motivo sólo se encuentra presente una vez, a diferencia del de Snf3 que se encuentra repetido dos veces (Ozcan y cols. 1996). La mutante *rgt2* presenta características importantes como la expresión constitutiva e independiente de glucosa, del gen *HXT1* (un transportador de hexosas) que es normalmente inducido por altas concentraciones de glucosa. Esto lleva a la propuesta de que **Rgt2** es capaz de percibir **altas** concentraciones de glucosa mientras que la proteína **Snf3** se encarga de percibir concentraciones **bajas** del azúcar. La expresión de *SNF3* se reprime por la presencia de glucosa, mientras que *RGT2* se expresa constitutivamente (Celenza y cols, 1988; Ozcan y cols, 1996). *SNF3* y *RGT2* controlan la transcripción de los genes de los diferentes transportadores de hexosas como *HXT1*, *HXT2*, *HXT3*, *HXT4*, *HXT6* y *HXT7* (Ozcan y cols. 1996; Liang y Gaber, 1996).

### INICIO DE LA SEÑAL.

#### *ACTIVACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE HEXOSAS.*

Se propone que cuando la glucosa se une a Snf3 o a Rgt2, provoca un cambio conformacional en el dominio carboxilo-terminal, sin la necesidad de llevarse a cabo la entrada de la glucosa. Mutaciones específicas en el dominio carboxilo de ambas proteínas producen una activación de la señal en ausencia de glucosa. Snf3 y Rgt2 por sí solas no son capaces de llevar a cabo la entrada de glucosa que permita mantener el crecimiento de las células, ni siquiera por la sobre-expresión de cualquiera de las proteínas (Ozcan y cols, 1998). Otro modelo sugiere que la unión intracelular de la glucosa al dominio carboxilo-terminal es el evento inicial en la transducción de la señal por carbono. La señal que genera la concentración intracelular de glucosa, integra la proveniente del medio extracelular y de ahí se traduce en la expresión de los transportadores de hexosas, para iniciar el ajuste metabólico de la célula. En condiciones normales, la concentración de glucosa intracelular varía en el rango de mM, mientras que las concentraciones extracelulares varían del orden de mM a M. De esta manera, es difícil aún entender de manera dinámica, cómo la levadura se puede ajustar a los cambios continuos del medio (Kruckeberg, 1998; Teusink y cols, 1998). El siguiente paso que sucede después de la percepción de la señal es la inducción de los genes de los transportadores de hexosas.

Rgt1 es una proteína con dominios de dedos de zinc que se une a los promotores de los genes para los transportadores de hexosas (en ausencia de glucosa) y recluta a los represores transcripcionales Ssn6 y Tup1 para inactivar estos genes. En **bajas concentraciones de glucosa**, Grr1 libera de la represión a los genes de los transportadores de hexosas, vía *SNF3*. En altas concentraciones de glucosa, Grr1 induce a Rgt1 para activar la transcripción del transportador de hexosas 1, *HXT1*; mientras que la vía de represión general inducido por la glucosa (dependiente de la actividad de la hexocinasa), reprime los genes de los transportadores de alta afinidad, *HXT2* y *HXT4* (Ozcan y Johnston, 1995; Ozcan, 1996). Otros factores también participan de manera paralela o aislada. Por ejemplo, *SKS1* que codifica para una proteína cinasa, induce la transcripción del gen *HXT2* de manera independiente de *SNF3* (Vagnoli y Bisson, 1998). De esta manera se tienen evidencias de los participantes abajo de las moléculas que perciben la presencia de glucosa extracelular. Recientemente se demostró que los extremos carboxilo terminal tanto de Snf3 como de Rgt2, pueden interaccionar con otros factores de transcripción (Krukkeberg, 1998).

#### *PAPEL DE LA HEXOCINASA.*

Las mutaciones en el gen de la hexocinasa 2 (*HXK2*) demostraron su papel durante la regulación por carbono. Estas mutaciones impiden la represión por glucosa de varios genes, entre ellos el de la invertasa (Entian, 1980). La Hxk2 tiene dos funciones: una catalítica y otra reguladora. Esta enzima existe en un equilibrio entre la forma monomérica y dimérica. La presencia de glucosa, por ejemplo, favorece la desfosforilación de la enzima y desplaza el equilibrio a la forma dimérica. De esta manera la actividad catalítica se favorece. En contraste, en bajas concentraciones de glucosa el equilibrio se desplaza a la forma monomérica, con la consecuente fosforilación de la enzima (Randez-Gil y cols, 1998). Aunque no se conoce cuál proteína fosforila a la Hxk2; se postula que sufre autofosforilación. Lo que sí es patente, es que se requiere que la enzima esté modificada para inducir su desfosforilación por parte del complejo Cid1/Glc7 y transducir la señal (Gancedo, 1998; Randez-Gil y cols, 1998).

#### *PAPEL DEL COMPLEJO TREHALOSA-SINTETASA.*

La proteína Tps1 es la subunidad del complejo trehalosa sintetasa, que participa en la síntesis de la trehalosa-6-fosfato. Se ha sugerido a esta enzima como parte del mecanismo de percepción de glucosa. Inicialmente se propuso el requerimiento de Tps1, porque mutantes Tps- no pueden crecer en presencia de glucosa. Por otro lado, también se requiere la presencia de la Hxk2. Las dobles mutantes en estos genes no pueden crecer en glucosa. Sin embargo, utilizando células diploides que sólo están mutadas en un alelo de estos dos genes, revelaron que no se requiere la participación de Tps1, en el mecanismo de percepción de glucosa, pero sí es importante la presencia de la Hxk2 (Gancedo, 1998).

#### **LOS ACTIVADORES DEL SISTEMA DE REGULACION POR CARBONO, EN AUSENCIA DE GLUCOSA**

##### *PARTICIPACIÓN DEL COMPLEJO hap2/3/4/5.*

Este complejo activa la transcripción cuando levadura crece en fuentes de carbono no fermentables. Específicamente, se une a la secuencia consenso ACCAA(T/C)NA, denominada caja CCAAT. Las proteínas Hap2, Hap3 y Hap5 son requeridas completamente para la unión a la caja y son suficientes para que la unión se lleve a cabo. Hap5 interacciona con Hap2 y Hap3, y las une permitiendo la interacción con los dominios de unión al DNA. Las proteínas Hap3 y Hap5 contienen además motivos de unión a histonas. Hap4 es la proteína responsable de la activación de la transcripción (Mazon, 1982). Se sabe que la glucosa disminuye los niveles de transcripción de Hap2 hasta 5 veces que cuando crece en fuentes de carbono no fermentables. El complejo Hap2/3/4/5 juega un doble papel: remodela la estructura de la cromatina, sin requerir aparentemente la participación de Hap4. El otro papel es la activación directa de la RNA polimerasa en el que Hap4 puede estar participando (Gancedo, 1998). El factor TFIIB contiene una hélice anfipática, especialmente requerida para activar la transcripción del complejo Hap2/3/4/5 (Gancedo, 1998; Shaw, 1996).

##### *PARTICIPACIÓN DE Gal4.*

Esta proteína activa la transcripción de una familia de genes como *GALI*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10* y *MEL1*; todos ellos son requeridos para el catabolismo de la

galactosa y de la melibiosa. Todos estos genes tienen de una a 4 copias del elemento regulador UASgal, al cual se une Gal4. Gal4 es una proteína que tiene un dominio de unión a DNA en el extremo carboxilo terminal, que es del tipo de dedos de zinc, y 2 regiones de activación de naturaleza ácida: una cerca del dominio de unión al DNA y la otra en el carboxilo terminal. Su unión al DNA la realiza de manera dimerica. También Gal4 hace complejo con la proteína represora Gal80. Cuando hay galactosa en el medio, la proteína reguladora Gal3 se une a Gal80, evitando así su acción inhibitoria sobre Gal4. En contraste, cuando la glucosa está presente en el medio, la transcripción de los genes *GAL* se reprime, aún en presencia de galactosa en el medio (Suzuki-Fujimoto T y cols, 1996). La glucosa reprime la transcripción de *GAL4*, vía la proteína reguladora Mig1, que se une al promotor (Marmorstein y cols, 1992; Suzuki-Fujimoto y cols, 1996).

#### *PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA Mal63.*

La proteína Mal63 pertenece a la misma familia de las proteínas con dominios de dedos de zinc como Gal4, pero con algunas diferencias. Estas son: el poder dimerizarse, aún en ausencia de DNA; y carece de regiones ricas en glutamina, que parecen estar asociadas a la capacidad de activar la transcripción en otros sistemas. Todavía no se conoce el mecanismo por el cual esta proteína se activa en presencia de maltosa. Se propone que la maltosa se une a Mal63, y produce un cambio conformacional que activa a la proteína (Charron y cols, 1986). La glucosa reprime la expresión de los genes requeridos para la utilización de la maltosa, aún en presencia de ésta. Además, parece que la presencia de glucosa afecta la transcripción del gen Mal63. El efecto en la transcripción es mediado de manera importante por Mig1 (Hu y cols, 1995).

#### *PARTICIPACIÓN DE Adr1.*

El gen *ADRI* codifica para una proteína con dominios de dedos de zinc, que se identificó como activador de la expresión del gen *ADH2*, que codifica para la alcohol deshidrogenasa 2 y que se reprime por glucosa (Ciriacy, 1975). Adr1 se localiza en el núcleo y sus dominios son importantes para su unión al DNA (Blumberg y cols, 1987). Para activar la transcripción eficientemente, Adr1 requiere de un complejo co-

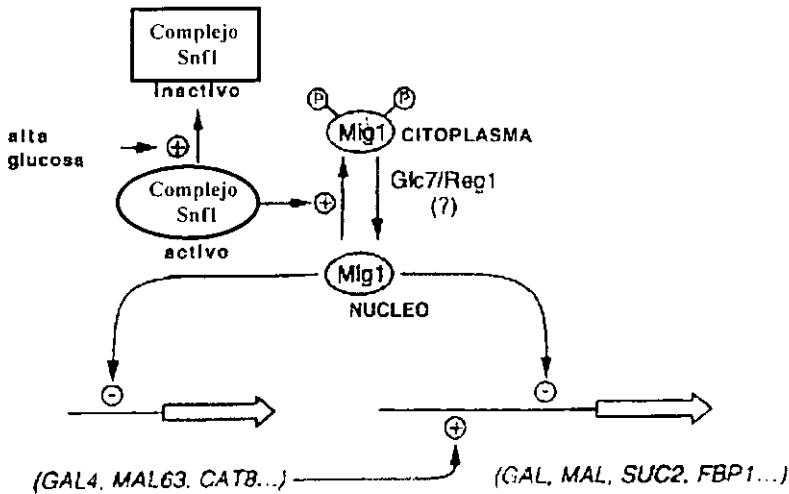


activador, para facilitar la acetilación de histonas e inducir un rearrreglo de los nucleosomas. La glucosa disminuye la transcripción del gen *ADRI* de 10 a 20 veces (Chiang y cols, 1996). La elevación de AMPc inhibe la transcripción de *ADRI*. Ya que la presencia de glucosa eleva el AMPc, es posible que esta vía este operando en la regulación del gen *ADRI*, fosforilando la proteína. Además se sabe que el gen *ADRI* es regulado postranscripcionalmente, pues la vida del mensajero en presencia de glucosa disminuye de 2h a 45 min (Cook y Denis, 1993).

### **LOS REPRESORES DEL SISTEMA DE REGULACIÓN POR CARBONO, EN PRESENCIA DE GLUCOSA.**

#### *LA PARTICIPACIÓN DEL COMPLEJO Mig1.*

La proteína Mig1 tiene dominios de dedos de zinc, y es capaz de unirse a los promotores de varios genes reprimidos por glucosa. La unión requiere de la presencia de la caja GC, pero además requiere de una región rica en AT hacia el extremo 5' de la caja GC. Se propone que la región rica en AT se requiere para estabilizar la interacción con el DNA y facilitar la formación del complejo DNA-proteína (Matsumoto y cols. 1982). Se sabe que los últimos 24 aminoácidos del extremo carboxilo terminal son suficientes para la represión. Se requiere de la participación de dos dominios de Mig1. Uno de estos dominios tiene una secuencia que representa un sitio potencial de proteína cinasa. El otro es el dominio carboxilo hacia los dominios de dedos de zinc, que se propone, dirige el transporte de la proteína al núcleo (Ostling, 1996). La proteína tiene dos serinas en las posiciones 311 y 381, que pueden ser potencialmente fosforiladas por Snf1. Todavía no se ha demostrado este hecho (Gancedo, 1998).



**Figura 3.** Proceso dinámico de Mig1 debido a modificaciones realizadas por Snf1, que le permiten activar o reprimir genes (tomado de Gancedo, *Microbiol Molec Biol Rev* 1998; 62: 334-361).

La figura 3 intenta explicar el proceso dinámico de Mig1: ésta interactúa con los promotores de los genes *GAL*, que son los genes requeridos para el metabolismo de la galactosa. Existe evidencia de que Mig1 ejerce su efecto represor, reclutando al complejo formado por las proteínas Tup1 y Cyc8 (Treitel y Carlson, 1995). Este complejo es capaz de reprimir a diferentes clases de genes de levadura, que dependen de la interacción DNA-proteína (Keleher y cols, 1992). Cyc8 y Tup1 pueden modificar la estructura de la cromatina y controlar la posición del nucleosoma. También pueden interferir directamente con los componentes basales de la maquinaria transcripcional (Cooper y cols, 1994). Existe evidencia de que la estructura de la cromatina se organiza de manera cerrada en la región del promotor de *SUC2* en presencia de glucosa. En cambio, las mutantes *cyc8* tienen una estructura de la cromatina más abierta, aún en presencia de glucosa (Hirschhorn y cols, 1992). Tup1 se une a las histonas H3 y H4, las cuales provocan la desrepresión de los genes regulados por el complejo Tup1-Cyc8. Mig1 es fosforilado en diferentes momentos del ciclo, aún en las células que están creciendo en fuentes de carbono fermentables y no fermentables (Celenza y cols, 1989). Liberar de la represión por Mig1, requiere de la actividad de la

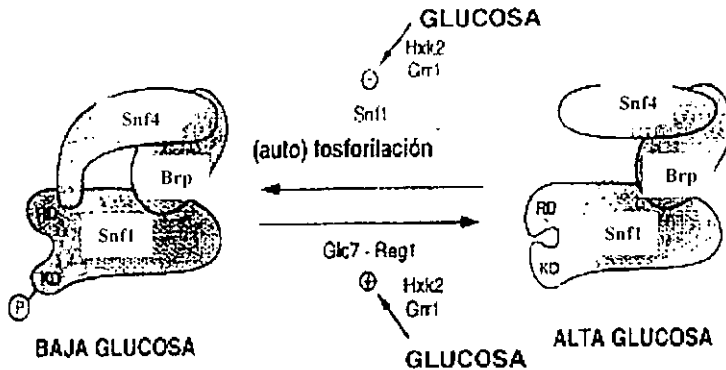
proteína cinasa Snf1, de esta manera el estado de fosforilación de Mig1 está relacionado con el control de la represión (Treitel y cols, 1995). Mig1 se localiza en el núcleo en células que están creciendo en presencia de glucosa. A los pocos minutos de retirar la glucosa del medio, Mig1 sufre fosforilación y es transportada al citoplasma (Devit y cols, 1997). Aunque Cyc8 y Tup1 también existen en formas fosforiladas, estas parecen no afectar sus funciones reguladoras (Redd y cols, 1997).

### ELEMENTOS INTERMEDIARIOS DEL SISTEMA.

#### *EL COMPLEJO Snf1.*

El gen SNF1 es requerido para la desrepresión de los genes reprimidos por glucosa (Carlson y cols, 1981). SNF1 codifica para una Ser/Tre proteína cinasa y tiene homología a la subunidad catalítica a de una proteína cinasa de mamíferos, activada por AMPc (Celenza y Carlson, 1986). La proteína Snf1 se encuentra asociada a otras proteínas: Snf4, Sip1, Sip2 y Gal83 (Celenza y Carlson, 1989). Se propone que las proteínas Sip1, Sip2 o Gal83 pueden actuar como puentes entre las proteínas Snf1 y Snf4, manteniéndolas juntas en el complejo (Jiang y Carlson, 1996). La figura 4 intenta explicar la regulación de Snf1 según las concentraciones de la fuente carbonada: en altas concentraciones de glucosa, el dominio regulador de Snf1 se une al dominio catalítico e inhibe su actividad de cinasa; en bajas concentraciones de glucosa, Snf4 interacciona con el dominio regulador de Snf1, interfiriendo con el efecto inhibitor del dominio (Gancedo, 1998; Jiang y Carlson, 1996). Snf1 no parece ser por sí misma sensible a la glucosa; sino que requiere de fosforilar algun(as) molécula(s) que son los blancos reales de la señal de la glucosa (Thompson-Jaeger y cols, 1991). No se ha reportado la cinasa que se encarga de fosforilar a Snf1. Sin embargo, llama la atención el hecho de no encontrar mutantes afectadas en la actividad de fosforilación de Snf1, lo que puede reflejar el hecho de que existan funciones redundantes por otras cinasas, o que realmente estas células no son viables de obtener en el análisis de mutantes (Gancedo, 1998). En presencia de glucosa, se genera una señal que requiere de Grr1/Cat80 y de la actividad de la hexocinasa 2 (Hxk 2), que facilita la desfosforilación de Snf1 por una proteína fosfatasa del complejo Glc7. Esta desfosforilación debilita la interacción entre Snf4 y el dominio regulador de Snf1, dejando libre el dominio catalítico (Jiang y Carlson, 1996; Gancedo, 1998). Las

mutantes *snf1* no pueden crecer en fuentes de carbono gluconeogénicas, sin embargo lo pueden hacer en condiciones de baja actividad de proteína cinasas dependientes de AMPc (Thompson-Jaeeger y cols, 1991).



**Figura 4.** Activación por fosforilación del dominio catalítico (KD) de Snf1, e interacción del dominio regulador (RD) con el dominio de unión a Snf4, en presencia de bajas concentraciones de glucosa. En alta glucosa, el dominio catalítico de Snf1 se regula por interacción con su propio dominio regulador. Brp, proteína puente entre Snf1 y Snf4 (tomado de Gancedo, *Microbiol Molec Biol Rev* 1998; 62: 334-361).

#### EL GEN *Glc7*.

Este gen codifica para una proteína fosfatasa tipo1, y controla un gran número de procesos, incluyendo la acumulación de glucógeno (Feng y cols, 1991). Por medio del análisis de sistema de dos híbridos, se evidenció la interacción entre *Reg1* y *Glc7*. También se puede proponer que *Snf1* puede ser blanco de *Glc7* (Tu y Carlson, 1995). Además, *Reg1* interacciona con la proteína *Grr1*. Esta proteína puede reconocer secuencias que marcan las proteínas para entrar a la vía de degradación, una de ellas puede ser *Reg1* (Gancedo, 1998).

#### LA PROTEÍNA *Grr1*.

Es una proteína de alto peso molecular con varios dominios de repeticiones ricas en leucina (Flick y Johnston, 1991). Es un componente del complejo enzimático que conjuga ubiquitina. De esta manera puede regular indirectamente a *Rgt1* (Li y Johnston, 1997). *Rgt1* es una proteína de unión a DNA que es capaz de reprimir o

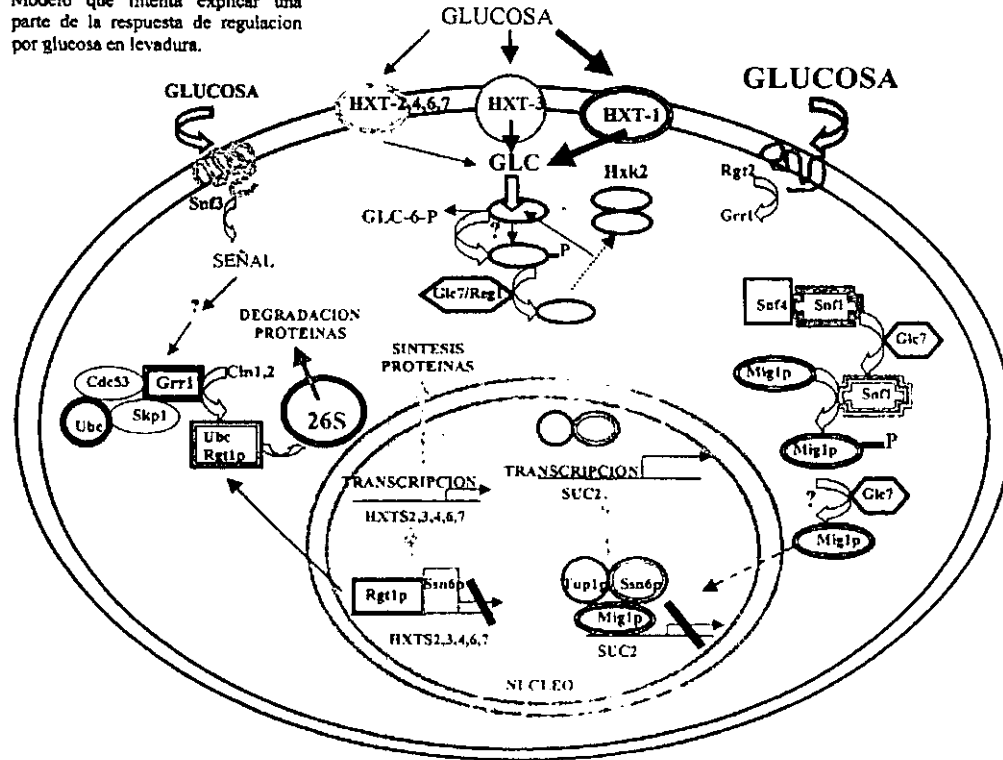
activar los genes de los transportadores de hexosas, en ausencia ó en altas concentraciones de glucosa (Ozcan y cols. 1996). Por otro lado, la proteína *Grr1* puede activar la función como represor de *Rgt1* en baja glucosa y, en alta glucosa la función de activador. La señal de glucosa puede ser transmitida via las moléculas de percepción de glucosa, *Snf3* y *Rgt2*. En ausencia de glucosa, *Rgt1* actúa permanentemente como represor y se libera la represión por glucosa de varios genes (Gancedo, 1998).

## **ELEMENTOS QUE JUEGAN UN PAPEL INDIRECTO EN EL MECANISMO.**

### *PAPEL DEL COMPLEJO Snf/Swi.*

Los genes *SNF2*, *SNF5* y *SNF6* se identificaron al analizar los genes necesarios para la transcripción del gen de la invertasa en condiciones de desrepresión (Neigeborn y Carlson, 1984). Estos genes se requieren para la transcripción de la alcohol deshidrogenasa y de la utilización de la galactosa, que son sensibles a regulación por glucosa (Peterson y Herskowitz, 1992). Posteriormente se comprobó que las proteínas *Snf* y *Swi* son componentes de un complejo multiproteico que incluye a *Sw1/Adr6*, *Snf2/Swi2*, *Swi3*, *Snf5*, *Snf6*, *Snf1*, *Swp73* y *Tfg3/TAF30*. No existe evidencia de que el complejo responda a la presencia de glucosa, sólo juega un papel indirecto en modular la expresión de los genes que son controlados a la represión catabólica (Gancedo, 1998). Por otro lado, el gen de la invertasa es reprimido, vía la interacción de las proteínas *Spt4*, *Spt5* y *Spt6*, con las histonas *H2A* y *H2B*, para producir una condensación de la cromatina, capaz de impedir la transcripción (Recht y cols, 1996). De esta manera, el complejo *Snf/Swi* se requiere para antagonizar el efecto de las proteínas *Spt* sobre la conformación de algunos genes regulados por glucosa (Gancedo, 1998).

Modelo que intenta explicar una parte de la respuesta de regulacion por glucosa en levadura.



## REGULACIÓN POR CARBONO EN MAMÍFEROS.

El nivel de la glucosa circulante en mamíferos, debe ser regulado porque tanto la hipoglucemia (disminución de azúcar) como la hiperglucemia (aumento de azúcar en la sangre) puede tener consecuencias importantes en la salud. En mamíferos, las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos de Langerhans son las que perciben los cambios nutricionales en el organismo, y responden modulando las concentraciones de glucosa con la secreción de insulina. La insulina es el principal regulador de las concentraciones de glucosa sérica en mamíferos. La secreción de insulina produce efectos biológicos tales como inhibir la producción de glucosa por parte del hígado y, en su caso, convertir el exceso de glucosa en glucógeno, estimulando la incorporación de glucosa en el músculo y en el tejido adiposo (Grupe y cols, 1995).

La percepción de glucosa se realiza por una elevación en el catabolismo de la misma, más que por una interacción receptor-ligando. En este punto es importante mencionar que la glucocinasa representa la molécula que percibe la señal de la elevación de la glucosa extracelular (Cook y Taborsky, 1990). La glucocinasa V se expresa exclusivamente en células  $\beta$  del páncreas, así como en los hepatocitos. Proteínas similares a la glucocinasa se han detectado en enterocitos del yeyuno, la pituitaria y en el hipotálamo medio (Jetton y cols, 1994). En el hígado, la glucocinasa puede participar en la regulación de la entrada de glucosa o de su salida, manteniendo un gradiente de concentración en la circulación sanguínea (Grupe y cols, 1995). La glucocinasa es un miembro de la familia de las hexosacinasas, tiene una alta especificidad por el sustrato, la glucosa, y tiene una  $K_m$  relativamente alta (10 mM), comparada con la de otras hexosacinasas (de 0.1 a 0.001 mM). La concentración fisiológica de glucosa en la sangre humana es de alrededor de 5 mM, por lo que la glucocinasa puede funcionar como sensor a estas concentraciones de glucosa; ésta función no la pueden realizar otras hexosacinasas como las hexocinasas I y II (Grupe y cols, 1995). Otra de las características de la glucocinasa es que no es inhibida alostéricamente por el producto final, la glucosa-6-fosfato. Así, debido a su  $K_m$  tan alta y a la ausencia de inhibición por el producto final, la fosforilación de la glucosa por la glucocinasa puede llevarse a cabo de manera paralela a las concentraciones circulantes de la glucosa en sangre (Epstein y cols, 1992). La glucosa y su metabolito gliceraldehído-3-fosfato son las principales moléculas inductoras de la secreción de

insulina. Las primeras evidencias puntualizaron que algunos metabolitos fosforilados de la glucólisis, eran las moléculas señal en las células pancreáticas  $\beta$ , ya que análogos de la glucosa como 2d-glucosa y 3-O-metilglucosa no eran capaces de inducir la secreción de insulina. Además, las células  $\beta$  carecen de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinas; de esta manera no pueden formar ninguno de los intermediarios tempranos de la vía glucolítica. Así, las células  $\beta$  perciben la glucosa por la generación y concentración de sus productos finales, basándose prácticamente en el flujo metabólico que puede variar de célula a célula en los diferentes tejidos. Las células  $\beta$  difieren de las neuronas o de los hepatocitos, en que el límite máximo de catabolismo de la glucosa en el caso del cerebro, esta por debajo de la concentración fisiológica de glucosa y no se incrementa el flujo metabólico (German, 1993). La *diabetes* es una enfermedad que se genera por la falta de producción de insulina o por una alteración en la respuesta a la insulina en las células. El análisis genético de una forma relativamente benigna de *diabetes* no insulino-dependiente en el humano, denominada diabetes juvenil, sugiere que la glucocinasa es la molécula que percibe la señal de la glucosa en las células  $\beta$  del páncreas. Aproximadamente el 50% de los pacientes con este tipo de *diabetes* esta asociada a mutaciones en el gen de la glucocinasa (Froguel y cols, 1993). Este tipo de mutaciones también se han reportado en otras variantes de *diabetes* como la de tipo gestacional (Stoffel y cols, 1993) y en la *diabetes* no insulino-dependiente descrita en poblaciones japonesas (Katagiri y cols, 1992). No existen reportes de individuos que carezcan completamente de la glucocinasa; esto sugiere que la deficiencia absoluta puede ser letal, aunque no se descarta que las restantes hexocinasas (como las hexocinasas I y II) puedan reemplazar la función de fosforilación de la glucosa, pero quizá no la de regulación (Grupe y cols, 1995). Modelos animales muestran que los "knockouts" para el gen de la glucocinasa inducen la muerte perinatal de los animales homócigos, debido a extrema hiperglucemia. Por otro lado, la sobre-expresión del gen de la hexocinasa de levadura en células  $\beta$ , aminora los síntomas de la enfermedad diabética en modelo de ratón. Estos datos sugieren que la glucocinasa es la molécula importante en la percepción de la señal (Epstein y cols, 1992). El promotor del gen para la hexocinasa que se expresa en hígado es inducido por la insulina. En las células  $\beta$  del páncreas, la actividad de la



glucocinasa es controlada a nivel traduccional o post-traduccional de acuerdo a los niveles de glucosa (Magnuson, 1992). Esto puede entenderse mejor en la Figura 5:

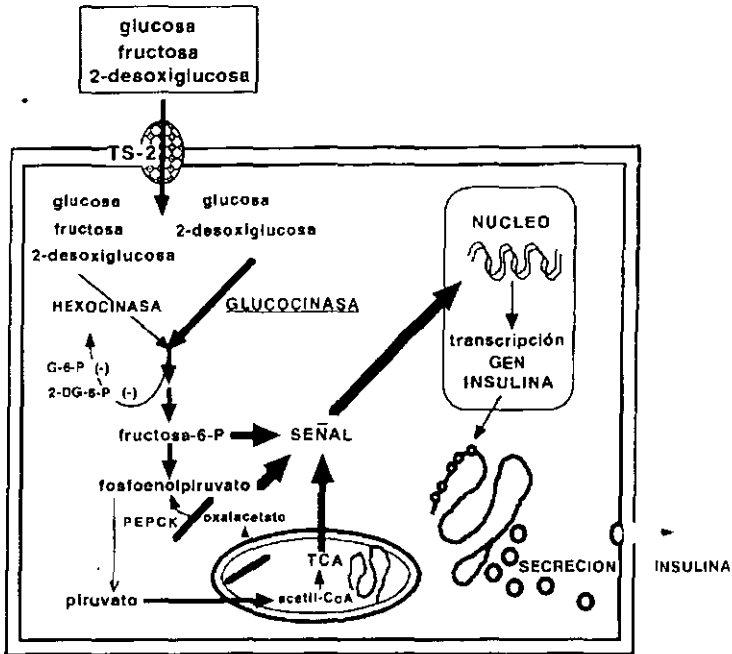


Figura 5. Modelo que intenta explicar la secreción de insulina como la molécula principal de regulación de los niveles sanguíneos de glucosa en mamíferos. Además de la importancia de la glucocinasa como la molécula que percibe y traduce la señal en las células  $\beta$  del páncreas (tomado de Epstein y cols, *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12038-12042).

## REGULACIÓN POR CARBONO EN PLANTAS

Las plantas superiores se desarrollan a partir de un embrión que depende del metabolismo heterotrófico de los productos de almacenamiento, que pueden ser desde aceites hasta azúcares y proteínas. Durante el crecimiento de las plantas, se generan hojas maduras que son capaces de realizar la fotosíntesis. Estos tejidos posteriormente, inician la exportación de azúcares a tejidos fotosintéticamente menos activos, o tejidos completamente consumidores de fotosintatos como raíces, frutos, flores y tubérculos. Sin embargo, esta dualidad de la planta no es estática. El ciclo de vida de la planta justamente se caracteriza por una transición de tejidos productores a tejidos consumidores de fotosintatos. También existen otros factores, tales como estreses bióticos y abióticos que pueden influir en la respuesta integral de la planta a los azúcares. En esta complejidad, están las influencias que pueden tener las hormonas vegetales, dejando claro que la influencia de los azúcares durante el desarrollo de las plantas, es más compleja de lo que puede parecer (Sonnewald y Willmitzer, 1992; Roitsch, 1999).

Los azúcares en las plantas, igual que en otros organismos son señales fisiológicas que reprimen o activan genes que participan en diferentes procesos como fotosíntesis, ciclo del glioxilato, respiración, síntesis y degradación de sacarosa y almidón, metabolismo del nitrógeno, mecanismos de defensa contra patógenos, respuesta a herida, senescencia y regulación del ciclo celular entre otros (Koch, 1996; Jang y Sheen, 1997). Los azúcares, además de ser la fuente de energía y de carbono de todas las moléculas orgánicas en las plantas (Chiou y Bush, 1996; Sauer y Stadler, 1993), participan como precursores para generar productos de almacenamiento como el almidón; y de polisacáridos estructurales como la celulosa (Avigad y Dey, 1997; Grant-Reid, 1997).

## EFFECTO DE LOS AZUCARES EN LAS PLANTAS

La fotosíntesis es un proceso que es regulado por la demanda de fosfato inorgánico/triosas fosfato y por efecto de la luz solar. Esta última es capaz de afectar el equilibrio redox en el estroma del cloroplasto, por el sistema de la tioredoxina que a su vez afecta la disponibilidad de ATP y NADPH. Finalmente por los cambios generados durante el transporte de electrones que se lleva a cabo en la fotosíntesis, se alteran las

condiciones de pH y las concentraciones tanto de  $Mg^{2+}$  como de  $Ca^{2+}$  (Bowyer y Leegood, 1997).

La utilización de fotosintatos está sujeta a la demanda por los órganos consumidores como hojas jóvenes, flores, frutos, raíces y semillas entre otros. Este planteamiento se ha comprobado en experimentos que reducen la exportación de fotosintatos *in planta* (Plaut y cols, 1987; Blechsmidt-Schneider y cols, 1989; Krapp y cols, 1991). Por ejemplo, plantas de tabaco que expresan la invertasa de levadura en el apoplasto, presentan efectos importantes en el desarrollo como crecimiento retardado, incremento de carbohidratos libres y una inhibición importante de la fotosíntesis (von Schaewen y cols, 1990). Otro ejemplo son plantas transgénicas de papa con el gen en antisentido del transportador de sacarosa, el cual provoca una reducción de la capacidad fotosintética, las hojas contienen altas concentraciones de carbohidratos solubles y tienen reducida la capacidad de exportación de sacarosa (Riesmeier y cols, 1994). La fotosíntesis también se reduce cuando se expone a altas concentraciones de  $CO_2$ , induciendo la elevación de azúcares en las hojas y la falta de demanda de carbohidratos por los tejidos consumidores (Van Oosten y Besford, 1996). Como estos dos hechos generan el mismo efecto, se propone que estos fenómenos están en la misma vía de transducción de señales (Krapp y cols, 1993). Otro dato importante se generó en sistemas transitorios, al transformar protoplastos de maíz. En estos ensayos se demostró que la expresión de 7 genes fotosintéticos de maíz fueron reprimidos específicamente por sacarosa, glucosa y fructosa (Sheen, 1989).

## ELEMENTOS QUE PARTICIPAN EN EL SISTEMA DE REGULACIÓN POR CARBONO EN PLANTAS

### *PAPEL DEL TRANSPORTE DE LOS AZÚCARES.*

Los primeros experimentos se encaminaron a demostrar si la entrada del azúcar al interior de la célula, era la señal para activar el mecanismo de percepción y regulación por azúcares (Jang y Sheen, 1997; Smeekens, 1998; Sheen y cols, 1999). Además, se evaluaron diferentes azúcares como sacarosa, glucosa y fructosa. Estos son los azúcares típicos de respuesta de regulación por carbono (Jang y Sheen, 1997; Sheen y cols, 1999). También se evaluaron análogos de la glucosa como 3-O-metilglucosa, glucosa-6-fosfato, que son transportados pero no son fosforilados por la

hexocinasa; y análogos como 2d-glucosa y manosa, que son interiorizados y sufren fosforilación (pero no son fácilmente metabolizables). Estos experimentos fueron dando los primeros elementos para proponer la participación importante de la actividad de la hexocinasa 2, en iniciar la respuesta de regulación por carbono como lo realiza la levadura. Los genes que participan en la fotosíntesis como *RBC-S*, *PC* y *CABI*, son sujetos a represión en respuesta a glucosa, fructosa, 2d-glucosa y manosa (Sheen y cols, 1999). Estos genes no responden a represión en presencia de 3-*O*-metil-glucosa y glucosa-6-fosfato (Sheen, 1989). De esta manera, es patente la participación de manera similar como en levadura y en mamíferos, de la actividad de fosforilación mediada por la hexocinasa 2 para iniciar la transducción de la señal (Jang y Sheen, 1997; Smeeckens, 1998; Sheen y cols, 1999; Moore y Sheen, 1999).

Hasta la fecha no se ha documentado en plantas la presencia de moléculas que perciben la señal de azúcares, como *Rgt2* y *Snf3* de levadura. Lo que sí es patente, es la importancia de los transportadores de azúcares en el desarrollo y crecimiento de plantas, principalmente en papa y tomate (Lalonde y cols, 1999).

#### *PARTICIPACIÓN DE LA HEXOCINASA EN LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL.*

La primera evidencia de la participación de la hexocinasa 2 de plantas en el mecanismo de transducción de la señal, proviene de los estudios realizados por Sheen y cols (1989). Ellos demostraron la inhibición de varios genes que participan en la fotosíntesis por glucosa, 2d-glucosa y manosa, en un sistema de expresión transitoria. La manoheptulosa (un inhibidor de la hexocinasa 2) puede bloquear la inhibición de estos genes. La glucosa-6-P no ejerce ningún tipo de señal, por lo que el evento de fosforilación es importante en el inicio de la transducción de la señal (Sheen y cols 1989).

Otro efecto que se evaluó muy importante en el desarrollo de plantas, fue la inhibición de la germinación por efecto de la manosa en *Arabidopsis*, y la reversibilidad de esta inhibición al agregar manoheptulosa (como inhibidor de la hexocinasa), durante la germinación (Pego y cols, 1999).

En *Arabidopsis*, la evidencia más importante la demostró Jang y cols (1997) sobre la participación de la hexocinasa en la regulación por carbono. Generaron plantas transgénicas con el gen de la hexocinasa 2 de *Arabidopsis* en sentido y

antisentido. Las plantas con la construcción en sentido del gen para esta enzima, son más sensibles y reprimen su desarrollo a dosis bajas de azúcares, tanto de glucosa como del análogo 2d-glucosa. También el efecto en la inhibición de la elongación de hipocotilos fue más dramático, así como el de los niveles de mensajeros para los genes *CABI* y *RBC-S*, en comparación con plantas silvestres. Otro dato se deriva de la sobre-expresión del gen de la hexocinasa 1 de *Arabidopsis* en plantas de tomate que inhibe su crecimiento, reduce la fotosíntesis e induce la senescencia temprana, en comparación con plantas silvestres ( Dai y cols, 1999).

También se demostró más de una vía de señalización por azúcares en plantas; esto es, que existen vías que no dependen de la actividad de la hexocinasa. Al parecer, algunas de estas vías están operando en tejidos consumidores de fotosintatos (Lalonde y cols, 1999). Estas evidencias se demostraron en cultivo de células de *Chenopodium rubrum* y al analizar la expresión de los genes sacarosa sintasa e invertasa apoplástica. Tanto la glucosa como la 6d-glucosa -que no es fosforilado por la hexocinasa-, fueron capaces de inducir la transcripción de estos genes. (Godt y cols, 1995; Roitsch y cols, 1995). Otro gen que puede inducirse por el análogo 3-O-metil-glucosa es el de la patatina I. Esto se demostró en plantas transgénicas de *Arabidopsis* con una construcción con el promotor de este gen y el gen reportero *Gus* (Martin y cols, 1997).

#### *IDENTIFICACIÓN EN PLANTAS DE ALGUNAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS, DESCRITAS EN LEVADURA EN LA REGULACIÓN POR GLUCOSA, Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN LA SEÑALIZACIÓN POR CARBONO.*

La primera secuencia en plantas homóloga al gen *SNF1* de levadura, fue descrita de endospermo de arroz y se denominó *RKIN1*. El gen codifica para una proteína con 48% de identidad en aminoácidos a la de levadura. El dominio de proteína-cinasa, localizado hacia el extremo amino terminal, muestra un 62-64% de identidad con la proteína de levadura y de mamíferos. Se han reportado clonas genómicas, cDNAs y productos de PCR de proteínas homólogas a *SNF1* de levadura en *Arabidopsis thaliana* (*AKIN10* y *ATSKIN1*), cebada (*BKIN2* y *BKIN12*), avena (*ASPK1-3*), papa (*PKIN1*), arroz (*RSK1*) caña de azúcar (*SBKIN154*) y tabaco (*NPK5*). Todas estas secuencias codifican para una proteína con una identidad del 68% de aminoácidos entre sí. Se ha demostrado que éstas proteínas pueden fosforilar a la

HMG-CoA reductasa, que participa en la generación de ácido mevalónico, principal precursor de la biosíntesis de isoprenoides. También regula a la nitrato reductasa y a la sacarosa fosfato sintasa (Halford y Hardie, 1998). De hecho, dos proteínas relacionadas a *Snf1* de espinaca, fosforilan e inactivan *in vitro* a estas tres enzimas que son sustratos de proteína-quinasas tipo *Snf1* (Sugden y cols, 1999). La participación de los homólogos de *Snf1* de levadura, y la posible existencia de una vía similar en plantas, proviene del hecho de que los genes aislados en plantas, pueden complementar a mutantes *snf1* de levadura, permitiendo su crecimiento en glicerol, etanol y sacarosa, así como la represión del gen de la invertasa en presencia de glucosa (Alderson y cols, 1991; Muranaka y cols, 1994).

Otros componentes del complejo *Snf3* de levadura, también se han caracterizado en plantas. Por ejemplo, Bouly y cols (1999) caracterizaron en *Arabidopsis*, proteínas homólogas a *Snf4* y a una de las subunidades del complejo *Sip1/Sip2/Gal83* de levadura, que también están participando en la señalización por carbono. Estas proteínas también pueden interactuar con *Snf1* de levadura, sugiriendo que esta vía podría funcionar también en plantas (Bouly y cols, 1999).

Finalmente, con la descripción de *prl1* que es una mutante hipersensible a sacarosa en *Arabidopsis thaliana* (Nemeth y cols, 1998), se documentó que la proteína denominada PRL1 puede interactuar con proteínas-quinasas del tipo de *Snf1* y regular los dominios de fosforilación de genes como la sacarosa fosfato sintasa (Bhalerao y cols, 1999).

Todavía no se establece una interconexión entre la vía de percepción de la señal realizada por la hexocinasa y la posible participación de las proteínas homólogas de levadura en plantas, del complejo remodelador de la cromatina *Snf1/Swi1* en algún gen de plantas, ni tampoco de la participación del complejo proteína-fosfatasa/proteína-quinasa *Snf3/Glc7*. Sin embargo, estas evidencias circunstanciales obtenidas de manera puntual, dejan claro la posible existencia de la interconexión de estas vías también en plantas.

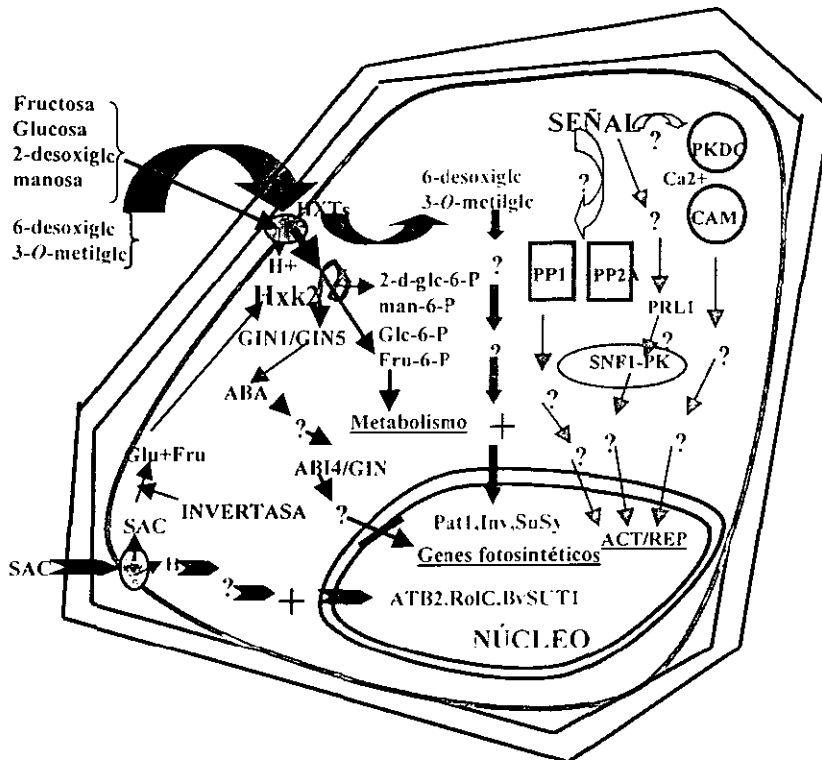


Figura 6. Modelo de regulación por carbono en plantas, de acuerdo a las evidencias experimentales *in vitro* y del estudio de algunas mutantes de regulación por carbono en *Arabidopsis thaliana*. Pretende integrar la vía descrita para Solanáceas por la vía de sacarosa y de los análogos 6-desoxiglucosa y 3-O-metilglucosa, principalmente para la regulación de tejidos consumidores de carbono (ilustrada en color verde). También la integración de las vías dependientes de la señal de la hexocinasa-2, para la regulación de genes fotosintéticos, de acuerdo a las evidencias generadas en *Arabidopsis* (ilustradas en color negro). Se señalan otros participantes en la regulación de genes de respuesta a azúcares, de los cuales no se conoce como inicia la señal ni la integración de estos en otras vías (ilustrada en color azul); algunas son proteínas homólogas descritas en levadura como SNF1. Abreviaturas: HXTs= transportadores de hexosas, Hxk2= hexocinasa-2, GIN1, GIN5, GIN6 = genes aislados de mutantes insensibles a altas concentraciones de glucosa en *Arabidopsis*; ABA = ácido abscísico; SAC = sacarosa; PKDC = proteína-cinasa dependiente de calcio; CAM = Calmodulina/calcio; PPI y PP2A = Proteína-fosfatasa; SNF1-PK = Proteína-cinasa tipo SNF1; PRL1 = gen aislado en la mutante de *Arabidopsis*: pleiotropic regulatory locus-1.

### OTROS MECANISMOS QUE OPERAN EN LA SEÑALIZACIÓN.

Existen evidencias que indican la participación de proteína fosfatasa tipo PPI y PP2A, la participación de  $Ca^{2+}$ -Calmodulina y de la activación de MAP-cinasas en la regulación de genes de respuesta a azúcares. Estos hechos se han demostrado en

tejidos consumidores de azúcares. Es muy posible que en los órganos y tejidos fotosintéticos, la vía de hexocinasa sea la principal vía de regulación por carbono (Sheen y cols, 1999).

La primera evidencia se generó al comprobar que inhibidores de proteína fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2A), pueden inhibir en pecíolos de hojas de papa la expresión de genes inducibles por azúcares, como el de la esporamina,  $\beta$ -amilasa y el de la subunidad pequeña de la ADP glucosa-pirofosforilasa (Takeda y cols, 1994). Este primer estudio evidenció la necesidad de desfosforilación de proteínas, como un requisito en la transducción de señales mediada por azúcares. En papa se demostró que el EGTA y el  $\text{La}^{3+}$  pueden inhibir la expresión de genes como esporamina y  $\beta$ -amilasa (Otho y cols, 1995).

Existe evidencia que la vía dependiente de proteína-quinasa activada por mitógenos (del inglés, mitogen-activated protein kinase, MAPK), también participa en la vía de señalización por glucosa. En cultivo de células de *Ch. rubrum*, se induce por efecto de la glucosa la fosforilación de una proteína con características similares a la mielínica básica de animales (Ehness y cols, 1997; Roitsch, 1999).

### **PARTICIPACIÓN DEL FOSFATO EN LA REGULACIÓN POR CARBONO.**

La participación del fosfato en la regulación de genes de respuesta a azúcares, lo documentó Sadka y cols (1994) para el gen *VspB* de soya. Posteriormente, Berger y cols (1995) reportaron la regulación del gen *Atvsp*, homólogo de soya, en *Arabidopsis* y que se regula por azúcares y fosfato. Sin embargo lo que debe quedar claro antes es que este gen es regulado por una vía independiente de la hexocinasa, y codifica para una proteína fosfatasa de almacenamiento en tejido vegetativo. Lo que es claro para plantas como tomate, papa y soya es que la regulación de proteínas de almacenamiento como esporamina, patatina y proteínas del tipo Vsp, ocurre por una vía diferente a la de la hexocinasa (Lalonde y cols, 1999).

Posteriormente, de los estudios de regulación de genes fotosintéticos en protoplastos de maíz -sistemas transitorios-, la co-electroporación de fosfato con manosa, no libera la represión de los genes de fotosíntesis por efecto de la manosa (Jang y Shenn, 1994). A partir de estos antecedentes, el efecto del fosfato en la regulación de genes de respuesta a glucosa de la vía de hexocinasa, centraron la



atención al hecho de que la manosa actúa más bien como secuestrador de fosfato, al formarse el intermediario manosa-6-fosfato (Halford y cols. 1999). Este compuesto fosforilado es metabolizable más lentamente en el interior de la célula, disminuyendo la concentración de fosfato intracelular y ATP, y elevando la concentración de ADP. De hecho, se considera a la manosa como un análogo de la glucosa con efecto más bien tóxico que capaz de generar una señal a una vía de transducción (Halford y cols 1999; Gibson y Graham, 1999). También el flujo de precursores de la vía glucolítica (triosas y hexosas fosfato) no tienen efecto en la respuesta de los genes regulados por azúcar, descartándose el papel del flujo metabólico en la regulación por carbono en plantas (Smeekens, 1998). Sin embargo, otro efecto que se observó fue la inhibición en la germinación de semillas de *Arabidopsis*, por efecto de la manosa. Se demostró que en exceso de sales inorgánicas de fosfato o de ATP, la manosa es capaz de seguir inhibiendo la germinación. Sólo se puede revertir este efecto inhibiendo la acción de la hexocinasa 2, con manoheptulosa (Pego y cols. 1999). De esta manera, el papel del fosfato en la regulación de genes de respuesta a glucosa, sólo se demostró para aquellos genes de proteínas que son de almacenamiento, que no son de la vía de hexocinasa, y para especies como papa, jitomate y soya. No se ha demostrado el papel del fosfato en la regulación de los genes de la vía de la hexocinasa, como los genes que participan en la fotosíntesis.

### **EL PAPEL DEL NITRÓGENO EN LA REGULACIÓN POR CARBONO.**

Conforme la fotosíntesis está produciendo activamente esqueletos hidrocarbonados, la planta puede iniciar o continuar el proceso de crecimiento. Esto implica la formación también de aminoácidos para las proteínas. La relación entre azúcares y nitrógeno se documentó cuando los genes que codifican para el transportador de nitrato, el de la nitrato reductasa, asparagina sintetasa y glutamina sintetasa son activados por azúcares (Koch, 1996; Jang y Sheen, 1997; Lam y cols, 1998; Lejay y cols, 1999). Es evidente que el balance entre el nitrógeno y el carbono que necesita la planta, se requiere para regular los genes implicados en la vía del nitrógeno. Esto se evidencia por el hecho de que la activación por carbono de estos genes, puede suprimirse por la presencia de un exceso de nitrógeno asimilado en forma de asparagina, glutamato y glutamina (Lam y cols, 1998). Sin embargo, se sabe

que los genes de la asparagina sintetasa-1 y glutamato sintasa, estan regulados por una vía independiente de la hexocinasa (Sheen y cols. 1999). Otra evidencia de la relación entre nitrógeno y carbono, es la de que cinasas relacionadas a *Snf1*, tienen como sustratos a 3 enzimas metabólicas como la nitrato reductasa, sacarosa fosfato sintasa y la HMG-CoA reductasa (Man y cols. 1997).

En maíz se demostró que la elevación de nitrógeno induce la expresión de los genes de fotosíntesis. Además, al parecer este efecto esta mediado también por la elevación en la concentración de citocininas, estableciendo un nexo entre las vías de regulación por carbono y la de hormonas (Sakakibara y cols. 1998).

### EL ESTUDIO DE LAS MUTANTES DE REGULACIÓN POR CARBONO EN PLANTAS.

De acuerdo a los estudios realizados en levadura, la primera estrategia sería aislar e ir describiendo los genes homólogos que participan en la regulación por carbono en levadura, ahora en plantas. Y como se ha descrito, efectivamente el aislamiento de genes homólogos a la proteína cinasa de *SNF1*, son las aproximaciones más claras de la posible participación de algunos genes descritos en la transducción de la señal en levadura, que están operando también en plantas (Halford y Hardie, 1998). Sin embargo, la otra estrategia es el aislamiento de mutantes en plantas con regulación alterada en presencia de un exceso de azúcares. Una manera hasta cierto punto artificial es el aislamiento de mutantes capaces de continuar su desarrollo, a pesar de la presencia de altas concentraciones de azúcares en el medio de crecimiento. En esta estrategia se aprovechan dos ventajas. La primera es la respuesta que las plantas silvestres presentan, y es la inhibición del desarrollo del tejido aéreo: falta de expansión de cotiledones y reverdecimiento de los mismos. Y la otra es la disposición de colección de mutantes tanto generadas por inserción de elementos como el T-DNA, así como la generación de mutantes por exposición a químicos como etilmetanosulfonato (EMS) o por la exposición a electrones acelerados (Smeekens y Rook, 1997; Sheen y cols. 1999). De esta manera se han aislado una serie de mutantes en *Arabidopsis*, que tienen fenotipos así como respuestas fisiológicas que se desvían del comportamiento de plantas silvestres cuando crecen en presencia de un exceso de azúcares. De las mutantes aisladas que tienen afectada la regulación de genes por

sacarosa, están la desacoplada a sacarosa (*sucrose-uncoupled, sun*), de respuesta reducida a azúcares (*reduced sugar response, rsr*), y las mutantes de alta y baja  $\beta$ -amilasa (*high  $\beta$ -amylase and low  $\beta$ -amylase, hba y lba*, respectivamente), (Smeekens y Rook, 1997; Dijkwel y cols, 1997; Martin y cols, 1997; Mita y cols, 1997a; Mita y cols 1997b). No son mutantes alteradas exclusivamente en la respuesta a sacarosa, pues los genes que tienen afectados también son de respuesta a glucosa (Sheen y cols, 1999). Las otras mutantes se han aislado con base en su fenotipo de crecimiento y desarrollo en presencia de alta fuente carbonada. Las mutantes seleccionadas con base en la influencia de azúcares en el desarrollo de las plantas, están las glucosa insensibles (*glucose insensitive, gin*), glucosa hipersensibles (*glucose oversensitive, glo*), las carbohidrato insensibles (*carbohydrate insensitive, cai*), sacarosa insensibles (*sucrose insensitive, sis*) y las manosa insensibles a la germinación (*mannose insensitive to germination, mig*), (Smeekens y Rook, 1997; Zhou y cols, 1998). Además, pueden presentar fenotipos interesantes en condiciones de crecimiento sin selección (es decir, en ausencia de concentraciones elevadas de azúcares). De esta manera, algunas de ellas han dejado ver claramente que la vía de señalización por azúcares en plantas tienen puntos de comunicación con otras vías de transducción como las inducidas por hormonas (Sheen y cols, 1999).

MUTANTE	RESPUESTA A AZUCARES	LOCÍ
<i>rsr</i> <sup>1</sup>	Sensibilidad disminuida por efecto de sacarosa a la expresión de patatina	
<i>lba</i> <sup>2</sup>	Sensibilidad disminuida por efecto de sacarosa a la expresión de $\beta$ -amilasa	
<i>hba</i> <sup>3</sup>	Sensibilidad elevada por efecto de sacarosa a la expresión de $\beta$ -amilasa	
<i>sun</i> <sup>4</sup>	Sensibilidad disminuida por sacarosa a la represión de plastocianina	<i>sun6</i> alelo <i>abi4</i>
<i>sis</i> <sup>5</sup>	Sensibilidad disminuida por efecto de glucosa o sacarosa a inhibir el desarrollo temprano de plántulas	<i>sis1</i> alelo <i>ctr1</i> <i>sis4</i> alelo <i>aba2</i> <i>sis5</i> alelo <i>abi4</i>
<i>gin</i> <sup>6</sup>	Sensibilidad disminuida por efecto de glucosa a inhibir el desarrollo temprano de plántulas	<i>gin1</i> alelo <i>aba2</i> <i>gin6</i> alelo <i>gin4</i>
<i>prl1</i> <sup>7</sup>	Sensibilidad elevada por efecto de azúcares, a inhibir el desarrollo temprano de plántulas	<i>PRL1</i> codifica proteína WD-40

**Cuadro 1.** Relación de mutantes aisladas en *Arabidopsis thaliana*, afectadas en su respuesta a diferentes azúcares. Referencias: 1. Martín y cols, 1997a; 2. Mita y cols, 1997b; 3. Mita y cols, 1997a; 4. Dijkwell y col, 1997; Huijser y cols 2000; 5. Laby y cols, 2000; Gibson y cols, 2000; Gibson y cols, 2001. 6. Zhou y cols, 1998; Arenas-Huetero y cols, 2000; Gibson y cols, 2000; 7. Németh y cols, 1998; Bhalerao y cols, 1999).

## PAPEL DE LAS HORMONAS EN LA REGULACIÓN POR CARBONO: LA INTERCONEXIÓN ENTRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN POR AZÚCARES Y POR HORMONAS.

Las primeras evidencias mostraron a nivel fisiológico el efecto que tienen las hormonas vegetales en el transporte de sacarosa en el floema, afectando a los transportadores de sacarosa. Posteriormente, al analizar un banco de mutantes de *Arabidopsis* generado por inserción de T-DNA, se describió la primera mutante en señalización por glucosa, con una clara interconexión con la vía de etileno. También se reveló por primera vez, cómo algunas mutantes en esta vía hormonal, se comportaron como mutantes en la vía de señalización por glucosa (Lalonde y cols. 1999; Zhou y cols, 1998; Sheen y cols. 1999).

Hormonas como auxinas y citocininas son capaces de incrementar el ritmo de transporte de azúcares. De hecho se sabe que las auxinas pueden promover la toma de sacarosa, mientras que el ácido abscísico actúa como un inhibidor (Sturgis y Rubery, 1982; Vreugdenhil, 1983). Por otro lado, las giberelinas también tienen efectos en promover el llenado del floema en plantas de cilantro, junto con auxinas; y en frijol promueven la exportación de fotosintatos (Daic y cols. 1997; Aloni y cols, 1986). Finalmente, se sabe que es importante que los azúcares puedan entrar a la célula para poder activar las vías de transducción y regular en ese momento el desarrollo. De esto depende la activación de los transportadores de azúcares. Se sabe que la sacarosa puede regular la expresión a nivel transcripcional, del transportador de sacarosa en caña de azúcar y en betabel (Chiou y Bush, 1998). La sacarosa induce la acumulación de dos ATPasas en tomate (Mito y cols, 1996). La actividad de los "simporters" de sacarosa, depende del gradiente de protones existente en el espacio apoplástico, que a su vez activa a la invertasa apoplástica para romper a la sacarosa en glucosa y fructosa. Este mecanismo puede operar en tejidos que demandan fotosintatos. Para el caso de los tejidos verdes (productores), la sacarosa tiene que entrar a la célula a expensas de la actividad del "simporter" <sup>+</sup>H-glucosa. De esta manera se ha observado que en hojas de papa, una vez activada la ATPasa de <sup>+</sup>H, la adición *in vitro* de auxinas y citocininas activa la transcripción y eleva los niveles de la proteína del transportador de sacarosa-1, SUT1 (Lalonde y cols, 1999).

La caracterización de la mutante *gin1* reveló la interconexión entre la vía de señalización por glucosa y la de etileno, al evidenciar que algunas mutantes como la sobreproductora de etileno (*eto*) y la mutante con fenotipo constitutivo de la triple respuesta (*ctr*), presentaron un fenotipo insensible a alta glucosa. Además, las mutantes insensibles a etileno (*etr1* y *ein2*), presentaron un comportamiento diferente y se clasificaron como mutantes hipersensibles a glucosa (mutantes *glo*), (Zhou y cols. 1998). De esta manera, la vía de señalización existente en plantas que depende de la actividad de hexocinasa, está interconectada y requiere de la activación de la vía de etileno (Sheen y cols. 1999). Además, la clonación y caracterización del gen *ein2*, puntualiza la interconexión entre las vías de etileno y las de estrés: la dependiente por ácido jasmónico y la de estrés oxidativo (Alonso y cols. 1999). Estos resultados claramente muestran que otras mutantes en las diferentes vías de señalización por algunas hormonas vegetales, pueden estar claramente comportándose como mutantes afectadas en la regulación por carbono; y esto refleja la interconexión entre las diferentes vías de transducción de señales inducidas por diferentes hormonas vegetales con las inducidas por la glucosa (Sheen y cols. 1999).

El estudio de la mutante *det2* dejó claro la interconexión entre una vía de regulación por los brasinoesteroides, y la realizada por efecto de la luz. Propiamente, sobre varios genes fotosintéticos como *PC*, *CAB* y *RUBISCO* que también son regulados por glucosa. En la oscuridad, las plantas mutantes de *det2* presentan características fenotípicas como tamaño menor, hipocotilos ensanchados, acumulan antocianinas, tienen cotiledones expandidos y el desarrollo y crecimiento del primer par de hojas verdaderas. Además estos cambios se acompañan por un incremento en la expresión de genes fotosintéticos. En presencia de luz, las mutantes *det2* son de talla más pequeña y de verde más intenso que las silvestres, fenotipos similares a algunas mutantes en regulación por carbono como *gin1* y *gin5*. Tienen retraso en el tiempo de floración, similar a muchas mutantes en regulación por carbono como *gin1*, *gin5* y *gin6*. El gen *det2* codifica para una proteína con alta similitud a la 5 $\alpha$ -reductasa en la biosíntesis de esteroides en mamíferos. Esta reductasa participa en la biosíntesis de los brasinoesteroides, y la falta de este gen afecta tanto las respuestas fotomorfogénicas como las reguladas por azúcares en *Arabidopsis* (Li y cols, 1996).

## PARTICIPACIÓN DE LOS DIFERENTES ESTRESSES EN LA REGULACIÓN POR CARBONO

En el ciclo de vida de cualquier planta, se lleva a cabo la transición de tejidos productores a consumidores de fotosintatos. Además, existe la competencia de todos los órganos de la planta por una misma fuente de azúcares como la sacarosa. Factores exógenos como estreses bióticos y abióticos pueden también influir en la distribución de los fotosintatos en la planta, por la demanda de energía que requiere alimentar las diferentes vías de transducción activadas por estos estreses. Así, el estudio de la regulación por carbono en plantas es más complejo de lo que puede uno imaginar (Roitsch, 1999).

### *EL ESTRÉS HÍDRICO Y SU INFLUENCIA EN LA GENERACIÓN DE FUENTES DE CARBONO.*

El estrés por agua induce importantes alteraciones en el desarrollo de las plantas, por los ajustes metabólicos que realizan al priorizar el crecimiento de algunos órganos, la redistribución de los fotosintatos transportados y la reducción en la tasa fotosintética (Davidson, 1969; Berman y Dejong, 1996). En papa se sabe que el estrés hídrico induce una disminución de la síntesis de almidón a expensas de la reducción de la tasa fotosintética (Geigenberger y cols, 1997; Escobar-Gutiérrez y cols, 1998). Otro efecto es la inducción de esterilidad masculina en cebada, por disminución en la concentración de la invertasa ácida (Dorion S y cols, 1996). En cambio en maíz, un estrés de agua más benigno produce una estimulación importante de actividad de invertasa vacuolar, induciéndose la degradación del almidón, con la consecuente generación de monosacáridos (Pelleschi y cols, 1997).

En general, estos antecedentes dejan ver cómo este tipo de estrés es capaz de modificar las concentraciones de diferentes azúcares en la planta, afectando en consecuencia el desarrollo, regulando la transcripción de diferentes genes que producen una respuesta bioquímica en particular. Se puede inferir que hormonas como el ácido abscísico en este tipo de estrés puede estar ejerciendo un efecto en la regulación y ajuste metabólico de las fuentes carbonadas; sin embargo este hecho queda por verificarse.

### *EL ESTRÉS SALINO Y LA GENERACIÓN DE SEÑALES POR DIFERENTES AZÚCARES.*

Se sabe que el estrés salino no solo afecta la fotosíntesis y los niveles de carbohidratos, sino también afecta el tipo de azúcares que son sintetizados y exportados por los tejidos verdes (Gilbert y cols, 1997; Gucci y cols. 1998). Se propone que esta selección en el tipo de azúcares, en estas condiciones de estrés, puede producir un tipo de señal para ajustar el metabolismo general en la planta (Gilbert y cols, 1997). No se ha explorado el tipo de señal activada por los diferentes azúcares inducidos en las diferentes condiciones de estrés (Roitsch, 1999).

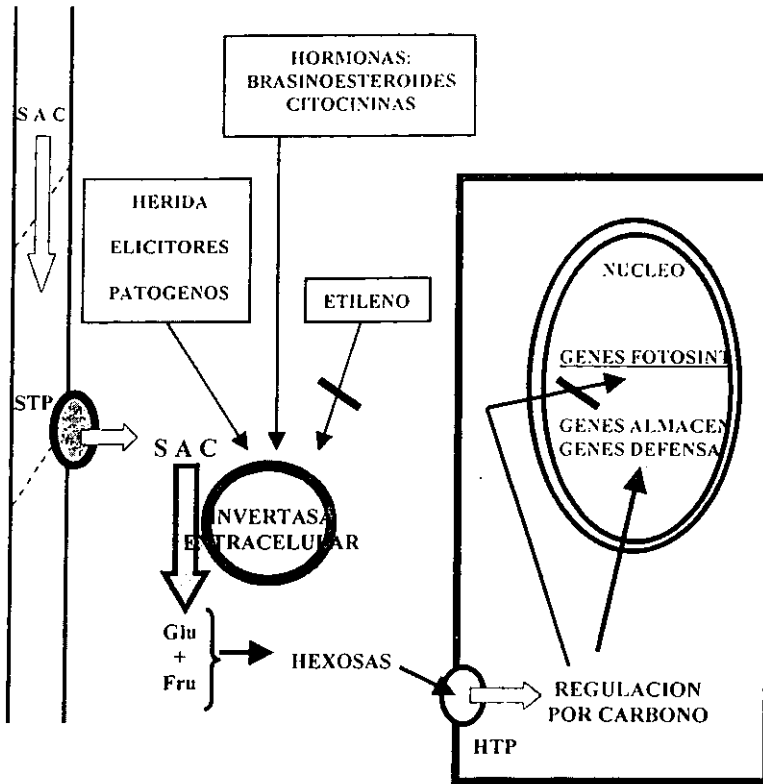
### *LA INFLUENCIA DE LOS ESTRESSES BIÓTICOS EN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS.*

Se sabe que la infección viral en plantas genera la movilización de proteínas virales que pueden influir en la fotosíntesis, en la acumulación de carbohidratos y en la distribución de los mismos (Lucas y Wolf, 1999). En *Ch. rubrum* se observó que dependiendo de la concentración de quitosán como elicitador de origen fúngico, se pueden activar los genes tanto de enzimas involucradas en la respuesta de defensa, así como la represión de varios genes que participan en la fotosíntesis (Ehness y cols. 1997). Además, se comprobó en tabaco que la inducción de los genes relacionados a patogénesis por glucosa y sacarosa: ésta fue independiente de ácido salicílico y dependió del estado de maduración de la hoja (Herbers y cols. 1996). Estos resultados indican que las respuestas de defensa frente a patógenos están íntimamente ligadas a la modificación del metabolismo en tejidos consumidores de fotosintatos, para satisfacer las demandas de energía que requiere la vía de señalización de defensa. La elevación de la demanda de energía, afecta disminuyendo la fotosíntesis y la activación de genes relacionados con la movilización de reservas (almidón). Por lo tanto, la vía de respuesta a patógenos, activa a otras vías metabólicas para satisfacer sus necesidades de energía (Roitsch, 1999).



### OBJETIVO

Caracterizar molecular, genética y fisiológicamente a la mutante de *Arabidopsis thaliana* denominada *gin5*, como una planta insensible a alta fuente carbonada y describir la participación de la hormona ABA en la vía de señalización por glucosa en plantas.

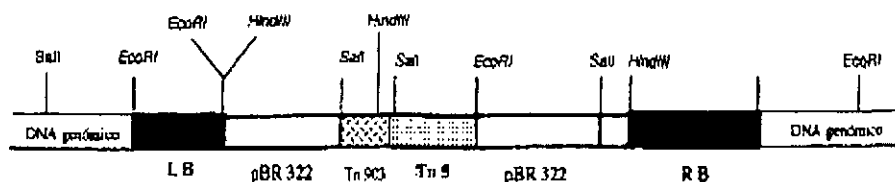


**Figura 7.** Modelo que intenta explicar de manera integral *in planta*, la regulación por carbono, iniciada por sacarosa, glucosa y fructosa. La alteración en las concentraciones de la enzima invertasa ácida, es el primer punto de interconexión entre las diferentes vías activadas por las hormonas y el efecto de la sacarosa. Los niveles de esta enzima también sufren alteraciones por efectos externos como ataque de patógenos, presencia de moléculas extrañas y por la inducción de herida. Hormonas como brasinosteroides y citoquininas activan el gen de la invertasa; en cambio el etileno lo reprime. Finalmente, las hexosas en el interior de la célula, participarán activando las señales correspondientes de la regulación por carbono: inhibiendo genes fotosintéticos, o activando genes que participan en el almacenamiento de proteínas y en la defensa al ataque de patógenos. STP = transportador de sacarosa. HTP = transportador de hexosas. SAC = sacarosa (tomado de Roitsch, *Curr Opin Plant Biol* 1999; 2: 198-206).

## RESULTADOS NO INCLUIDOS EN EL ARTICULO

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *gin5*.

La mutante *gin5* se aisló de un banco de mutantes generadas por la inserción de un elemento denominado T-DNA 2850::1003. La longitud del T-DNA es de 16.94 kb. Su construcción contiene secuencias de 2.9 Kb del borde derecho (right border) y 2 Kb del borde izquierdo (left border) del T-DNA, respectivamente. Además de contener las regiones codificadoras de resistencia a kanamicina en procariontes (Tn903) y en eucariontes (Tn5); contiene dos plásmidos derivados del pBR322. El primer plásmido tiene una longitud de aproximadamente 3 Kb y carece de aproximadamente, 800 pb del cassette de resistencia a tetraciclina. El segundo plásmido tiene una longitud de 3.9 Kb y su secuencia contiene todos los elementos de un pBR322 silvestre. La estructura del T-DNA 3859::1003 se ilustra en la Figura 1:



**Figura 1.** Construcción del T-DNA 3850::1003 utilizado para generar las mutantes por inserción en *Arabidopsis*, del banco de DUPONT, y realizado por el Dr. Keneth Feldman. Se ilustra el mapa de restricción así como los dos plásmidos pBR322, potenciales para realizar el recate de plásmidos con fragmentos genómicos con digestiones de DNA genómico, con las enzimas *Sall* y *EcoRI*.

Con el propósito de conocer el número de inserciones del T-DNA presentes en el genoma de la mutante *gin5*, así como las características moleculares de la inserción, se realizó un southern genómico de la planta mutante homociga, hibridando con secuencias tanto del borde izquierdo como del borde derecho del T-DNA. Las sondas de ambos bordes se obtuvieron de plásmidos que contienen secuencias de: un fragmento *PstI-EcoRI* del borde izquierdo de 2.3 Kb en el plásmido pH10-3 y, un fragmento *BamHI-HindIII* del borde derecho de 1.1 Kb en el plásmido pH23-3.

# Genes

& Development

Volume 14 No. 16

August 15, 2000

A JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Role for abscisic acid in glucose regulation

Also in this issue:

- RGS proteins regulate *C. elegans* behavior in response to food
- PML and premature senescence



Cold Spring Harbor Laboratory Press

Open 2000

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

Francisco Arenas-Huetero,<sup>1,3</sup> Analilia Arroyo,<sup>1,3</sup> Li Zhou,<sup>2</sup> Jen Sheen,<sup>2</sup> and Patricia León<sup>1,4</sup>

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

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

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

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

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

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

1998), hexoses seem to play a major role in plant sugar regulation (Sturm and Tang 1999). Different lines of evidence point to the involvement of hexokinase (HXX) as a critical component in one of the sugar sensing and signaling pathways in plants (Jang and Sheen 1997; Smeekens and Rook 1997; Pego et al. 1999; Sheen et al. 1999). Analysis of transgenic *Arabidopsis* plants with either increased or decreased HXX levels show a hyper- or hypo-sensitivity to high glucose concentrations during germination and seedling development (Jang et al. 1997). Overexpression of AtHXX1 in transgenic tomato also alters photosynthesis, growth, and senescence (Dai et al. 1999). Recent studies with an AtHXX1 null mutation indicate its predominant role in many glucose responses and the uncoupling of glucose signaling from glucose metabolism (Moore and Sheen 1999). This HXX-dependent sugar signaling pathway has been shown to be responsible for the regulation of genes including several photosynthetic genes, nitrate reductase, and others (Jang and

<sup>3</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>4</sup>Corresponding author.

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

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

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

To dissect the multiple sugar signaling pathways, two general strategies have been employed to isolate sugar response mutants in *Arabidopsis*. In one, genetic screenings based on sugar-regulated gene repression or activation have yielded sucrose-uncoupled (*sun1*), reduced sucrose responses (*rsr*), and low and high  $\beta$ -amylase (*lba*, *hba*) mutants [Dijkwel et al. 1997; Martin et al. 1997; Mita et al. 1997a,b]. The alternative strategy takes advantage of the striking developmental arrest imposed by high concentrations of hexoses or sucrose on early seedling development. Sugar response mutants selected by this method include glucose insensitive (*gin1*), glucose oversensitive (*glo*), carbohydrate insensitive (*cai*), sucrose insensitive (*sis*), and mannose-insensitive germination [*mig*] [Smeekens and Rook 1997; Zhou et al. 1998; Sheen et al. 1999]. The characterization of these mutants has started to provide important information about novel cross-talk between sugar and other signaling pathways mediated by phytohormones, nitrogen, and light signals [Sheen 1999]. For example, an *Arabidopsis* pleiotropic mutant, *prl1*, displays enhanced sensitivity to sucrose and affects the responses to several plant hormones [Németh et al. 1998]. The *PRL1* gene encodes a WD-protein that potentially interacts with multiple signaling components, including the *Arabidopsis* SNF1 homologs [Bhalerao et al. 1999]. The analysis of *gin1* [Zhou et al. 1998], on the other hand, revealed an interesting link between the HXK-dependent glucose and the ethylene signal transduction pathways.

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

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

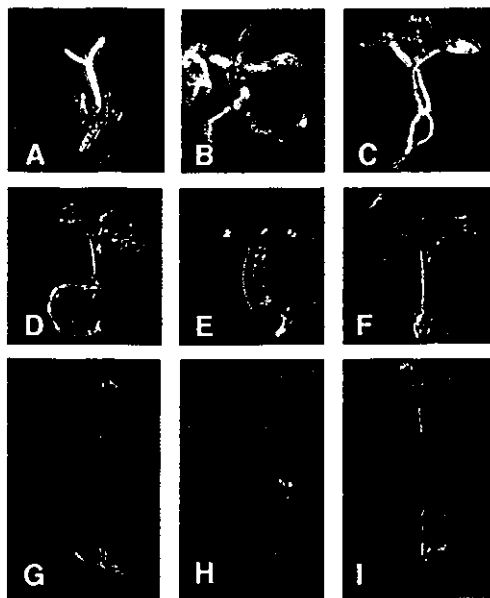
Although the participation of ABA during seed development, germination, and stress responses is well established, our data provide the first direct evidence to support a novel and central role of ABA in the plant glucose signal transduction pathway governing postembryonic development. Apparently, glucose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

## Results

### *Isolation and genetic analyses of the gin5 and gin6 mutants*

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

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



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

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

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

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

In the case of the *gin6* mutant, the segregation analyses of  $F_1$  families from 33 independent self-pollinated  $F_2$  glucose-insensitive plants showed that the kanamycin-resistant phenotype was always linked to glucose insensitivity. This suggests that the mutant phenotype is likely due to a T-DNA insertion. Southern blot analysis confirmed the presence of one T-DNA insertion in the *gin6* mutant genome (data not shown). In contrast, the tagging status of the *gin5* mutant was uncertain, and thus genetic mapping was carried out to determine its chromosomal location. A mapping population was generated by crossing *gin5* homozygous mutant plants with the WT Ler ecotype. The chromosomal location of *gin5* was determined through the analysis of the mutant  $F_2$  DNA, using simple sequence length polymorphism (SSLP) markers [Bell and Ecker 1994]. The *GIN5* gene is located on chromosome 1. The results from the analysis of 280 chromosomes indicated that the *gin5* mutation mapped 20 cM centromeric from the SSLP marker nga59.

#### Molecular cloning of the *GIN6* gene

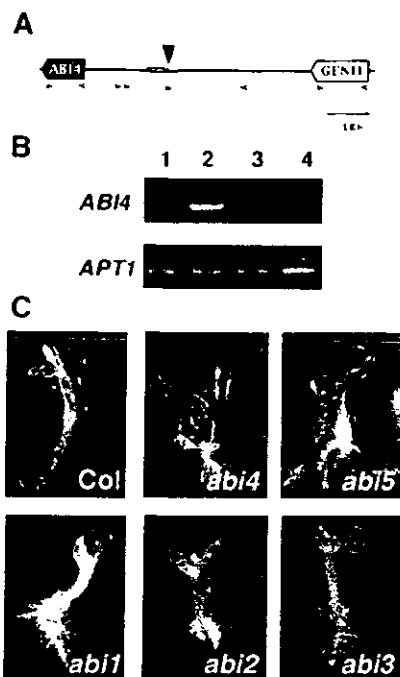
To isolate sequences flanking the T-DNA insertion site in the *gin6* mutant plant, thermal asymmetric interlace (TAIL)-PCR was performed [Liu et al. 1995]. A single PCR fragment of ~450 bp was isolated after four enrichment cycles as described in Materials and Methods. The PCR fragment was cloned and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

**Table 1.** Genetic segregation and complementation tests

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

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

\*Not significant at  $P = 0.05$ .



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

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

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

#### Glucose signaling is mediated by specific ABI genes

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



*gin5* is affected in ABA-mediated responses

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

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

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

*gin5* is insensitive to glucose regulation of ABA levels

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

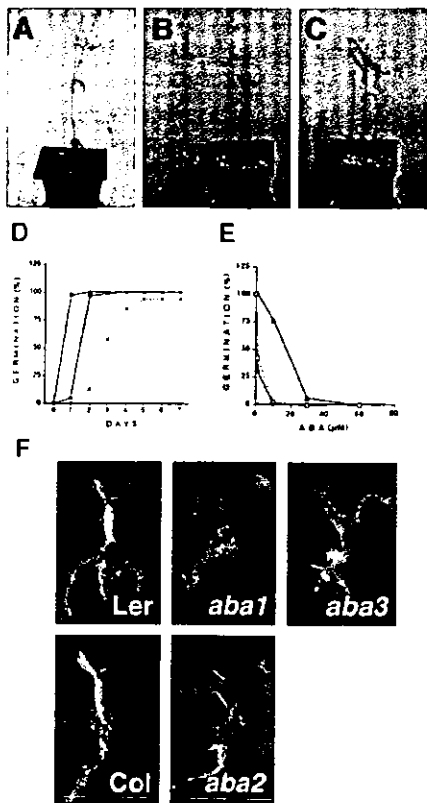


Figure 3. ABA-mediated responses in *gin5* and *gin6* mutants. *gin5* and wild-type plants were grown under well-watered conditions for 3 weeks and then subjected to drought stress by withholding water for 5 days. The plants were then sprayed with 10 ml of either water (A,B) or 3  $\mu$ M of ABA water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

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

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

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

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

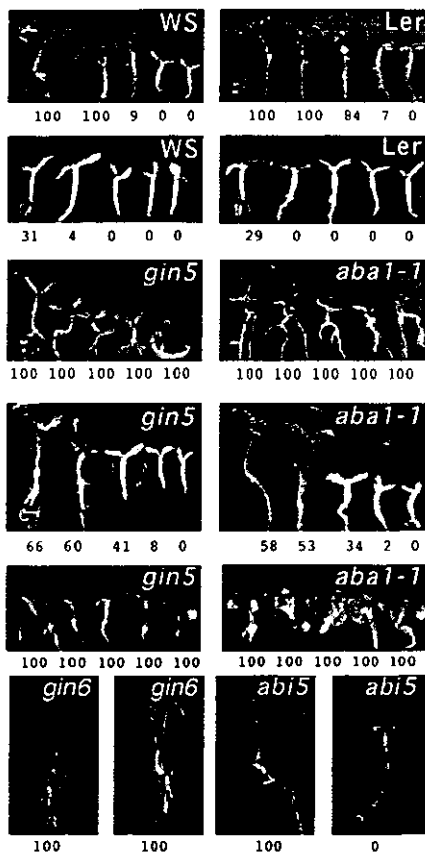
#### An increase in ABA is required for sugar regulation in plants

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

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

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

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



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

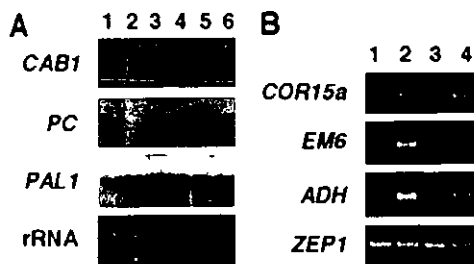
and 7% glucose [Fig. 4L]. Surprisingly, the addition of ABA reverted the glucose-insensitive phenotype of the *abi5-1* mutant, in spite of having been isolated as an ABA-insensitive mutant [Fig. 4M,N]. These results suggest that the *GIN6/ABI4* gene participates downstream of the induction of ABA in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

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

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

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

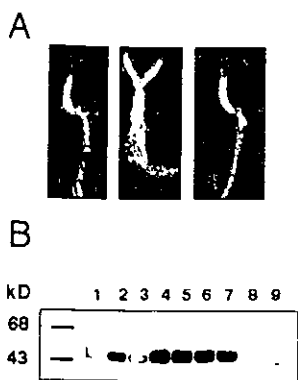
To further elucidate the function of *ABI4* in glucose and ABA signaling during seedling development, we analyzed the expression profile of ABA- and stress-inducible genes in the *gin6* mutant by RT-PCR analysis. As shown in Figure 5B, the *COR15a* gene transcript, which encodes a chloroplast-targeted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



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

#### *gin5* affects the HXK-mediated glucose signaling pathway

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



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

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

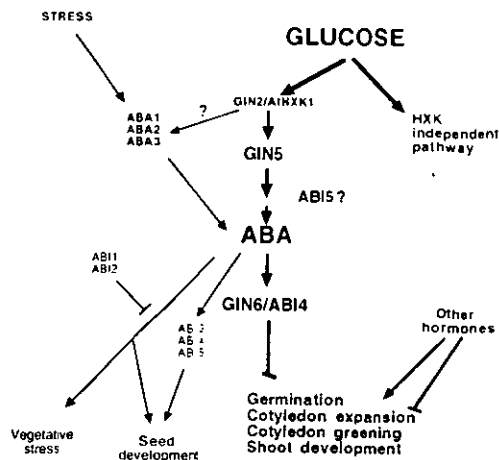
## Discussion

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

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

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

In this work, based on the genetic, physiological, and molecular characterization of two *Arabidopsis* glucose-insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, it was discovered that the plant hormone ABA participates in the HXK-mediated glucose response in plants (Fig. 7). Through the studies of wild-type and *gin5* plants, we propose that an increase of ABA levels is involved in the glucose signaling pathway that leads to decrease in gene expression and developmental arrest (Fig. 7). The inability to increase ABA levels results in a glucose-insensitive phenotype manifested in the *gin5* mutant. We have substantiated this conclusion further by demonstrating that three ABA biosynthetic-deficient mutants (*aba1*) are also insensitive to high glucose concentrations and that this phenotype can be reverted by the addition of very low levels of exogenous ABA (100 nM). Thus, the intracellular ABA levels seem to determine the glucose sensitivity in all of these mutants. However, it is important to emphasize that an ABA increase is not the only factor mediating the



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

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

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

#### *ABI4 as a putative transcription factor for glucose signaling*

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

[Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 1997; Leung and Giraudat 1998]. However, the mechanisms by which these signals are discriminated or integrated inside the cell are mostly unknown. The characterization of the *gin6* mutant resulted in the identification of *ABI4* as a candidate for the transduction of the glucose-specific signal. We found that the *ABI4* transcript is induced in wild-type plants in response to high glucose and this induction was diminished in the *gin6* mutant. The reduced transcript levels in the *gin6* mutant are likely the result of the T-DNA insertion in the promoter region, as no other changes were found in this mutant's *ABI-2* gene in comparison to the reported amino acid sequence [Finkelstein et al. 1998]. We have found that this insertion also affects the function of the *ABI4* gene during seed germination, as the *gin6* mutant displays an ABA germination-insensitive phenotype. These results suggest that important *cis*-acting sequences required for the regulation of the *ABI4* gene lie at least 2 kb upstream of the start codon. This observation contrasts the data published by Finkelstein et al. [1998], in which the seed-specific phenotype of the *abi4* mutant is complemented by a genomic clone containing a promoter region of only 1.3 kb upstream of the start codon but not by a clone containing 1.7 kb upstream. Our results support the idea proposed by Finkelstein et al. [1998] that sequences further upstream of 1.7 kb of the start codon are required for the proper expression of the *ABI4* gene. Another possibility is that the T-DNA insertion in the *gin6* plant might disrupt the *ABI4* gene regulation downstream of the insertion site. Further analysis will be required to clarify these possibilities. We confirmed that the original *abi-4* allele is also glucose insensitive. The *ABI-2* gene was identified as a putative transcription factor [Finkelstein et al. 1998], and it shows homology to a family of plant transcription factors with *AP2* domains that seem to control a variety of processes [Okamura et al. 1997]. The fact that the glucose-insensitive phenotype is maintained independently of the addition of ABA in *gin6* and *abi-4* mutants suggests that this transcription factor could be acting near the end of the ABA-mediated glucose signaling cascade [Fig. 7]. Efforts are currently being directed to find out whether *ABI4* can bind directly to *CAB1* and *PC* promoters in high glucose conditions. In addition, the predicted amino acid sequence of *ABI4* contains a serine/threonine-rich domain, which is a possible target for protein kinases such as those of the SnRK family. Our gene expression analysis has shown the participation of the *ABI4* gene in the expression of both sugar- and stress-responsive genes. The analysis of different alleles or site-directed mutagenesis can be used to further dissect the function of *ABI4* in stress and glucose signaling, both in seeds and vegetative tissues.

#### *The glucose responses mediated through ABA involve specific signaling molecules*

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

belong to the protein phosphatase 2C (PP2C) family and have pleiotropic and overlapping roles affecting ABA signaling in both seeds and vegetative tissues. In contrast, ABI3 and ABI5, as well as ABI4, were initially reported to affect various aspects of seed maturation and seed gene expression [Finkelstein 1994, Bonetta and McCourt 1998]. Our results have shown that neither *abi1*, *abi2*, or *abi3* mutants are resistant to high glucose. The *abi1* and *abi2* mutants are dominant gain-of-function alleles with virtually abolished PP2C activity [Leung and Giraudat 1998; Sheen 1998]. It is unlikely that these two molecules play any major role in the ABA induction in response to high glucose (Fig. 7). However, our studies demonstrate that in addition to ABI4, ABI5 also has a role in the glucose response. Thus, in spite of the seed-specific roles that have been proposed for ABI4 and ABI5, both molecules have an important role in this newly identified ABA-mediated response in vegetative tissues. In fact, the recent isolation of a salt-tolerant mutant, *san5* [Quesada et al. 2000], which corresponds to a new *abi4* allele, indicates that the participation of ABI4 in vegetative ABA responses might be a more general phenomenon. We have shown that the *abi5-1* mutant has a glucose-insensitive phenotype, but surprisingly this phenotype is reverted in the presence of ABA (100 nM). This suggests that this recently cloned transcription factor [Finkelstein and Lynch 2000] might participate in regulating the expression of genes required for transmitting signals from HXK that lead to the ABA increase while GIN6/ABI4 acts downstream of ABA (Fig. 7). Because of the fact that these genes are active in both seed-specific and glucose-mediated signaling pathways, it is possible that each stimulus can trigger multiple signaling pathways that possess complex interconnections. Further analysis will be required to have a better understanding of other convergent points between the glucose and ABA signaling pathways.

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

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

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

Glucose-insensitive mutants were isolated in 7% glucose GM

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

### Genetic analyses

Backcrosses were performed using mutant plants as the pollen donors and WS-0 wild-type as female plants. F<sub>1</sub> plants were allowed to self-pollinate and the glucose-insensitive phenotype was scored in the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> population at the seedling stage. Complementation groups between *gin1-1*, *gin5* and *gin6* were determined by crossing homozygous plants in reciprocal orientation.

The mapping population was obtained by crossing homozygous *gin5* mutant plants to wild-type Ler plants. Homozygous *gin5* mutant plants from the F<sub>2</sub> progeny were grown on 7% glucose medium and plants displaying green and fully expanded cotyledons were selected. Genomic DNA was prepared from these homozygous *gin5* individual plants. The map position was determined by testing the linkage to simple sequence length polymorphism [SSLP] markers [Bell and Ecker 1994].

### Phenotypic analyses

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

### Molecular cloning of GIN6

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

### Expression analysis techniques

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

supplemented with 2% and 7% glucose. Hybridizations were done at high-stringency conditions with fragments from the *CABI* gene (GenBank accession no. J04098), the *PC* gene (GenBank accession no. M20937), and the *PAL1* gene (GenBank accession no. L33677). cDNA was synthesized using 5 µg of total RNA by oligo(dT)-primed reverse transcription, using Super Script II reverse transcriptase (GIBCO BRL). A fraction 1/100<sup>th</sup> of the first strand cDNA was used as a template for PCR. Linearity for each amplification was corroborated. The primers used and the corresponding size products and accession numbers are as follows: *ABI4* [5'-ATGGACCCTTTAGCTTCCCA-3', 5'-AAGATGGGATCAATAAAATC-3'; 974 pb; accession no. AF040959]; *APT1* [5'-TCCCAGAATCGCTAAGATTGCC-3', 5'-CCTTTCCCTTAAGCTCTG-3'; 478 pb; accession no. Y07681]; *ADH* [5'-GCCAGGAGATCATGTGTTGC-3', 5'-GCACCAGCGATTCTCAGACC-3'; 398 pb; accession no. M12196]; *COR15a* [5'-GTGACGGATAAAACAAAAGAGG-3', 5'-GACCCTACTTTGTGGCATCCTT-3'; 210 pb; accession no. U01377]; *AtEm6* [5'-AAACCATGGCGTCTCAACAAG-3', 5'-GCGGTCCGACATCCGTGTGGGAAAGT-3'; 302 pb; accession no. Z11923]; *ZEP1* [5'-CGGAACACGGAACC-TAT-3', 5'-CTCAAATTATCGAAAACCG-3'; 261 pb; accession no. T45502].

#### Western blot analysis

Crosses between *gm5-1* and *35S-AtHXK1* were performed and the F<sub>2</sub> generation was obtained. The glucose-resistant phenotype was scored from a total of 1550 plants selected on 7% glucose during 8 days. Total protein extracts were obtained from individual plants. Immunodetection was done using a polyclonal antibody, produced against the HXK following the protocol by Zhou et al. (1998). An anti-rabbit immunoglobulin alkaline phosphatase-conjugate was used as a secondary antibody (Zymed Laboratories, Inc.) and was detected using the BCIP/NBT substrate kit (Zymed Laboratories, Inc.).

#### ABA determination

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

#### Acknowledgments

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

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

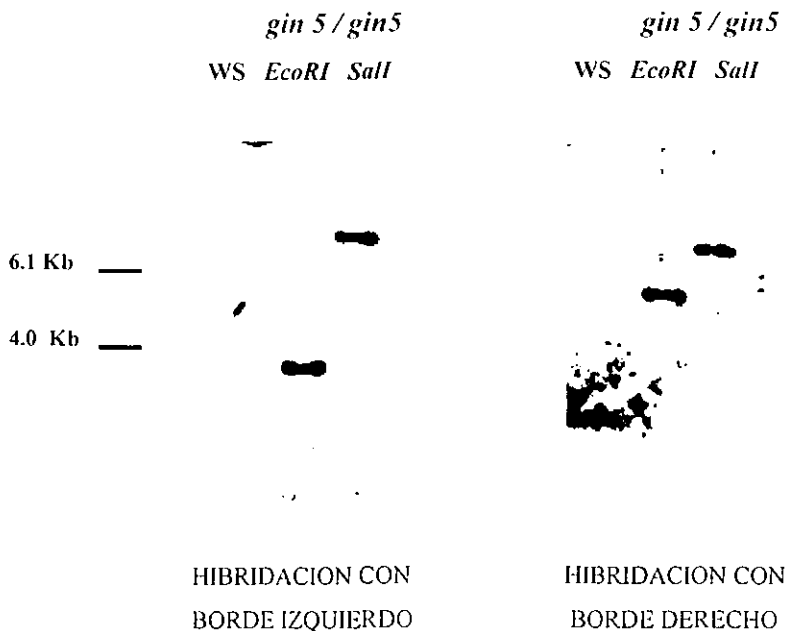
marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734 solely to indicate this fact.

#### References

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.C., Smith, J.A., and Struhl, K. 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Bell, C.J. and Ecker, J.R. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19: 137-144.
- Bhalerao, R.P., Saichert, K., Bakó, L., Okrészl, L., Szabados, L., Muranaka, T., Machida, Y., Schell, J., and Konec, C. 1999. Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5322-5327.
- Ronetta, D. and McCourt, P. 1998. Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends Plant Sci.* 3: 231-235.
- Chou, T.J. and Bush, D.R. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 4784-4788.
- Cutler, A.J. and Krochko, J.E. 1999. Formation and brake down of ABA. *Trends Plant Sci.* 4: 472-478.
- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., Levine, A., and Granot, D. 1999. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11: 1253-1266.
- de Bruxelles, G.L., Peacock, W.J., Dennis, E.S., and Dolferus, R. 1996. Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 111: 381-391.
- Deng, X.W. and Quail, P.H. 1999. Signalling in light-controlled development. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 10: 121-129.
- Dijkwel, P.P., Huijser, C., Weisbeck, P., Chua, N.-M., and Smeekens, S.C.M. 1997. Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 583-595.
- Éhness, R., Ecker, M., Godt, D.E., and Roitsch, T. 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 9: 1825-1841.
- Fankhauser, C. and Chory, J. 1997. Light control of plant development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13: 203-229.
- Finkelstein, R.R. 1994. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J.* 5: 765-771.
- Finkelstein, R.R. and Lynch, T.J. 2000. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599-609.
- Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S., and Goodman, H.M. 1998. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 10: 1043-1054.
- Gancedo, J.M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 334-361.
- Gaubier, P., Raynal, M., Hull, G., Huestis, G.M., Grellet, F., Arenas, C., Pages, M., and Delseny, M. 1993. Two different *Em*-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Mol. Gen. Genet.* 238: 409-418.
- Gibson, S.I. and Graham, I.A. 1999. Another player joins the complex field of sugar-regulated gene expression in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 4746-4748.
- Grupe, A., Hultgren, B., Ryan, A., Ma, Y.H., Bauer, M., and Stewart, T.A. 1995. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic  $\beta$  cell glucokinase in maintaining

- glucose homeostasis. *Cell* 83: 68-78.
- Jang, J.C. and Sheen, J. 1997. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.* 115: 208-213.
- Jang, J.C., León, P., Zhou, L., and Sheen, J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9: 5-19.
- Johnston, M. 1999. Feasting, fasting and fermenting glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* 15: 29-33.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509-540.
- Koornneef, M. and Karssen, C.M. 1994. *Seed dormancy and germination*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C., and Karssen, C.M. 1982. The isolation of abscisic acid [ABA] deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* [L.] Heynh. *Theor. Appl. Genet.* 61: 385-393.
- Koornneef, M., Reuling, C., and Karssen, C.M. 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 61: 377-383.
- Leung, J. and Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 199-222.
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., and Whittier, R.F. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8: 457-463.
- MacRobbie, E.A.C. 1991. Effect of ABA on ion transport and stomatal regulation. In *Abscisic acid: physiology and biochemistry* (ed. W.J. Davies and H.G. Jones), pp. 153-158. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Martin, T., Hellmann, H., Schmidt, R., Willmitzer, L., and Frommer, W.B. 1997. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant J.* 11: 53-62.
- Mita, S., Hirano, H., and Nakamura, K. 1997a. Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in *Arabidopsis thaliana*. A recessive mutation causing enhanced expression of a gene for  $\beta$ -amylase. *Plant Physiol.* 114: 575-582.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M., and Nakamura, K. 1997b. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for  $\beta$ -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J.* 11: 841-851.
- Moffatt, B.A., McWhinnie, E.A., Agarwal, S.K., and Schaff, D.A. 1994. The adenine phosphoribosyltransferase-encoding gene of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 143: 211-216.
- Moore, B. and Sheen, J. 1999. Plant sugar sensing and signaling—a complex reality. *Trends Plant Sci.* 4: 250.
- Nambara, E., Keith, K., McCourt, P., and Naito, S. 1995. A regulatory role for the *ABI3* gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 121: 629-636.
- Németh, K., Salchert, K., Putnok, P., Bhalerao, R., Koncz-Kálmán, Z., Stankovic-Stangeland, B., Bakó, L., Mathur, J., Okrész, L., Stabel, S., et al. 1998. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* 12: 3059-3073.
- Newman, T., de Bruijn, F.J., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlrogge, J., Raikhel, N., Somerville, S., Thomashow, M., et al. 1994. Genes galore: A summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* 106: 1241-1255.
- Okamoto, J.K., Caster, B., Villarroel, R., Montagu, V.M., and Jofuku, K.D. 1997. The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 7076-7081.
- Pego, J.V., Weisbeck, P.J., and Smeekens, S.C.M. 1999. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiol.* 119: 1017-1023.
- Peña-Cortés, H., Sanchez-Serrano, I., Martens, R., Willmitzer, L., and Pratt, S. 1989. Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 9851-9855.
- Quesada, V., Ponce, M.R., and Micol, J.L. 2000. Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 154: 421-436.
- Rutsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 198-206.
- Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeck, P., and Smeekens, S. 1998. Sucrose-specific signaling represses translation of the *Arabidopsis* *ATF2 bZIP* transcription factor gene. *Plant J.* 15: 253-263.
- Sauer, M.H., Chauvaux, S., Deutscher, J., Reizer, J., and Ye, J.J. 1995. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biol. Sci.* 20: 267-271.
- Schwartz, S.H., Leon-Klosterziel, K.M., Koornneef, M., and Zevevaart, I.A.D. 1997. Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 114: 161-166.
- Sheen, J. 1998. Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 975-980.
- 1999. C4 gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 187-217.
- Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J.C. 1999. Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 410-418.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
- Smeekens, S. 1998. Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 230-234.
- Smeekens, S. and Rook, F. 1997. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol.* 115: 7-13.
- Sturm, A. and Tang, G.Q. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* 4: 401-407.
- Wang, M.L., Belmonte, S., Kim, U., Dolan, M., Morris, I.W., and Goodman, H.M. 1999. A cluster of ABA-regulated genes on *Arabidopsis thaliana* BAC T07M07. *Genome Res.* 9: 325-333.
- Weatherwax, S.C., Ong, M.S., Degenhardt, I., Bray, E.A., and Tobin, E.M. 1996. The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiol.* 111: 363-370.
- Wilhelm, K.S. and Thomashow, M.F. 1993. *Arabidopsis thaliana cor15b*, an apparent homolog of *cor15a*, is strongly responsive to cold and ABA, but not to drought. *Plant Mol. Biol.* 23: 1073-1077.
- Wobus, U. and Weber, H. 1999. Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* 380: 937-944.
- Zhou, L., Jang, J.C., Jones, T.L., and Sheen, J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 10294-10299.



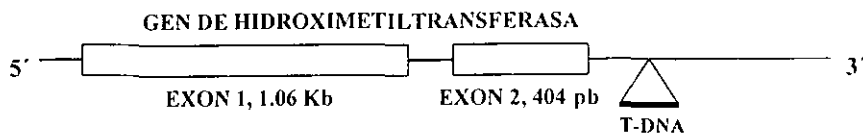


**Figura 2.** Southern genómico de la mutante homóciga *gin5* e hibridación con sondas genómicas que codifican para el borde izquierdo y borde derecho del T-DNA. La presencia de sólo una banda de hibridación en cada digestión, del tamaño predicho para ambos bordes, sugirió fuertemente la presencia de un sólo elemento de inserción.

Los resultados (Figura 2) demuestran la presencia de un sólo T-DNA en el genoma de *gin5*. La digestión con la enzima *Sall* y la hibridación con el fragmento del borde izquierdo, reveló un fragmento mayor de 6 Kb, que fue predecible de acuerdo al mapa del T-DNA. Un fragmento similar en tamaño también se observó en la digestión con la enzima *EcoRI* y la hibridación con el borde derecho. Estas bandas de hibridación contienen fragmentos genómicos adyacentes al T-DNA y cada uno contiene un plásmido pBR322. Este hecho permite potencialmente la posibilidad de clonar parte de este fragmento genómico por la técnica de rescate de plásmido. El éxito de esta técnica radica en el tamaño del plásmido a rescatar: los plásmidos mayores de 5 kb se rescatan con menos frecuencia (Behringer y Medford, 1992). Uno de los objetivos principales de este proyecto fue la identificación del gen afectado en la mutante *gin5*. Se realizaron 4 intentos de rescate de plásmido, pero ninguno fue exitoso, por lo que conociendo las secuencias de cada uno de los bordes del T-DNA, se decidió intentar la clonación de

fragmentos genómicos por una técnica que utiliza la reacción de PCR con oligonucleótidos conocidos y arbitrarios y a diferentes temperaturas de alineamiento, descrita por Liu y cols. (1995), denominada “thermal asymmetric interlaced PCR” ó TAIL-PCR. Esta técnica utiliza tres pares de “primers” específicos en reacciones sucesivas, junto con un primer arbitrario degenerado de tal manera que los productos de amplificación específicos y no específicos se controlan por temperatura. De esta manera, utilizando los oligonucleótidos específicos: LB1, 5'-CGATCTGAGGATGAGATGTCATT-3'; LB2, 5'-GACGATATATAGAGCAAGATGGAAA-3'; LB3, 5'-CACATCATCTCATTGATGC-TTGG-3'; LB4, 5'-AACGTCCGCAATGTGTATTA-3' diseñados con base en la secuencia del borde izquierdo del T-DNA, y de los oligonucleótidos arbitrarios: AD1, 5'-TCGAGTATGGAGTT-3'; AD2, 5'-GTTCGAGAGACAAGAA-3'; AD3: 5'-AGAGCAGAAGCAGAGA-3', se clonó un fragmento genómico de 1.2 kb hacia el borde derecho en pMOS. El fragmento genómico clonado se secuenció y la secuencia obtenida fue comparada con el banco de genes descritos para *Arabidopsis*, en un análisis tipo FASTA. En ese momento no se encontró una fase de lectura abierta. Paralelamente, Li Zhou en el Massachusetts General Hospital, del grupo de la Dra. Jen Sheen, clonó un fragmento de 700 pb del borde derecho del T-DNA de *gin5* en pKS, con otra técnica derivada de PCR (Rudenko y cols, 1993). La secuencia de 700 pb de este fragmento se encuentra contenida en el fragmento de 1.2 Kb clonado en nuestro laboratorio. Ya que en el laboratorio de la Dra. Jen Sheen se dispone de secuencias contenidas en cromosomas bacterianos artificiales o BACS correspondientes a cada uno de los cromosomas del genoma de *Arabidopsis*, decidieron hibridar con el fragmento de 700 pb clonado. De esta manera se observó la hibridación del fragmento clonado (de 700 pb) con el BAC F5D10 que contiene parte de una secuencia genómica y se ubica físicamente hacia el telómero superior del cromosoma 1 (Figura 4). Sin embargo, para ese momento sólo se conocía alrededor del 40% de la secuencia del cromosoma 1 de *Arabidopsis*. Tampoco se conocía la secuencia completa de ese BAC y de la secuencia del telómero superior del cromosoma 1. Recientemente, se han secuenciado BACs hacia la zona del mapeo de la mutación de *gin5*, y actualmente se sabe que el T-DNA se encuentra hacia el extremo 3', a 2 kb antes de una secuencia cuyo marco de lectura codifica para una posible proteína

con actividad de hidroximetil-transferasa (HMT) en otros organismos, incluyendo *Arabidopsis*.



**Figura 3.** Mapa genético que ilustra la inserción del T-DNA en el genoma de la mutante *gin5*. La inserción se localiza a 2 Kb hacia el extremo 3' del gen de la HMT. El gen de la HMT tiene 2 exones.

### LAS HIDROXIMETILTRANSFERASAS EN PLANTAS.

Son tetrámeros de subunidades de 53 kD y contienen fosfato de piridoxal. Catalizan la conversión reversible de serina (ser) y tetrahidrofolato (THF) a glicina (gli) y 5,10-metilenTHF. Por lo que estas enzimas se denominan más bien serin-hidroximetiltransferasas (SHMT). El 5,10-metilenTHF puede ser convertido a metil, metenil y formil THF que sirven como sustratos primarios de un carbono, en diferentes estados de oxidación para las reacciones de biosíntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas y síntesis de lípidos. Los eucariontes tienen isoformas citosólicas y mitocondriales (Cossins, 1987).

Las SHMT en plantas participan en la vía fotorrespiratoria. La oxigenación del sustrato ribulosa-1,5-bisfosfato es catalizada por la enzima RUBISCO, y genera una molécula de 2-fosfoglicolato y 3-fosfoglicerato. El 2-fosfoglicolato es reciclado por medio de una serie compleja de reacciones que se llevan a cabo en los cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias. En las mitocondrias de tejido verde fotorrespirando, la SHMT se asocia con el complejo glicina Descarboxilasa (GDC, Bowe, 1991; Douce y Neuberger, 1999). Esta última enzima cataliza la descarboxilación de la gli fotorrespiratoria proveniente del fosfoglicolato, para generar amoníaco, dióxido de carbono y una unidad de un carbono que es transferida al THF para formar metilenTHF. El dióxido de carbono de la descarboxilación de la gli, es liberado como dióxido fotorrespiratorio. El carbono del metilenTHF es transferido por la SHMT a una segunda molécula de gli, para formar serina, que es reciclada al Ciclo de Calvin en el interior de los cloroplastos, después de su conversión a fosfoglicerato (Oliver y McIntosh, 1995).

En *Arabidopsis* están descritos 5 genes de SHMT: SHMT-1, -2, -3, -4 Y -5. El análisis de secuencia entre estas enzimas, mostró que la SHMT-1 y -2 presentan en el extremo amino terminal, una secuencia polipeptídica con características de tránsito a matriz mitocondrial. Las 3 restantes enzimas carecen de esta secuencia, por lo que se clasifican del tipo citosólico. Los genes de las SHMT-1, -3, -4 y -5 se localizan en el cromosoma 4, mientras que la SHMT-2 se localiza en el cromosoma 5 (McClung y cols, 2000).

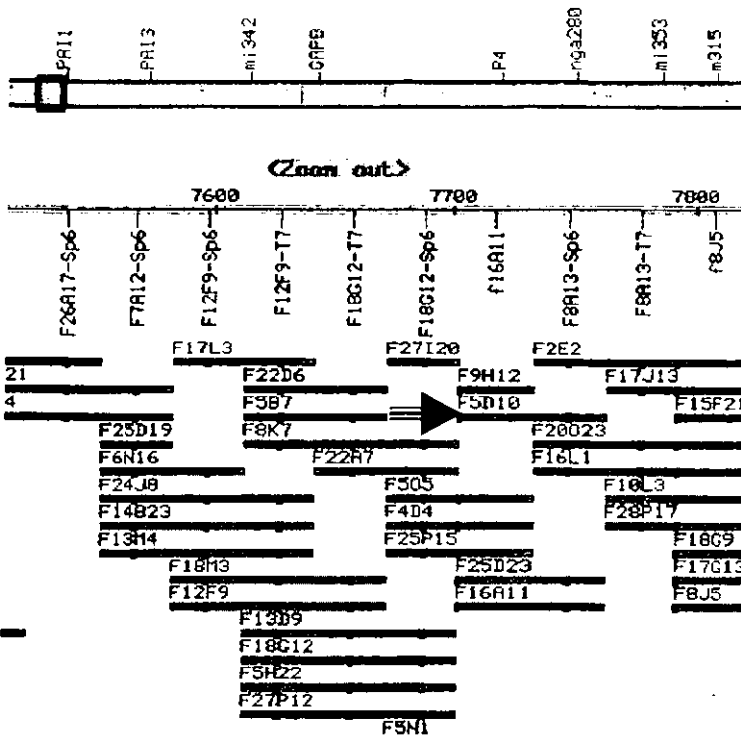
El análisis de secuencia entre el gen de la hidroximetiltransferasa cercano a la inserción del T-DNA en *gin5*, y de la SHMT-5 (que es citoplásmica) de *Arabidopsis*, muestra que esta enzima posee una identidad en secuencia del 53.7% en el exón 1, del 55% en el intrón y del 54.4% en el exón 2 %. Este gen puede representar una nueva enzima con posible actividad también de SHMT.

### CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *gin5*

Con el propósito de conocer la posición de la mutación de *gin5*, en nuestro laboratorio se realizó el mapeo cromosómico por medio de la técnica que reconoce el polimorfismo en la longitud de secuencias sencillas (SSLP) amplificadas por PCR (Bell y Ecker, 1994). Los resultados del análisis de 280 cromosomas indicaron que la mutación se ubica a 20 cM del centrómero del marcador tipo SSLP nga59 en el cromosoma 1 y hacia el telómero superior. Muy cerca de esta región se encuentra un marcador genético denominado ABA3, a 4 cM aproximadamente (cerca del marcador nga63), donde se ubica la mutación de *gin5* (Figura 5).

Con el objeto de evaluar el posible alelismo entre la mutante *gin5* y la mutante en biosíntesis de ácido abscísico *aba3*, se realizaron cruza entre ambas mutantes. Los resultados del cuadro 2 muestran que los individuos *gin5+ / aba3-2+*, presentaron un fenotipo de insensibilidad a alta glucosa, lo que sugiere que la mutante *gin5* es un alelo de la mutante *aba3-2*.

Es importante puntualizar que el fenotipo de insensibilidad aparece dos a tres días después del tiempo en que se observa para las plantas mutantes progenitoras. Ambas



**Figura 4.** Posición física del BAC F5D10 (flecha) sobre el cromosoma 1 de *Arabidopsis*. El fragmento genómico de 700 pb de *gin5*, amplificado por PCR por Li Zhou hibridó con este BAC hacia el telómero superior.

plantas progenitoras, *gin5* y *aba3-2*, presentan un fenotipo de insensibilidad a 7% de glucosa, entre el tercer y el cuarto día de germinación. Es posible que la suma de las mutaciones inducidas entre los progenitores de la cruce; es decir, *aba3-2* generada por etilmetanosulfonato (puntual), y la de *gin5* que fue inducida por la inserción de un T-DNA, afecten dramáticamente el comportamiento y el fenotipo en los individuos de la cruce en condiciones de alta glucosa, y generar un fenotipo de insensibilidad a alta glucosa más tardío. La cruce entre *gin5* con otras mutantes *aba*, sólo se realizó para corroborar que *aba1-1* y *aba2-1* forman parte de otros grupos de complementación a *gin5*.

Hasta el momento, el gen afectado en la mutante *aba3-2* no se ha clonado. Se caracterizó bioquímicamente la mutación por Schwartz y cols (1997): la mutante *aba3-2* es incapaz de generar ABA a partir de su precursor ABA-aldehído, es decir el último paso de oxidación. Sin embargo, si es capaz de acumular *trans*-ABA-alcohol y su correspondiente glucósido conjugado del mismo ABA-alcohol.

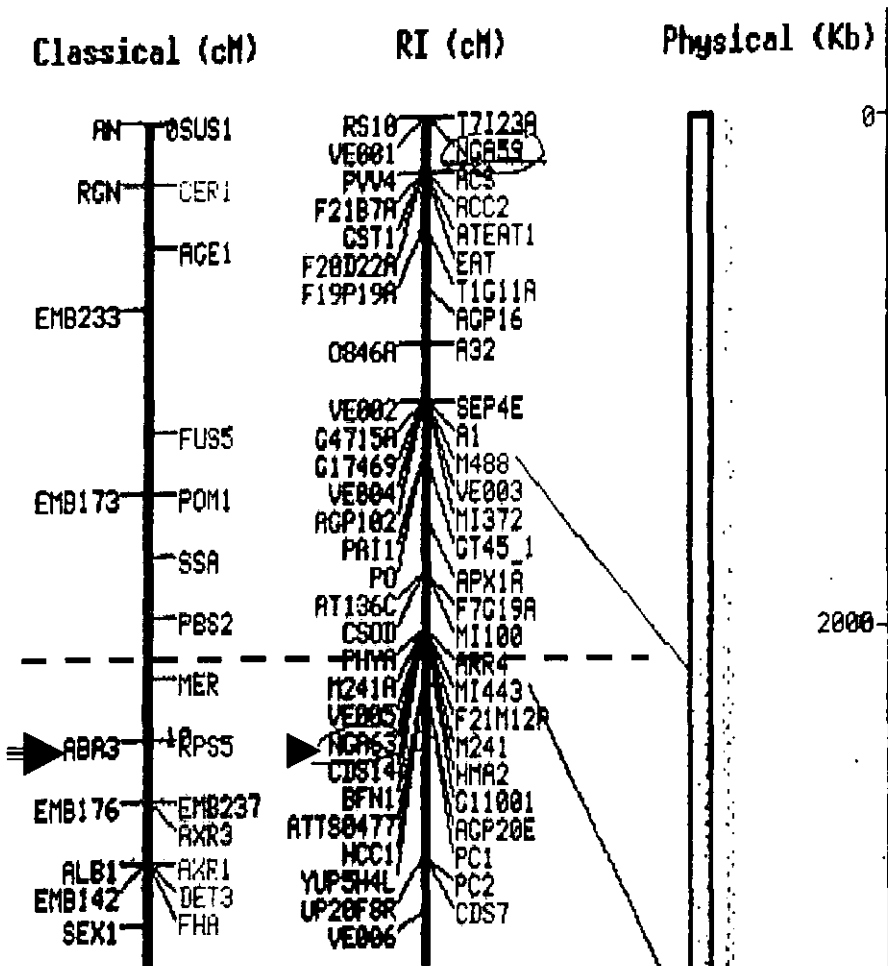
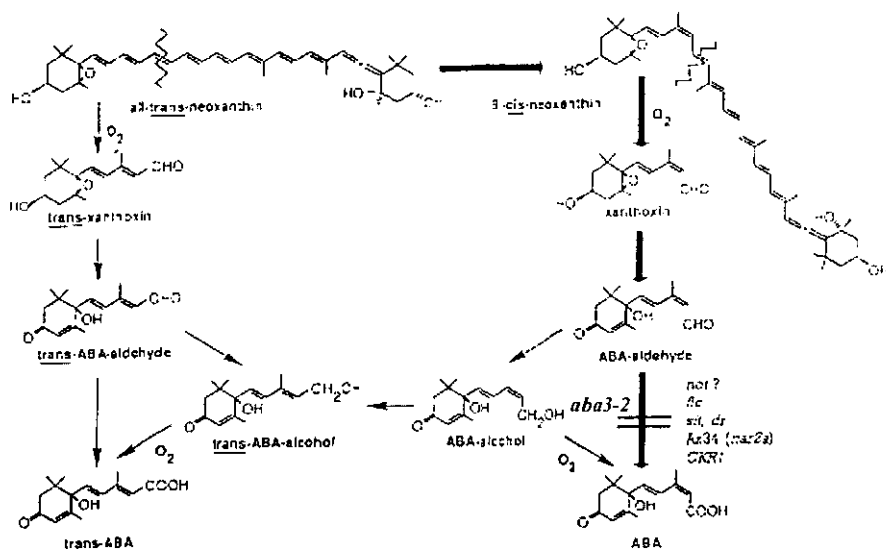


Figura 5. Esquema que intenta corresponder los marcadores moleculares ilustrados en la parte central, con marcadores genéticos ilustrados en la parte izquierda. La línea punteada ubica la mutación de *gin5* de acuerdo al mapeo molecular. La flecha indica la posición del marcador genético ABA3. El marcador molecular más cercano a la mutación en *gin5* es NGA63 (cabeza de flecha), y se encuentra a 2 cM aprox. de ABA3.

CRUZA	GENERACION	TOTAL	FENOTIPO	
			MUTANTE	SILVESTRE
<i>gin5/gin5 X aba1-1/aba1-1</i>	F1	24	0	24
<i>gin5/gin5 X aba2-1/aba2-1</i>	F1	32	0	34
<i>gin5/gin5 X aba3-2/aba3-2</i>	F1	64	64	0

**Cuadro 2.** Grupos de complementación entre la mutante *gin5* y las mutantes *aba*: *aba1-1*, *aba2-1* y *aba3-2*. El fenotipo evaluado fue el de insensibilidad a 7% de glucosa.

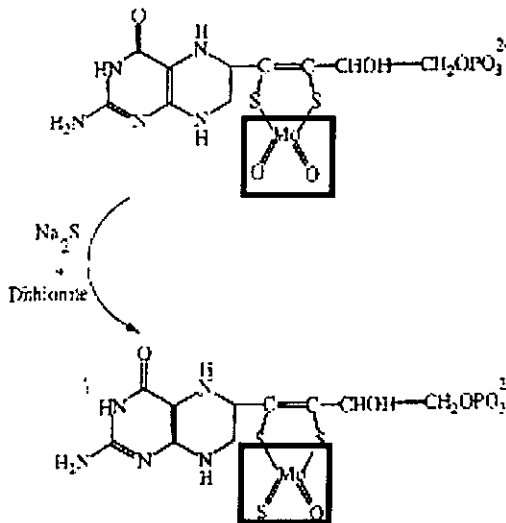


**Figura 6.** Ruta biosintética de *trans*-ABA a partir de los isómeros de la neoxantina. Se ilustra como intermediario al ABA-alcohol y su isomerización *trans* como precursor principal para la biosíntesis de *trans*-ABA. Las flechas más gruesas muestran la ruta principal o clásica de biosíntesis de ABA (tomado de Rock y cols, 1991).

Se sabe que todas las mutantes en los últimos pasos en biosíntesis de ABA tanto en *Arabidopsis*, así como en tabaco y en tomate, tienen cantidades residuales de la hormona (Mendel y Schwarz, 1999). Análisis detallado de las mutantes en tomate *flacca*

(mutante homóloga a *aba3-2* en *Arabidopsis*) y *sitiens*, demostraron la existencia de una vía menor convirtiendo ABA-alcohol a ABA (Rock, 1991). Esto se ilustra en la Figura 6.

Los estudios en la mutante *aba3-2* en *Arabidopsis* demostraron que la mutación no reside en la enzima aldehído oxidasa (AO) *per se*, sino en la reacción terminal de sulfurilación (Mendel y Schwarz, 1999) del cofactor de molibdeno Moco, requerido para la actividad de esta enzima (del inglés Moco, **M**olibdenum **c**ofactor). El Moco consiste de un átomo de molibdeno unido covalentemente a un grupo ditioleno, y que proviene del precursor molibdopterin (Kuper y cols, 2000). El Moco es generado primeramente en una forma dioxo, que es biológicamente activo para las enzimas nitrato reductasa (NR) y sulfito reductasa (SR), pero no para las AO y xantina deshidrogenasas (XDH). Se especula que la sulfurilasa afectada en *aba3-2* de *Arabidopsis* no modifica al Moco de la forma dioxo a la mono-oxo con la sulfurilación, de tal manera que no se registra en ensayos *in vitro* actividad de AO (Figura 7).



**Figura 7.** Modificación química del MoCo por una enzima sulfurilasa terminal que genera la forma mono-oxo (inferior) del precursor general dioxo (superior). Se propone que este paso está afectado en la mutante *aba3* en *Arabidopsis* (tomado de Schwartz y cols, 1997).

Un análisis fisiológico detallado e integral de varias mutantes afectadas en oxidasas dependientes de Moco, así como de mutantes con fenotipos *aba*, ha llevado a proponer



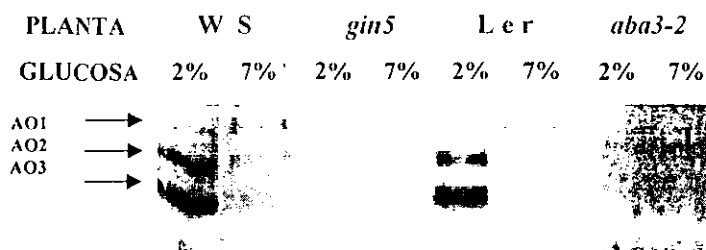
que justo estos fenotipos pueden ser causados por 3 tipos de mutaciones **completamente diferentes** (Mendel y Schwarz, 1999):

1. Deficiencia en la reacción de sulfurilación, ya sea para regular la enzima y/o activarla. En este caso las mutantes presentarán un fenotipo NR+, AO-, XDH-. Estos fenotipos corresponden a las mutantes *aba3-2* en *Arabidopsis* (Schwartz y cols, 1997), *flacca* en tomate (Marin y Marion-Poll, 1997) y *abal* en *Nicotiana plumbaginifolia* (Leydecker y cols, 1995).
2. Deficiencia en el gen estructural de la AO específica para la biosíntesis de ABA. El fenotipo esperado de las mutantes será NR+, AO-, XDH+. Este fenotipo parece corresponder a *sitiens* de tomate (Marin y Marion-Poll, 1997). Una AO de tomate mapea muy cerca de la mutación de *sitiens* (Taylor y cols. 1988). En *Arabidopsis* queda por demostrar cuál de las AO descritas: AO-2, AO-3 y AO-4, es la que participa directamente en la generación de ABA. Se sabe por homología de la AO de maíz, zmAO-1, con la AO-1 de *Arabidopsis*, que es la AO-1 la que participa en la síntesis de ácido indolacético, IAA, una auxina (Mendel y Schwarz, 1999).
3. Deficiencia en la síntesis de Moco. El fenotipo esperado será NR-, AO-, XDH-. En cebada se describió la mutante *nar2a* con niveles de ABA fuertemente reducidos. Además de observarse efectos pleiotrópicos en todas las reacciones enzimáticas que requieren de la participación del Moco (Mendel y Schwarz, 1999). Recientemente se describió la mutante *cnxA* en tabaco, con características similares a la mutante descrita en cebada (Mendel y Schwarz, 1999). Además aquí hay que mencionar que la biosíntesis del Moco requiere de varios pasos, mejor estudiados en bacterias y poco descritos en plantas.

Finalmente, como se puede observar, muchas enzimas que contienen al Moco catalizan transformaciones importantes en los ciclos globales del azufre (por acción de la sulfito oxidasa), del nitrógeno (por acción de la XD) y del carbono (por acción de la AO).

Se comprobó que también la mutante *gin5* carece de actividad de aldehído oxidasa (Figura 8), como en el caso de la mutante *aba3-2*. Este dato corrobora el alelismo

obtenido mediante las cruza *gin5* X *aba3-2*. Fue interesante observar la inducción en alta glucosa (7%) de las AO-1 y -2 en las plantas silvestres. Por lo tanto, ambas mutantes tienen afectado alguno(s) de los genes que participan en la reacción ó regulación de la modificación del Moco, biológicamente activo (en la forma monosulfo) para la actividad de una(s) AO, que participa(n), probablemente en la biosíntesis de ABA. No se puede encontrar la relación entre el gen más próximo a la inserción en *gin5*, una hidroximetil-transferasa y su participación en reacciones de modificación de cofactores con molibdeno, para la actividad de enzimas tipo AO que participan en la biosíntesis de ABA.



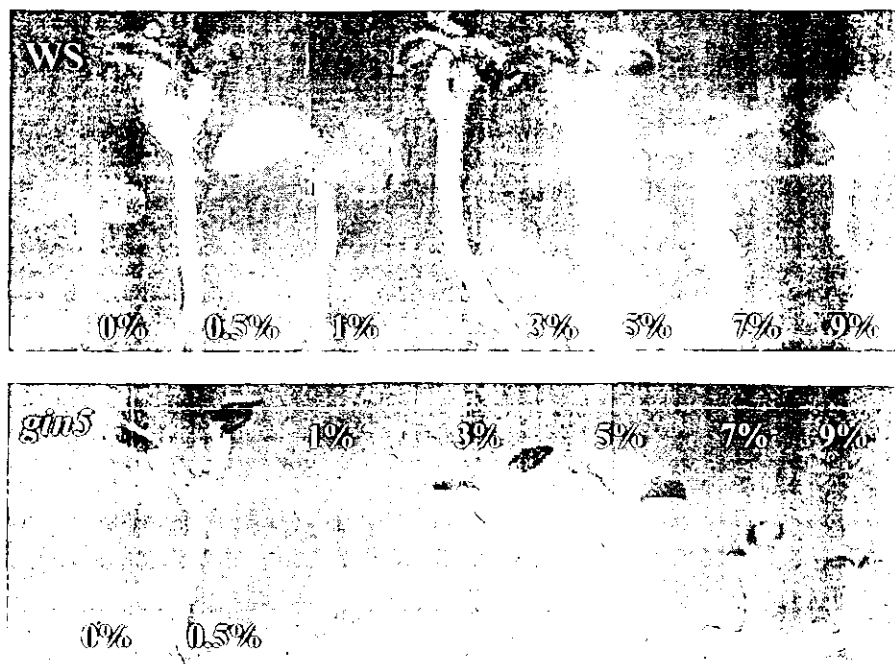
**Figura 8.** Se ilustra la actividad de aldehído oxidasa (AO) en extractos crudos de las diferentes plantas de 17 días de edad, crecidas en las condiciones indicadas de acuerdo a la técnica de Seo y cols (1998). Se procesaron 30 µg de proteína del extracto a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes a 4° C. Posteriormente, se reveló la actividad de AO utilizando como sustrato al heptaldehído, como aceptor de electrones de la oxidación del sustrato a la fenazina-metosulfato y como aceptor final de electrones al MTT que se precipita en estas condiciones, como formazan en cada banda de actividad. Se aprecian en las plantas silvestres (WS y Ler), 3 bandas de actividad de AO que corresponden de menor a mayor peso molecular a las AO1, AO2 y AO3, respectivamente (indicado por flechas). En cambio, las mutantes *gin5* y *aba3-2* carecen de actividad de AO en cualquier condición experimental.

### CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE *gin5*.

#### RESPUESTA A DIFERENTES AZÚCARES DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO.

Diferentes tipos de azúcares son capaces de afectar el desarrollo temprano, además de que *in vitro*, pueden afectar otras funciones celulares (Smeekens, 1998; Sheen y cols, 1999). Por lo que una vez aislada *gin5* como planta mutante insensible a altas concentraciones de glucosa, se demostró además que es insensible aún a concentraciones de azúcar tan altas como 9%, concentración en la cual las plantas silvestres se encuentran severamente detenidas en su desarrollo (figura 9). Una respuesta fenotípica similar se observó en *gin5* cuando se sembró en presencia de concentraciones crecientes de fructosa y de nuevo, a una concentración de 7 y 9% de este azúcar, las plántulas silvestres detienen dramáticamente su desarrollo (Figura 10). La evaluación del efecto a dosis crecientes de sacarosa, ilustra la capacidad de plántulas silvestres de poder desarrollarse hasta concentraciones de 9% del disacárido. Esta respuesta contrasta notablemente con la observada en las mismas condiciones en *gin5*, ya que la mutante fue capaz de seguir su crecimiento aún a dosis tan altas de sacarosa como 17%. El desarrollo es menor a esta última concentración de sacarosa en *gin5*, pero es evidente su capacidad de reverdecer y expandir sus cotiledones; hecho que contrasta con la inhibición completa de la germinación en semillas de plantas silvestres (Figura 11).

Existen análogos de la glucosa como la 2d-glucosa y manosa que pueden ejercer también ciertos efectos en el desarrollo de algunas plantas. Además, se sabe que estos análogos son transportados y fosforilados por la hexocinasa 2, activando una señal durante el desarrollo, similar al efecto que provocan la glucosa y la fructosa (Jang y Sheen, 1997; Smeekens, 1998). La diferencia radica en el hecho de que estos análogos no son metabolizables fácilmente en la célula (Jang y Sheen, 1997; Pego y cols, 1999). Como se puede observar en la figura 12, concentraciones crecientes de 2d-glucosa son capaces de inhibir la expansión completa de los cotiledones de plántulas

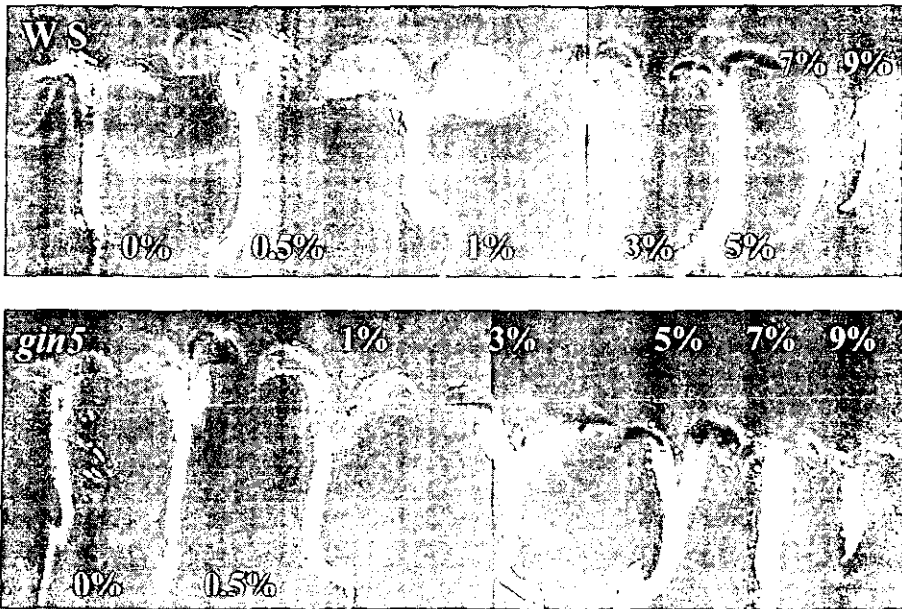


**Figura 9.** Respuesta fenotípica de plántulas silvestres (WS) y de *gin5* a concentraciones crecientes de glucosa (indicadas en %). Se ilustran plántulas representativas de 10 días de edad, crecidas en medio sólido a las diferentes concentraciones del azúcar.

silvestres, observándose mejor este efecto a 50  $\mu$ M de concentración; hecho que contrasta con la respuesta observada en plántulas de *gin5* que logran expandir completamente los cotiledones y elongar mejor su hipocotilo.

Un efecto similar se observó en la respuesta a dosis crecientes de manosa, en la cual a 0.05% las semillas de plantas silvestres logran a los 7 días sólo la salida de la radícula. A esta dosis se observó que semillas de *gin5* fueron capaces de emerger de la testa e inician el proceso de reverdecimiento. Además estas últimas logran siempre elongar mejor su hipocotilo que como en el caso de las plántulas silvestres (Figura 13).

Finalmente se evaluó el efecto de 7% de 3-*O*-metilglucosa. Este análogo se sabe es transportado al interior de la célula sin ser fosforilado por la hexocinasa 2 (Sheen, 1995). La respuesta fenotípica es clara al observarse el desarrollo, reverdecimiento y



**Figura 10.** Respuesta fenotípica de plántulas silvestres (WS) y de *gin5* a concentraciones crecientes de fructosa (indicadas en %). Se ilustran plántulas representativas de 10 días de edad, crecidas en medio sólido a las diferentes concentraciones del azúcar.

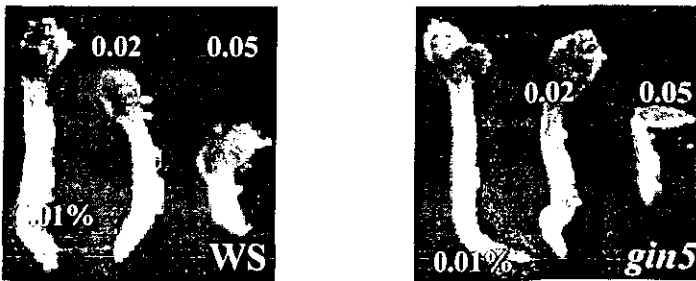
expansión de los cotiledones en ambas plántulas. Esto demuestra que la mutación de *gin5* no afecta la respuesta de regulación por carbono, independiente de la vía de la hexocinasa (Figura 14). Además de que el método de aislamiento de mutantes insensibles a la regulación por alta glucosa (7%), permite identificar genes que están en una vía de regulación que no depende únicamente del transporte de azúcares.



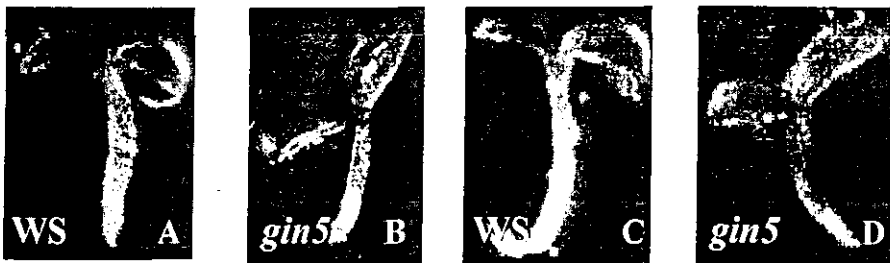
Figura 11. Respuesta fenotípica de plántulas silvestres (WS) y de *gin5* a concentraciones crecientes de sacarosa (indicadas en %). Se ilustran plántulas representativas de 10 días de edad, crecidas en medio sólido a las diferentes concentraciones del azúcar.



Figura 12. Respuesta fenotípica de plántulas silvestres (WS) y de *gin5* a concentraciones crecientes del análogo 2d-glucosa (indicadas en  $\mu\text{M}$ ). Se ilustran plántulas representativas de 10 días de edad, crecidas en medio sólido a las diferentes concentraciones.



**Figura 13.** Respuesta fenotípica de plántulas silvestres (WS) y de *gin5* a concentraciones crecientes del análogo manosa (indicadas en %). Se ilustran plántulas representativas de 10 días de edad, crecidas en medio sólido a las diferentes concentraciones del azúcar.

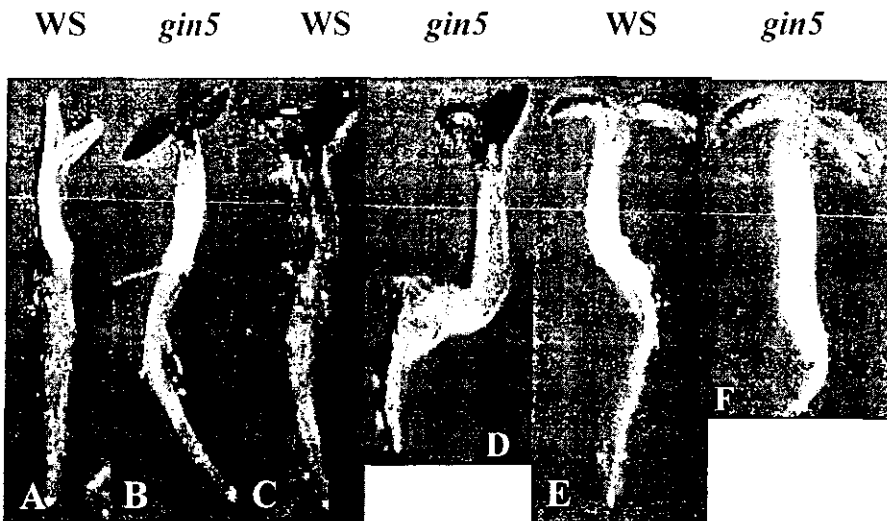


**Figura 14.** Respuesta fenotípica en presencia de 6% del análogo 3-*O*-metilglucosa sólo (A y B), y con 100 nM de ABA (C y D), en plántulas silvestres (WS) y de *gin5*, respectivamente. Se ilustran plántulas representativas de 10 días de edad.

### EFEECTO DE DIFERENTES POLIOLES EN EL DESARROLLO DE *gin5*

Mucho se ha cuestionado el efecto que tiene la concentración de 7% de glucosa en detener el desarrollo, principalmente del tejido aéreo en plántulas silvestres, y como método de selección para aislar diferentes mutantes. Estas críticas radican en que ésta concentración de glucosa también es capaz de ejercer efectos osmóticos (Déjardin y cols, 1999). Para apoyar que la señal activada a esa concentración de glucosa es más específica para carbono, se evaluó el desarrollo tanto de plántulas silvestres como de *gin5* en diferentes polioles como manitol y un polímero de alto peso molecular como el polietilenglicol 8000 (PEG). El manitol es capaz de penetrar a la célula, por lo que su efecto puede ser más directo (Sttop y Pharr, 1993). En cambio, el polietilenglicol sólo

ejerce un efecto osmótico externo a toda la planta. De esta manera, puede distinguirse si el fenotipo observado en plántulas silvestres en 7% de glucosa, se debe únicamente a efectos osmóticos directos o indirectos en el tejido aéreo, ó si es realmente una respuesta específica a la glucosa. Como se ilustra en la Figura 15, sólo a altas concentraciones de glucosa (7%), las plántulas silvestres fueron capaces de detener su desarrollo. En 7% de manitol y PEG las plántulas pueden continuar con el reverdecimiento y expansión de cotiledones de manera similar a *gin5*. El efecto osmótico sólo se manifiesta con el poco desarrollo de la raíz, pues es un órgano importante en las respuestas a estrés en plantas (Quesada y cols, 2000). De esta manera, las diferencias observadas en el fenotipo durante el crecimiento en 7% de glucosa principalmente del tejido aéreo, entre plántulas silvestres y de *gin5*, son efectos directos por la señal del carbono. Sin embargo, el desarrollo de la raíz sí se ve afectado a estas concentraciones de cada agente osmótico, siendo dramático en 7% de PEG para el caso de la mutante *gin5* (Figura 15 F). La glucosa ejerce un efecto menos dramático en comparación a la respuesta observada en manitol y en PEG.

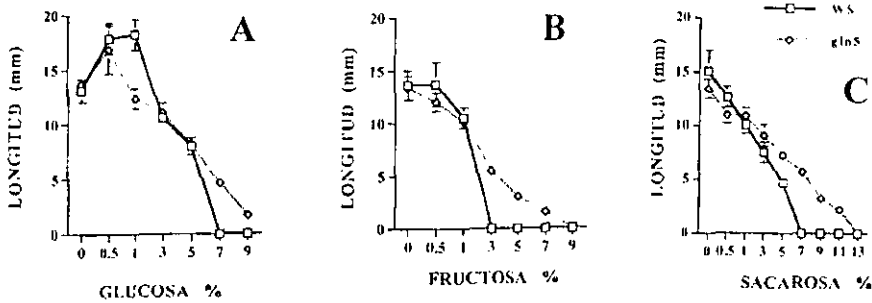


**Figura 15.** Respuesta fenotípica de plántulas silvestres (WS) y de *gin5* en presencia de 7% de glucosa (A y B), 7% de manitol (C y D) y 7% de PEG 8000 (E y F). Se ilustran plántulas representativas de 7 días de edad, crecidas en medio sólido a las diferentes concentraciones tanto de glucosa como de cada poliol.



## EFFECTO DE LA GLUCOSA, FRUCTOSA Y SACAROSA EN LA ELONGACION DEL HIPOCOTILO EN *gin5*

Con el objeto de evaluar el efecto de concentraciones crecientes de azúcares en el crecimiento de las células *in planta*, se midió la elongación de hipocotilos en concentraciones crecientes de azúcares, en un ensayo que se realizó de la siguiente manera. Las semillas se sembraron desde el inicio a las dosis indicadas de cada azúcar, durante 7 días en oscuridad, y posteriormente se expuso a la luz durante 4 horas para observar el efecto de reverdecimiento en los cotiledones. Como se ilustra en la Figura 16, el efecto de disminución en la elongación de los hipocotilos fue evidente en plántulas silvestres, en las que 7% de glucosa, 3% de fructosa y 7% de sacarosa inhibieron incluso la germinación de las semillas.

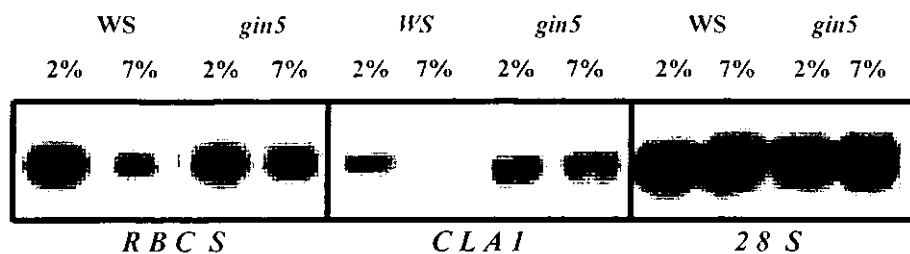


**Figura 16.** Efecto en la elongación del hipocotilo a concentraciones crecientes de glucosa (A), fructosa (B) y sacarosa (C). Se ilustran los promedios de la medición de 30 plántulas en cada concentración de cada azúcar. La línea continua (—) ilustra la cinética observada en plántulas silvestres y la línea punteada ( ··· ) muestra la cinética correspondiente para la mutante *gin5*.

## EFFECTO DE LA GLUCOSA EN EL CONTENIDO DE PIGMENTOS EN *gin5*

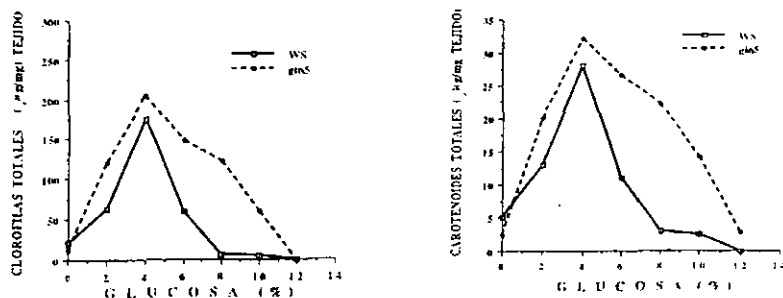
El efecto de los diferentes azúcares en etapas tempranas del desarrollo se aprecia en el fenotipo observado. En el caso de plántulas silvestres, la carencia de pigmentos refleja directamente la represión de los genes relacionados con la fotosíntesis. Esto se demostró en los resultados del Northern blot ilustrados en el artículo, en diferentes condiciones de glucosa en plantas silvestres.

Se corroboró a diferentes niveles el efecto de alta glucosa en plántulas silvestres y en *gin5*: a nivel fenotípico y de transcripción de algunos genes como *CABI* y *PC*. Además, se caracterizaron otros genes como el de la subunidad pequeña de Rubisco, *RBC-S*, y del primer gen que participa en una de las vías de biosíntesis de isoprenoides, conocido como *CLA1*. Los resultados mostraron que estos genes también responden a la regulación por glucosa, reprimiendo su transcripción en plántulas silvestres crecidas en alta glucosa. En el caso del *gin5* se observó también que la regulación de estos genes se encuentra afectada (Figura 17). Para este momento, se desconocía si el gen *CLA1* estaba sujeto a regulación por carbono. Por lo que resultó importante evaluar la influencia de la glucosa en la expresión de este gen. La Figura 17 ilustra que el gen *CLA1* es también un gen regulado por glucosa.



**Figura 17.** Regulación por glucosa en la expresión de los genes *RBC-S* y *CLA1*, en plántulas silvestres y de *gin5* crecidas durante 17 días a 2% y 7% de glucosa en medio sólido.

Debido a que el gen *CLA1* se ve reprimido por altas concentraciones de glucosa, y es uno de los genes más tempranos en la biosíntesis de precursores para la generación de pigmentos, se decidió cuantificar productos finales como clorofilas y carotenoides. La extracción de pigmentos se realizó de acuerdo a la técnica de Lichtenthaler y Wellburn (1993). Como se puede apreciar en la Figura 18, el máximo contenido tanto de clorofilas como de carotenoides totales se registró a 4% de glucosa en plántulas silvestres y de *gin5*, con una ligera elevación en el contenido en estas últimas. Sin embargo, más del 50% de disminución en el contenido de ambos pigmentos se observó al elevarse a 6% de glucosa en plántulas silvestres, y casi un 30% de disminución se registró a esa concentración en plántulas de *gin5*. Es hasta 10% y 12% de glucosa, donde se observó más del 50% de disminución en el contenido de ambos pigmentos en plántulas de *gin5*.



**Figura 18.** Contenido de clorofilas y carotenoides totales, en extractos de plántulas de 10 días de edad, crecidas a las diferentes concentraciones de glucosa, indicadas en %. Se muestra el promedio de 2 experimentos independientes.

### RESPUESTA A DIFERENTES HORMONAS VEGETALES EN ETAPAS TEMPRANAS Y TARDIAS DEL DESARROLLO EN *gin5*

Existen claras evidencias de la interconexión entre diferentes vías de señalización de nutrientes como carbono, fósforo y nitrógeno, con las de algunas hormonas vegetales (Sheen y cols. 1999; Geir-Moller y Chua, 1999). Zhou y cols (1998) demostraron claramente la interconexión entre las vías de señalización por glucosa y la de etileno al estudiar la mutante *gin1*. También se demostró la relación entre las vías de citocininas con las de carbono y nitrógeno en *Nicotiana plumbaginifolia* (Faure y cols. 1994), así como la activación del gen 1 de la invertasa apoplástica, un gen de respuesta a azúcares, en cultivo de células de *Ch. rubrum* (Ehneb y Roitsch, 1997). También se demostró que las citocininas activan el reverdecimiento de los cotiledones y por lo tanto la activación de las funciones fotosintéticas que son reprimidas por azúcares, en *Lupinus luteus*, activando la expresión del gen de la protoclorofilo oxidoreductasa (Kusnetsov y cols, 1998). En embriones de cebada se demostró que genes como el de la  $\alpha$ -amilasa, que son inducidos durante la germinación por giberelinas, pueden ser reprimidos por azúcares (Perata y cols. 1997). La relación entre las vías de señalización por auxinas y carbono también se demostró cuando la sacarosa fue capaz de antagonizar el efecto represor de auxinas, sobre la expresión del gen *Vsp* en soya (DeWald y cols, 1994). En la mutante *pr11* se demostró un efecto pleiotrópico de esta mutación en la respuesta a diferentes azúcares y hormonas. La mutación en este caso provoca hipersensibilidad no sólo a las

fuentes de carbono, sino a diferentes hormonas, entre ellas citocininas, etileno, ABA y auxinas (Nemeth y cols, 1998). La mutante *gin2* en *Arabidopsis*, que carece de la hexocinasa 1, además del fenotipo de insensibilidad a alta glucosa, tiene alterada la sensibilidad tanto a auxinas como a citocininas (Sheen y cols. 1999). El estudio de la mutante *gin5* demostró la participación de la hormona ABA en la respuesta de regulación por carbono en *Arabidopsis*, utilizando como molécula efectora al factor transcripcional *ABI4*, clonado por Analilía Arroyo durante el estudio de la mutante *gin6*.

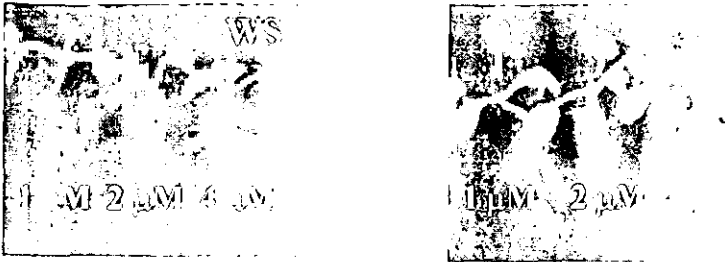
De esta manera se evaluó la respuesta de *gin5* a diferentes hormonas vegetales como auxinas, citocininas, ABA, etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico. Las dosis evaluadas se tomaron de las reportadas por Nemeth y cols (1998) en el reporte de la mutante *pr11* y los resultados obtenidos se describen a continuación.

#### RESPUESTA FENOTÍPICA A AUXINAS.

La evaluación a dosis crecientes de auxina (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), después de 5 días de crecimiento no mostró cambios fenotípicos importantes entre plántulas silvestres y las de *gin5*. Sin embargo, después de 3 semanas de crecimiento, a dosis mayores de 1  $\mu\text{M}$ , las plántulas de *gin5* desarrollaron un mayor número de pelos radiculares en comparación a la silvestre. A la dosis de 4  $\mu\text{M}$ , fue evidente la disminución de la talla del hipocotilo en las plántulas de *gin5* (Figura 19).

#### RESPUESTA FENOTÍPICA A CITOCININAS.

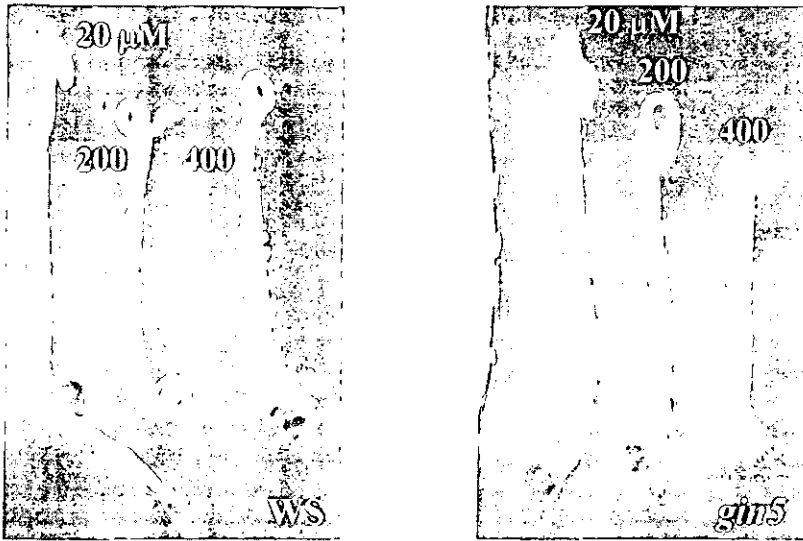
La evaluación frente a dosis crecientes de citocininas ( $\text{N}^6$ -benciladenina) no mostró ningún cambio fenotípico entre plántulas silvestres y de *gin5*. Todas las plantas respondieron a nivel de cotiledones como se ha descrito en *Arabidopsis*: aumento en su tamaño (Kusnetsov y cols, 1998), en comparación con las plantas no tratadas con  $\text{N}^6$ -benciladenina.



**Figura 19.** Respuesta fenotípica de plántulas silvestres (WS) y de *gin5*, a concentraciones crecientes de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Se ilustran plántulas representativas de 21 días de edad, crecidas en medio sólido a las diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

#### RESPUESTA FENOTÍPICA A ETILENO.

La respuesta de *gin5* en presencia de etileno se evaluó primeramente en el desarrollo de la triple respuesta. El crecimiento de plántulas silvestres y de *gin5*, durante 5 días en la oscuridad y en ausencia de etileno, desarrolló los cambios fenotípicos característicos de esta respuesta: ensanchamiento del hipocotilo, desarrollo del gancho apical y de pelos radiculares (no ilustrados). En presencia de dosis crecientes de etefón, que es un precursor de etileno (20, 200 y 400  $\mu\text{g/ml}$ ), las características de la triple respuesta se incrementan: un ensanchamiento importante del hipocotilo, desarrollo del gancho apical pronunciado, con una vuelta de casi  $360^\circ$  y el aumento del desarrollo de los pelos radiculares. Una respuesta similar se observó en plántulas silvestres. Estos resultados sugirieron que *gin5* es capaz de producir etileno, de percibirlo exógenamente y de responder, generando una señal, por lo tanto no es una mutante que tenga afectada la producción y la sensibilidad a esta hormona (Figura 20).



**Figura 20.** Triple respuesta inducida en plántulas silvestres (WS) y de *gin5* a concentraciones crecientes de etefón como precursor de etileno (indicadas en  $\mu\text{M}$ ). Se ilustran plántulas representativas de 5 días de edad, crecidas en medio sólido a las diferentes concentraciones y en oscuridad.

La respuesta de *gin5* a dosis crecientes de precursor de etileno y en presencia de luz, indicaron solamente cambios importantes en la evaluación a 3 semanas, las plántulas presentaron signos de amarillamiento en el primer par de hojas verdaderas, posiblemente representando el inicio temprano de la senescencia a las 3 dosis mayores de etefon: 160, 320 y 640  $\mu\text{M}$  (Figura 21).

#### RESPUESTA FENOTÍPICA A ACIDO JASMONICO Y A ACIDO SALICILICO.

No se observaron cambios fenotípicos en la respuesta entre plántulas silvestres y de *gin5*, a dosis crecientes de ácido jasmónico y ácido salicílico, tanto a 5 días como a 3 semanas de crecimiento.

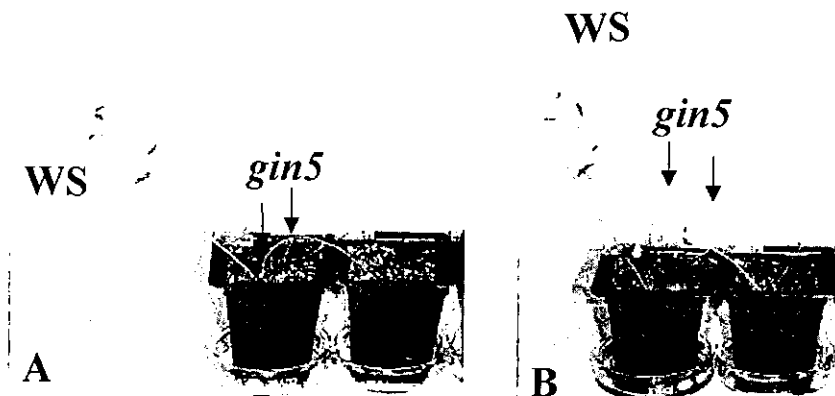


**Figura 21.** Respuesta fenotípica de plántulas silvestres (WS) y de *gin5* a concentraciones crecientes de etefón como precursor de etileno (indicadas en  $\mu\text{M}$ ). Se ilustran plántulas representativas de 3 semanas de edad, crecidas en medio sólido a las diferentes concentraciones del precursor.

#### EVALUACION DE ESTRES POR RIEGO EN LA MUTANTE *gin5*

Desde el inicio del aislamiento de la mutante *gin5*, fue patente la presencia del fenotipo marchito que co-segregó con el fenotipo de insensibilidad a 7% de glucosa. Este fenotipo de marchitamiento sugirió fuertemente su relación con respuestas reguladas por la hormona ABA. De acuerdo a lo anterior, su relación más directa fue por la presencia de la marchitez y pérdida de turgencia, hechos que comparte con las mutantes *abi1*, *abi2* y con mutantes relacionadas a la biosíntesis, mutantes *aba*.

Se demostró que posterior a los 5 min, fuera del ambiente de la cámara de crecimiento, la pérdida de turgencia es evidente, comparada con el fenotipo observado de la planta silvestre. Posteriormente, se determinó que el 3er día sin riego de agua aparece el fenotipo marchito (Figura 22A), y la turgencia se recupera regando de nuevo con agua (Figura 22B). Además, en condiciones de máximo estrés por riego para la mutante, aplicando a las hojas 3 mM de ABA, los estomas de las hojas de *gin5* responden, ya que las plantas no pierden turgencia y se mantienen erectas, similar a plantas silvestres (Figuras 3A, 3B y 3C del artículo Arenas-Huerta y cols, 2000). Este primer resultado sugirió fuertemente que *gin5* es una mutante afectada en la biosíntesis de ABA, pero sensible a ésta, y la separó del comportamiento de una mutante insensible a ABA como las mutantes *abi*.

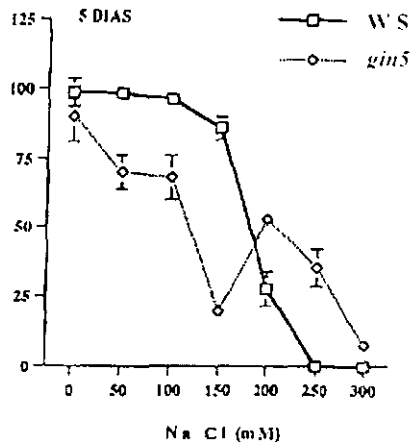


**Figura 22.** Respuesta fenotípica de plantas silvestres y de *gin5* a estrés por riego (5 días sin riego, A) y su recuperación 24 hs después de riego (B). Se indica la pérdida de turgencia en *gin5* (flechas blancas) y su recuperación después de 24 hs de riego (flechas negras).

#### RESPUESTA DE *gin5* FRENTE A ESTRÉS SALINO POR NaCl

Uno de los primeros efectos en la semilla en presencia de altas concentraciones de sal, es la disminución en la germinación. De esta manera se registró el índice de germinación a los 5 días en dosis crecientes de NaCl en plántulas silvestres y de *gin5*. En la Figura 23 se ilustra el promedio de 3 experimentos independientes, en los que se cuantificaron 100 semillas sembradas en cada uno. Como se puede observar, el índice de germinación disminuye de manera importante en *gin5* desde las primeras dosis de sal; de hecho a 150 mM existe menos del 25% de germinación en la mutante, comparado con 90% observado en plántulas silvestres. Sin embargo, a 200 mM de NaCl se observó una recuperación en el índice de germinación de *gin5*. A esta dosis se registró un 50% de germinación en *gin5*, comparado con un 25% en las semillas silvestres. De hecho *gin5* es más resistente a dosis mayores de 200 mM de sal, en comparación con plantas silvestres.





**Figura 23.** Efecto de dosis crecientes de NaCl en la germinación de semillas de plantas silvestres, WS. (—) y de semillas de la mutante *gin5* (---). Se ilustra el promedio de 3 experimentos independientes, registrando la respuesta de 100 semillas en cada uno.

En la Figura 24 se ilustra el crecimiento en 50, 100 y 200 mM de NaCl, a los 21 días, ubicando a las plántulas silvestres del lado derecho de la caja de Petri. Es evidente un mayor número de plántulas de *gin5* que empiezan a presentar signos de toxicidad por Na<sup>+</sup>: disminución de clorofila en las hojas y pérdida de vigor de las plántulas. Sin embargo, a 200 mM, se observan todavía plántulas de *gin5* con menor desarrollo y algunas con clorofila; hecho que contrastó con lo observado en plántulas silvestres con fenotipos de plantas muertas.

Para tratar de explicar el comportamiento de recuperación de *gin5* a dosis crecientes de NaCl, se realizó un análisis de la respuesta de la raíz frente a las diferentes dosis de sal. Esto por el hecho conocido de que la respuesta rizogénica defiende a la planta del estrés salino, reduciendo su absorción y previniendo la muerte por toxicidad (Vartanian y cols, 1994). La primera evaluación fue la respuesta de los pelos radiculares. El crecimiento de *gin5* en medio sin NaCl reveló que esta planta presenta pelos radiculares más largos y en mayor número, comparado con plántulas silvestres. De hecho se puede apreciar que la distancia de los internodos sobre el cuerpo de la raíz, es menor en la mutante que en la silvestre (Figura 25).

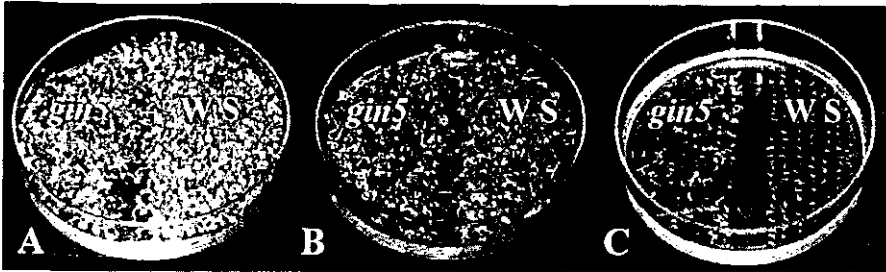


Figura 24. Respuesta de plántulas silvestres, WS, y de *gin5*, a 50 mM (A), 100 mM (B) y 200 mM (C) de NaCl. Se ilustran plántulas de 21 días de edad, crecidas en medio sólido a las diferentes concentraciones de sal.

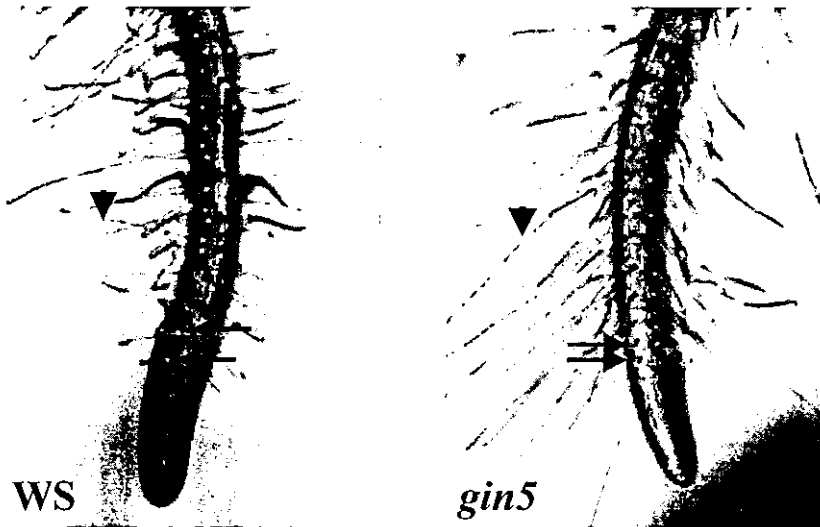


Figura 25. Crecimiento de pelos radiculares de plántulas silvestres (WS) y de *gin5*, crecidas en medio sólido. Se ilustra la separación más estrecha de los internodos en la raíz de *gin5* (flechas), comparada con la de plántulas silvestres. Además, es mayor la longitud de los pelos radiculares en la mutante *gin5* (cabeza de flecha).

La presencia de 50 mM de NaCl en plántulas silvestres, provocó una respuesta rizogénica de la raíz. Esta respuesta se caracteriza por la inhibición del crecimiento de los pelos, formando estructuras a manera de ámpulas, sobre el cuerpo de la raíz. Esta respuesta le permite disminuir la absorción, principalmente de  $\text{Na}^+$  que a esas

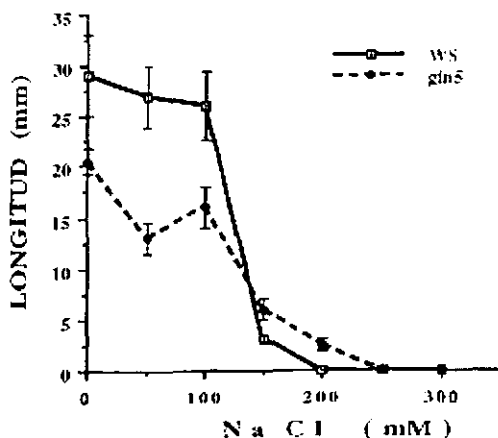
concentraciones puede ser tóxico para las células (Vartanian y cols. 1994). Esta respuesta es aún más evidente a 100 mM de NaCl (Figura 26). En contraste, la mutante *gin5* no respondió rizogénicamente y se observó la aparición de pelos radiculares a esta concentración de sal, aunque de menor longitud (Figura 26). No es hasta 200 mM, donde se observó la respuesta rizogénica de estos pelos (Figura 26). Es interesante que si se agrega 100 nM de ABA, la respuesta de la raíz de la mutante se activa y responde de manera similar a la silvestre, principalmente a 100 mM de NaCl (Figura 26).



**Figura 26.** Respuesta rizogénica en la raíz de plántulas silvestres (WS) y de *gin5* a diferentes concentraciones de NaCl (indicadas en mM). Se ilustran (flechas negras) las estructuras rizogénicas en la raíz de plántulas silvestres, crecidas a 100 mM, 200 mM y 100 mM + 100 nM de ABA. A 100 mM de NaCl, *gin5* no es capaz de desarrollar estructuras rizogénicas, sino hasta 200 mM ó a 100 mM de NaCl + 100 nM de ABA exógeno (indicado con flechas blancas).

Finalmente se evaluó el efecto de dosis crecientes de NaCl, en la longitud de la raíz principal, como otro parámetro de toxicidad, tanto en plántulas silvestres como de *gin5*. Como se puede observar en la Figura 27, la longitud de la raíz principal de la mutante en condiciones de crecimiento sin sal, es menor que la observada en plántulas silvestres. Durante la evaluación de este parámetro, a 100 mM de sal la raíz disminuyó cerca de 5 mm su longitud en plántulas silvestres, hecho que contrastó con la respuesta de disminución de 10 mm a esa misma concentración en *gin5*, que incluso fue significativa.

A dosis de 150 y 200 mM de NaCl, se observó todavía desarrollo de la raíz en la mutante, comparado con la respuesta de plántulas silvestres que carecieron de crecimiento de la raíz; *gin5* logró todavía un crecimiento de 2.5 mm. Con este parámetro también se corroboró el efecto de resistencia a mayores concentraciones de sal, medido por el efecto en la germinación y fenotípicamente (Figuras 23 y 24, respectivamente).



**Figura 27.** Efecto de dosis crecientes de NaCl en la longitud de la raíz principal en plántulas silvestres (WS) y de *gin5*. Se ilustran los promedios de longitud, obtenidos de la medición de la raíz de 10 plántulas, en cada concentración de sal. Las plántulas crecieron durante 10 días en presencia de luz, y en posición vertical para lograr el crecimiento de la raíz.

#### EFFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN LA SÍNTESIS DE PROLINA Y EN LA INDUCCION DEL GEN P5CS1

Como se demostró en el artículo, la mutante *gin5* no es capaz de elevar los niveles de ABA en presencia de alta glucosa, de la misma forma que la silvestre (Tabla 2 del artículo). Por esta razón, la mutante no puede regular su respuesta a altas concentraciones de carbono. Paradójicamente, esta planta fue capaz de resistir altas concentraciones de NaCl, como se describió en los ensayos de estrés salino. Durante la respuesta a diferentes tipos de estreses se sabe que se inducen varios genes cuyos productos permiten responder frente a los mismos. Algunos de estos genes codifican para la biosíntesis de algunos

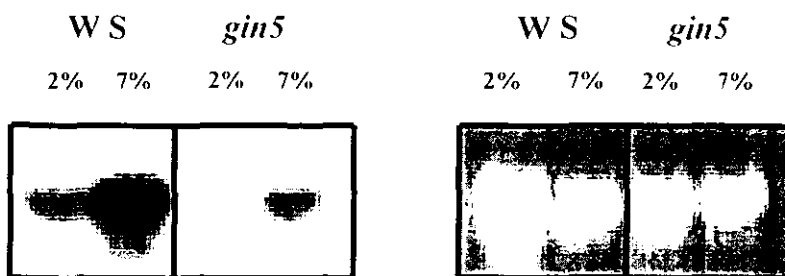
osmolitos orgánicos como es el caso de la prolina (Delauney y Verma, 1993; Yoshida y cols. 1997).

Un hecho que llama la atención en *gin5* es la falta de elevación de los niveles de ABA en alta glucosa, que contrasta con su capacidad de resistir altas concentraciones de NaCl. La biosíntesis de prolina depende de la activación del gen P5CS1 que es un gen de respuesta a ABA. En condiciones de alta glucosa, *gin5* no es capaz de elevar los niveles de prolina, como lo realizan plantas silvestres (Cuadro 3).

PLANTA	W S		<i>gin 5</i>	
	2%	7%	2%	7%
mg prol/mg tejido*	12.76 (3.7)	20.61 (1.4)	7.57 (1.3)	4.24 (1.1)

**Cuadro 3.** Concentración de prolina en plántulas silvestres (WS) y de *gin5*, crecidas 17 días en medio sólido a las diferentes concentraciones de glucosa (indicadas en %). \* La concentración de prolina se midió espectrofotométricamente a 193 nm. Las plántulas se congelaron, se extrajo el agua total de ellas por microcentrifugación en una columna de un tubo de 500 µl, en el interior de uno de 1.5 ml. Posteriormente se cuantificó de 5 µl de este extracto, en una curva patrón utilizando L-prolina como estándar. Se ilustra el promedio y error estándar (en paréntesis) de la medición de 10 plántulas por cada condición.

En condiciones de alta glucosa, la inducción del gen P5CS1 es evidente en plantas silvestres; la mutante también eleva el mensajero del gen, pero en menor magnitud que la silvestre (Figura 28). Es claro que esta respuesta depende de la elevación de los niveles de ABA. La mutante *gin5* no es una planta nula en ABA endógeno en diferentes órganos (cuadro 3). Sin embargo, contiene siempre menores cantidades de ABA en los diferentes tejidos de los contenidos en plantas silvestres (Cuadro 4).



**Figura 28.** Inducción del gen P5CS1 (panel izquierdo) en diferentes concentraciones de glucosa (indicadas en %), tanto en plántulas silvestres como de *gin5*. Las plántulas crecieron durante 17 días en medio sólido a las diferentes concentraciones del azúcar. Se ilustra en el panel derecho, el RNA ribosomal 28S para indicar la cantidad de RNA en cada condición.

TEJIDO	PLANTA	
	W S	<i>gin5</i>
SEMILLA	240 (3.0)	160 (1.0)
RAIZ	5.6 (1.6)	4.2 (1.6)
PLANTULA	14.0 (1)	7.2 (2.0)

**Cuadro 4.** Contenido endógeno de ABA en cada tejido de plantas silvestres y de *gin5*. La cuantificación de ABA en raíz se realizó de plántulas que crecieron 17 días en medio GM líquido con agitación y en presencia de luz. El contenido en plántulas se realizó en tejido de 15 días de edad, crecidas en medio GM sólido. La cantidad de ABA se indica en ng de ABA por gramo de tejido en peso fresco. En paréntesis se indica el error estándar. Se cuantificó para cada tipo de tejido por duplicado en 10 mg como mínimo.

Estos hechos revelan:

1. La participación de otros factores que pueden discriminar una señal inducida por la presencia de altos niveles de fuente carbonada, y la proveniente de una señal por algún tipo de estrés para elevar los niveles de ABA. Un ejemplo lo representan las mutantes *abi*. Estas mutantes fueron aisladas por su insensibilidad a inhibir la germinación en presencia de ABA. Sin embargo, las mutantes *abi-1*, *abi-2* y *abi3* son

sensibles a alta glucosa: en cambio las mutantes *abi4* y *abi5* responden como mutantes insensibles a alta glucosa (Arenas-Huerta y cols. 2000). Por otro lado, la mutante *abi2* es osmotolerante y exhibe una respuesta similar a la de una planta silvestre en presencia de alta fuente carbonada (Laby y cols. 2000). Estos resultados demuestran que las respuestas de sensibilidad a estreses y a la presencia de concentraciones elevadas de glucosa, son genéticamente separables: además de la respuesta de sensibilidad a hormonas como el ABA.

2. Que existe efectivamente otra vía menor de biosíntesis de ABA, que quizá es la responsiva para los factores que se activan selectivamente por la señal del estrés, y que trata de reemplazar la biosíntesis de ABA, afectada de la vía principal.
3. A pesar de existir esta vía menor de biosíntesis de ABA, al parecer no se activa en condiciones de alta glucosa, revelando que la vía principal parece actuar siempre en condiciones de alta glucosa y en condiciones de estrés. Los resultados de activación del gen *P5CS1* que requiere de ABA, es inducido en baja magnitud en la mutante de como se induce en la silvestre. Este dato sugiere fuertemente que existe una vía menor activada en la mutante y que permite responder no en la proporción en como lo realiza la silvestre. También existe la posibilidad de activarse por las vías independientes de ABA, que le permitan a *gin5* contender con el estrés salino. La razón de la osmotolerancia de las mutantes insensibles a alta glucosa no se conoce. Sin embargo, una posibilidad es que estas mutantes pueden acumular concentraciones elevadas de azúcares endógenos, que pueden funcionar como osmolitos protectores al estrés (Gibson, 2000). De hecho se sabe que *gin5* acumula mayores concentraciones de azúcares reductores, que las plantas silvestres:

HOJA ROSETA	WS	<i>gin5</i>
1	1.55 (0.14)	2.7 (0.14)*
2	1.22 (0.30)	2.9 (0.10)*
3	1.33 (0.10)	3.5 (0.14)*

**Cuadro 5.** Concentraciones endógenas de azúcares reductores totales, en las 3 primeras hojas de la roseta de plantas silvestres (WS) y de *gin5*. Las plantas crecieron durante 21 días en tierra, a 21° C y fotoperiodo de 16 X 8 (luz X oscuridad). El número progresivo indica la edad de las hojas. Se ilustran los promedios de las cuantificaciones de 5 diferentes individuos por planta y desviación estándar en paréntesis. Se cuantificaron los azúcares reductores por una modificación del método de Dubois y cols (1956), utilizando el reactivo de DNS para el desarrollo de color.

4. La mutante *gin5* como en otras mutantes en biosíntesis de ABA, posee como la planta silvestre, una vía de respuesta a diferentes estreses que es independiente de la presencia de ABA. Seguramente esta vía no debe estar afectada. No se exploró este hecho en la mutante *gin5*, pero se sabe que esta vía puede operar de manera paralela a la vía dependiente de ABA. El ABA permite respuestas muy rápidas (de segundos a minutos), mientras que la otra vía puede operar en tiempos más largos (de horas a días), es decir, permite una respuesta sostenida. Es posible que este hecho explique la respuesta a estrés salino por parte de la mutante *gin5* sólo a 200 mM de NaCl. Se sabe que la mutante *aba1-1* expresa el gen *abi4* (Söderman y cols, 2000). Por ensayos fisiológicos se demostró que este gen permite tanto a las mutantes *aba* como a las mutantes *abi2* y *abi5*, a ser resistentes a estreses osmóticos y salinos. De hecho Söderman y cols (2000) demostraron que el gen ABI3 es importante para la inducción de proteínas tardías durante la embriogénesis, para preparar las semillas a resistir la desecación. En cambio, ABI4 y ABI5 participan en las respuestas a ABA, glucosa y estrés. El gen ABI4 se expresa en las mutantes *aba1-1*, *eral*, *abi2* y *abi5* en niveles similares a los expresados en plantas silvestres. Esto aún en presencia o en ausencia de ABA, lo que demuestra que otros factores independientes de ABA, también están participando en la inducción de ABI4. Es posible que la participación del gen ABI4



entre otros factores que aún no se han descrito, permitan a mutantes tipo *aba3-2*, *gin5* así como a otras mutantes en biosíntesis de ABA, a ser resistentes a 200 mM de NaCl (León-Kloosterziel y cols. 1996; Söderman y cols, 2000).

## DISCUSIÓN

### *LA GLUCOSA COMO MOLÉCULA SEÑAL EN PLANTAS*

El estudio de mutantes ha puesto de manifiesto la intercomunicación que existe entre las diferentes vías de señalización en una célula. Lo más interesante y a la vez complejo, es el hecho de que la célula sea capaz de discriminar entre señales generadas ya sea por un nutriente, o algún tipo de estrés, para activar respuestas a corto y largo plazo. Así, no sorprende el hecho de que una mutante aislada por un defecto en la respuesta a algún tipo de estrés, sea a su vez una mutante en otros procesos fisiológicos y vice versa.

### *LAS PLANTAS COMO MODELO DE ESTUDIO*

#### *DE REGULACIÓN POR CARBONO*

El mecanismo de regulación por carbono en plantas es más complejo que el de levadura. Esto radica en el hecho de que las plantas son tanto productores de fuentes de carbono (tejidos verdes) como consumidoras de los mismos (hojas jóvenes, flores, frutos y raíces). De esta manera, los tejidos productores y los tejidos consumidores tienen vías de regulación diferentes para la disponibilidad de carbono. Aún en un mismo tipo de tejidos, pueden existir diferencias según la especie. En Solanáceas por ejemplo y en especial en papa, Lalonde y cols (1999) han puntualizado la importancia de los transportadores de sacarosa en el mecanismo de percepción de la señal por fuentes de carbono. Hasta ahora se ha visto que este tipo de transportadores juegan un papel nutricional, aportando azúcares a las células para su crecimiento y desarrollo. Otros participan en la generación de los gradientes osmóticos para el flujo en el interior del floema; y finalmente existen otros transportadores que participan en el inicio de la señal de regulación por fuentes de carbono. Se propone que estos últimos transportadores pueden participar en Solanáceas, en la regulación por carbono.

En otras especies como *Arabidopsis*, se demostró la importancia de la hexocinasa en la percepción e inicio de la señal, para la regulación por carbono. Esta vía dependiente de hexocinasa, regula un gran número de genes que participan en la fotosíntesis, como *RBC-S*, *CAB*, *PC* entre otros. La importancia de la vía de la hexocinasa para la regulación por carbono, se comprobó por diferentes estrategias experimentales: la generación de

plantas transgénicas con construcciones en sentido y antisentido del gen de la hexocinasa (Jang y cols, 1997); y el aislamiento de mutantes insensibles a altas concentraciones de glucosa (Sheen y cols, 1999; Gibson, 2000). Muchas de estas mutantes denominadas glucosa insensibles (mutantes *gin*): *gin1*, *gin2*, *gin5*, *gin6*, representan diferentes grupos de complementación con características fenotípicas relacionadas a la alteración en otros procesos celulares (pleiotropía). Estos efectos pleiotrópicos claramente reflejan como una mutación que afecta un proceso celular (regulación por carbono), puede a su vez estar afectando otros mecanismos no relacionados (regulación por hormonas).

## LA IMPORTANCIA DE LOS EFECTOS PLEIOTRÓPICOS DE LA MUTACIÓN EN *gin5*: LA REGULACIÓN POR CARBONO Y LA PARTICIPACIÓN DE LA HORMONA ABA

El hecho de que diferentes mutantes *aba*, sean insensibles a altas concentraciones de glucosa, demostró claramente la participación del ABA en la vía de señalización por glucosa. Varias de las mutantes *gin* muestran alteraciones en otras respuestas relacionadas a otras hormonas. Por ejemplo, en el caso de *gin1*, se encuentran afectadas algunas respuestas reguladas por la hormona etileno (Zhou y cols, 1998). En el caso de *gin5*, la mutante se caracterizó por presentar un fenotipo marchito, característica importante que poseen las mutantes *aba*. El fenotipo marchito de *gin5* puede revertirse con la aplicación exógena de 3  $\mu$ M de ABA, en solución acuosa sobre las hojas (Figura 3F del artículo). Esta deficiencia en ABA tanto en *gin5* como en las diferentes mutantes *aba*, sugirió que la aplicación exógena de ABA (100 nM) en altas concentraciones de glucosa (desde 6% hasta 7%), era capaz de restaurar la sensibilización del sistema a la alta glucosa, y así sucedió tanto en *gin5* como en la mutante *aba1-1*. Por otro lado, se comprobó que las plántulas silvestres de *Arabidopsis* de diferentes ecotipos: Ws, Ler y BE, crecidas en 7% de glucosa y 0.1 nM de Norfluorazona como agente inhibidor de la biosíntesis de ABA (Leung y Giraudat, 1998), fueron menos sensibles a las altas concentraciones de glucosa. Lo que apoya que en alta fuente de carbono se requiere de la elevación de los niveles endógenos de la hormona ABA. Queda por verificarse si la movilización del ABA es desde sitios de reserva y/o almacenamiento. Sin embargo, ya que la Norfluorazona es una droga que preferentemente se usa para inhibir la biosíntesis

de ABA, sugiere fuertemente que esta elevación pudiera provenir de una biosíntesis más que una movilización desde los sitios de almacenamiento.

La mutante *gin5* también es insensible a altas concentraciones de fructosa como a sacarosa (Figuras 10 y 11 de resultados). Los resultados sugieren que estos azúcares pueden utilizar la misma vía de señalización por glucosa, es decir la dependiente por la actividad de la hexocinasa.

### **¿CUÁL ES LA RELACIÓN ENTRE EL GEN AFECTADO EN *gin5* CON LA REGULACIÓN POR CARBONO Y LA VÍA DE BIOSÍNTESIS DE ABA EN *Arabidopsis*?**

Los resultados generados de la secuencia del fragmento genómico amplificado por PCR de la mutante *gin5*, y contenido en la misma secuencia del BAC F5D10, y de los resultados del mapeo cromosómico, corroboraron que el gen afectado en la mutante *gin5* se localizó en el cromosoma 1 hacia el telómero superior. El campo de lectura del gen más cercano a la inserción del T-DNA, codifica para una enzima del tipo hidroximetiltransferasa. ¿Cuál es la relación con el sistema de regulación por carbono?. ¿Cuál es la relación de esta enzima en la biosíntesis de la hormona ABA?. En este momento no se puede dar una explicación directa, lo que es patente es el desconocimiento de muchas de las enzimas así como el requerimiento de cofactores que participan en el biosíntesis de ABA (Cutler y Krochko, 1999).

La cruce entre las mutantes *gin5* con *aba3-2*, revelaron que ambas mutantes son alélicas, además que *gin5* no tiene actividad de aldehído oxidasa como es el caso de la mutante *aba3-2* (Figura 8 de resultados). Se propone que la mutante *aba3-2* carece de la sulfurilasa terminal, de acuerdo a los resultados de la caracterización bioquímica (Schwartz y cols, 1997; Mendel y Schwartz, 1999). Se desconoce cuál es el gen afectado en *aba3-2*. Con los resultados obtenidos en *gin5*, deja claro que el mecanismo de regulación por carbono es muy complejo, y por otro lado que se desconocen pasos importantes en la biosíntesis de la hormona ABA, en que pueden estar participando enzimas del tipo hidroximetiltransferasas. Una prueba contundente de que el gen afectado en *gin5* está participando en la regulación por carbono y en la biosíntesis de ABA será la complementación de *gin5* con la secuencia del gen silvestre de la

hidroximetiltransferasa, desde la inserción del T-DNA, pues en ocasiones las regiones no traducidas pueden participar en la respuesta y función del gen.

### **LA MUTANTE *gin5* COMO OTRAS MUTANTES EN REGULACIÓN POR CARBONO, TIENEN AFECTADAS LAS RESPUESTAS A OTRAS HORMONAS VEGETALES**

La mutante *gin5*, además de tener afectada la capacidad de elevar los niveles endógenos de ABA en presencia de alta glucosa, también desarrolla más rápido la senescencia en presencia de concentraciones exógenas del precursor de etileno. La mutante *pr11* fue aislada como una mutante hipersensible a azúcares, pero también es hipersensible a etileno, auxinas, citocininas y ABA exógeno (Nemeth y col 1999). La mutante *gin2* tiene alterada la sensibilidad a hormonas como auxinas y citocininas (Sheen y cols, 1999). La mutante *gin1* fue aislada como una mutante insensible a alta glucosa, y su mutación esta relacionada con la respuesta a la hormona etileno, pero también tiene afectada la respuesta a otras hormonas como ABA (Zhou y cols, 1998). Estos hechos demuestran claramente la participación de los azúcares en vías de regulación por hormonas y viceversa.

### ***gin5* CONTIENE MAYOR CONTENIDO DE PIGMENTOS, EN ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA, EN COMPARACIÓN CON PLANTAS SILVESTRES COMO CONSECUENCIA DE LA MUTACIÓN.**

La mutante *gin5* no reprime algunos genes que participan en la fotosíntesis como *CAB*, *RBC-S* y *PC* entre otros (Figura 5 del artículo; Figura 17 de resultados). También *gin5* no disminuye el contenido de pigmentos totales en altas concentraciones de glucosa, solo a 9% de concentración la mutante es capaz de disminuir hasta el 50% del contenido de pigmentos. En esta concentración de glucosa tan alta, las plantas silvestres carecieron totalmente de pigmentos. En *Arabidopsis*, los azúcares como la glucosa son capaces de reprimir la transcripción de muchos genes que participan en la fotosíntesis, y de varios productos sintetizados en el cloroplasto. Algunos de ellos pueden ser isoprenoides y sus productos finales como clorofilas y carotenoides (Sheen, 1999). También en *Arabidopsis* se demostró que la regulación de estos genes fotosintéticos están en la vía dependiente de

hexocinasa (Sheen y cols, 1999). Existen varias evidencias *in planta* que corroboraron la participación, por un lado de la hexocinasa, y por el otro de la acumulación de azúcares reductores, como señales capaces de afectar las concentraciones de pigmentos. Las plantas transgénicas de tomate que sobre-expresan el gen en sentido de la hexocinasa 1 de *Arabidopsis*, presentaron fenotipos evidentes como la disminución en la talla de las plantas, así como la disminución de pigmentos en las hojas (Dai y cols, 1999). Significa que la vía de regulación por carbono que depende de la hexocinasa, al no regular los procesos celulares, permite la acumulación de azúcares y estos pueden producir una reducción en los niveles endógenos de pigmentos. La siguiente estrategia permite corroborar como afecta la elevación de azúcares reductores endógenos *in planta*: plantas transgénicas de tabaco que sobre-expresan el gen de la invertasa de levadura producen la elevación de monosacáridos entre ellos glucosa, y fenotipos de tallas menores en las plantas, de los observados en plantas silvestres. También presentaron disminución en la cantidad de clorofila e inicio temprano de la senescencia en las hojas de la roseta (Heineke y cols, 1994). Para el caso de *gin5* se observó la acumulación de azúcares reductores, de pigmentos y también una talla menor, en comparación a plantas silvestres. La disminución de la talla en mutantes afectadas en los mecanismos de regulación por carbono de *Arabidopsis*, son fenotipos también observados en diferentes mutantes reportadas en levadura, que están directamente afectando la regulación por glucosa (Ronne, 1995).

Un hallazgo nuevo e importante fue verificar la regulación del gen *CLA1* por efecto de la glucosa: en altas concentraciones de este azúcar, se reprime el gen en plantas silvestres, pero no responde a regulación en la mutante *gin5*. El gen *CLA1* es el primer gen que participa en la biosíntesis de isoprenoides en la vía no mevalónica, en el cloroplasto. Los isoprenoides son precursores de muchos productos finales sintetizados en el cloroplasto, como algunas hormonas vegetales, y pigmentos como clorofilas y carotenoides. En el laboratorio se corroboró en plantas transgénicas que tienen la construcción en antisentido del gen *CLA1*, que los productos finales que se biosintetizan en el cloroplasto como clorofilas, carotenoides y de la hormona ABA, se encuentran también disminuidos en comparación de los niveles encontrados en plantas silvestres. En la mutante *gin5* se corroboró que se encuentra afectada la regulación del gen *CLA1*, de

manera similar a los genes *CAB*, *RBC-S* y *PC*. Se sabe que la mutación de *gin5* se encuentra en la vía de la hexocinasa (Figura 6 del artículo), por lo que una evidencia nueva es que la regulación del gen *CLA1* se encuentra también en la vía de la hexocinasa, como es el caso de algunos de los genes fotosintéticos. De esta manera, los azúcares como la glucosa regulan enzimas críticas y limitantes como la proteína *CLA1*, que es la primera enzima en la vía de biosíntesis de un gran número de precursores para moléculas biológicamente activas.

La mutante *gin5* es una planta insensible a altas concentraciones de glucosa. Existe otra mutante que es hipersensible a fuentes de carbono denominada *pr11*. Esta mutante también acumula grandes cantidades de azúcares reductores entre otros. Por la presencia de la mutación, los azúcares son capaces de inhibir *in planta* algunas vías o genes que están normalmente bajo el control por glucosa. Algunos de ellos son los genes que están relacionados con la biosíntesis de clorofilas, carotenos y antocianinas. También la mutante *pr11* presenta altas concentraciones de clorofilas y otros pigmentos (Nemeth y cols. 1998). Estos datos demuestran lo complejo que resulta ser el mecanismo de regulación por carbono en plantas y su mecanismo de control generalizado en la planta.

#### **LA RESPUESTA DE *gin5* EN PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE AZÚCARES Y DEL ANÁLOGO 3-O-metilglucosa, VERIFICA QUE LA MUTACIÓN DE *gin5* ESTA EN LA VÍA DE LA HEXOCINASA**

Altas concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa pueden reprimir el desarrollo del tejido aéreo en plantas silvestres. La mutante *gin5* fue insensible a 9% de glucosa y fructosa, y a 17% de sacarosa para reprimir este tejido. Las altas concentraciones de glucosa reprimen varios genes fotosintéticos que se encuentran en la vía de la hexocinasa. Todas las mutantes insensibles a alta glucosa, aisladas tanto por el grupo de Jen Sheen como en el laboratorio, están en la vía de la hexocinasa, lo que permite concluir que este método de aislamiento es específico para obtener mutantes afectadas en esta vía.

Altas concentraciones del análogo 3-O-metilglucosa (7%), no produjo represión en el desarrollo del tejido fotosintético tanto en plántulas silvestres como de la mutante *gin5* (Figura 14 de resultados). La presencia de 100 nM de la hormona ABA en 7% de

este análogo fue incapaz de inducir efectos en el desarrollo del tejido aéreo tanto en plántulas silvestres como de la mutante *gin5*. Esta respuesta fenotípica contrastó con la observada en *gin5*, crecida en 7% de glucosa más 100 nM ABA (Figura 4G del artículo). En modelo de cultivo celular de *Ch. rubrum*, se demostró que el análogo 3-*O*-metilglucosa activa algunos genes de respuesta a azúcares como el de la invertasa apoplástica, la sacarosa sintasa y el de la fenilalaninamonio liasa-1 (PAL-1). Estos hechos evidenciaron que el transporte de azúcares es otra vía de regulación por carbono. En *Arabidopsis*, esta vía sólo se ha demostrado en plantas transgénicas que expresan un promotor heterólogo, como el de la patatina y el gen reportero GUS (Martin y cols, 1997). En *Arabidopsis* no se ha demostrado *in planta* si análogos como la 3-*O*-metilglucosa regulen genes que participan en la fotosíntesis como *PC*, *CAB* y *RBC-S* entre otros. Probablemente la vía de señalización que depende solamente del transporte de azúcares (como el de la 3-*O*-metilglucosa), no esté operando en la vía que depende de la hexocinasa, o que en su defecto, esté operando ésta vía de transporte de azúcares en tejidos consumidores de azúcares.

### LOS AZÚCARES AFECTAN EL CRECIMIENTO CELULAR EN PLANTAS SILVESTRES, PERO EN MENOR MAGNITUD EN LA MUTANTE *gin5*

Dependiendo del tejido y tipo celular, los azúcares pueden inducir crecimiento ó senescencia (Koch, 1996). La glucosa, fructosa y sacarosa inhibieron menos la elongación del hipocotilo en plántulas de *gin5*, en comparación del efecto observado en plantas silvestres. Jang y cols (1997) demostraron en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, con la secuencia en antisentido del gen de la hexocinasa, que concentraciones elevadas de glucosa no son capaces de reprimir la elongación del hipocotilo, en comparación con plántulas silvestres o de plántulas transgénicas con la construcción del gen en sentido. Estos hechos demuestran como la glucosa afecta fuertemente procesos generales tales como la división celular. Este es uno de los efectos similares al de una hormona de crecimiento como la somatostatina en mamíferos, que se reconoce de los azúcares y en este caso en plantas (Sheen, 1999).



**LA PRESENCIA DE UN MAYOR NÚMERO DE PELOS RADICULARES EN *gin5* CARACTERIZÓ SU RESPUESTA INCREMENTADA A LA PRESENCIA DE AUXINAS EXÓGENAS.**

Fue interesante observar que la mutante *gin5* respondió con mayor desarrollo de raíces secundarias y de pelos radiculares, a mayores concentraciones de auxinas (2 y 4.5  $\mu\text{M}$ ), en comparación con la respuesta en plantas silvestres. La mutante *superroot1* en presencia de ácido indolacético (IAA) exógeno, es capaz de desarrollar un mayor número de raíces secundarias y pelos radiculares. Pero en esta mutante se corroboró que existe una sobreproducción de auxina, a expensas del incremento importante en la actividad de la enzima aldehído oxidasa-1 (AO-1). De esta manera se evidenció que esta enzima participa en la biosíntesis del ácido indolacético. Es posible que los pelos radiculares al ser de mayor longitud y estar presentes en mayor número, permiten ver una respuesta amplificada en presencia de auxinas exógenas en *gin5*.

**LA MUTANTE *gin5* EN ALTAS CONCENTRACIONES DE ETILENO EXÓGENO INICIA MÁS PRONTO LA SENESCENCIA EN TEJIDO FOTOSINTÉTICO, QUE LA RESPUESTA EN PLANTAS SILVESTRES**

La mutante *gin5* a dosis exógenas de 320 y 640  $\mu\text{M}$  de etilén como precursor de etileno, inician más pronto la senescencia, mientras que las plantas silvestres se mantienen sin cambios aparentes. Se sabe que altas concentraciones de azúcares son capaces de inducir senescencia (Koch, 1996). *gin5* contiene altas concentraciones de azúcares reductores (Cuadro 5 de resultados). Es posible que el etileno exógeno a dosis altas de las ensayadas, active prontamente el inicio de la senescencia en *gin5*. La respuesta fenotípica a etileno puede variar dependiendo la mutante en regulación por carbono evaluada. Por ejemplo, la mutante *pr11* se caracterizó en su respuesta a etileno exógeno, por presentar un mayor número de pelos radiculares. Sin embargo, en esta mutante no se descarta la posibilidad de que auxinas endógenas estén produciendo este efecto (Nemeth y cols, 1998).

De acuerdo a los estudios en la mutante *gin1* por Zhou y cols (1998), se demostró que el etileno es una hormona importante en la regulación por carbono en plantas. De hecho, las mutantes *eto* y *ctrl* se comportan como mutantes insensibles a altas

concentraciones de glucosa. Estos hechos sugieren fuertemente que durante la regulación por carbono se requieren:

- a) Por un lado la disminución de los niveles endógenos de etileno. Las mutantes sobreproductoras de etileno, *eto* (*ethylene overproduction*) y la de triple respuesta constitutiva de etileno, *ctr1* (*constitutive triple response*), son insensibles a alta glucosa. Y por otro lado, las mutantes insensibles a etileno, *etr1* (*ethylene resistant*) y *ein2* (*ethylene insensitive*), al no activar la vía de transducción por la hormona y manejar niveles endógenos menores de etileno, se comportan como mutantes hipersensibles a glucosa.
- b) Finalmente, se requiere también de la elevación de los niveles de ABA. Se demostró que varios alelos de las mutantes *aba* son insensibles a alta glucosa. La aplicación exógena de ABA a concentraciones incapaces de reprimir la germinación, 100 nM, es suficiente para hacer sensibles a estas mutantes y a *gin5*, a altas concentraciones de carbono como una respuesta observada en las silvestres. Además, la aplicación de cantidades tan pequeñas del inhibidor Norfluorazona, 0.01 nM, en alta glucosa permite a las plantas silvestres a ser menos sensibles a altas concentraciones de glucosa.

#### **LA MUTACIÓN DE *gin5* PERMITE EXPLICAR ALGUNAS DE LAS FUENTES DE BIOSÍNTESIS DE ABA, Y A SU VEZ ALGUNOS DE LOS FENOTIPOS CARACTERÍSTICOS DE LA MUTANTE**

La mutante *gin5* contiene niveles endógenos menores de ABA que los contenidos en plantas silvestres (Cuadro 4 de resultados). Este hecho en parte puede explicar el fenotipo marchito reversible a la aplicación exógena de ABA en las hojas. El no elevar los niveles endógenos de ABA en presencia de alta glucosa por parte de *gin5*, puede también explicar su fenotipo de insensibilidad a alta glucosa. También este fenotipo de *gin5* se puede revertir agregando exógenamente ABA en alta glucosa. Sin embargo existen otras respuestas fisiológicas de esta mutante que no pueden explicarse por su fenotipo deficiente en ABA endógeno. Otras características difíciles de explicar en *gin5* son el contener la misma cantidad y el mismo tipo de proteínas de almacenamiento en las semillas, que las contenidas en semillas de plantas silvestres; la respuesta fenotípica

similar a las plantas silvestres en presencia de altas concentraciones de polioles (manitol y polietilenglicol, Figura 15 de resultados). Sobre todo lo que más llamó la atención fue su resistencia durante el crecimiento en altas concentraciones de NaCl. 200 mM.

Durante mucho tiempo se ha propuesto que el ABA requerido para la maduración de la semillas en mutantes *aba* de *Arabidopsis*, proviene del tejido materno (Karsen y cols, 1983). Pero ¿cómo se explica la carencia de mutantes nulas en la biosíntesis de ABA y la existencia de mutantes *aba* capaces de resistir estreses osmóticos por polioles y por NaCl?. Las posibles respuestas a estas interrogantes sobre la mutante *gin5*, pueden en parte responderse en relación a la(s) ruta(s) de biosíntesis del ABA. Se requiere en la biosíntesis de precursores para formar xantofilas que son productos isoprenoides sintetizados en el cloroplasto. En esta ruta se han clonado muchos de los genes que participan en la formación y rompimiento de moléculas que forman estos precursores: desde la formación del fitoeno, caroteno, licopeno,  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, violoxantina y neoxantina. Sin embargo, se han clonado muy pocos genes en la ruta de biosíntesis del ABA, como el de la zeaxantina epoxidasa (Scolnik y Bartley, 1996). Actualmente, no se ha identificado todavía un gen que convierta los intermediarios provenientes de los carotenoides a ABA. Al parecer, una de las razones es la carencia de suficiente información sobre el metabolismo del ABA-aldehído. Además existen evidencias de que este intermediario no es el único producto para formar el ABA (Cutler y Krochko, 1999). Desde 1990, Rock y Zeevaart han sido los únicos que han documentado al ABA-aldehído como un producto natural. Posteriormente, diferentes autores sólo se han dedicado a seguir las reacciones *in vitro* de la conversión del ABA-aldehído. De hecho Netting y Milborrow (1994) demostraron *in vivo* que al dar ABA-aldehído marcado con deuterio como precursor, y en presencia de  $^{18}\text{O}_2$  o  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , encontraron que el ABA con deuterio no contenía  $^{18}\text{O}$ ; mientras que el ABA no marcado si lo contenía. Estos datos sugieren fuertemente que el ABA proveniente del ABA-aldehído marcado por  $^{18}\text{O}$ , fue formado por una enzima diferente de la vía tradicionalmente descrita. Existe otra evidencia, y es la acumulación de *trans*-ABA-alcohol en la mutante *flacca* de tomate y en *droopy* de papa, que no son mutantes nulas a ABA. Por este precursor en la forma de alcohol, se propone que muchas de estas mutantes puedan estar sintetizando niveles necesarios de ABA para subsistir (Cutler y Krochko, 1999). Es posible que algunas mutantes *aba* de *Arabidopsis*

estén acumulando ABA-alcohol, entre ellas *aba3-2* y posiblemente *gin5*. Sin embargo, se tendrá que verificar este hecho. Además, estudios de actividad de AO y de biosíntesis de ABA sugieren que el xantoxal (la xantofila más inmediata en la ruta de biosíntesis de ABA) y no el ABA-aldehído, es el sustrato para la AO dependiente de MoCo. Los estudios *in vitro* han demostrado que el xantoxal y el ABA-aldehído pueden estar compitiendo por la AO produciendo ácido xantoico y ABA. Los estudios de actividad en gel han demostrado que el ABA-aldehído parece ser un sustrato menos eficiente que otras formas de aldehído. En ningún estudio hasta el momento se ha evaluado el xantoxal como sustrato. Finalmente, Cowan (2000) propone:

- a) La existencia de una ruta de biosíntesis de ABA inducida por estreses. Si existiera la liberación del xantoxal de los cloroplastos, después de algún estímulo tipo estrés, este podría ser un precursor importante de la biosíntesis de ABA y sustrato de la AO. Son muy escasos los datos generados sobre este punto.
  
- b) La otra vía puede provenir a partir de ABA-aldehído. Otros estímulos la estarían activando (por ejemplo altas concentraciones de glucosa). También queda la posibilidad de que el ABA-alcohol sea un precursor y podría asistir la ruta biosintética del ABA-aldehído.

Frente a estrés salino, *gin5* es más sensible a dosis bajas de NaCl, en comparación a la respuesta de plantas silvestres. Esto se verificó con diferentes parámetros: índice de germinación, crecimiento en caja a dosis crecientes de NaCl, desarrollo y respuesta rizogénica de los pelos radiculares y longitud de la raíz (Figuras 23, 24 y 27 de resultados, respectivamente). Sin embargo llama la atención la resistencia de *gin5* a altas dosis de NaCl. La base molecular de la osmotolerancia en estas mutantes y en mutantes *aba* se desconoce, incluso la resistencia a estrés salino. Pero las mutantes insensibles a alta fuente carbonada acumulan concentraciones elevadas de azúcares, que pueden estar funcionando como osmolitos (Gibson, 2000). En *gin5* se documentaron altas concentraciones de azúcares reductores, estos pueden estar funcionando como osmoprotectores.

Con los antecedentes anteriores, la mutación de *gin5* apoya la existencia de otra vía de biosíntesis de ABA. Es muy posible que la vía proveniente de la oxidación del

ABA-aldehído se lleve a cabo como tradicionalmente se ha determinado, en la raíz y se active por diferentes estreses. Es posible que en esta vía también se genere ABA a partir de ABA-alcohol. Una elevación de este precursor frente a fuertes estímulos de estreses (altas dosis de NaCl por ejemplo), sea capaz de alimentar fuertemente la ruta de biosíntesis de ABA y se eleven los niveles endógenos de la hormona. Si el xantoxal proviniera de los cloroplastos, esto significa que el tejido fotosintético podría ser la fuente de ABA, y un estímulo de estrés que implique el cierre de estomas en las hojas, los cloroplastos serían la fuente más rápida de ABA disponible, que la esperada desde la raíz. Sin embargo por el fenotipo marchito de *gin5*, estaría reflejando también que esta vía de biosíntesis posiblemente se encuentre afectada. Sería interesante y a la vez relevante cuantificar ABA en tejido aéreo (verde) y en raíz en la mutante *gin5*, frente a diferentes tipos de estreses. para tratar de disectar y conocer cómo estos tipos de tejidos pueden responder a un estrés de manera independiente. No hay que olvidar que la raíz es la fuente importante de biosíntesis de ABA, y que puede atender mayoritariamente las demandas de esta hormona en los diferentes tejidos.

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que la mutación generada en *gin5*, fue debida a la inserción de un elemento del T-DNA, generando una mutación de tipo recesivo que produce una planta insensible a alta glucosa (7%). El fenotipo de insensibilidad a alta glucosa además, cosegrega con el fenotipo marchito en *gin5*. El gen que interrumpe la inserción del T-DNA, se encuentra a 2 kb hacia el extremo 3' de un gen que codifica para una enzima con actividad de hidroximetiltransferasa que participa en las reacciones de fotorespiración en plantas, así como en el metabolismo de nitrógeno y en la síntesis de lípidos.

La mutación en *gin5* es alélica a la mutación presente en la mutante *aba3-2*. La mutante *gin5* carece de actividad de las 3 enzimas con actividad de aldehído oxidasa, como es el caso de la mutante *aba3-2*.

La mutación de *gin5* se encuentra en la vía de regulación por carbono, dependiente de la hexocinasa, por lo que no regula (reprime) la transcripción de genes fotosintéticos en alta glucosa, como lo lleva a cabo plantas silvestres. La mutante *gin5* ha perdido la capacidad de regular la expresión del primer gen de la biosíntesis de isoprenoides, el gen *CLA1*. Además este gen se encuentra regulado por la vía de la hexocinasa, similar a la regulación de los genes fotosintéticos.

El fenotipo de *gin5* es generado por la señal iniciada por la glucosa, ya que en altas concentraciones de polioles no se inhibió el desarrollo de tejido aéreo de plantas silvestres. La mutante *gin5* también es insensible a altas concentraciones de fructosa y sacarosa. Las altas concentraciones de azúcares afectan en menor magnitud el desarrollo y crecimiento celular en la mutante *gin5*, en comparación al efecto inhibitorio observado en plantas silvestres.

La mutante *gin5* tiene niveles endógenos disminuidos de la hormona ABA, similar a las mutantes *aba* de *Arabidopsis*, con ello los alelos *aba1-1*, *aba2-1* y *aba3-2* son plantas insensibles a altas concentraciones de glucosa, similar a la mutante *gin5*. La aplicación

exógena de ABA en alta glucosa, permite restablecer el fenotipo sensible similar a la silvestre, en las mutantes *gin5-1* y *aba1*.

En altas concentraciones de etileno exógeno, las hojas cotiledonarias y el primer par de hojas verdaderas inician más pronto la senescencia en *gin5*. El mayor número de pelos radiculares en *gin5*, permite una respuesta hipersensible a la aplicación exógena de auxinas.

El fenotipo marchito de *gin5* es reversible a la aplicación exógena de ABA en las hojas, durante el estrés por riego. La mutante *gin5* es resistente a altas concentraciones de NaCl, tanto en la germinación como en el desarrollo temprano y en el crecimiento de la raíz principal. La respuesta rizogénica en *gin5* sólo aparece a altas concentraciones de NaCl (200mM). La resistencia de *gin5* a altas concentraciones de NaCl puede deberse a las concentraciones elevadas de azúcares endógenos en la mutante, que le permiten funcionar como osmolitos de protección.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alderson A. Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by plant protein kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8602-8605.
- Aloni B, Daie J, Wyse R E. Enhancement of [<sup>14</sup>C] sucrose export from source leaves of *Vicia faba* by gibberelic acid. *Plant Physiol* 1986; 82: 962-967.
- Alonso J M, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker J R. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 1999; 284: 2148-2152.
- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen y Leon P. 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 sugars. *Genes Dev* 2000; 14: 2085-2096.
- Avigad G, Dey P M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. En: Plant biochemistry. 1997. Dey P M, Harborne J B, (Eds). Academic Press. Great Britain. pp 143-203.
- Behringer F J, Medford J I. A plasmid rescue technique for recovery of plant DNA disrupted by T-DNA insertion. *Plant Mol Biol Rep* 1992; 10:190-198.
- Bell C J, Ecker J R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 1994; 19: 137-144.
- Berger S, Bell E, Sadka A, Mullet J E. *Arabidopsis thaliana Atvsp* is homologous to soybean *VspA* and *VspB*, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Mol Biol* 1995; 27: 933-942.
- Bhalerao R P, Salchert K, Bako L, Okresz L, Szabados L, Muranaka T, Machida Y, Schell J, Koncz C. Regulatory interactions of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5322-5327.
- Blechsmidt-Schneider S, Ferrar P, Osmond C B. Control of photosynthesis by carbohydrate levels in leaves of the C4 plant *Amaranthus*. *Planta* 1989; 177: 515-525.



Blumberg H, Eisen A, Sledziewski A, Bader D, Young E T. Two zinc fingers of a yeast regulatory protein shown by genetic evidence to be essential for its function. *Nature* 1987; 328: 443-445.

Bouly J-P, Gissot L, Lessard P, Kreis M, Thomas M. *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKIN $\alpha$ 1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J* 1999; 18: 541-550.

Bowes G. Growth at elevated CO<sub>2</sub>: photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant Cell Environ* 1991; 14: 795-806.

Bowyer J R, Leegood R C. Photosynthesis. En: Plant biochemistry. 1997. Dey P M, Harborne J B, (Eds). Academic Press. Great Britain. pp 49-104.

Cairns B R, Kim Y J, Sayre H, Laurent B C, Kornberg R D. A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6/, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5 and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1950-1954.

Carlson M, Osmond B C, Neigeborn L, Botstein D. Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* 1981; 98: 25-40.

Celenza J L, Carlson M. A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* 1986; 233: 1175-1180.

Celenza J L, Carlson M. Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 5034-5044.

Celenza J L, Eng F J, Carlson M. Molecular analysis of the *SNF4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 5045-5054.

Celenza J L, Marshall C L, Carlson M. The yeast *SNF3* gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 2130-2134.

Ciriacy M. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose repressible ADHIII. *Mol Gen Genet* 1975; 138: 157-164.

Cook D L, Taborsky G J.  $\beta$ -cell function and insulin secretion. En: Diabetes mellitus: theory and practice. 1990. Rifkin H, Porte D, (Eds). Elsevier. New York. pp 89-103.

Cook W, Denis C L. Identification of three genes required for the glucose-dependent transcription of the yeast transcriptional activator ADR1. *Curr Genet* 1993; 23: 192-200.

Cooper J P, Roth S Y, Simpson R T. The global transcriptional regulators, SSN6 and TUP1, play distinct roles in the establishment of a repressive chromatin structure. *Genes Dev* 1994; 8: 1400-1410.

Cossins E A. Folate biochemistry and the metabolism of one-carbon units. En: The biochemistry of plants. 1987. Davis D D, (Ed). Academic Press. New York. pp 317-353.

Cowan A K. Is abscisic acid aldehyde really the immediate precursor to stress-induced ABA? *Trends Plant Sci* 2000; 5: 191-192.

Cutler A J, Krochko J E. Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci* 1999; 4: 472-478.

Charron M J, Dubin R A, Michels C A. Structural and functional analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 3891-3899.

Chiang Y-C, Komarnitsky P, Chase D, Denis C L. ADR1 activation domains contact the histone acetyltransferase GCN5 and the core transcriptional factor TFIIB. *J Biol Chem* 1996; 271: 32359-32365.

Chiou T-J, Bush D R. Molecular cloning, immunichemical localization to the vacuole, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet. *Plant Physiol* 1996; 110: 511-520.

Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 1999; 11: 1253-1266.

Daie J, Watts M, Aloni B, Wyse R E. *In vitro* and *in vivo* modification of sugar transport and translocation in celery by phytohormones. *Plant Sci* 1986; 46: 35-41.

Davidson R L. Effect of soil nutrients and moisture on root/shoot ratio in *Lolium perenne* L. and *Trifolium repens*. *Annals Bot* 1969; 33: 571-577.

De Wald D B, Sadka A, Mullet J E. Sucrose modulation of soybean *1/2sp* gene expression is inhibited by auxin. *Plant Physiol* 1994; 104: 439-444.

Déjardin A, Sokolov S N, Kleczkowski L A. Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem J* 1999; 344: 503-509.

Delauney A J, Verma D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants: *Plant J* 1997; 4: 214-223.

Deuce R, Neuberger M. Biochemical dissection of photorespiration. *Curr Opin Plant Biol* 1999; 2: 214-222.

Deutchser J, Kessler U, Hengstenberg W. Streptococcal phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase system: purification and characterization of a phosphoprotein phosphatase which hydrolyzes the phosphoryl bond in seryl-phosphorylated histidine-containing protein *J Bacteriol* 1985; 163: 1203-1209.

Devit M J, Waddle J A, Johnston M. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell* 1997; 8: 1603-1618.

Dijkwel P P, Huijser C, Weisbeek P J, Chua N-H, Smeekeens S. Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1997; 9: 583-595.

Dorion S, Lalonde S, Saini H S. Induction of male sterility in wheat by meiotic-stage water deficit is preceded by a decline in invertase activity and changes in carbohydrate metabolism in anthers. *Plant Physiol* 1996; 111: 137-145.

Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28: 350-356.

Ehness R, Ecker M, Godt D E, Roitsch T. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 1997; 9: 1825-1841.

Entian K D. Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. *Mol Gen Genet* 1980; 178: 633-637.

Epstein P N, Boschero A C, Atwater I, Cai X, Overbeek P A. Expression of yeast hexokinase in pancreatic  $\beta$  cells of transgenic mice reduces blood glucose, enhances

insulin secretion, and decreases diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12038-12042.

Escobar-Gutiérrez A J, Zipperlin B, Carbonne F, Moing A, Gaudillère J P. Photosynthesis, carbon partitioning and metabolite content during drought stress in peach seedlings. *Aust J Plant Physiol* 1998; 25: 197-205.

Faure J-D, Caboche M. *Zea3*: a pleiotropic mutation affecting cotyledon development, cytokinin resistance and carbon-nitrogen metabolism. *Plant J* 1994; 5: 481-491.

Feng Z, Wilson S E, Peng Z Y, Schlender K K, Reiman E M, Trumbly R J. The yeast *GLC7* gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *J Biol Chem* 1991; 266: 23796-23801.

Flick J S, Johnston M. *GRR1* of *Saccharomyces cerevisiae*. is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats. *Genetics* 1991; 130: 295-304.

Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Permutt M A, Beckmann J S, Bell G I, Cohen D. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. *N Eng J Med* 1993; 328: 697-702.

Gancedo J M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Molec Biol Rev* 1998; 62: 334-361.

Geigenberger P, Reimholz R, Geiger M, Merlo L, Canale V, Stitt M. Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta* 1997; 201: 502-518.

German M S. Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: The key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1781-1785.

Gibson S I, Graham I A. Another player joins the complex field of sugar-regulated gene expression in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4746-4748.

Gibson S I. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol* 2000; 124: 1532-1539.

Gibson S I, Laby R J, Donggiun K. The *sugar-insensitive1* (*sis1*) mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctr1*. *Biochem Biophys Res Comm* 2001; 280: 196-203.

Gilbert G A, Wilson C, Madore M A. Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in coleus. *Plant Physiol* 1997; 115: 1267-1276.

Godt D E, Riegel A, Roitsch T. Regulation of sucrose synthase expression in *Chenopodium rubrum*: Characterization of sugar induced expression in photoautotrophic suspension cultures and sink tissue specific expression in plants. *J Plant Physiol* 1995; 146: 231-238.

Grant-Reid J S. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. En *Plant biochemistry*. 1997. Dey P M, Harborne J B, (Eds). Academic Press. Great Britain. pp 205-235.

Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma Y H, Bauer M, Stewart T A. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic  $\beta$  cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* 1995; 83: 69-78.

Gucci R, Moing A, Gravano E, Gaudillère J P. Partitioning of photosynthetic carbohydrates in leaves of salt-stressed olive plants. *Aust J Plant physiol* 1998; 25: 571-579.

Halford N G, Hardie D G. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants?. *Plant Mol Biol* 1998; 37: 735-748.

Harman J G, Botsford J L. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* 1992; 56: 100-122.

Heinecke D, Sonnewald U, Büssis D, Günter G, Leidreter K, Wilke I, Easchke K, Willmitzer L, Hledt H W. Apoplastic expression of yeast-derived invertase in tobacco. Effects on photosynthesis, leaf soluble composition, water relations, and tuber composition. *Plant Physiol* 1992; 100: 301-308.

Herbers K, Meuwly P, Metraux J-P, Sonnewald U. Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Let* 1996; 397: 239-244.

Hirschhorn J N, Brown S A, Clark C D, Winston F. Evidence that *SNF2/SWI2* and *SNF5* activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* 1992; 6: 2288-2298.

Hu Z, Nehlin J O, Ronne H, Michels C A. *MIG1*-dependent and *MIG1*-independent glucose regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 1995; 28: 258-266.

Hueck Ch J, Hillen W. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria? *Mol Microbiol* 1995; 15: 395-401.

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

Jang J-Ch, Leon P, Zhou L, Sheen J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 1997; 9: 5-19.

Jang J-Ch, Sheen J. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci* 1997; 2: 208-214.

Jetton T L, Liang Y, Pettepher C C, Zimmerman E C, Cox F G, Horvath K, Matschinsky F M, Magnuson M A. Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *J Biol Chem* 1994; 269: 3641-3654.

Jiang R, Carlson M. Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev* 1996; 10: 3105-3115.

Karssen C M, Brinkhorst-van der Swan D L C, Breeklund A E, Koornneef M. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 1983; 157: 158-165.

Katagiri H, Asano T, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Miyazaki J I, Tsukada K, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y. Nonsense mutation of glucokinase gene in late-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1992; 340: 1316-1317.

Keleher C A, Redd M J, Schultz J, Carlson M, Johnson A D. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 1992; 68: 709-719..

Koch K E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996; 47: 509-540.

Kolb A, Busby S, Buc H, Garges S y Adhya S. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* 1993; 749-795.

Krapp A, Hofmann B, Schafer C, Stitt M. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the "sink regulation" of photosynthesis?. *Plant J* 1993; 3: 817-828.

Krapp A, Quick W P, Stitt M. Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase, other photosynthetic enzymes and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via transpiration steam. *Planta* 1991; 186: 58-69.

Kruckeberg A L, Walsh M C, Van Dam K. How do yeast cells sense glucose?. *BioEssays*. 1998; 20: 972-976.

Kuper J, Palmer T, Mendel R R, Schwarz G. Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1G from *Arabidopsis thaliana* define functions for molybdopterin binding, molybdenum insertion, and molybdenum cofactor stabilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6475-6480.

Kusnetsov V, Herrmann R G, Kulaeva O N, Oelmüller R. Cytokinin stimulates and abscisic acid inhibits greening of etiolated *Lupinus luteus* cotyledons by affecting the expression of the light-sensitive protochlorophyllide oxidoreductase. *Mol Gen Genet* 1998; 259: 21-28.

Laby R J, Kincaid M S, Kim D, Gibson S I. The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J* 2000; 23: 587-596.

Lalonde A, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick J W, Frommer W, Ward J M. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 1999; 11: 707-726.

Lam H-M, Hsieh M-H, Coruzzi G. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1998; 16: 345-353.

Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive F D, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A. Molecular and functional regulation of two NO<sub>3</sub>-uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J* 1999; 18: 509-519.

León-Kloosterziel K M, Alvvarcz-Gil M, Ruijs G J, Jacobsen S E, Olszewski N E, Schwartz S H, Zeevaart J A D, Koornneef M. Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* 1996; 10: 655-661.

Leung J, Giraudat J. Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; 49: 199-222.

Leydecker M-T, Moureaux T, Kreapiel Y, Schnorr K, Caboche M. Molybdenum cofactor mutants, specifically impaired in xanthine dehydrogenase activity and abscisic acid biosynthesis, simultaneously overexpress nitrate reductase. *Plant Physiol* 1995; 107: 1427-1431.

Li F N, Johnston M. Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae*. is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J* 1997; 16: 5629-5638.

Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris T C, Chory J. a role for Brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 1996; 271: 398-481.

Liang H, Gaber R F. A novel signal transduction pathway in *Sacharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of *HXT6*. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 1953-1966.

Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. 1987. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.

Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T y Whittier R F. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 1995; 8: 457-463.

Lucas W J y Wolf S. Connections between virus movement. macromolecular signaling and assimilate allocation. *Curr Opin Plant Biol* 1999; 2: 192-197.

Mach H, Hecker M, Mach F. Physiological studies on cAMP synthesis in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 1988; 52: 189-192.

Magnuson M A. Tissue-specific regulation of glucokinase gene expression. *J Cell Biol* 1992; 48: 115-121.

Man A L, Purcell P C, Hannappel U, Halford N G. Potato SNF1-related protein kinase: molecular cloning, expression analysis and peptide kinase activity measurements. *Plant Mol Biol* 1997; 34: 31-43.



Marin E y Marion-Poll A. Tomato *flacca* mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities. *Plant Physiol Biochem* 1997; 35: 369-372.

Marmorstein R, Carey M, Ptashne M, Harrison S C. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* 1992; 356: 408-414.

Marshall-Carlson L, Neigeborn L, Coons D, Bisson L, Carlson M. Dominant and recessive suppressors that restore glucose transport in a yeast *snf3* mutant. *Genetics* 1991; 128: 505-512.

Martin T, Hellman H, Schmidt R, Willmitzer L, Frommer W B. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant J* 1997; 11: 53-62.

Matsumoto K, Toh A, Oshima Y. Isolation and characterization of dominant mutations resistant to catabolite repression of galactokinase synthesis in *S. cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1982; 1: 83-93.

Mazon M J, Gancedo J M, Gancedo C. Phosphorylation and inactivation of yeast fructose biphosphatase *in vivo* by glucose and by protein ionophores. A possible rôle for cAMP. *Eur J Biochem* 1982; 605-608.

McClung C R, Hsu M, Painter J E, Gagne J M, Karlsberg S D, Salomé Patrice A. Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two *Arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase. *Plant Physiol* 2000; 123: 381-392.

Mendel R R y Schwarz G. Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Crit Rev Plant Sci* 1999; 18: 33-69.

Mita S, Hirano H, Nakamura K. Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in *Arabidopsis thaliana*. A recessive mutation causing enhanced expression of a gene for  $\beta$ -amylase. *Plant Physiol* 1997a; 114: 575-582.

Mita S, Murano N, Akaike M, Nakamura K. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for  $\beta$ -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J* 1997b; 11: 841-851.

Mito N, Wimmers L E, Bennett A B. Sugar regulates mRNA abundance of +H-ATPase gene family members in tomato. *Plant Physiol* 1996; 112: 1229-1236.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- Moller S G, Chua N-H. Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J Mol Biol* 1999; 293: 219-234.
- Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem*. 1997; 66: 807-822.
- Moore B D, Shenn J. Plant sugar sensing and signaling -a complex reality. *Trends Plant Sci* 1999; 4: 250-251.
- Muranaka T, Banno H, Machida Y. Characterization of the tobacco protein kinase NPK5, a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible *SUC2* gene for a secreted invertase of *S. cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2958-2965.
- Neigeborn L, Carlson M. Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1984; 108: 845-858.
- Nemeth K, Salchert K, Putnoky P, Bhalerao R, Koncz-Kalman Z, Stankovic-Stangeland B, Laszlo-Bako L, Mathur J, Okresz L, Stabel S. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 1998; 12: 3059-3073.
- Netting A G, Milborrow B V. Endogenous biosynthetic precursors of (+)-[<sup>3</sup>H]abscisic aldehyde, <sup>18</sup>O<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub><sup>18</sup>O. *Aust J Plant Physiol* 1994; 21: 345-357.
- Nihashi J-I, Fujita Y. Catabolite repression of inositol dehydrogenase and gluconate kinase in *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* 1984; 798: 88-95.
- Ohto M, Hayashi K, Isobe M, Nakamura K. Involvement of Ca<sup>2+</sup> signalling in the sugar-inducible expression of genes coding for sporamin and β-amylase of sweet potato. *Plant J* 1995; 7: 297-307.
- Oliver D J, McIntosh C A. The biochemistry of the mitochondrial matrix. En: The molecular biology of plant mitochondria. 1995. Levings C S, Vasil I K, (Eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp 237-280.
- Ostling J, Carlberg M, Ronne H. Functional domains in the Mig1 repressor. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 753-761.
- Ozcan A, Johnston M. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1564-1572.

Ozcan S, Dover J, Johnston M. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1998; 17: 2566-2573.

Ozcan S, Dover J, Rosenwald A G, Johnston M. Two glucose transporters in *Sacharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12428-12432.

Ozcan S, Leong T, Johnston M. Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6419-6426.

Pego J V, Weisbeek P J, Smeekens S C M. Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiol* 1999; 119: 1017-1023.

Pelleschi S, Rocher J-P, Prioul J-L. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize. *Plant Cell* 1997; 20: 493-503.

Perata P, Matsukura C, Vernieri P, Yamaguchi J. Sugar repression of a giberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. *Plant Cell* 1997; 9: 2197-2208.

Peterson C L, Herskowitz I. Characterization of the yeast *SWI*, *SWII*, and *SWI3* genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 1992; 68: 573-583.

Peterson C L, Tamkun J W. The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem* 1995; 20: 143-146.

Plaut Z, Mayoral M L, Reinhold L. Effect of altered sink-source ratio on photosynthetic metabolism of source leaves. *Plant Physiol* 1987; 85: 786-791.

Quesada V, Ponce M, Micol J. Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 2000; 154: 421-436.

Ramamurthy B, Hook P, Larsson L. An overview of carbohydrate-protein interactions with specific reference to myosin and ageing. *Acta Physiol Scand* 1999; 167: 327-329.

Randez-Gil F, Sanz P, Entian K-D, Prieto J A. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2940-2948.

Recht J, Dunn B, Raff A, Osley M A. Functional analysis of histones H2A and H2B in transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2545-2553.

Redd M J, Arnaud M B, Johnson A D. A complex composed of Tup1 and Ssn6 represses transcription *in vitro*. *J Biol Chem* 1997; 272: 11193-11197.

Reizer J, Romano A H, Deutscher J; The role of phosphorylation of HPr, a phosphocARRIER protein of the phosphotransferase system, in the regulation of carbon metabolism in gram-positive bacteria. *J Cell Biochem* 1993; 51: 19-24.

Riesmeier J, Frommer W B, Willmitzer L. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J* 1994; 13: 1-7.

Rock C D, Heat T G, Gage D A, Zeevaert J A D. Abscisic alcohol is an intermediate in abscisic acid biosynthesis in a shunt pathway from abscisic aldehyde. *Plant Physiol* 1991; 97: 670-676.

Roitsch T, Bittner M, Godt D E. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analogue and tissue specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol* 1995; 108: 285-294.

Roitsch T. Source-sink regulation by sugars and stress. *Curr Opinion Plant Biol* 1999; 2: 198-206.

Ronne H. Glucose repression in fungi. *Trends Genet* 1995; 11: 12-17.

Rudenko G N, Rommens C M T, Nijkamp H J J, Hille J. Support PCR: an efficient procedure to amplify sequences flanking a known DNA segment. *Plant Mol Biol* 1993; 21: 723-728.

Sadka A, DeWald D B, May G D, Park W D, Mullet J E. Phosphate modulates transcription of soybean VspB and other sugar-inducible genes. *Plant Cell* 1994; 6: 737-749.

Saier M H, Chauvaux S, Deutscher J, Reizer J, Jing-Jeng Y. Protein phosphorylation of carbon metabolism in gram-negative versus gram-positive bacteria. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 267-271.

Saier M H, Ramseier T M, Reizer J. Regulation of carbon utilization. En: *Escherichia coli and Salmonella*. Cellular and molecular biology. Vol 1. 1992. Neidhardt F C, Curtis III R, Ingraham J L, Lin E C C, Brooks Low K, Magasanik B, Reznikoff W S, Riley M, Schaechter M, Umberger H E, (Eds). ASM Press. Washington D C, USA. pp 1325-1343.

Saier, M H. A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic organisms. *New Biol* 1991; 3: 1137-1147.

Sakakibara H, Suzuki M, Takei K, Deji A, Taniguchi M, Sugiyama T. A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *Plant J* 1998; 14: 337-344.

Sauer N, Stadler R. A sink-specific H<sup>+</sup>/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant J* 1993; 4: 601-610.

Scolnik T A, Bartley G E. A table of some cloned plant genes involved in isoprenoid biosynthesis. *Plant Mol Biol Rep* 1996; 14: 305-319.

Schwartz S H, Léon-Kloosterziel K M, Koornneef M y Zeevaart J A D. Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1997; 114: 161-166.

Seo M, Akaba A, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T. Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing *superrot1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1998; 116: 687-693.

Serrano R. Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. En: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. 1991. Broach J R, Pringle J R, Jones E W (Eds). Cold Spring Harbor Lab Press. Cold Spring Harbor, New York. pp 523-585.

Shaw S P, Wingfield J, Dorsey M J, Ma J. Identifying a species-specific region of yeast TFIIB *in vivo*. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3651-3657.

Sheen J, Zhou L, Jang J-Ch. Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 1999; 2: 410-418.

Sheen J. Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 1989; 2: 1027-1038.

Smeekens S, Rook F. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol* 1997; 115: 7-13.

Smeekens S. Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr Opinion Plant Biol* 1998; 1: 230-234.

Söderman E M, Brocard I M, Lynch T J, Finkelstein R R. Regulation and function of the *Arabidopsis ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol* 2000; 124: 1752-1765.

Sonnewald U, Willmitzer L. Molecular approaches to sink-source interactions. *Plant Physiol* 1992; 99: 1267-1270.

Stoffel M, Blackburn K L, Powell K L, Seo T S, Takeda J, Vionnet N, Xiang K-S, Gidh-Jain M, Pilkis S J, Ober C, Bell G I. Identification of glucokinase mutations in subjects with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 1993; 42: 937-940.

Stulke J, Arnaud M, Rapaport G, Martin-Verstraete I. PRD: a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol Microbiol* 1998; 28: 865-874.

Sturgis J N, Rubery P H. The effect of indol 3-indolyl-acetic acid and fusicoccin on the kinetic parameters of sucrose uptake by disc from expanded primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Sci Lett* 1982; 24: 319-326.

Sugden Ch, Donaghy P G, Halford N G, Hardie D G. Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiol* 1999; 120: 257-274.

Suzuki-Fujimoto T, Fukuma M, Yano K-I, Sakurai H, Vonika A, Johnston S A, Fukasawa T. Analysis of the galactose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between Gal3p and Gal80p. *Mol Cell Bio*. 1996; 16: 2504-2508.

Takeda A, Mano S, Ohto M, Nakamura K. Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiol*. 1994; 106: 567-574.

Taylor I B, Linforth R S T, Al-Naieb R J, Bowman W R, Marphes B A. The xilly tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant Cell Environ* 1988; 11: 739-745.

Teusink B, Diderich J A, Westerhoff H V, van Dam K, Walsch M C. Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *J Bacteriol* 1998; 180: 556-562.

Thompson-Jaeger S, Francois S J, Gaughran J P, Tatchell K. Deletion of *SNF1* affects the nutrient response of yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. *Genetics* 1991; 129: 697-706.

Treitel M A, Carlson M. Repression by SSN1-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3132-3136.

Tu J, Carlson M. REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1995; 14: 5939-5946.

Vagnoli P, Bisson L F. The *SKS1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for long-term adaption of *snf3* null strains to low glucose. *Yeast* 1998; 14: 359-369.

Vagnoli P, Coons D M, Bisson L F. The C-terminal domain of Snf3 mediates glucose-responsive signal transduction in *Sacharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 160: 31-36.

Van Oosten J J, Besford R T. Acclimation of photosynthesis to elevated CO<sub>2</sub> through feedback regulation of gene expression: climate of opinion. *Photosynthesis Res* 1996; 48: 353-365.

Vartanian N, Marcotte L, Giraudat J. Drought rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1994; 104: 761-767.

von Schaewen A, Stitt M, Schmidt R, Sonnewald U, Willmitzer L. Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J* 1990; 9: 3033-3044.

Vreugdenhil T. Abscisic acid inhibits loading of sucrose. *Physiol Plant* 1983; 57: 463-467.

Weickert M J, Adhya S. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J Biol Chem* 1992; 267:15869-15874.

Weir G C, Sharma A, Zangen D H, Bonner-Weir S. Transcription factor abnormalities as a cause of beta cell dysfunction in diabetes: a hypothesis. *Acta Diabetol* 1997; 34: 177-184.

Wilson C J, Chao D M, Imbalzano A N, Schnitzler G R, Kingston R E, Young R A. RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 1996; 84: 235-244.

Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol* 1997; 36: 1095-1102.

Zhou L, Jang J C, Jones T L, Sheen J. Glucose and ethylene signal transduction cross-talk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10294-10299.