

00562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Análisis del patrón de expresión del promotor de *ABI4*
en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

TESIS QUE PRESENTA

FLAVIA SOLEDAD BOSSI SANDOZ

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. PATRICIA LEON MEJIA

CUERNAVACA, MORELOS

JULIO 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Los azúcares como señales regulatorias	5
¿Cómo se perciben los azúcares?	8
¿Cómo se estudian las vías de señalización por azúcares?	10
¿Quiénes participan en la percepción y transducción de señales de azúcar en plantas?	12
¿Por qué estudiar <i>ABI4</i> ?	19
Familia de factores transcripcionales AP2/ERF	21
Funciones de <i>ABI4</i>	26
Objetivos del trabajo	29
Materiales y métodos	30
Material vegetal y condiciones de crecimiento	30
Ensayos fluorimétricos	30
Ensayos histoquímicos	31
Análisis de expresión por northern blot	31
Construcción del árbol filogenético	32
Resultados	33
Búsqueda de homólogos de <i>ABI4</i> en el genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
Patrón de expresión del mensajero de <i>ABI4</i> en plantas transgénicas	36
Expresión génica de <i>ABI4</i> en respuesta a altas concentraciones de glucosa	38
Vía de señalización que regula a <i>ABI4</i>	44
Regulación del transcrito de <i>ABI4</i> en respuesta a estrés osmótico y fitohormonas	45
Discusión y conclusiones	48
<i>ABI4</i> parece ser un gen único en el genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i>	48

El promotor de <i>ABI4</i> se expresa en etapas tempranas del desarrollo	50
El promotor de <i>ABI4</i> es inducible por glucosa	51
La inducción de <i>ABI4</i> en respuesta a glucosa parece ser por vía dependiente de hexocinasa	54
El promotor de <i>ABI4</i> responde a estrés osmótico y fitohormonas	56
Bibliografía	60

RESUMEN

Los azúcares actúan como importantes señales regulatorias capaces de modular múltiples procesos metabólicos. Se postulan 4 vías de señalización por azúcares en plantas, aparentemente muy complejas y a pesar del papel central que los azúcares tienen en el desarrollo de plantas superiores, se conoce poco acerca de los componentes y mecanismos implicados en esta vía de señalización en plantas. Una estrategia para identificar componentes de las vías de señalización es el aislamiento de mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensibles a azúcar. La caracterización de la mutantes *gin6* permitió establecer que *GIN6* es necesario para responder adecuadamente a altas concentraciones de glucosa durante el desarrollo temprano. Además, el mensajero de *GIN6/ABI4* se acumula en plantas silvestres en respuesta a altas concentraciones de glucosa. El gen *GIN6* corresponde a un alelo de *ABI4*. *ABI4* codifica para un factor de transcripción de tipo *apetala2* implicado en las respuestas a ABA durante la germinación. Con el objetivo de caracterizar más detalladamente el gen *ABI4* y su participación en la vía de señalización por glucosa se analizaron plantas transgénicas *ABI4:GUS* mediante ensayos histoquímicos y fluorimétricos en distintas etapas del desarrollo y en presencia de diferentes condiciones. Los resultados obtenidos indican que el promotor de *ABI4* se expresa en etapas tempranas de desarrollo de la plántula, observándose expresión en semillas y en todos los órganos de plántulas de 3 días, mientras que ya no se observa en la raíz de plantas de 7 días. Por otro lado, la expresión del promotor de *ABI4* en respuesta a azúcares aumenta aproximadamente 20 veces en plantas de 10 días crecidas en altas concentraciones de glucosa. Además, el análisis por northern blot de los niveles de expresión de los genes *GUS* y *ABI4* en respuesta a glucosa permitió demostrar que *ABI4* es capaz de ser inducido por glucosa en una ventana del desarrollo temprano. Por otro lado, los niveles de expresión del promotor de *ABI4* también se ven aumentados en presencia de estrés osmótico, etileno y auxinas. Por lo tanto, *ABI4* parece ser un elemento importante en las respuestas relacionadas a la señalización por azúcares durante el desarrollo temprano de la plántula. Este factor transcripcional parece estar bajo una regulación muy estricta y compleja durante diferentes etapas del desarrollo y en respuesta a múltiples estreses.

ABSTRACT

Sugars have been recognized as important signals that modulate a variety of metabolic and developmental processes in plants. The evidence so far available points out that sugar-mediated regulation in plants occurs through several signaling pathways. To define the components of the sugar signalling pathways, a number of Arabidopsis glucose insensitive (*gin*) mutants have been isolated. These mutants were selected by their ability to develop in high glucose concentrations. The characterization of mutant *gin6* revealed that *GIN6* is required for proper glucose response during early seedling development. We found that the levels of *GIN6/ABI4* transcript are accumulated in wild types plants in response to high glucose concentrations. This gene corresponds to an allele of the previously identified *ABI4* transcription factor, involved in ABA responses. *ABI4* belongs to a family of transcription factors containing the AP2 DNA-binding domain. To understand the role of *ABI4* in the glucose-mediated signaling process, we performed the analyses of transgenic plants carrying the *ABI4* promoter fused to the reporter GUS gene. In the present work, we report the GUS expression pattern in different organs and in different developmental stages. Fluorimetric assays were performed in plants during different stages of development and it was observed that the GUS activity is high in seeds and during early stages of the development of the seedling (2-5 days). Histochemical assays show that enzymatic activity is observed in all organs of 3 days-old plants, and it is undetectable in the roots of 7 days-old plants. In order to analyze *ABI4* promoter response to glucose, we performed similar assays where it was observed that transgenic plants grown in high glucose concentration increase GUS activity 20 fold. The histochemical staining shows that the enzymatic activity is localized in the shoot, in the root apical meristem and in cotyledons. Besides, northern blot analysis shows that the expression levels of the *GUS* and *ABI4* genes are induced shortly after high glucose exposure only in young seedlings. Finally, fluorimetric assays and histochemical staining shows that *ABI4* promoter respond to osmotic stress, auxin and ethylene. In conclusion, *ABI4* seems to be an important element in sugar signaling responses during early seedling development. This transcription factor seems to be under a strict and complex regulation during different stresses and developmental stages.

INTRODUCCIÓN

Los Azúcares Como Señales Regulatorias

Tanto en los organismos procariotes como en los eucariotes los azúcares desempeñan funciones como fuentes de energía para el metabolismo celular, como componentes estructurales y como señales moleculares regulatorias. Particularmente en las plantas, los azúcares tienen un papel fundamental como reguladores de varios procesos fisiológicos, como las respuestas a estrés biótico y abiótico; el crecimiento y el desarrollo, desde la embriogénesis, germinación y morfogénesis, hasta la floración y senescencia (1-6).

La regulación por azúcares en plantas parece ser clave para su adaptación y sobrevivencia. Los azúcares, el producto final de la fotosíntesis, se utilizan como fuente de esqueletos carbonados para una serie de procesos bioquímicos tanto anabólicos (síntesis de aminoácidos, nucleótidos, etc.) como catabólicos (glucólisis, etc). Es por ello que la percepción de los niveles de carbohidratos en todo el organismo es fundamental para mantener un balance adecuado entre los tejidos productores (source) y consumidores (sink), que permita racionalizar la utilización y producción de carbohidratos según los requerimientos inmediatos de los distintos tejidos y órganos de una planta (7). Esto sólo es posible a través de vías de transducción de señales que impliquen la percepción de los niveles de carbohidratos y la generación de una respuesta mediada por cambios rápidos del metabolismo y/o la activación/represión de genes (4, 8).

En los últimos años la lista de genes regulados por azúcares ha aumentado de manera notable (8-32). En la Tabla 1 se mencionan algunos de los genes inducidos o reprimidos por azúcares, así como el proceso fisiológico en el que participan. Es importante mencionar que la regulación génica mediada por azúcares no sólo ocurre a nivel transcripcional, sino también a nivel post-transcripcional, ya sea modulando la estabilidad del mensajero (18, 21, 22, 27) o la traducción del transcrito (24). A este respecto se ha reportado que la vida media de tres genes de α -amilasa (α AMY3, α AMY7 y α AMY8), se prolonga en presencia

de sacarosa (18). Para el caso de α AMY3 se ha establecido que la región no traducida 3' (UTR) tiene un papel esencial para dirigir este mensajero a degradación (21, 22). El análisis con inhibidores de la traducción demuestran que ciertas proteínas lábiles estarían involucradas en desestabilizar el transcrito de α AMY3, mientras que otras proteínas parecen estabilizar los mensajeros de α AMY7 y α AMY8, lo que sugiere que la estabilidad de estos mensajeros está regulada por mecanismos diferentes (18).

Asimismo, la expresión del gen *ATB2*, que codifica para un factor transcripcional bZIP, se modula por el desarrollo, la luz y la sacarosa. Los ensayos de protección de RNAsa en presencia de sacarosa indican que el azúcar tiene un efecto a nivel postranscripcional mediado por la región líder 5' no traducida (24).

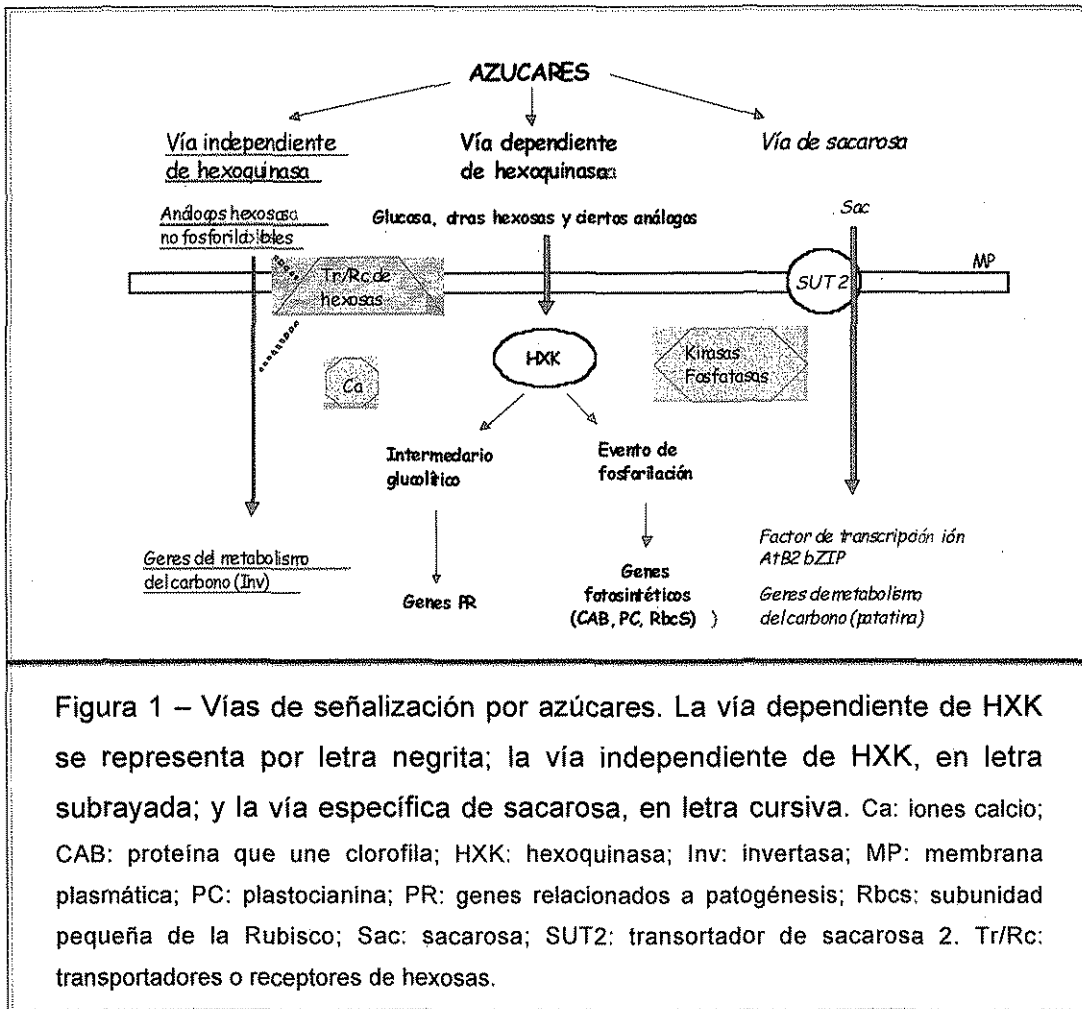
Tabla 1 – Genes regulados por azúcares reportados en la literatura

<i>Gen</i>	<i>Modo de regulación</i>	<i>Proceso</i>	<i>Referencia</i>
β -amilasa	Inducción		15
α -amilasa (<i>Ramy 1a</i>)	Represión		23
Patatina	Inducción	Metabolismo de carbohidratos	9, 110
Invertasa de pared celular (<i>CIN</i>)	Inducción		89
Sacarosa sintasa (<i>SUSY</i>)	Inducción		111
Proteínas que unen clorofilas (<i>CAB</i>)	Represión		1, 33, 112
Rubisco (<i>RBC 1, 3 y S</i>)	Represión	Fotosíntesis	1, 33
Plastocianina (<i>PC</i>)	Represión		16, 33
Genes de biosíntesis de etileno	Inducción		113
Genes de biosíntesis de brasinosteroides	Represión		114
Genes de biosíntesis de ABA (<i>ABA1, 2,3 y AAO3</i>)	Inducción	Síntesis de fitohormonas y señalización por ABA	96
Genes de señalización de ABA (<i>ERA1, ABI4 y 5</i>)	Inducción		33, 38, 87
Gen asociado a senescencia 21 (<i>SAG21</i>)	Inducción	Senescencia	33, 115
Fosfolipasa D (<i>PLD</i>)	Inducción		33
Fenilalanina amonioliasa 1 (<i>PAL1</i>)	Inducción		33, 53
Genes relacionados a patogénesis (<i>PR1 y 5</i>)	Inducción	Defensa	33
Chalcona sintasa (<i>CHS</i>)	Inducción		20, 33
Chalcona flavonona isomerasa (<i>CHI</i>)	Inducción	Síntesis de antocianinas	20
Dihidroflavonol 4-reductasa (<i>DFR</i>)	Inducción		20
Nitrato reductasa (<i>NR</i>)	Inducción		11, 12
Asparagina sintetasa (<i>AS1</i>)	Represión	Metabolismo nitrogenado	33
α -tubulina	Inducción		30
Factor transcripcional bZIP (<i>ATB2</i>)	Represión	Otros	24
Ciclinas D2 y 3 (<i>CycD2 y 3</i>)	Inducción		28, 31

¿ Cómo Se Perciben Los Azúcares ?

A pesar del papel central que los azúcares tienen en el desarrollo de las plantas superiores, se conoce poco acerca de los componentes y mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en esta vía de señalización y transducción (3, 4, 33-37).

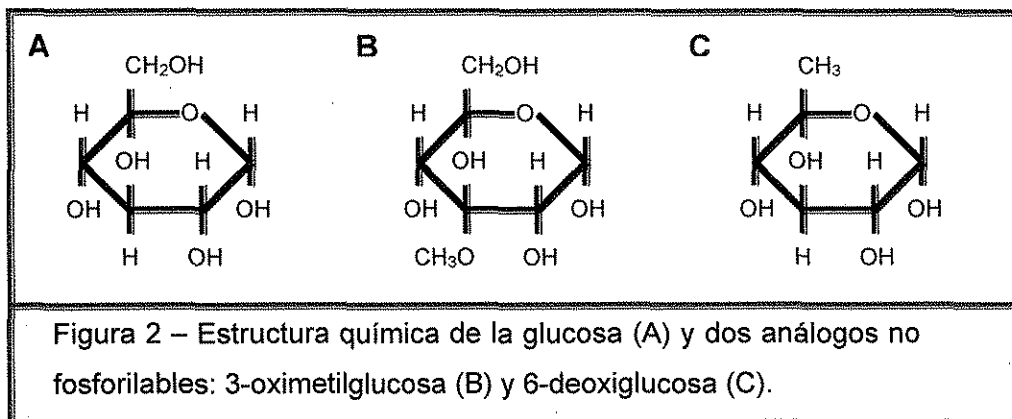
Actualmente se postulan 4 vías diferentes empleadas por las plantas para percibir los niveles de carbohidratos (Figura 1). Estas son: 1- la vía dependiente de hexocinasa (HXK), 2- la vía dependiente del catabolismo de la glucosa que también involucra a la HXK), 3- la vía independiente de HXK relacionada a sensores asociados al transporte de hexosas y 4- una vía específica de sacarosa.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

El mecanismo que cuenta con más evidencias experimentales es la vía dependiente de hexocinasa, donde esta enzima tiene una función dual ya que además de su acción enzimática en glucólisis, actúa como sensor (34). La hexocinasa también participa en la señalización por azúcares en levaduras y al parecer también en mamíferos, por lo tanto esta función parece estar conservada en diferentes organismos (81, 122). Recientemente, Xiao (33) propone que las respuestas de ciertos genes involucrados en la respuesta a patógenos (como *PR1* y *PR5*) dependen del catabolismo de la glucosa y/o intermediarios de glucólisis, lo que sugiere la existencia de una vía dependiente de la actividad catalítica de la hexocinasa. Los estudios con análogos de glucosa no fosforilables como la 3-oximetilglucosa y la 6-deoxiglucosa (Figura 2), sugieren la existencia de vías de señalización por hexosas independientes de hexocinasa donde podrían participar transportadores de hexosas con función sensora (89). La vía de señalización específica de sacarosa se apoya en que existen genes regulados exclusivamente por sacarosa (7, 24).

Por otro lado, el empleo de inhibidores del transporte de calcio y de proteínas tipo cinasas y fosfatasa indica que el calcio, calmodulinas y proteínas con actividad de cinasa y fosfatasa podrían ser elementos aún no caracterizados de las vías de señalización por azúcares (28, 51-54). En las siguientes secciones se describen con más detalle los elementos relacionados a las vías de transducción de señales disparadas por azúcares.



En los últimos años la visión del funcionamiento de las vías de señalización

ha cambiado de "líneas" a "redes" (80). Por lo tanto, es de esperar que las vías de señalización por carbohidratos interaccionen con programas endógenos de desarrollo, así como con vías involucradas en percibir estímulos externos, dando como resultado una respuesta fisiológica integrada. Esto se ha verificado demostrando que las vías de señalización por azúcares se "sobrelapan" o interaccionan con las vías de transducción activadas por señales ambientales (luz, nitrógeno, estrés salino y osmótico) y endógenas asociadas al desarrollo en las que participan diferentes fitohormonas (38-41, 75-79). Las interacciones entre los azúcares y las hormonas vegetales se ha demostrado para el ácido abscísico (ABA) (38) y el etileno (39), y se ha sugerido para las auxinas (40) y las citocininas (41).

¿ Cómo Se Estudian Las Vías De Señalización Por Azúcares ?

Las vías de señalización por azúcares están bien caracterizadas en otros sistemas como, por ejemplo, en levaduras. Por lo cual una de las estrategias para identificar elementos que participan en las vías de señalización por azúcares consiste en buscar los homólogos en plantas de proteínas que participan en alguna de estas vías en levaduras. Así se ha identificado la participación de elementos transportadores de hexosas y de proteínas relacionadas a SNF1, en plantas.

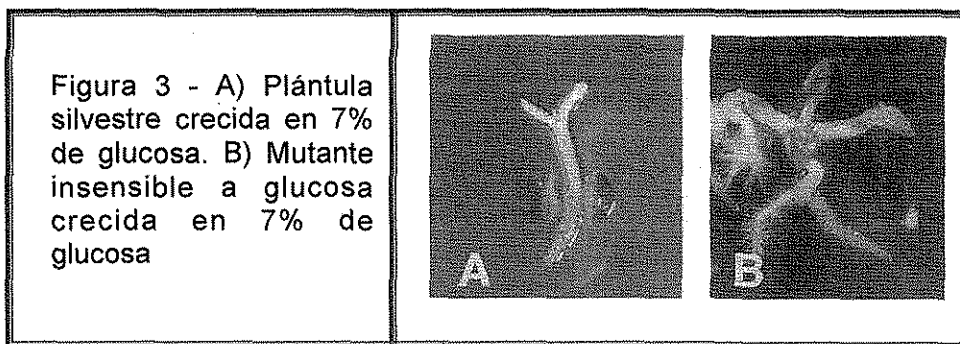
Por otro lado, la función *in vivo* de una proteína puede deducirse viendo el efecto que su remoción provoca en una célula u organismo multicelular. En la práctica, ésto se realiza de manera indirecta a través del aislamiento y caracterización de mutantes. Los individuos mutantes se identifican de acuerdo a un criterio pre-establecido en función de las diferencias en la apariencia, la fisiología, el comportamiento y/o las características del desarrollo y el crecimiento, bajo una condición determinada.

En base a lo anterior, una de las estrategias empleadas para identificar elementos de las vías de señalización por azúcares ha sido el aislamiento de mutantes de *Arabidopsis thaliana* hipersensibles o insensibles a diferentes

azúcares.

En general, se han utilizado dos tipos de escrutinio para identificar las mutantes. En uno de ellos se utilizan plantas transgénicas que expresan un gen reportero regulado por un promotor que responde a azúcar, seleccionándose líneas que ya no modulan correctamente la expresión del gen reportero en respuesta a azúcares.

La segunda estrategia más empleada se basa en observaciones fenotípicas que constituyen una manera muy práctica de seleccionar líneas mutantes. Algunas colecciones de mutantes se obtuvieron eligiendo líneas que no mostraban retraso en la germinación en presencia de altas concentraciones de azúcar (46). Otras colecciones se generaron a partir de mutantes capaces de desarrollarse a altas concentraciones de glucosa o sacarosa, a las cuales las plántulas silvestres se detienen en etapas tempranas de su desarrollo (38, 39) (Figura 3).



Cada una de las estrategias presenta limitantes, sin embargo, ambas dieron origen a diferentes colecciones de mutantes que actualmente se están caracterizando en diferentes grupos de investigación (Tabla 2), y que están contribuyendo al estudio inicial de los componentes de las vías de señalización por azúcares y sus interacciones.

La caracterización detallada de tales mutantes, mediante análisis de complementación y estudios de su fisiología con técnicas de biología molecular y celular, ha servido para identificar algunos componentes claves de esta vía de regulación e iniciar el estudio y planteamiento de posibles modelos de acción que permitan obtener una visión integral de los mecanismos utilizados por las plantas

para percibir y responder a azúcares.

Tabla 2 – Mutantes insensibles a azúcares

Mutante	Nombre	Escrutinio	Referencia
<i>gin</i>	glc insensitive	Crecimiento en 330mM glucosa	38, 39
<i>mig</i>	man-insensitive germination	Crecimiento en 7.5mM manosa	123
<i>sis</i>	sugar-insensitive	Crecimiento en 300mM glucosa-sacarosa	46
<i>sun</i>	suc-uncoupled	PC-LUC, 88mM sacarosa	116
<i>rsr</i>	reduced sugar response	Pat(B33)-GUS, 90mM sacarosa	110
<i>lba</i>	low level β -amylase	Actividad amilasa, 175mM sacarosa	20
<i>hba</i>	high level β -amylase	Actividad amilasa, 175mM sacarosa	49

glc: glucosa; man: manosa; suc: sacarosa; PC-LUC: fusión transcripcional promotor de plastocianina-luciferasa; pat(B33)-GUS: fusión transcripcional promotor de patatina- β -glucuronidasa.

¿ Quiénes Participan En La Percepción Y Transducción De Señales De Azúcar En Plantas ?

Aún se conocen muy pocos elementos relacionados a las vías de transducción de señales por azúcares en las plantas superiores. A continuación se discute brevemente la participación de una serie de moléculas que implicadas en los diferentes mecanismos de señalización.

1- Vía dependiente de hexocinasa

Hexocinasa –La hexocinasa participa en el primer paso de la glucólisis y, ahora se conoce que juega un papel crítico en la señalización por glucosa (33, 34). En *Arabidopsis* se conocen dos genes de hexocinasa (*AtHXK1* y *AtHXK2*) que son altamente similares entre sí (82%) y presentan similitud de secuencia a glucocinasas de mamíferos y a hexocinasas de levadura. Se sabe que la participación de la HXK ocurre a dos niveles. Por un lado, puesto que análogos de

glucosa fosforilables, pero no metabolizables a través de la glucólisis (como 2-deoxiglucosa y manosa), son capaces de disparar una respuesta, se sugiere que la HXK mide el flujo de carbono a través de contabilizar los eventos de fosforilación de hexosas.

Por otro lado, los estudios en las plantas transgénicas que sobreexpresan la HXK2 de levadura han establecido una vía paralela en la cual la HXK es necesaria para generar los intermediarios de glucólisis que actúan como señales *per se* (34). En levaduras también se conocen dos hexocinasas que tienen funciones diferentes, ya que mientras que la HXK1 presenta actividad sensora, la HXK2 realiza el primer paso en glucólisis. Mediante su sobreexpresión en plantas se demostró que la expresión de dos genes de patogénesis (*PR1* y *PR5*) depende solamente de la actividad catalítica de la HXK. Además de participar en la regulación de la expresión de los genes de patogénesis, se sabe que la HXK es el sensor de azúcares responsable de reprimir la expresión de genes fotosintéticos (*CAB*, *PC* y *RBCS*) (1, 16, 33, 112) y genes del ciclo del glioxicolato como malato sintasa e isocitrato liasa (17, 19).

Proteínas que participan en la ruta de biosíntesis de ABA – Las vías de señalización por azúcares interaccionan con otras vías, entre las que destacan las vías de síntesis y percepción de ABA (38). El ABA es una hormona vegetal que además de participar durante la dormancia y germinación y en las respuestas a estrés en plantas adultas, recientemente se ha demostrado que tiene un papel importante en la señalización por azúcares (38). De hecho, se ha observado que mutantes aisladas como insensibles a azúcar, también son insensibles a ABA durante la germinación, o deficientes en la biosíntesis de ABA y viceversa, por lo tanto, en estas mutantes el elemento afectado es necesario para el funcionamiento normal tanto de la vía de señalización de azúcares, como de la vía de biosíntesis o señalización de ABA (38, 45, 46, 96) .

En particular, estudios en el laboratorio con la mutante insensible a glucosa *gin5*, han permitido establecer que los niveles de ABA aumentan durante la señalización por glucosa. *Gin5* presenta un fenotipo de insensibilidad a glucosa que puede “fenocopiarse” con la adición de ABA (38). Genéticamente se ha establecido que

GIN5 es un alelo de *ABA3* (mutante deficiente en la síntesis de ABA) que codifica para una sulfurasa del cofactor de molibdeno que es necesaria para la activación de la aldehído oxidasa involucrada en el último paso de la biosíntesis de ABA (43) (Figura 4). El reporte de *gin5* fue el primero de una serie de reportes confirmando la interacción de ambas vías (45, 46, 96).

Otra mutante en la biosíntesis de ABA, *aba2/gin1* también es insensible a azúcares (39, 96). *ABA2* codifica para una dehidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR) que participa en el penúltimo paso de la biosíntesis de ABA y cataliza la formación de ABA-aldehído a partir de xantoxina (96) (Figura 4). Los análisis realizados en las mutantes deficientes en ABA permiten concluir que todas son insensibles a glucosa y por lo tanto, que se requiere de una biosíntesis adecuada de ABA para que la señalización por glucosa se lleve a cabo.

Proteínas que participan en la ruta de señalización de ABA – La proteína ABI4 es un factor de transcripción que consta de un dominio de unión a ADN del tipo APETALA2 (AP2) y un dominio rico en Ser/Thr posible blanco de protein-cinasas, por lo que se ha sugerido que ABI4 podría ser una proteína regulatoria que participa al final de la cascada de señalización dependiente de hexoquinasa (44). Además, existen evidencias de que ABI4 actúa como un punto de convergencia entre las respuestas a glucosa, ABA y a los estreses salino y osmótico (38, 45-47). Por otro lado, ya que la mutante *abi5* es insensible a azúcares, la proteína ABI5 también parece estar implicada en la vía de señalización por azúcares. ABI5 es un factor transcripcional que pertenece a la familia de los factores de transcripción tipo cremallera de leucina (bZIP) cuyo gen se induce en respuesta a ABA y a glucosa (98, 87). Otros factores de la familia bZIP, como ABF3 y ABF4, también podrían tener un papel en la señalización por azúcares, ya que plantas que sobreexpresan dichos factores transcripcionales son hipersensibles a azúcares (97).

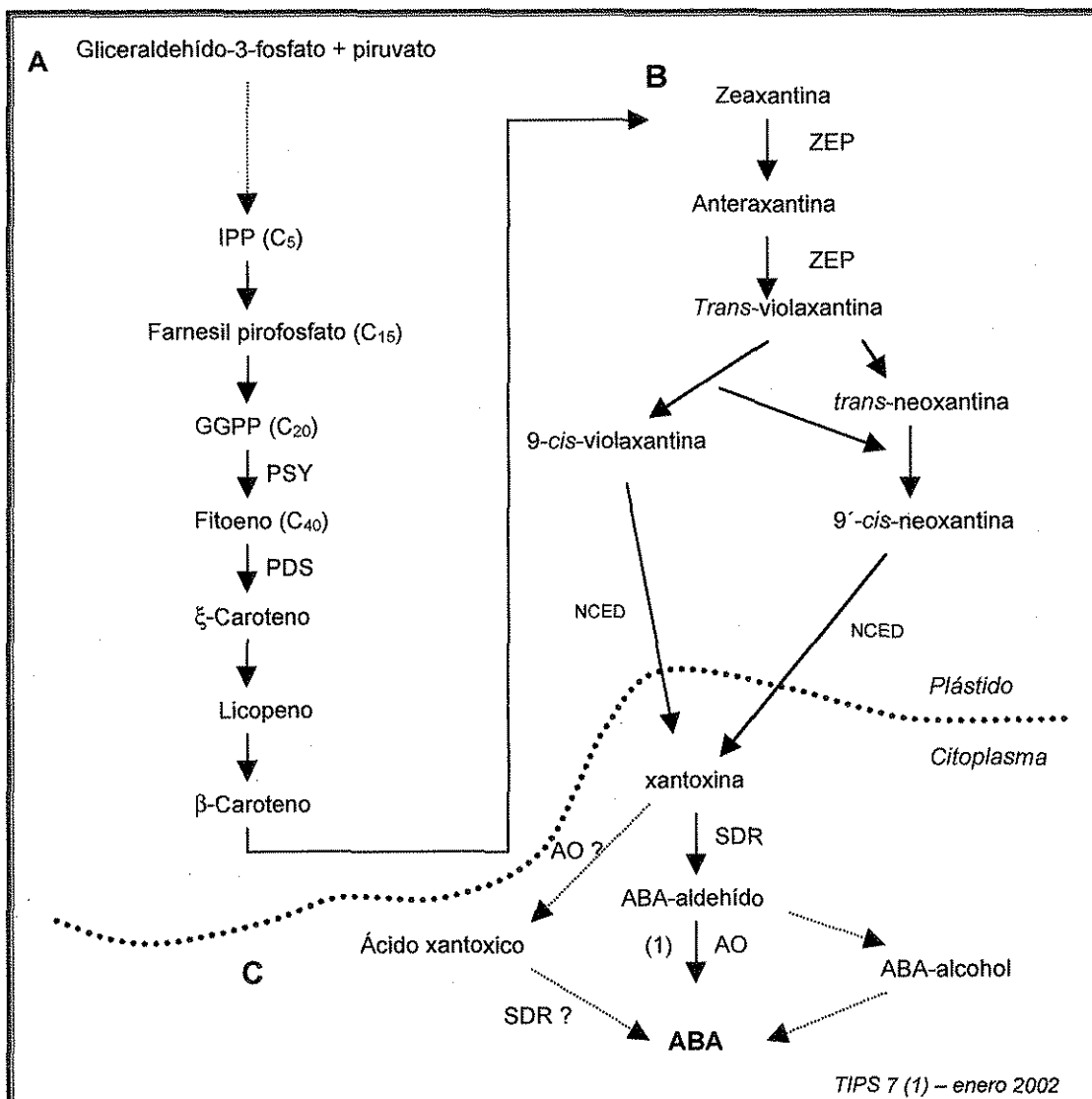


Figura 4 – Biosíntesis de ABA en plantas. A) Síntesis del precursor carotenoides. El ABA se sintetiza a partir de carotenoides de 40 carbonos. Los carotenoides se sintetizan en los plástidos a partir del isopentenil pirofosfato (IPP) mediante la vía no mevalónica. B) Formación de epoxicarotenoides y su ruptura en plástidos. El primer paso específico de la síntesis de ABA es la epoxidación de zeaxantina catalizada por ZEP. C) Reacciones citosólicas de la formación de ABA. Se proponen 3 vías. La (1) es la que probablemente funciona en plantas.

Abreviaciones: ABA: ácido abscísico; AO: aldehído oxidasas; DXP: 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato; DXS: DXP cintasa; GGPP: geranilgeranil pirofosfato; IPP: isopentenil pirofosfato; NCED: 9-*cis*-epoxicarotenoides dioxigenasa; PDS: fitoeno desaturasa; PSY: fitoeno cintasa; SDR: dehidrogenasa/reductasa de cadena corta; ZEP: zeaxantina epoxidasa.

2- Vía independiente de hexoquinasa

Sensores de hexosas – En levaduras las proteínas SNF3 y RGT2 constituyen transportadores de hexosas con baja eficiencia en el transporte de glucosa, pero con función de receptor de glucosa asociado a membrana. SNF3 parece ser un receptor de glucosa de alta afinidad mientras que RGT2, uno de baja afinidad. Las regiones carboxi-terminal de estas proteínas son inusualmente largas (de más de 200 aminoácidos), citoplasmáticas y necesarias para transmitir la señal de glucosa. Se especula que una secuencia de 26 aminoácidos, común a las regiones carboxi-terminales de ambos receptores, es crítica para transducir la señal de glucosa al interior celular (81). A la fecha no se conoce el mecanismo de transducción, aunque se ha postulado que probablemente la unión de la glucosa al receptor genera un cambio conformacional que se transmite al interior celular a través de la interacción de la región carboxi-terminal con proteínas citoplasmáticas (81-82). SNR3 y RGT2 presentan similitud a transportadores de glucosa de plantas, sin embargo, hasta el momento no se han encontrado transportadores de hexosas con función sensora en plantas (83, 90), si bien es de esperarse que existan moléculas capaces de cumplir con esta función según lo indican los estudios con análogos de glucosa (89).

Proteínas tipo SNF1 – En levaduras el complejo heterotrimérico SNF1 está constituido por SNF1, SNF4 y miembros de la familia de proteínas que interaccionan con SNF1 llamadas SIP. Este complejo tiene un papel central en la desrepresión de genes reprimidos por azúcares. La proteína SNF1 es una cinasa de serin-treonina que a su vez es fosforilada en una treonina por una cinasa-cinasa.

En plantas se han aislado homólogos de la proteína SNF1; SnRK1, 2 y 3 (SnRK: proteína-cinasa relacionada a SNF1), y homólogos de los otros componentes del complejo, como AtSNF4, AKIN β 1 y AKIN β 2 en *Arabidopsis thaliana*, PV42 en *Phaseolus vulgaris* y StubGAL83 en *Solanum tuberosum* (4, 48, 99). Los estudios en plantas transgénicas de papa que sobreexpresan una secuencia antisentido de SnRK1 han demostrado que esta enzima es necesaria para la inducción del gen de la sacarosa sintasa en presencia de sacarosa (124). Además, SnRK1 es capaz

de fosforilar e inactivar *in vitro* a las enzimas HMG-Co A reductasa, nitrato reductasa y sacarosa fosfato sintasa (48). Por lo tanto, el complejo SNF1 de plantas parece tener un papel importante en el control del metabolismo de carbono a través de la regulación de la expresión génica y de la actividad enzimática de proteínas clave. Recientemente se ha demostrado que SnRK es capaz de interaccionar con la subunidad $\alpha 4$ /PAD1 presente en la subunidad 20S del proteosoma 26S y con la subunidad SKP1/ASK1 (SCF) de la ligasa de ubiquitina E3 (100). Esta interacción entre SKP1/ASK1 y SnRK está regulada por glucosa *in vitro*, lo cual concuerda con lo encontrado para otros componentes de SCF de levadura (101). Por otro lado, utilizando una estrategia novedosa basada en la identificación de clonas capaces de activar la represión catabólica en ausencia de glucosa en levaduras, recientemente se ha identificado una proteína con caja F de *Arabidopsis thaliana* (102). Por consiguiente, otra manera de señalar la respuesta a azúcares podría ser mediante la degradación de proteínas específicas.

PRL1 - Es una proteína nuclear con motivos WD-40 que une α -importina y parece actuar como un regulador negativo de las SnRKs de *Arabidopsis*, ya que en un sistema de dos híbridos la unión de PRL1 a la región C-terminal de las SnRKs inhibe la actividad catalítica de esta última (50). La mutante *prl1* (*Pleiotropic Regulatory Locus 1*) que tiene afectada la regulación de genes que son reprimidos por sacarosa, presenta alteraciones en el desarrollo como raíces cortas, hojas más pequeñas, de margen aserrado y pecíolo corto, y es hipersensible a glucosa, sacarosa, frío, citocininas, auxinas, etileno y ABA (41, 50). Debido a la naturaleza pleiotrópica de la mutación, se piensa que PRL1 es un elemento regulador central dentro de varias vías de transducción que señalizan para múltiples procesos, entre ellas la señalización por azúcares.

3- Vía específica de sacarosa

Transportadores de sacarosa – El gen *SUT2* de tomate codifica para una proteína tipo transportador de sacarosa que no es capaz de complementar una mutante de levadura deficiente en la captación de sacarosa. Por lo tanto, se ha

sugerido que la proteína SUT2 de tomate podría ser un posible sensor de sacarosa. La región N-terminal y los dominios centrales de SUT2 son más grandes que los reportados para otros miembros de la familia de transportadores de sacarosa. Además, SUT2 comparte con SNF3 y RGT2 (sensores de hexosas en levaduras) la presencia de una gran región C-terminal citoplasmática. Por otro lado, SUT2 parece estar implicado en controlar de manera directa la actividad, expresión y recambio de otros transportadores de sacarosa (SUT1 y SUT4) con los cuales co-localiza en los elementos cribosos (42). Sin embargo, *AtSUC3*, el gen ortólogo de *SUT2* en *Arabidopsis*, presenta un comportamiento diferente. *AtSUC3* codifica para un transportador de sacarosa localizado en membrana plasmática, que cataliza la acumulación de sacarosa dependiente de energía en células de levadura transgénicas (84). Por lo tanto, se sugiere que *AtSUC3* es un transportador de sacarosa funcional, cuya particularidad es la presencia de un gran dominio citoplasmático que no está implicado directamente en transporte, por lo que no se excluye la posibilidad de que *AtSUC3* también pueda actuar como sensor de sacarosa (84).

4 - Elementos comunes a todas las vías

Cinasas y fosfatasa – Los inhibidores de las serin-treonin fosfatasa 1 y 2A tales como el ácido okadaico y calculina A son capaces de bloquear la inducción por azúcar del gen de la β -amilasa y de dos ciclinas (51, 28). Además, se ha caracterizado una protein-cinasa dependiente de calcio (CDPK) de 54kDa asociada a membrana plasmática, cuya autofosforilación se induce por sacarosa (52, 125). Estos resultados indican que algunas proteínas con actividad de cinasa y fosfatasa deben estar implicadas en la señalización por glucosa. Sin embargo, la interacción de estos probables componentes y su función específica durante la señalización por azúcares aún no se conoce. Curiosamente, en estudios en cultivo celular de *Chenopodium rubrum*, se ha demostrado que la regulación de dos genes modulados por azúcares como son el gen de la invertasa de pared celular (*CIN1*) y el gen que codifica para la fenilalanina-amonioliasa (*PAL*), se mimetiza con inhibidores de fosfatasa. Esto sugiere que la desfosforilación de proteínas es

también un elemento necesario para la inducción por azúcares de estos dos genes que responden a una vía independiente de hexoquinasa (53).

Calcio - El empleo de inhibidores del transporte de calcio y de calmodulina (EGTA, La^{3+}) permitieron establecer que el calcio está involucrado en la expresión inducible por azúcares de los genes que codifican para esporamina y β -amilasa (54). Además se ha visto que las concentraciones de calcio citoplasmático aumentan luego de tratamientos con azúcares (54). Por lo tanto, el calcio podría participar como segundo mensajero durante la señalización por azúcares, regulando respuestas generales o específicas.

¿ Por Qué Estudiar ABI4 ?

El laboratorio dispone de una colección de mutantes insensibles o incapaces de responder a glucosa (*gin*), de la cual se han aislado algunos elementos involucrados en la vía de señalización por azúcares (38, 39). Entre ellos, destaca la proteína GIN6/ABI4, cuya función representa un punto de convergencia entre las respuestas a glucosa y la hormona vegetal ácido abscísico (38). Particularmente, el estudio del gen *GIN6* en el laboratorio ha permitido establecer que este gen está regulado positivamente en respuesta a altas concentraciones de glucosa y que en plantas silvestres está involucrado tanto en el desarrollo y la morfogénesis de la plántula, como en modular la expresión de genes implicados en fotosíntesis (*CAB1* y *PC*). Los resultados del análisis de la secuencia del gen *GIN6*, su mapeo físico y estudios de complementación de mutantes, indicaron que este gen es un alelo del gen *ABI4*, aislado y caracterizado inicialmente a partir del escrutinio de mutantes insensibles a ABA durante la germinación (44).

Sin embargo, *GIN6* no es el único alelo conocido de *ABI4*, empleando diversos criterios de selección se han logrado identificar de manera independiente varios alelos (*GIN6*, *SUN6.1*, *SUN6.2*, *SIS5.1*, *SIS5.2*, *SIS5.3*, *SIS5.4* y *SAÑ5*), que al portar mutaciones en diferentes posiciones del gen sugieren sitios importantes para el control de su regulación y actividad (38, 44-47) (Tabla 3).

Los diferentes criterios de selección empleados en los escrutinios permitieron establecer que la mutación del gen *ABI4* da lugar a los siguientes fenotipos: insensibilidad a azúcares (sacarosa, glucosa y manosa); insensibilidad a ABA y paclobutrazol (inhibidor de la síntesis de giberelinas) y tolerancia a estrés salino (NaCl, KCl y NaSO₄) y osmótico (sorbitol y manitol) (38, 44-47). Por lo tanto, una mutación en esta proteína provoca un comportamiento bastante pleiotrópico. Además debido a que muchas de estas mutantes pueden continuar su desarrollo en condiciones en que plantas silvestres no pueden, se sugiere que *ABI4* podría formar parte de un "check point" durante el desarrollo temprano de las plántulas.

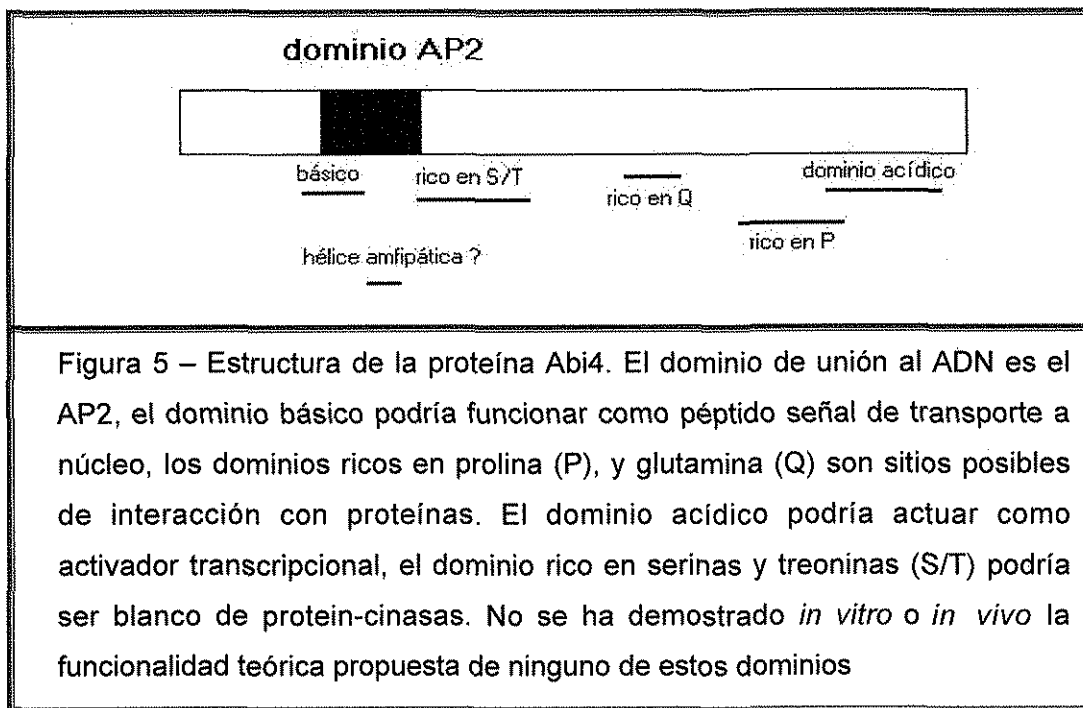
Tabla 3 – Alelos de *Abi4*

ALELO	MUTACIÓN	FENOTIPO	REFERENCIA
<i>gin6</i>	T-DNA (- 2kb)	Insensible a glucosa.	38
<i>sis5</i>	C → T (stop) (aa 193) C → T (stop) (aa 39) G → A (stop) (aa 80) G → A (Leu) (aa 69)	Insensible a sacarosa, glucosa, manitol, sorbitol y paclobutrazol.	46
<i>sun6</i>	G → A (stop) (aa 80) tDNA (-44 b)	Insensible a manosa, glucosa y sacarosa.	45
<i>sañ5</i>		Tolerante a NaCl, KCl, Na ₂ SO ₄ y manitol.	47

ABI4 parece ser un gen único en el genoma de *Arabidopsis*, y además hasta la fecha no se han reportado ortólogos en otros organismos vegetales. *ABI4* pertenece a la familia de factores transcripcionales AP2/ERF, exclusiva de plantas, donde se incluyen proteínas con funciones muy diversas (57). La familia génica agrupa miembros que participan en un mismo proceso. Por ejemplo, los EREBP1-4 de tabaco participan en las respuestas a etileno, mientras que los Pti4-6 de tomate y los ORCA1-3 de *Catharanthus roseus*, están relacionados a las

respuestas a patógenos (66, 63, 109). A la fecha no se ha reportado que otros miembros de la familia AP2/ERF participen en la señalización por azúcares.

El gen *ABI4* codifica para una proteína que consta de un dominio de unión al ADN tipo APETALA2 (AP2), un dominio rico en serinas y treoninas, probable blanco de proteín-cinasas y dominios ricos en prolina, glutamina y residuos ácidos, relacionados a la activación de la transcripción (44) (Figura 5).



Familia De Factores Transcripcionales AP2/ERF

La familia multigénica AP2/ERF agrupa factores transcripcionales con diversas funciones a lo largo de todo el ciclo de vida de una planta. La familia de proteínas AP2/ERF dependiendo del número de dominios de unión al ADN, se ha dividido en dos subclases (55-57). Las proteínas tipo AP2 que tienen 2 dominios AP2 en “tandem”, y las proteínas tipo ERF (factores de respuesta a etileno) solamente contienen uno (58-67, 91-94, 103-109). En la Tabla 4 se enumeran algunos de los factores AP2/ERF más conocidos.

Tabla 4 – Proteínas con dominio AP2/ERF

PROTEINA	Nºdominios	PLANTA	REFERENCIA
ABI4	1	<i>Arabidopsis</i>	44
AtEBP	1	<i>Arabidopsis</i>	60
RAP 2.1 - 2.6	1	<i>Arabidopsis</i>	56
RAP 2.8 -2.12	1	<i>Arabidopsis</i>	56
EREBP 1 – 4	1	Tabaco	59
DREB1A, 2A y 2B	1	<i>Arabidopsis</i>	68
ORCA1 – 2	1	<i>Catharanthus</i>	65
Pti 4 –6	1	Tomate	63
CRT/DRE binding factor 1 (CBF 1)	1	<i>Arabidopsis</i>	62
CRT/DRE binding factor 2 (CBF 2)	1	<i>Arabidopsis</i>	64
At ERF1 – 5	1	<i>Arabidopsis</i>	66
TINY	1	<i>Arabidopsis</i>	69
RAV1 y 2	1	<i>Arabidopsis</i>	74
APETALA2	2	<i>Arabidopsis</i>	58
AINTEGUMENTA	2	<i>Arabidopsis</i>	70
GLOSSY15	2	Maiz	71
IDS1	2	Maiz	72
RAP 2.7	2	<i>Arabidopsis</i>	56

El dominio AP2 consta de 68 aminoácidos (a.a.) con dos motivos de secuencia muy conservados: 1) el elemento YRG, que consiste de 18-22 a.a. y es altamente básico y 2) el elemento RAYD, conformado por 42-43 a.a. que a su vez, contiene una región altamente conservada de 18 a.a. que podría formar una hélice anfipática. Dentro del elemento YGR también se han identificado otras secuencias conservada típicas para cada una de las subfamilias: WEAR/WESH presente en las proteínas tipo AP2; y la caja WAAEIRD, encontrada en las proteínas tipo ERF (56).

Actualmente se conoce la especificidad de unión para diferentes factores transcripcionales con un solo dominio AP2, entre ellos se pueden distinguir 3

clases de proteínas. La primera incluye a las proteínas EREBPs de tabaco, AtERF y AtEBP de *Arabidopsis* y Pti4-6 de tomate (59, 60, 63, 66, 67, 91, 92), las cuales se unen a los elementos ERE o a las caja GCC sobre los promotores de genes regulados por etileno en respuesta a patógenos. La caja GCC consta de 12 p.b. (TAAGAGCCGCC), donde la secuencia GCCGCC es clave para la unión al ADN. Por otro lado, se ha determinado que AtERF1 se une al ADN mediante una estructura novedosa constituida por 3 hojas- β plegadas contra una α -hélice, y que los residuos responsables del reconocimiento se encuentran en la hoja- β plegada (73). Dentro de esta clase también podrían incluirse los ORCAs, ya que estos factores de transcripción interactúan con una secuencia de 42 p.b. que contiene una caja tipo GCC (66). Esta secuencia denominada JERE, por elemento de respuesta a elicitores y a jasmonato, está presente en el promotor del gen de la estrictosodina sintasa que es una enzima involucrada en la biosíntesis de los alcaloides vindolina y vinblastina (66, 103, 109).

La segunda clase de proteínas tipo ERF agrupa a aquellas que reconocen la secuencia consenso C/DRE (CCGAC), como son los factores transcripcionales CBF1-2, DRED1A y DREB2A de *Arabidopsis* implicados en las respuestas a bajas temperaturas y estrés por sequía (62, 64, 68, 94). Hao *et al.* (67) demostró que la segunda G, la quinta G y la séptima C de la caja GCC (AGCCGCC) son las que determinan las interacciones específicas con los ERF. Recientemente, Sakuma *et al.* (108) reporta que la cuarta C, la quinta G y la séptima C de la secuencia DRE (TACGCAT) son esenciales para la interacción de las proteínas DREB. Comparando las secuencias de la caja GCC y DRE, se ha especulado sobre la existencia de una secuencia consenso común: CCGNC donde las bases 3 y 5 están presentes en ambas cajas, mientras las bases 2 y 4 son exclusivas para GCC y DRE, respectivamente. Por consiguiente, se sugiere que las proteínas ERF y DREB pueden regular diferentes genes blanco debido a diferencias en las secuencias que rodean al consenso común.

La tercera y última clase comprende a las proteínas RAV1 y RAV2. Estas proteínas se diferencian de las anteriores porque contienen dos dominios diferentes de unión al ADN: un dominio AP2 y un dominio tipo B3. Para RAV1 se

ha determinado que el dominio AP2 reconoce la secuencia CAACA, y el dominio B3 reconoce la secuencia CACCTG sobre un promotor bipartito (74).

Si bien se conocen las secuencias consenso de unión al ADN para los factores transcripcionales con un dominio AP2, no se conocía ninguna secuencia de unión para factores con dos dominios AP2 hasta el reciente reporte de Nole-Wilson (104) que demuestra que en la proteína AINTEGUMENTA (ANT) que tiene dos dominios AP2, ambos son necesarios para unirse al ADN con alta afinidad, aunque cada uno por separado también puede unirse débilmente a la secuencia consenso. La secuencia consenso de unión determinada *in vitro* es [5'-gCAC(A/G)N(A/T) TcCC(a/g)ANG(c/t)-3']. La secuencia de aminoácidos de la región que une los dos dominios AP2 está altamente conservada entre los miembros de la subfamilia AP2 y parece ser importante para orientar los dos dominios de unión al ADN. De esta manera, el dominio AP2 ubicado hacia el extremo N-terminal de ANT podría unirse a la secuencia 5' del consenso y el dominio AP2 C-terminal, a la región 3' del consenso. Esta última corresponde a la secuencia CC(a/g)AN, la cual al ser similar a la secuencia DRE concuerda con el hecho de que ANT es capaz de unirse a las cajas C/DRE sobre el promotor del gen *COR15a*. Todos estos datos sugieren que la unión al ADN de los factores AP2/ERF es muy compleja y depende, tanto de la estructura que adopte la proteína en función de las interacciones que puedan existir entre diferentes factores transcripcionales, como de secuencias consenso y del contexto en el que estas se encuentren sobre el ADN.

Las proteínas con dominios AP2/ERF están involucradas en procesos fisiológicos como el desarrollo floral (AP2, ANT, IDS1) y vegetativo (Glossy 15, ESR1), la respuesta de defensa a patógenos (ORCA, Pti, AtEBP), las vías de señalización por etileno (ERF, AtERF), ABA y glucosa (ABI4) y las respuestas a factores ambientales como las bajas temperaturas y el déficit de agua (CBF, DREB). Últimamente ha tomado mayor importancia la participación de factores AP2/ERF en la regulación de las respuestas a estrés en plantas, e incluso se han postulado modelos de acción (106, 107, 109). En la Figura 6 se esquematiza la participación de algunos factores de este tipo en la respuesta a azúcares,

patógenos y estrés abiótico.

Aunque sólo se han caracterizado unas pocas proteínas con dominios AP2/ERF, se estima que aproximadamente 125 genes en el genoma de *Arabidopsis thaliana* codifican proteínas tipo AP2/ERF, lo que claramente demuestra su importancia en el control de la expresión de los genes vegetales (57).

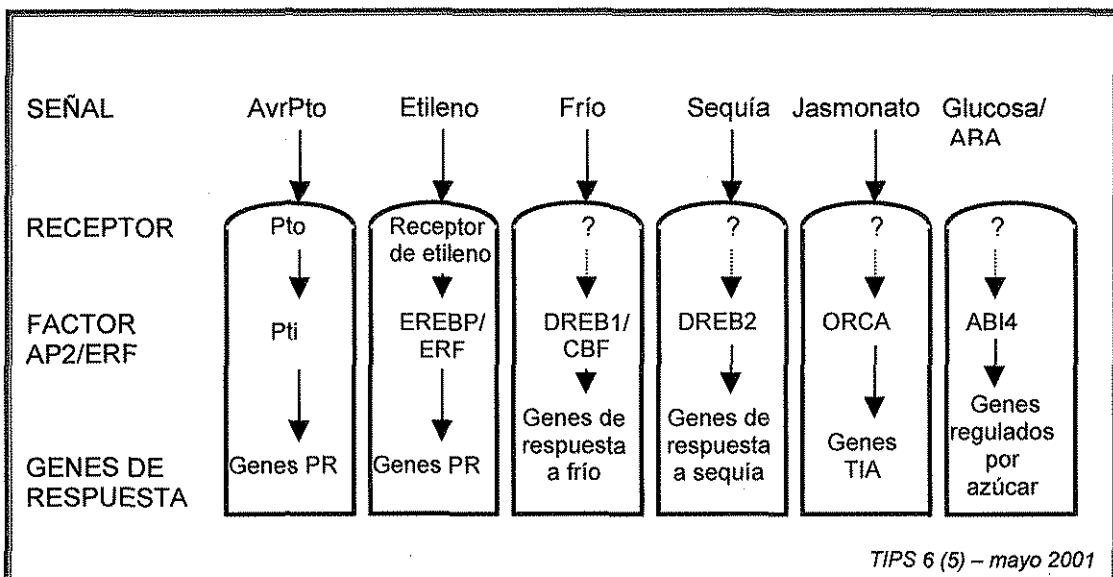


Figura 6 – Participación de factores de transcripción AP2/ERF en la regulación de la expresión de genes de defensa y estrés. La señal de estrés es percibida por un receptor cinasa que activa una cascada de transducción de señales que modula la expresión génica. Como parte de esta cascada, se sintetizan *de novo* o se modula la actividad de factores AP2/ERF preexistentes. AvrPto: producto del gen de avirulencia bacteriano reconocido por Pto; CBF: factor que une el repetido C; DRE: elemento de respuesta a deshidratación; DREB: proteína que une DRE; EREBP: proteína que une el elemento de respuesta a etileno; ERF: factor que une el elemento de respuesta a etileno; ORCA: proteína con dominio AP2 de *Catharanthus* que responde a octadecanoides; PR: relacionado a patogénesis; Pti: proteína que interactúa con Pto; Pto: proteína-cinasa de tomate que confiere resistencia a *Pseudomonas syringae* pv *tomato* que expresa AvrPto; TIA: terpenoides, indoles, alcaloides.

Funciones De ABI4

La expresión sostenida de ABI4 en una planta silvestre coincide con la detención del desarrollo, evitando la elongación del hipocotilo, la expansión y enverdecimiento de cotiledones, y la formación de hojas verdaderas. De acuerdo al fenotipo de insensibilidad al detención del desarrollo que muestra la mutante en presencia de glucosa, es posible suponer que ABI4 participa en la señalización por glucosa sólo en una pequeña ventana del desarrollo que inicia después de la germinación y culmina cuando la plántula, luego de monitorear el ambiente externo, inicia el crecimiento vegetativo con el consecuente establecimiento de su autotrofia (87). Esta función de "check-point" propuesta para ABI4 en respuesta a glucosa es similar a la propuesta para ABI5 en respuesta a ABA (98).

La formación de raíces laterales determina la arquitectura y el arreglo espacial del sistema radicular en plantas. A diferencia del desarrollo de la raíz primaria que está predeterminado desde la embriogénesis, la formación de raíces laterales está íntimamente ligada a la disponibilidad de nutrientes presentes en el suelo. De manera general, se acepta que los suelos pobres favorecen el desarrollo de las raíces laterales y que los suelos ricos lo inhiben. Uno de los nutrientes importantes a este respecto es el nitrato, que regula el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis* de dos maneras diferentes: concentraciones bajas de nitrato favorecen la elongación localizada de raíces pre-existentes y concentraciones altas la inhiben de manera sistémica (120). Considerando la importancia de la relación carbono/nitrógeno en este fenómeno (78, 79), Signora *et al.* (88) se avocó a analizar el desarrollo de raíces laterales en una mutante insensible a azúcar (*sun6/abi4*) postulando que la proteína ABI4 es importante en la regulación por nitrato del desarrollo de raíces laterales.

ABI4 es una proteína con función de factor transcripcional capaz de activar el promotor que responde a GAL4 en el sistema heterólogo de levadura (85). Sin embargo, no existen reportes sobre los genes blanco de la proteína ABI4. Aunque se conoce que los genes *CAB* y *PC* están desregulados en la mutante *abi4*, aún

no se ha demostrado de que manera este factor transcripcional participa en la modulación de tales genes fotosintéticos. Por consiguiente, a pesar de su “obvia función” el conocimiento sobre la actividad de factor transcripcional de ABI4 es muy escasa.

De hecho, sólo se han reportado los genes blanco para algunos miembros de la subfamilia ERF (Figura 6). Algunos de estos genes blanco codifican para proteínas con funciones enzimáticas, pero aún se desconoce la función de la gran mayoría de ellos. Recientemente se ha reportado que el factor ANT es capaz de regular AGAMOUS (AG) (104). Aparentemente ANT se une al segundo intrón de AG, de la misma manera que el factor APETALA2. AGAMOUS es un factor de transcripción perteneciente a la familia de los genes con caja MADS, implicado en desarrollo floral, y APETALA2 es un factor tipo AP2 también involucrado en desarrollo floral (58). Esto resulta interesante porque demuestra que las proteínas tipo AP2 parecen regular factores transcripcionales pertenecientes a otras familias. ABI4 también presenta posibles dominios de interacción con proteínas (Figura 5), sin embargo, hasta el momento no se han reportado proteínas que interactúen con ABI4.

El gen *ABI5* fue aislado a partir de la misma colección de mutantes insensibles a ABA durante la germinación que *ABI4* (117). Su caracterización posterior demostró que *ABI5* codifica para un factor de transcripción tipo bZIP, capaz de unirse *in vitro* a elementos de respuesta a ABA (cajas ABRE), lo cual concuerda con el hecho de que semillas de la mutante *abi5* presentan bajos niveles de dos genes de embriogénesis tardía (*AtEm1* y *AtEm6*) que contienen cajas ABRE en sus promotores (98, 118). Asimismo, López-Molina *et al.* (98) demostraron que tanto la acumulación del mensajero, como la acumulación y actividad de la proteína ABI5, están regulados por ABA durante una ventana de desarrollo. Todos estos datos indican que ABI5 es otro elemento importante en la vía de señalización por ABA. Recientemente, estudios realizados en un sistema de dos híbridos han permitido establecer que ABI5 es capaz de formar homodímeros y heterodímeros con el factor de transcripción tipo B3 denominado ABI3 (86). Ensayos transitorios *in vivo* realizados en protoplastos de arroz confirman la

interacción entre ABI3 y ABI5 para regular genes inducidos por ABA como *Em* (marcado de metionina temprano) de maíz, *AtEm6* de *Arabidopsis* y β -*phaseolina* de *Phaseolus* (119). En estos reportes también se analiza la posibilidad de que ABI4 interaccione con estos factores, pero aunque se pensaba que ABI4 podría interaccionar con ABI5, el análisis *in vitro* e *in vivo* de posibles interacciones físicas entre ellos indica lo contrario (86, 119). Es importante tener en cuenta que estas interacciones se estudiaron en respuesta a ABA, por lo que existe la posibilidad de que ABI4 interaccione con ABI3 y/o ABI5 en respuesta a otros estímulos (glucosa p.e.). Datos preliminares obtenidos en el laboratorio sugieren fuertemente que los genes *ABI4* y *ABI5* se autorregulan y que ambos modulan su expresión de manera similar en respuesta a azúcares (87).

A pesar de los esfuerzos invertidos a la fecha para conocer detalladamente las funciones de este factor transcripcional, todavía no se ha establecido claramente el papel de ABI4 en el desarrollo, ni en las vías de señalización en las que su participación se sugiere. Estudios como el presente aportan datos valiosos para comprender la función de este factor transcripcional, cuya regulación es muy compleja y cuya participación en la vía de señalización por glucosa en plántulas jóvenes parece ser clave.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es caracterizar la expresión del promotor del gen *ABI4* en respuesta a glucosa en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos Específicos

- Determinar el patrón de expresión del promotor del gen *ABI4* en distintos órganos y etapas del desarrollo.
- Estudiar el comportamiento del promotor y del gen *ABI4* en respuesta a altas concentraciones de glucosa.
- Estudiar las respuestas del promotor del gen *ABI4* al estrés osmótico y fitohormonas.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal Y Condiciones De Crecimiento

Los análisis se realizaron con plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0), mutantes homocigotas de la mutante *abi4* y 4 líneas transgénicas independientes portadoras del gen reportero GUS bajo la regulación de la región 5' reguladora de *ABI4* (3kb). Tanto la mutante *abi4* como las transgénicas están en ecotipo Columbia-0. Las semillas de *Col-0* y *abi4* se obtuvieron del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) y las líneas transgénicas que fueron provistas por la Dra. Ruth Finkelstein (Universidad de California, Santa Bárbara, USA) se llevaron a homocigocidad mediante su selección en kanamicina. Para los experimentos, las semillas desinfectadas se sembraron en condiciones de esterilidad en medio GM compuesto por la mezcla de sales Murashige y Skoog 1X suplementada con vitaminas B5, 0.05% de MES, 1% de sacarosa (u otra fuente de carbono) y 0.7% de fitoagar. Para romper dormancia y sincronizar la germinación las semillas se incubaron 3 días a 4°C antes de transferirse a 25°C con un fotoperíodo estandar de 16:8 horas luz/oscuridad donde se mantuvieron por el tiempo indicado en cada experimento.

Los análisis de inducción se realizaron empleando medios GM adicionados con 4% y 7.5% glucosa, 7.5% sorbitol, 1µg/ml ácido indol-acético, benzil-adenina y ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano.

Ensayos Fluorimétricos

Los ensayos cuantitativos de la actividad enzimática de GUS se realizaron según Jefferson, 1987 (95). Los extractos totales de proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (Biorad, CA, USA). La cuantificación de la actividad enzimática se realizó con un fluorómetro DyNAQuant 200 (Hoefer, CA, USA) empleando 4.5 µg de proteína total, incubaciones a 37°C, y colectando muestras a tiempo cero como control y a otros tiempos donde la actividad de GUS se

comportaba de manera lineal.

Ensayos Histoquímicos

Las tinciones histoquímicas se realizaron según Jefferson, 1987 (95). El material vegetal a analizar se cubrió con buffer de tinción conteniendo X-glu, (Sigma-Aldrich, MO, USA) como sustrato de la β -glucuronidasa, aplicando vacío durante 3 minutos para facilitar la penetración del sustrato. Las muestras se incubaron a 37°C durante toda la noche para permitir el desarrollo de la reacción. Concluida la reacción, las plántulas se lavaron repetidamente con una solución 3:1 de metanol:acetona para eliminar la clorofila. Finalmente, las muestras se conservaron a 4°C en glicerol 50%. Las observaciones microscópicas se realizaron con un estereoscopio SNZ-2T (NIKON, Tokio, Japón) y con un microscopio ECLIPSE E600 (NIKON, Tokio, Japón).

Análisis De expresión Por Northern Blott

El RNA total se aisló de plántulas jóvenes de dos días empleando un protocolo estandar (139) y se precipitación con CILi según Pawlowsky *et al.*, (140). 8 μ g de RNA total se resolvieron en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.2% que se transfirieron a membranas, por capilaridad, empleando una solución de SSC 10X como acarreador. El RNA se fijó a la membrana con luz ultravioleta y para verificar de la transferencia la membrana se tiñó con una solución de azul de metileno 0.03%. Las hibridaciones se realizaron a 65°C en buffer de hibridación Churchill modificado empleando sondas correspondientes a los genes *Abi4* (AF040959), *GUS* (AF485783) y *CAB* (J04098) marcadas radioactivamente utilizando el sistema Megaprime DNA Labelling Systems (Amersham LIFE SCIENCE, UK).

Construcción Del Árbol Filogenético

Los genes relacionados filogenéticamente a ABI4 se identificaron mediante un escrutinio electrónico tipo blast (NCI) empleando como sondas independientes la secuencia completa de nucleótidos del *cDNA* del gen de *ABI4*; con la secuencia de aminoácidos de la proteína ABI4 y con la secuencia que constituye el dominio apetala2 (AP2) de ABI4. El árbol filogenético de las secuencias del dominio AP2 se construyó empleando el programa de secuencias mínimas usando la versión 4d64 de PAUL (D.L. Swofford, Laboratory of Molecular Systematics, Smithsonian Institution, Washington, D.C.), gentileza de la Dra. Elena Alvarez Buylla (Instituto de Ecología, UNAM, México).

Búsqueda De Homólogos De *Abi4* En El Genoma De *Arabidopsis Thaliana*

Con el objetivo de conocer el número de genes con homología al gen *ABI4* presentes en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, se realizó un escrutinio electrónico tipo blast (NCI) empleando como sondas independientes el ADNc completo del gen *ABI4*, la secuencia de aminoácidos de la proteína *ABI4* y el dominio *apetala2* (*AP2*).

En total se obtuvieron 142 secuencias de varias especies vegetales incluyendo ADNc y proteínas, con las que se generó una base de datos que se utilizó para realizar un árbol filogenético. Debido a que las proteínas que pertenecen a la familia *AP2/ERF* solamente presentan similitud en el dominio de unión al ADN y los tres escrutinios arrojaron resultados similares, únicamente se emplearon las secuencias del dominio *AP2* para realizar un árbol filogenético preliminar (Figura 7).

Los resultados obtenidos por el método de distancias mínimas indican que está en un clado separado lo que sugiere que *ABI4* es un gen único que ha evolucionado separadamente de los otros miembros de la familia *AP2/ERF*. Los miembros de la familia que presentan una mayor similitud a *ABI4* a nivel de los dominios de unión al ADN son *DREB2A*, *DREB2B* y *ORCA1* (grupo 6, Figura 7-6). Curiosamente estos genes están involucrados en las respuestas a patógenos y a estrés (68, 109) y a la fecha se desconoce si son regulados por azúcares y/o participan en sus vías de señalización.

En términos generales, se observa que el árbol se podría dividir en 8 grupos discretos. El primero de ellos comprende 9 factores, entre ellos las proteínas *AtERF 3*, *AtERF 4* y *EREBP 3*, que si bien participan en la respuesta a etileno no se agrupan junto a los otros factores implicados en la señalización por etileno (59, 66, 67, 91, 92) (Figura 7-1). Uno de los grupos mas numerosos es el 2, que cuenta con 28 miembros. Los factores transcripcionales mejor caracterizados de este grupo son *AtERF 2*, 5 y 6; *EREBP 1*, 2 y 4; *Pti 4* y 5 y *ORCA 2*. Todos ellos están implicados a las respuestas de defensa a patógenos, vía etileno o jasmónico (59,

63, 65, 66, 67, 91, 92) (Figura 7-2). Aquí otra vez se observa que proteínas implicadas en los mismos procesos no tienen dominios de unión al ADN muy similares y por consecuencia se agrupan en clados diferentes. Las secuencias agrupadas dentro del grupo 3 corresponden a posibles proteínas, de igual manera que ocurre con el grupo 7 (Figuras 7-3 y 7-7). El factor de transcripción Pti 6, a diferencia de Pti 4 y 5, se encuentra en el grupo 4 formando un grupo pequeño junto a otros 7 miembros no caracterizados (Figura 7-4). El grupo 5 es el más grande y cuenta con 40 miembros. En este grupo se encuentran factores como TINY, DREB 1A, y CBF1 y 3. La función de TINY no está clara, aunque se especula que podría participar en la vía de señalización de etileno (69, 57), mientras las proteínas DREB y CBF están implicadas en las respuestas a deshidratación, frío y sequía (62, 64, 68, 94) (Figura 7-5). Finalmente en el grupo 8 se encuentran todos los factores AP2/ERF implicados en desarrollo: APETALA2 y AINTEGUMENTA de *Arabidopsis*, y GLOSSY15 e IDST de maíz (58, 70, 71, 72). Es importante mencionar que estos factores presentan 2 dominios de unión al ADN, los cuales parecen haber divergido tempranamente ya que los dominios AP2 N-terminal de cada uno de ellos presentan mayor similitud entre sí, que con sus respectivos dominios C-terminal (Figura 7-8).

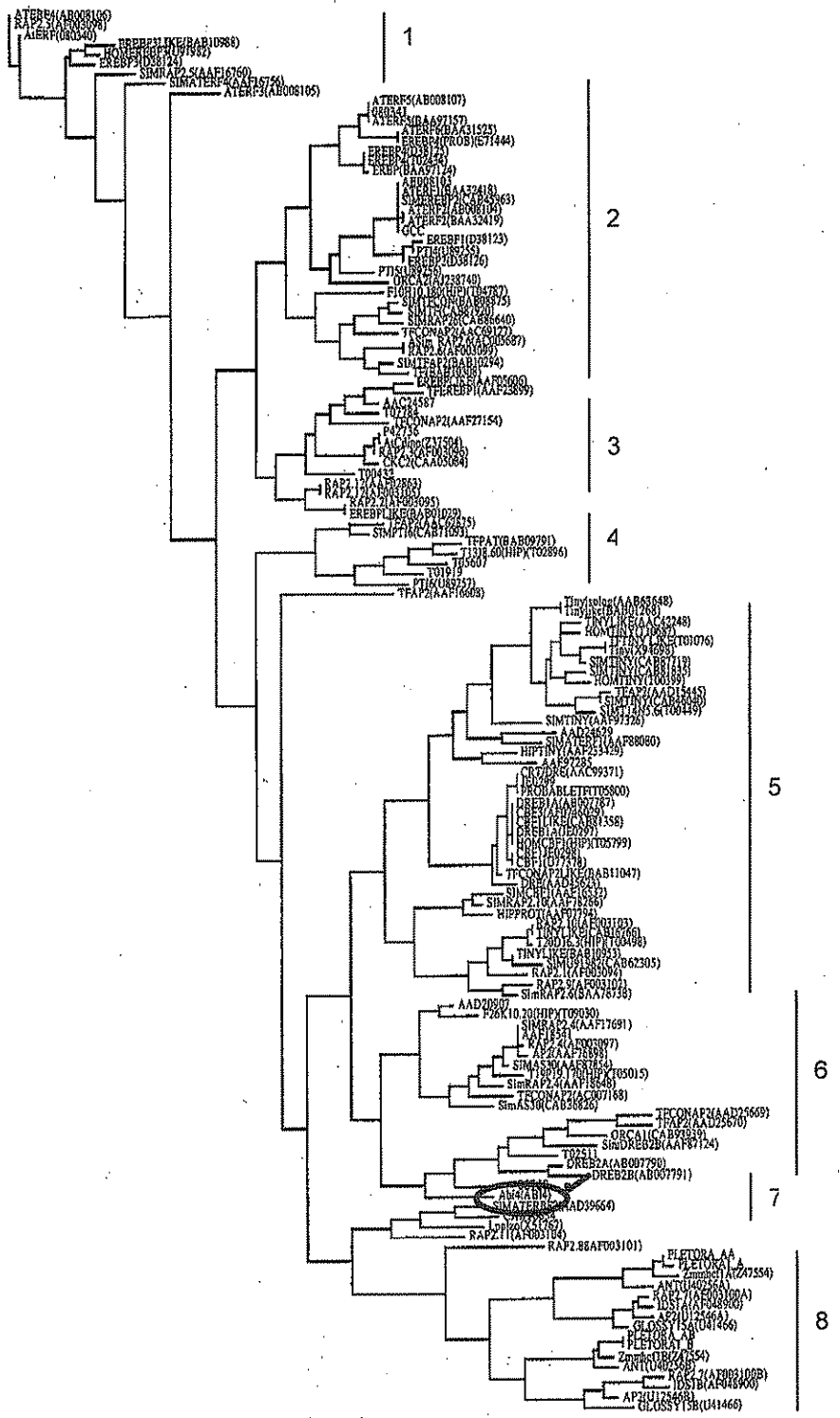


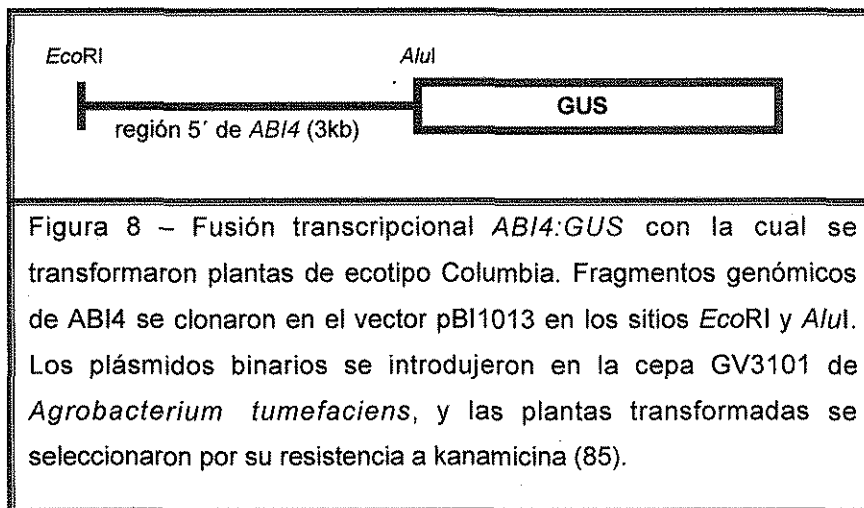
Figura 1 – Árbol filogenético de la familia AP2/ERF que incluye 142 secuencias obtenidas del The Arabidopsis Information Resource (TAIR).

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

Patrón De Expresión Del Mensajero De Abi4

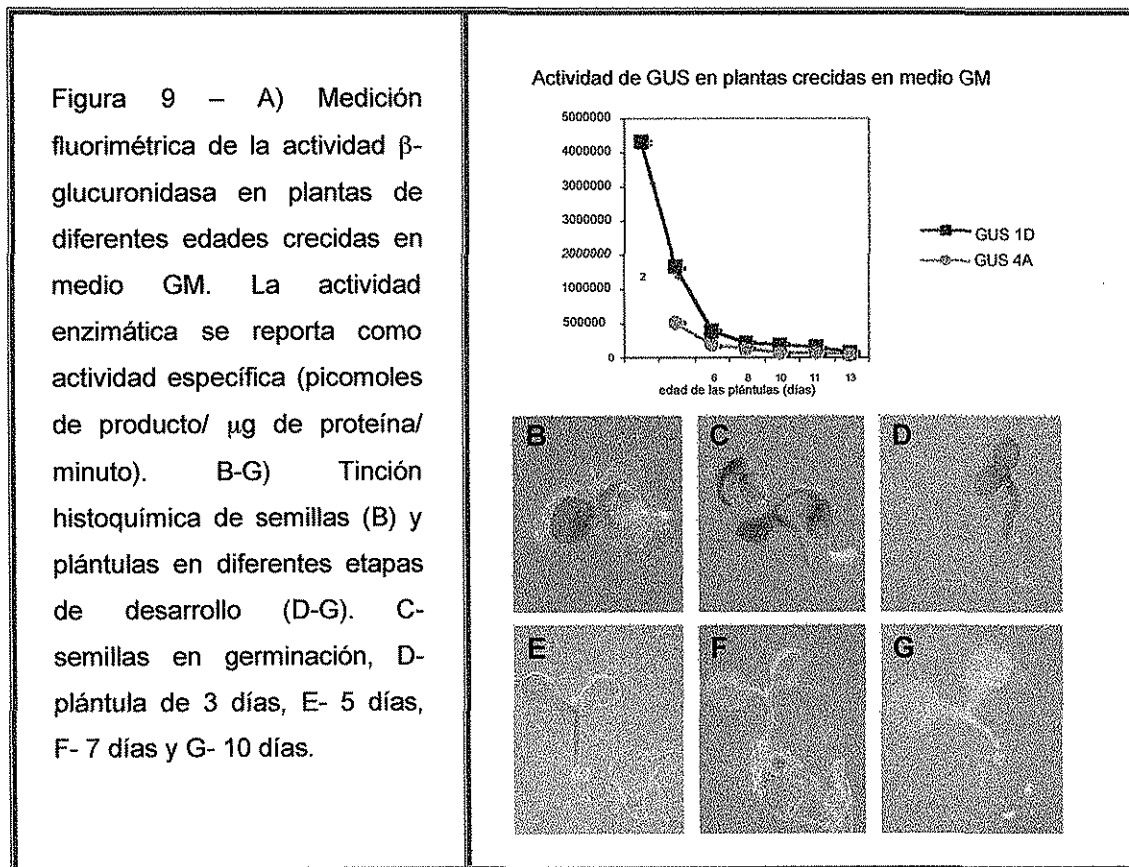
En Plantas Transgénicas.

En estudios previos se observó que las plantas crecidas en alta concentración de glucosa presentan altos niveles de *ABI4*, pero no se conoce su patrón de expresión durante el desarrollo y en distintos órganos (38). De tal manera como parte de la caracterización del papel de *ABI4* en la vía de señalización por azúcares, resulta importante conocer el patrón de acumulación de su mensajero. Esto se realizó a través del análisis de expresión en plantas transgénicas portadoras de construcciones quiméricas del gen reportero β -glucuronidasa (*GUS*) bajo la regulación de un fragmento de 3Kb de la región 5' de *ABI4*, que fueron amablemente proporcionadas por la Dra. R. Finkelstein (Universidad de California, Santa Bárbara, USA) (Figura 2).



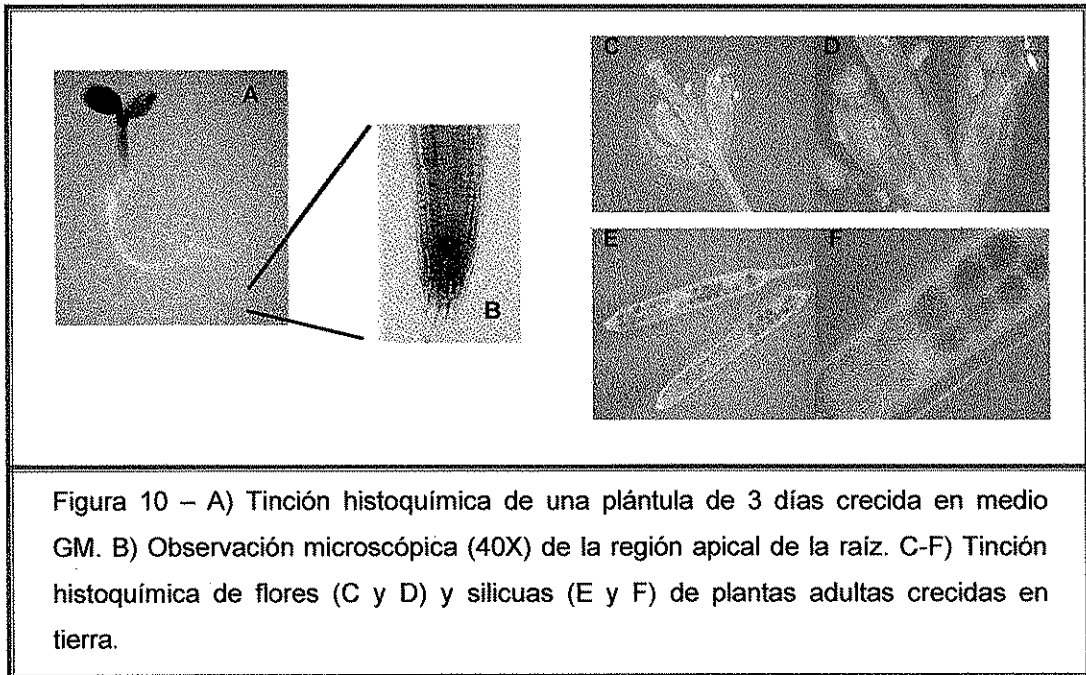
Mediante una combinación de análisis fluorimétricos (cuantitativo) e histoquímicos (cualitativo), se ha observado que en condiciones normales de crecimiento el promotor de *ABI4* se expresa en etapas muy tempranas del desarrollo, desde semilla hasta plántula de 10 días (Figura 9). La actividad de

GUS es mayor en los estadios tempranos post-germinativo y va disminuyendo paulatinamente a medida que la plántula crece. Debido a la estabilidad de la proteína β -glucuronidasa (121), esta estrategia no permite precisar la etapa del desarrollo en la que se suspende la actividad del promotor de *ABI4*.



En cuanto al patrón de expresión, se ha encontrado que el promotor de *ABI4* se expresa en embriones de semillas maduras e inmaduras, y en la radícula emergente durante la germinación (Figuras 9B, 9C y 10C-F). En plántulas de 3 a 5-7 días se observa expresión tanto en el hipocotilo como en los cotiledones, siendo más intensa la expresión a los 3 días y disminuyendo gradualmente hasta desaparecer alrededor del día 10 (Figura 9D-G). Igualmente en plántulas de 3 días se observa expresión del promotor de *ABI4* en la raíz (Figuras 9D y 10A-B), presentando un patrón de expresión íntimamente ligado al desarrollo. Las raíces de semillas en germinación muestran expresión en toda la radícula, las plántulas

jóvenes de 3-5 días presentan expresión localizada en el ápice de la raíz (cofia, centro quiescente y células iniciales – Figura 10B), y en las raíces de plántulas de más de 5 días ya no se observa expresión. En plantas mayores de 10 días no se detecta expresión del gen reportero en ningún órgano, si bien en la etapa de floración reaparece en flores y silicuas. Particularmente en flores, se limita a aquellas que han sido polinizadas y empiezan a desarrollar embriones (Figura 10 C-F).



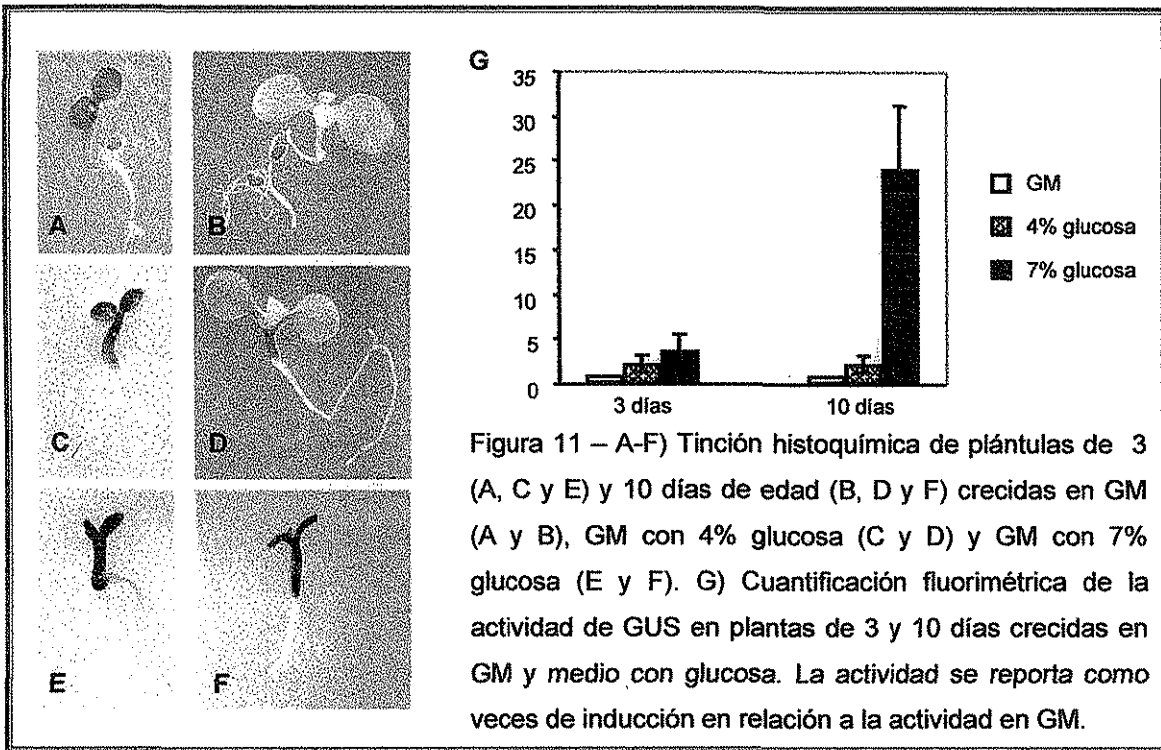
Expresión Génica De ABI4 En Respuesta

A Altas Concentraciones De Glucosa

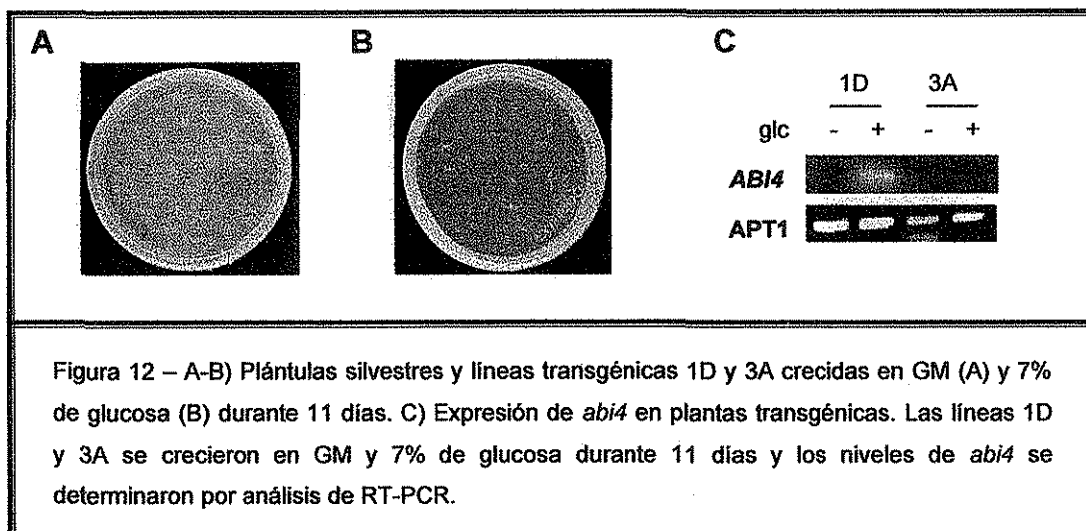
En el laboratorio estamos interesados en estudiar las vías de señalización por glucosa por lo que resulta atractivo evaluar la regulación del gen *ABI4* en respuesta a glucosa. Para ello, se analizó el comportamiento de las plantas transgénicas descritas en presencia de altas concentraciones de glucosa. La

actividad de la enzima β -glucuronidasa se midió en extractos totales de proteínas de plantas de 3 y 10 días crecidas en medio GM basal (1% sacarosa), y suplementado con 4% o 7% de glucosa. En 4 de las 5 líneas analizadas se observó claramente la inducción del gen reportero, lo que nos permitió establecer que la región 5' reguladora de 3kb es suficiente para controlar la expresión modulada por glucosa (Figura 11).

En la Figura 11 se presentan los resultados del análisis del patrón de expresión dirigido por la región promotora de *ABI4* en presencia de glucosa. El gen reportero se encuentra presente en plántulas de 3 días en medio sin glucosa y claramente su expresión en plántulas de la misma edad se intensifica cuando el medio de crecimiento contiene concentraciones elevadas de glucosa. De hecho el aumento de actividad es directamente proporcional a la concentración de glucosa (Figura 11A, 11C y 11E). En plántulas de 10 días el efecto de la glucosa es más pronunciado, mientras que las plántulas crecidas en medio con 1% sacarosa no expresan GUS. Aquellas crecidas en medio suplementado con 4% glucosa presentan un desarrollo aparentemente normal, con expresión de GUS en cotiledones e hipocotilo, indicando que la expresión del reportero en respuesta a glucosa es independiente del fenotipo de arresto y de la alta osmolaridad. Por último, en las plántulas crecidas en alta glucosa muestran un fenotipo de detención con expresión del reportero muy intensa en hipocotilo, cotiledones y ápice de la raíz. En el gráfico de la Figura 5 (G) se encuentran expresados de manera cuantitativa los datos obtenidos a partir de un análisis fluorimétrico de las plántulas descritas en el análisis histoquímico.



Una de las líneas (3A) no fue capaz de inducir *ABI4*, además presentó un fenotipo de resistencia a glucosa y por RT-PCR se comprobó que no expresa el gen *ABI4* endógeno. Probablemente dicha línea presenta algún fenómeno de silenciamiento génico que no fue analizado (126, 127) y, por lo tanto, se excluyó de los análisis posteriores (Figura 12).



Previamente se ha demostrado que en presencia de 1% sacarosa el promotor de *ABI4* se expresa a niveles elevados en semillas y durante las etapas tempranas del desarrollo de la plántula (Figuras 9A-G y 10E-F). Con el objeto de analizar si este patrón de expresión se altera por azúcares, se realizó una cinética en la que los niveles de GUS se evaluaron en semillas secas, embebidas y en vernalización y en plántulas crecidas en GM y 7.5% de glucosa. Los resultados muestran que los niveles de GUS en semillas son muy altos en todos los estadios analizados, independientemente de la presencia de glucosa. Por su parte, en las plantas que crecen sin glucosa, se observa una disminución de la actividad a partir de 3-5 días de germinación. Por el contrario, en las plantas crecidas en glucosa la actividad de GUS se incrementa en función del tiempo. Por ejemplo, el aumento es de 3.5 veces en plantas de 3 días, mientras aumenta unas 18 veces en plantas de 7 días. Estos datos sugieren que el promotor de *ABI4* es tanto dependiente del desarrollo, como capaz de responder a glucosa. Así, puede decirse que el

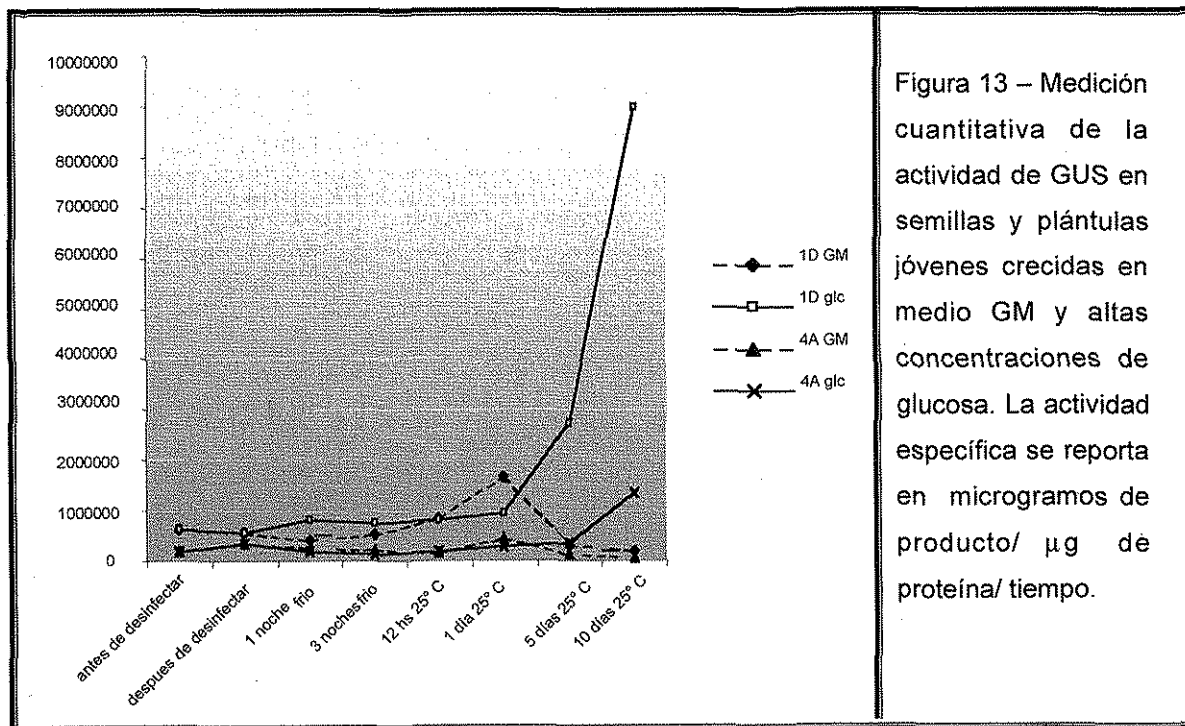


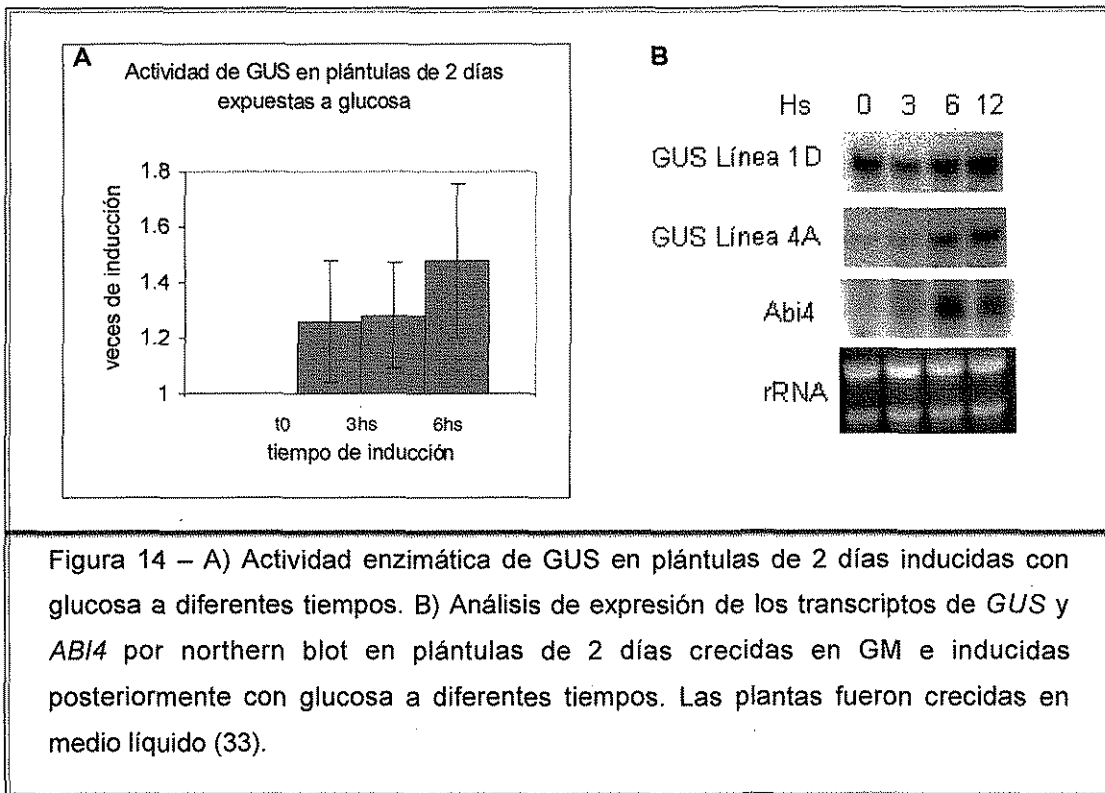
Figura 13 – Medición cuantitativa de la actividad de GUS en semillas y plántulas jóvenes crecidas en medio GM y altas concentraciones de glucosa. La actividad específica se reporta en microgramos de producto/ μ g de proteína/ tiempo.

desarrollo “decide” el patrón de expresión mientras que la glucosa actúa como un inductor que aumenta y prolonga los niveles de expresión de *ABI4* en los órganos

y tejidos determinados por el desarrollo (Figura 13).

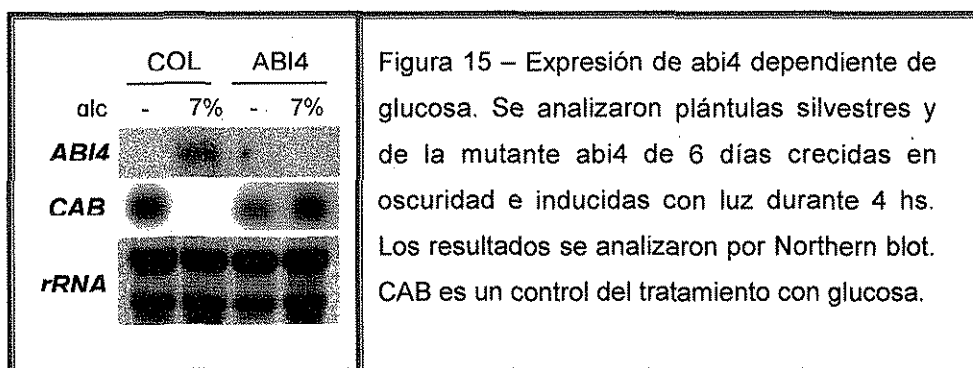
Una vez establecido que el promotor es capaz de responder a la presencia de glucosa, se realizó una cinética de inducción a tiempos cortos, tanto para descartar que la actividad del reportero se deba a reminiscencias de la actividad en semilla como para intentar desacoplar la expresión de *ABI4* inducida por glucosa de aquella dirigida por el desarrollo. Puesto que en el laboratorio previamente se había determinado que *ABI4* sólo es capaz de ser inducido por glucosa en plántulas de hasta 3 días, para este análisis se decidió emplear plántulas de 2 días (87). Para ello, las líneas transgénicas se crecieron en medio GM líquido durante 2 días antes de añadirles la glucosa a una concentración final de 7.5%, colectándose muestras al tiempo 0 (control) y a las 3, 6 y 12 horas de exposición a glucosa.

Los resultados demuestran que la actividad de β -glucuronidasa, medida por fluorimetría, prácticamente no varía en presencia de glucosa (Figura 14A). Sin embargo, análisis tipo northern de los niveles de ARNm de los genes *GUS* (en las líneas transgénicas), y *ABI4* (en plantas silvestres) demostraron que los niveles de los transcritos aumentan claramente a las 6 y 12 horas de exposición a glucosa en ambos sistemas (Figura 14B). Dicho resultado sugiere que en el sistema de transgénicas es posible observar claramente la inducción del promotor de *ABI4* en presencia de azúcares a nivel de mensajero, pero no así a nivel de actividad, la cual se mantuvo prácticamente constante a lo largo de todos los estadios analizados. Esto parece lógico dada la estabilidad de la proteína β -glucuronidasa (121).



Todos los resultados aquí presentados indican una asociación íntima entre desarrollo y glucosa. Además se sabe que las plántulas silvestres crecidas en glucosa detienen su desarrollo, y que los niveles de *ABI4* se encuentran elevados en esta condición. Por otro lado, la inducción *de novo* de *ABI4* en presencia de azúcares se verifica en un estadio muy temprano del desarrollo de la plántula. Con el objetivo de contrastar esta afirmación, el comportamiento del gen *ABI4* en respuesta a glucosa se analizó en plántulas silvestres y la mutante *abi4* crecidas en oscuridad y transferidas a condiciones de luz durante 4 horas (33). Todas las plántulas mantenidas en oscuridad presentaron fenotipo etiolado, mientras que en presencia de luz y glucosa, las plantas silvestres detienen su desarrollo, pero no así la mutante *abi4*. Esto sugiere que la luz es un estímulo necesario para que las plántulas presenten el fenotipo de arresto típico de estas condiciones de crecimiento, mediado por la glucosa u otras condición (98). Los resultados de la expresión del gen *ABI4* indican que este gen se expresa solamente en las plantas silvestres etioladas que se crecieron en glucosa (Figura 15), demostrando que la

glucosa es capaz de ejercer un efecto independientemente del arresto del desarrollo sobre la expresión de *ABI4*. La expresión del gen *CAB* se analizó como control del tratamiento con azúcares, observándose que en plantas silvestres la glucosa interfiere con la inducción de *CAB* en presencia de luz, mientras que la mutante *abi4* es insensible (Figura 15). Estos datos confirman las observaciones previas (38) y sugieren que *ABI4* es un elemento importante para la represión de *CAB* inducida por glucosa.

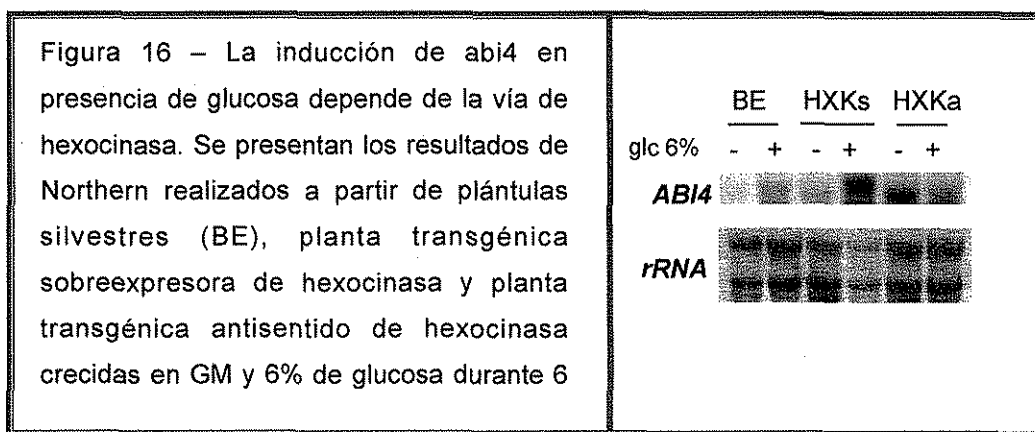


Vía De Señalización Que Regula A *ABI4*

Estudios previos en el laboratorio indican que en plantas silvestres los genes fotosintéticos *CAB* y *PC* que se reprimen en altas concentraciones de glucosa se encuentran desregulados en la mutante *abi4* (38). Por su parte, el gen *PAL1* se induce en presencia de glucosa tanto en plantas silvestres como mutantes (38). Estos resultados sugieren que *ABI4* claramente participa en la vía de señalización por glucosa dependiente de hexoquinasa y parece ser capaz de modular la regulación por carbono de algunos genes fotosintéticos.

Con el objetivo de establecer la vía de señalización que regula la expresión de *ABI4* se analizó la expresión del mensajero de *ABI4* en presencia de glucosa en plantas silvestres, en plantas transgénicas sobreexpresoras y antisentido de hexocinasa. Los resultados indican que el aumento de la expresión de *ABI4* en respuesta a glucosa se ve exacerbado en plantas transgénicas que sobreexpresan

la HXK con respecto a la silvestre, sugiriendo que la regulación del mensajero de *ABI4* en respuesta a glucosa depende de la vía de HXK. Por otro lado, la expresión de *ABI4* no se ve modulada por glucosa en plantas antisentido. De hecho, se detecta expresión de *ABI4* en plantas antisentido crecidas en GM indicando que la HXK además de participar durante su inducción en respuesta a altas concentraciones de glucosa, también es importante para reprimir la expresión de *ABI4* en respuesta a bajas concentraciones de glucosa. Estos resultados sugieren que la regulación de *ABI4* va por vía dependiente de hexocinasa (Figura 16), y que la participación de esta enzima es dual.

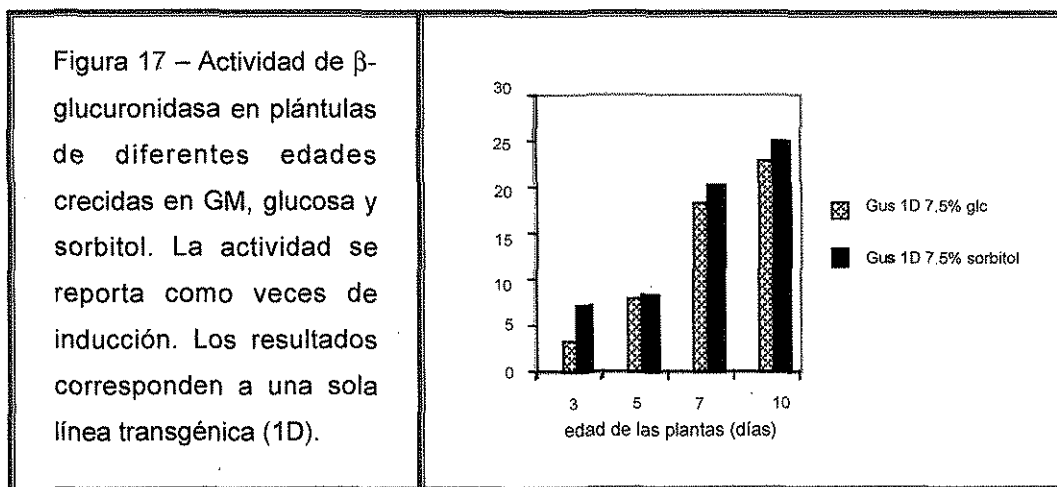


Regulación Del Transcripto De *Abi4* En Respuesta De Estrés Osmótico Y Fitohormonas

Hay evidencias que indican que *ABI4* se induce por estrés osmótico (87), además las concentraciones de glucosa empleadas en nuestros experimentos son elevadas y, por lo tanto, capaces de producir un efecto osmótico. Con el objeto de comparar el efecto producido por el choque osmótico con aquel provocado por la glucosa, se realizaron experimentos creciendo plantas transgénicas en sorbitol y glucosa con la misma osmolaridad. Los resultados indican que la actividad de GUS aumenta de manera directamente proporcional al tiempo de exposición a sorbitol o glucosa; 7 veces en plantas de 3 días y alrededor de 20 veces en

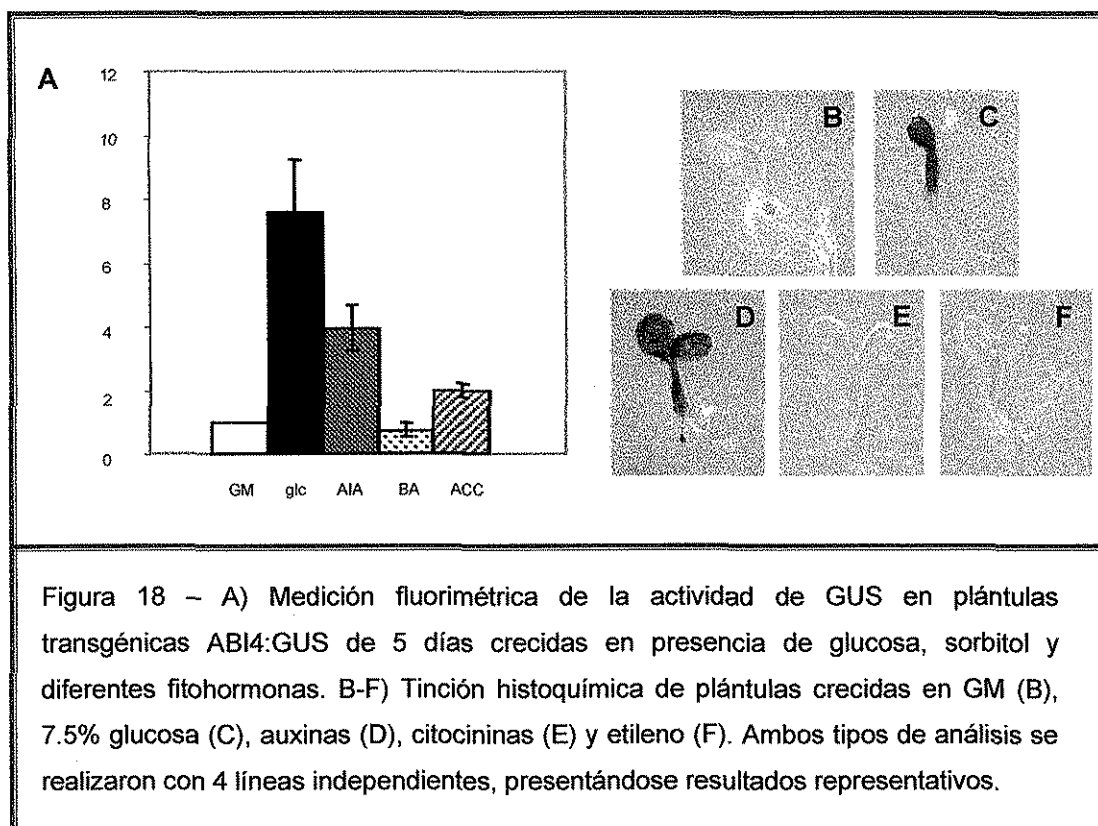
plantas de 7 días, no percibiéndose diferencias en los niveles de expresión (Figura 17). Dada la naturaleza estable del sistema reportero empleado, una estrategia para establecer diferencias entre tratamientos sería el análisis del mensajero, el cual es objeto de experimentos en curso.

Estudios de RT-PCR realizados en nuestro laboratorio muestran una diferencia significativa entre la acumulación del transcrito de *ABI4* en respuesta a glucosa y estrés osmótico (87). Si bien ambas condiciones inducen el gen, la cinética de inducción es diferente para cada una de ellas. La respuesta al estrés osmótico es más rápida, pero más débil que la provocada por glucosa (87). Dichas diferencias no se detectan en los ensayos fluorimétricos o histoquímicos de actividad de GUS empleando las líneas transgénicas (Figura 17). Estos resultados aparentemente contradictorios pueden explicarse por la estabilidad del sistema reportero empleado (121) que enmascara la detección de diferencias sutiles como las descritas. Asimismo, la comparación de resultados tampoco es válida debido a que los experimentos con las transgénicas se efectuaron con plántulas crecidas permanentemente en sorbitol y glucosa, mientras que los análisis por RT-PCR provienen de plántulas inducidas a tiempos cortos.



La mutante *abi4* se ha reportado como insensible a azúcares (sacarosa, glucosa y manosa), ABA y paclobutrazol (inhibidor de la síntesis de gibelerinas) y tolerante a estrés salino (NaCl, KCl y NaSO₄) y osmótico (sorbitol y manitol) (38,

44-47). Por otro lado, igualmente se ha reportado que la expresión del gen *ABI4* responde a glucosa, ABA y estrés osmótico (38, 85, 87). Por lo tanto, para profundizar más sobre la regulación del gen *ABI4* resultó interesante evaluar su respuesta a algunas fitohormonas. En plantas transgénicas de 5 días se ve un aumento de la actividad de *GUS* en respuesta a las hormonas auxinas y etileno, pero no a citocininas. Especialmente la inducción observada en presencia de auxinas resulta interesante, que si bien es más baja que la obtenida con azúcares, resulta reproducible y significativa. Esta observación preliminar resulta interesante de analizarse con mayor profundidad para establecer la relación entre este regulador del crecimiento y la actividad del gen *ABI4*. La inducción por etileno no es tan fuerte como la inducción por auxinas, sin embargo, sugiere que *Abi4* podría participar también en la vía de etileno de manera independiente o a través de la bien documentada interrelación ABA-etileno (63, 96, 128, 129) (véase discusión). De manera similar a lo observado con la glucosa, las auxinas y el etileno afectan solamente los niveles de expresión, pero no el patrón de expresión (Figura 18).



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El gen *ABI4* se aisló originalmente a partir de un escrutinio de mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensibles a ABA durante la germinación. Su caracterización posterior permitió conocer que *ABI4* codifica para un factor transcripcional con un dominio de unión al ADN tipo AP2. Alelos de *ABI4* se han aislado independientemente en diferentes escrutinios de mutantes dirigidos para obtener elementos que participen en la señalización por azúcares o en la resistencia a sales, indicando que *ABI4* también es un elemento importante de la vía de señalización por varios factores, por lo que resulta importante caracterizarlo a más detalle. En este trabajo se ha iniciado la caracterización del mensajero y del promotor de *ABI4* durante el desarrollo y en respuesta a azúcares, estrés osmótico y fitohormonas. A continuación se discuten los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos.

Abi4 Parece Ser Un Gen Único En El Genoma De Arabidopsis Thaliana

Dado que en este trabajo se ha establecido que *ABI4* tiene un papel clave en la señalización por azúcares durante el desarrollo temprano de la plántula, resulta predecible que su función debe estar conservada en otras especies vegetales. Sin embargo, a la fecha no se han reportado ortólogos de *ABI4* en otras especies vegetales, lo que no resulta del todo extraño considerando que sólo el genoma de *Arabidopsis* está completamente secuenciado. A pesar de ello, debido a las características de tolerancia a diferentes estreses que presenta la mutante *abi4*, sería interesante identificar sus ortólogos en especies de interés comercial que a largo plazo pudiesen emplearse en estrategias de mejoramiento biotecnológico.

Un escrutinio electrónico tipo blast (NCI) arrojó 142 secuencias con homología con el dominio AP2 de *ABI4* de varias especies vegetales, ninguna de

las cuales se encuentra en el mismo clado que ABI4. Tales resultados sugieren que *ABI4* es un gen único en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, que presenta una mayor similitud a nivel del dominio AP2 con DREB2A, DREB2B y ORCA1. Estos genes están involucrados en las respuestas a patógenos y a estrés hídrico (68,109), pero se desconoce si son regulados por azúcares y/o participan en esta vía de señalización. Explorar esta posibilidad parece interesante de abordar en trabajos futuros, ya que existen reportes que sugieren que las vías de respuesta a patógenos interactúan con las vías de señalización por azúcares (131, 134, 33, 53) y estos podrían resultar elementos de convergencia.

Un ejercicio que resulta interesante consiste en sobreponer en árbol filogenético de la Figura 7 los genes por sus funciones. Así se obtienen el grupo 1 que comprende factores con actividad represora que participan en la respuesta a etileno, el grupo 2, con genes que activan la transcripción en respuesta patógenos, vía etileno o jasmónico, el grupo 5 que incluye los factores implicados en las respuestas a deshidratación, frío y sequía, el 6 representado por ABI4, involucrado en la señalización por ABA y glucosa, y un último grupo que abarca todos los factores AP2/ERF implicados en desarrollo. Además estos datos sugieren que los dominios AP2 de factores con la misma función presentan una mayor similitud entre sí y, en algunos casos, reconocen las mismas secuencias de unión.

El sitio de unión en el ADN al que se une ABI4 no ha sido identificado, pero dada la similitud de secuencia del dominio AP2 de ABI4 con el de las proteínas DREB2A, DREB2B y ORCA1, se puede especular que ABI4 se uniría a secuencias similares a las que reconocen estos factores. Si bien los DREB y los ORCA reconocen elementos cis-reguladores diferentes, se ha reportado que ambas secuencias comparten un consenso común constituida por la secuencia de nucleótidos CCGNC, donde las bases 3 y 5 están presentes a ambas cajas y las bases 1, 2 y 4 son exclusivas para GCC y DRE, respectivamente (108). De tal manera, la especificidad de unión de cada factor estaría dada por diferencias en las bases que rodean al consenso común. Es decir, teóricamente ABI4 podría reconocer un sitio de unión que contenga la secuencia CCGNC más otras bases específicas, cuya identidad queda por establecerse.

El análisis del árbol filogenético presentado en este trabajo coincide con los reportados por Riechmann (57) y más recientemente por Sakuma (108). Sin embargo, el análisis presentado aquí puede considerarse más completo, ya que el reporte de Riechmann es anterior a la culminación de la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis* por lo que incluyó sólo el 25% de las secuencias ahora reportadas, y el de Sakuma (108) se limita a reportar el alineamiento de las secuencias de los dominios AP2 de la subfamilia ERF.

El Promotor De ABI4 Se Expresa En Etapas Tempranas Del Desarrollo

En este trabajo se ha observado que en condiciones normales de crecimiento el promotor de *ABI4* se expresa en etapas muy tempranas del desarrollo (Figura 9), con alta actividad en los estadios tempranos post-germinativos, que va disminuyendo paulatinamente a medida que la plántula crece.

Previamente Sodeman (85) ha reportado que *ABI4* se expresa tanto en semillas durante la segunda mitad de la embriogénesis y durante la maduración, como en plántulas de 2, 3 y 5 días crecidas en medio GM. Tales observaciones coinciden con los resultados de este trabajo, que demuestra la presencia del reportero en semillas, flores polinizadas y silicuas (Figuras 9B, 10C-F), así como en el hipocotilo y en los cotiledones de plántulas de 3 a 5-7 días bajo un patrón de expresión temporal con una actividad intensa que va disminuyendo gradualmente hasta desaparecer alrededor del día 10 (Figura 9D-G).

Una observación interesante la constituye el hecho de que si bien el promotor de *ABI4* es claramente activo en los cotiledones de plántulas de 5-7 días, su actividad es indetectable en las hojas verdaderas emergentes de la misma planta, lo que sugiere que los tejidos jóvenes derivados de estructuras embrionarias son los únicos capaces de expresar *ABI4* en etapas tempranas del desarrollo.

La expresión del promotor de *ABI4* en la raíz (Figuras 9D y 10A-B) presenta un patrón interesante que por primera vez se describe detalladamente. Las raíces de semillas en germinación muestran expresión en toda la radícula, las plántulas jóvenes de 3-5 días presentan expresión localizada en la cofia, centro quiescente y células iniciales (Figura 10B), mientras que en las raíces de plántulas mayores de 5 días la expresión se abate. Ya que las células iniciales constituyen el promeristemo que da origen a todos los diferentes tejidos de la raíz, la expresión específica del promotor de *ABI4* en centro quiescente y células iniciales de la raíz sugiere que *ABI4* podría estar involucrado en el control del desarrollo y diferenciación celular.

ABI4 está presente solamente en los estadios tempranos del desarrollo en plántula silvestres con desarrollo normal. Sin embargo, la presencia continua de *ABI4* en respuesta a altas concentraciones de glucosa en una planta silvestre coincide con el arresto del desarrollo temprano. Debido a que la mutante *abi4* es insensible a glucosa, estrés salino y osmótico y continúa su desarrollo en condiciones de severo estrés, se sugiere que la función de *ABI4* es importante para sensar el ambiente endógeno y exógeno asegurándose que están dadas las condiciones adecuadas para continuar el desarrollo y establecer la autotrofia. El análisis de plantas sobrepresoras de *ABI4* demuestra que estas plántulas no presentan un fenotipo de arresto, sugiriendo que la presencia de *ABI4* no es suficiente para arrestar el desarrollo, aunque si pudiese ser necesaria (85).

El Promotor De ABI4 Es Inducible Por Glucosa

Diferentes alelos del gen *ABI4* se han aislado mediante distintos escrutinios orientados a identificar elementos en la señalización por azúcares. Esto sugiere que *ABI4* es un elemento importante para la cascada de transducción de señales disparada por azúcares durante el desarrollo temprano. Por lo tanto, resulta interesante analizar el efecto de la glucosa sobre la regulación del gen *ABI4*.

Las plantas crecidas en medio con altas concentraciones de glucosa

manifiestan un fenotipo de arresto del desarrollo, en el que las plántulas no elongan el hipocotilo, no expanden cotiledones, ni acumulan clorofila (Figura 3A). De tal manera que la comparación entre una plántula crecida durante varios días en medio basal y otra crecida en medio suplementado con altas concentraciones de glucosa presenta un sesgo experimental importante dado por el arresto del desarrollo. Por lo tanto, resultó necesario emplear una estrategia que permitiera desacoplar la inducción de *ABI4* por desarrollo de aquella que pudiese estar ejerciendo la glucosa.

Los análisis histoquímicos y fluorimétricos de plántulas transgénicas que sobreexpresan el gen reportero *GUS* bajo la regulación del promotor de *ABI4* permitieron establecer que concentraciones de glucosa que no detienen el desarrollo son aún capaces de inducir la expresión de *ABI4*, lo que demuestra que su regulación no depende del arresto, ni de efectos osmóticos del medio de crecimiento (Figura 11). Es decir, los resultados de este análisis indican claramente que la glucosa ejerce un efecto sobre la expresión o estabilidad del mensajero de *ABI4*.

El patrón de expresión de *ABI4*, en los cotiledones e hipocotilo de plántulas crecidas en medio basal (GM) o suplementado con glucosa al 4% y 7% no se altera por efecto del azúcar (Figura 11A-F). Sin embargo, en la raíz se observa que concentraciones crecientes de glucosa si son capaces de modificar el patrón de expresión el cual de limitarse solamente al ápice radicular, cambia para expresarse en una zona más amplia de la raíz (Figura 11A,C,E).

Se ha reportado que la proteína *ABI4* es importante en la regulación por nitrato del desarrollo de raíces laterales (88). Sin embargo, en el presente trabajo no se observó expresión del reportero *GUS* en raíces laterales bajo ninguno de los estadios o condiciones analizadas. De tal manera que con el objetivo de explorar con más detalle el papel de *ABI4* en la raíz durante el desarrollo y en respuesta a glucosa y nitrógeno, a futuro sería interesante evaluar la expresión de *ABI4* en las mismas condiciones que las reportadas por Signora *et al.* (88). El metabolismo del carbono y del nitrógeno están íntimamente relacionados. Los carbohidratos generados por fotosíntesis constituyen los esqueletos carbonados necesarios para

la asimilación de nitrógeno, lo cual implica que entre ambas rutas metabólicas existe una regulación coordinada, tanto a nivel transcripcional como postraducciona (77-79). Recientemente se ha demostrado que algunas respuestas a la señal de azúcar dependen de la concentración de nitrógeno, y algunas respuestas a la señal de nitrógeno dependen de la concentración de carbono, indicando que la relación carbono:nitrógeno (C:N) constituye una señal regulatoria que añade complejidad a las respuestas reguladas por estos dos nutrientes (77). La mutante *abi4* es insensible a azúcares y además, en un medio de crecimiento bajo en sales es insensible a altas concentraciones de nitrógeno durante el desarrollo de raíces laterales (38, 88). Dicho medio bajo en sales tiene una relación C:N notablemente diferente a aquella de los medios empleados en este trabajo, por lo que resulta interesante analizar si el fenotipo de las raíces laterales responde a señales específicas del nitrógeno a una señal dependiente de la proporción de C:N en el medio.

Dada la estabilidad de la proteína β - glucuronidasa (121), el análisis de la actividad de GUS en líneas transgénicas no es adecuado para analizar respuestas de inducción de *ABI4* a corto plazo. Por lo tanto, la cinética de inducción a tiempos cortos de *ABI4* en respuesta a azúcares se analizó por Northern blot. Esto permitió determinar que los niveles de transcrito de *ABI4* aumentan claramente a las 6 y 12 horas de exposición a glucosa (Figura 14B). Estos resultados demuestran que la glucosa es capaz de modular la expresión de *ABI4*, si bien claramente su efecto está íntimamente relacionado con el desarrollo ya que la glucosa no es capaz de regular la expresión de *ABI4* en plántulas crecidas en medio GM después de 2-3 días de desarrollo (87). En base a los resultados discutidos, se sugiere que *ABI4* participa como un elemento importante dentro de un fenómeno complejo que incluye la percepción de azúcares y el establecimiento post-germinativo de la plántula. Además, como se ha reportado que las plántulas sólo son capaces de detener su desarrollo en respuesta a azúcares durante las primeras 48 horas de germinadas (128), que coincide con la capacidad de respuesta de *ABI4* a la glucosa, se propone que este gen actuaría a través de una vía de señalización exclusiva durante etapas muy tempranas.

El transgen mediante el cual se analizó el patrón de expresión de *ABI4* contiene una región 5' reguladora (promotor más región 5' no traducida) de 3kb (Figura 8). De manera que los resultados de análisis de expresión del gen reportero indican que dicho fragmento de 3kb es suficiente para controlar la expresión modulada por glucosa (Figura 11), y falta por establecer de que manera la glucosa promueve la acumulación del transcrito. Uno de los mecanismos de regulación por azúcares más apoyado es aquel que implica regulación a nivel transcripcional, pero también se conocen reportes donde el azúcar ejerce una regulación pos-transcripcional (8, 22, 24). Así, se ha demostrado que la región 3' no traducida controla la estabilidad del mensajero del gen α -amilasa de arroz en respuesta a sacarosa (22). Por otro lado, se ha reportado que el gen *ATB2* es modulado mediante la región 5' no traducida (24). Particularmente en este caso, debido a que en presencia de sacarosa los niveles de ARNm no varían en función de la extensión de la región 5' de *ATB2*, mientras que la actividad del reportero si depende de la construcción, se ha sugerido que la regulación ocurre a nivel traduccional. Es decir, de alguna manera la sacarosa modula la traducción de *ATB2*, sin alterar la estabilidad del mensajero o la transcripción del gen (24). Puesto que la secuencia regulatoria que responde a azúcar se encuentra en la región 5' fusionada a GUS, un mecanismo similar podría estar implicado en la regulación de *ABI4*. Un análisis de delecciones de la región regulatoria de 3kb, debería ser conducido si se pretende contrastar esta hipótesis.

La Inducción De Abi4 En Respuesta A Glucosa Parece Ser Por Vía Dependiente De Hexocinasa

Para el control de las respuestas vegetales mediadas por azúcares actualmente se postulan 3 vías de señalización específicas de hexosas y una vía dependiente de sacarosa. También se conocen algunos de los genes que son regulados por cada una de dichas vías descritas (Figura 1). Estudios previos en el laboratorio sugieren que la proteína *ABI4* participa en la vía de señalización por

glucosa dependiente de hexoquinasa, que además, parece ser capaz de modular la regulación por carbono de algunos genes fotosintéticos. Sin embargo, poco se conoce sobre la vía de señalización que controla su propia expresión en respuesta a glucosa. Con el objetivo de analizar cual de las vías propuestas podría ser responsable de regular la expresión del gen *ABI4* en presencia de glucosa, la acumulación del mensajero se comparó entre plantas silvestres y en plantas transgénicas sobreexpresoras y con una versión antisentido del gen de hexocinasa, crecidas en ausencia y presencia de glucosa. Los resultados indican que la disminución de los niveles de HXK en plantas antisentido provoca un aumento en la expresión de *ABI4* en ausencia de glucosa, en contraste, la expresión de *ABI4* se ve aumentada en respuesta a glucosa en las plantas transgénicas que sobreexpresan la HXK. Estos datos sugieren que la regulación del mensajero de *ABI4* en respuesta a glucosa depende de la vía de HXK (Figura 16). Estos resultados preliminares, indican que la regulación de *ABI4* está dada por vía dependiente de hexocinasa. Por lo tanto, la proteína ABI4 estaría participando en la misma vía de señalización que controla los niveles de su propio mensajero, es válido suponer que el gen *ABI4* podría auto-regularse, como ha sido reportado para algunos otros genes (87, 135). Estos datos concuerdan con el reporte de Arroyo et al. (87) que observó que el gen *ABI4* responde a la 2-deoxiglucosa (2-DG) de manera similar a la glucosa. La 2-DG es un análogo de glucosa que si bien es capaz de ser fosforilado por la HXK, se metaboliza muy lentamente por glucólisis. Además, dado que la 2DG se usa a muy bajas concentraciones (0.5-0.8 mM), su empleo permite analizar las respuestas a glucosa que dependen exclusivamente de la vía de HXK evitando el efecto que provoca un medio con alta osmolaridad. Resultados muy similares se observan en el factor transcripcional ABI5. ABI5 también participa en la vía de señalización por azúcares y estudios realizados en este y en otros laboratorios indican que el mensajero de ABI5 se regula por glucosa vía hexocinasa y que además es capaz de auto-regularse (87, Finkelstein-comunicación personal).

El Promotor De *Abi4* Responde A Estrés Osmótico Y Fitohormonas

Estudios por RT-PCR han mostrado diferencias significativas en la cinética de acumulación del transcrito de *ABI4* en respuesta a glucosa y estrés osmótico (87). Dichas diferencias fueron indetectables en los ensayos fluorimétricos de actividad de GUS empleando las líneas transgénicas descritas en este trabajo (Figura 10). Esto puede explicarse por la naturaleza estable del sistema reportero empleado (121), que no permite detectar diferencias sutiles como las detectadas por una técnica tan sensible como el RT-PCR (87). Una estrategia para validar o refutar las observaciones de Arroyo et al. (87) consistiría en analizar la expresión del mensajero de GUS en condiciones experimentales similares a las reportadas. Está bien documentado que las vías de señalización por azúcares interaccionan con vías de transducción activadas por señales ambientales y por señales asociadas al desarrollo donde participan diferentes fitohormonas (38-41, 75-79). Por lo tanto, para el correcto análisis de un fenómeno tan complejo como resulta ser la expresión del gen *ABI4* y la función de la proteína correspondiente es necesario considerar todas las posibles inter-relaciones que estén interactuando en un proceso determinado.

Hemos establecido que la expresión del gen *ABI4* responde a glucosa, ABA y estrés osmótico (38, 85, 87) y en este trabajo por primera vez se reporta que el promotor de *ABI4* se induce en respuesta a auxinas y etileno. La inducción por auxinas es más baja que la obtenida en respuesta a azúcares y sorbitol, sin embargo, esta observación preliminar resulta interesante de analizarse con mayor detalle en un futuro para establecer la relación causal entre las auxinas y la actividad del gen *ABI4*. Las auxinas regulan diversos procesos del desarrollo, como la división, elongación y diferenciación celular, mediante una acción coordinada con otras fitohormonas que implica la interacción de varias vías de señalización (136). En *Arabidopsis*, por ejemplo, las auxinas y el etileno regulan coordinadamente la formación del gancho apical, el crecimiento de raíz, la formación de pelos radicales y el fototropismo del hipocotilo (136). Igualmente se

ha reportado que las auxinas son capaces de estimular la biosíntesis de etileno mediante la activación del gen de la ACC-sintasa, por lo que resulta difícil separar si un efecto dado está mediado por auxinas, etileno o por interacciones sinérgicas entre ambos. Por otro lado, se ha reportado que las auxinas interactúan con ABA regulando la apertura de los estomas de manera antagónica. Además, existen evidencias que estas dos fitohormonas son capaces de interactuar de manera sinérgica para modular el crecimiento de la raíz y la germinación de semillas (136).

Como *ABI4* también se induce por etileno y ABA, existe la posibilidad de que este gen esté regulado por estos reguladores de crecimiento de manera independiente o a través de la interrelación etileno-ABA. Se ha reportado que el etileno y el ABA son antagonistas durante el desarrollo de la semilla, ya que mientras el ABA promueve la dormancia el etileno interfiere con la acción del ABA promoviendo la germinación. Así mismo, en varios reportes se sugiere que el etileno regula negativamente la biosíntesis de ABA y que probablemente también puede influir sobre la sensibilidad de la semilla a ABA (129).

Se ha observado que tanto las auxinas como el etileno y el ABA son capaces de inducir la expresión de *ABI4*, pero también es cierto que los datos no permiten establecer si la inducción responde a eventos diferentes o depende de interacciones entre estas hormonas o sus vías de señalización. Las interacciones entre vías de señalización de estas fitohormonas son confusas, y en algunos casos contradictorias. Por un lado un reporte indica que la producción de etileno inducida por el aumento exógeno de auxinas dispara la biosíntesis de ABA en *Gallium aparine* e inhibe el crecimiento del tallo (137), lo que sugiere que estas tres fitohormonas actúan de manera sinérgica. Por otro lado, altas concentraciones de glucosa aumentan los niveles de ABA y arrestan el desarrollo. El efecto producido por la glucosa durante el crecimiento temprano de la planta puede ser contrarrestado con la aplicación exógena de un precursor de etileno (63), indicando que el efecto de ABA y el etileno es antagónico durante la germinación y el crecimiento de la raíz. Estos datos aparentemente contradictorios han dirigido la hipótesis de que las auxinas actúan como segundos mensajeros

relacionados a desarrollo y no a la señalización por azúcares en etapas tempranas. Como se mencionó *ABI4* participa en la regulación mediada por nitrato del desarrollo de raíces laterales (88) y debido a que las auxinas son importantes reguladores del desarrollo y crecimiento de la raíz, resulta lógico especular que la inducción del promotor del gen *ABI4* en respuesta a auxinas se relacione de alguna manera a la participación de esta proteína en respuestas específicas del desarrollo raíz. Por su parte, la inducción por etileno sugiere que *ABI4* responde también a estrés abiótico y biótico, mientras que las respuestas a glucosa y ABA son específicas para el fenómeno de señalización por glucosa vía hexocinasa en etapas tempranas del desarrollo.

Un análisis teórico del fragmento de la región 5' regulatoria de 3kb empleada para dirigir la expresión de GUS en las plantas transgénicas usadas en este trabajo utilizando la base de datos del programa PLACE (138) reconoció que esta secuencia regulatoria contiene una variedad de elementos *cis*-reguladores relacionados a la especificidad de tejidos (raíz, polen y semilla), a la respuesta a estímulos ambientales (luz y ciclo circadiano), y a la respuesta a azúcar, estreses y hormonas (frío, auxinas y ácido salicílico). Los elementos *cis*-reguladores relacionados a azúcar que se encuentran en esta secuencia fueron reportados en las regiones regulatorias de los genes α -amilasa y β -amilasa y su participación en la regulación de la transcripción en respuesta a azúcares ha sido demostrada (25, 141). Sin embargo, la relevancia de estos elementos en el promotor de *ABI4* aún debe analizarse, especialmente si se considera que el elemento identificado en el gen β -amilasa reprime su transcripción en presencia de azúcar (25). En particular, la presencia de 7 secuencias de tres elementos diferentes de respuesta a auxinas, cuya funcionalidad queda por demostrarse, permiten suponer su participación en la regulación de *ABI4* por auxinas. Por otro lado, dado que la región promotora no contiene ningún elemento de respuesta a etileno, puede postularse que la expresión de *ABI4* no es regulada directamente por etileno, sino más bien que el etileno regula algún elemento que modula la expresión de *ABI4*. Sin embargo, en ambos casos es importante tener en cuenta que la presencia de un elemento *cis*-regulador no garantiza "*per se*" su participación en el control de una respuesta

determinada. De hecho, bien podría ser indirecta a través de la inducción de la expresión de un factor de transcripción que directamente afecte la expresión de *ABI4*. De esta manera podría explicarse por qué a pesar de los efectos antagónicos que estas fitohormonas ejercen sobre diferentes procesos, su efecto sobre la expresión de *ABI4* resulta similar. En cualquier caso, numerosos estudios con diferentes enfoques deberán conducirse para esclarecer la participación de cada inductor sobre la expresión de *ABI4* a nivel molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Sheen J., 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell* 2: 1027-1038.
- 2- Smeekens S. & Rook F., 1997. Sugar sensing and sugar mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol.* 115: 7-13.
- 3- Jang J-C & Sheen J., 1994. Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell* 6: 1665-1679.
- 4- Smeekens S., 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 49-81.
- 5- Ohto M. et al., 2001. Effects of sugars on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127 : 252-261.
- 6- Ho S-L et al., 2001. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiol.* 125: 877-890.
- 7- Chiou T-J and Bush D. R., 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *PNAS USA* 95: 4784-4788.
- 8- Koch K.E., 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509-540.
- 9- Jefferson R. et al., 1990. Transcriptional regulation of a patatin-1 gene in potato. *Plant Mol. Biol.* 14:995-1006.
- 10- Liu X-J et al., 1990. Cis-regulatory elements directing tuber specific and sucrose inducible expression of a quimeric class I patatin promoter/GUS-gene fusion. *Mol. Gen. Genet.* 223: 401-406.
- 11- Cheng C-L et al., 1992. Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *PNAS* 89: 1861-1864.
- 12- Vincentz M. et al., 1993. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant Journal* 3 (2): 315-324.
- 13- Grierson C. et al., 1994. Separate cis-sequences and trans-factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *The Plant Journal* 5(6): 815-826.
- 14- Sheu J-J et al., 1994. Control of transcription and mRNA turnover as mechanisms of metabolic repression of α -amylase gene expression. *The Plant Journal* 5(5): 655-664.

- 15- Mita S. *et al.*, 1995. Sugar inducible expresión of a gene for β -amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 107: 895-904.
- 16- Dijkwel P.P. *et al.*, 1996. Sucrose represses the developmentally controlled transient activation of the plastocyanin gene in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* 110: 455-463.
- 17- Sarah C. J. *et al.*, 1996. Distinct cis-acting elements direct the germination and sugar responses of the cucumber malate synthase gene. *Mol. Gen. Genet.* 250: 153-161.
- 18- Sheu J-J. *et al.*, 1996. Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice α -amylase genes that is modulated through complicated transcriptional and posttranscriptional processes. *JBC* 271 (43): 26998-27004.
- 19- De Bellis *et al.*, 1997. Distinct cis-acting sequences are required for the germination and sugar responses of the cucumber isocitrate lyase gene. *Gene* 197: 375-378.
- 20- Mita S. *et al.*, 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *The Plant Journal* 11(4): 841-851.
- 21- Chan M-T and Yu S-M., 1998. The 3'untranslated region of a rice α -amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *PNAS USA* 95: 6543-6547.
- 22- Chan MT and Yu SM., 1998. The 3'untranslated region of a rice α -amylase gene mediates sugar-dependent abundance of mRNA. *The Plant Journal* 15(5): 685-695.
- 23- Morita A. *et al.*, 1998. Functional dissection of a sugar repressed α -amylase gene (RAmy1 A) promoter in rice embryos. *FEBS Letters* 423: 81-85.
- 24- Rook F. *et al.*, 1998. Sucrose specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal* 15(2): 253-263.
- 25- Toyofuku K. *et al.*, 1998. Promoter elements required for sugar repression of the RAmy3 D gene for α -amylase in rice. *FEBS Letters* 438: 275-280.
- 26- Loreti E. *et al.*, 2000. Glucose represssion of an α -amylase in barley embryos is independent of GAMYB transcription. *Plant Mol. Biol.* 44: 85-90.
- 27- Loreti E. *et al.*, 2000. Glucose and disaccharide sensing mechanisms modulate the expresssion of α -amylase in barley embryos. *Plant Physiol.* 123: 939-948.
- 28- Riou-Khamlichi C. *et al.*, 2000. Sugar control of plant cell cycle: Differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol. and Cel. Biol.*: 4513-4521.
- 29- Toyofuku K. *et al.*, 2000. Glucose modulates the abscisic acid inducible Rab16A gene in cereal embryos. *Plant Mol. Biol.* 42 : 451-460.
- 30- Datta R. and Chourey P. S., 2001. Sugar regulated control of α -tubulin in maize cell

suspension culture. *Plant Cell Reports* 20: 262-266.

31- Healy J. M. S. *et al.*, 2001. The *Arabidopsis* D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact *in Vivo* with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but differentially controlled. *JBC* 276 (9): 7041-7947.

32- Maeo K. *et al.*, 2001. Sugar responsive elements in the promoter of a gene for β -amylase of sweet potato. *Plant Mol. Biol.* 46: 627-637.

33- Xiao W. *et al.*, 2000. The role of hexokinase in plants signal transduction and growth and development. *Plant Mol. Biol.* 44: 451-461.

34 - Jang J-C. *et al.*, 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell*, vol 9: 5-19.

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

36- Koch K. *et al.*, 2000. Multiple paths of sugar sensing and a sugar oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *Journal of Experimental Botany*, vol 51: 417-427.

37 - Pego J. V. *et al.*, 2000. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany*, vol 51: 407-416.

38- Arenas Huertero F. *et al.*, 2000. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes and Development* 14, n 16: 2085-2096.

39- Zhou L. *et al.*, 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *PNAS USA* 95:10294-10299.

40- De Wald D.B. *et al.*, 1994. Sucrose modulation of soybean Vsp gene expression is inhibited by auxin. *Plant Physiol.* 104: 439-444.

41- Németh K. *et al.*, 1998. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 12: 3059-3073.

42- Barker L. *et al.*, 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *The Plant Cell* 12: 1153-1164.

43- Bitter F. *et al.*, 2001. ABA3 is a molybdenum cofactor sulfuryase required for the activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *JBC* 276 (44): 40381-40384.

44 - Finkelstein R.R. *et al.*, 1998. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *Abi4* encodes an APETALA2 domain protein. *The Plant Cell* 10: 1043-1054.

45- Huijser C. *et al.*, 2000. The *Arabidopsis* SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical

to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses. *The Plant Journal* 23 (5): 577-585.

46 - Laby R.J. *et al.*, 2000. The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *The Plant Journal* 23 (5): 587-596.

47- Quesada V. *et al.*, 2000. Genetic analysis of salt-tolerance mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 154: 421-436.

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

49- Mita S., *et al.*, 1997. Negative regulation in the expresión of a sugar-inducible gene in Arabidopsis thaliana. A recessive mutation causing enhanced expression of a gene for β -amylase. *Plant Physiol.* 114: 575-582.

50- Bhalerao Bhalerao R.P. *et al.*, 1999. Regulatory interaction of PRL1 WD proteian with Arabidopsis SNF1-like proteina kinases. *PNAS USA* 96: 5322-5327.

51- Takeda S. *et al.*, 1994. Inhibitors of portein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiol.* 106: 567-574.

52- Ohto M. and Nakanura K., 1995. Sugar-induced increase of calcium-dependent protein kinases associated with the plasma membrane in leaf tissues of tobacco. *Plant Physiol* 109: 973-981.

53- Ehness R. *et al.*, 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.

54- Ohto M. *et al.*, 1995. Involvement of Ca²⁺ signalling in the sugar inducible expresión og genes coding for sporamin and β -amylase of sweet potato. *The Plant Journal* 7(2): 297-307.

55- Weigel D., 1995. The APETALA2 domain is related to novel type of DNA binding domain. *The Plant Cell*: 388-389.

56- Okamoto J.K. *et al.*, 1997. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *PNAS USA* 94: 7076-7081.

57 - Riechmann J.L. and Meyerowitz E.M., 1998. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol. Chem.* 379: 633-646.

58 - Jofuku K.D. *et al.*, 1994. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *The Plant Cell* 6: 1211-1225.

59 - Ohme-Takagi M. and Shinshi H., 1995. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell* 7: 173-182.

- 60 - Buttner M. and Singh K.B., 1997.** Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *PNAS USA* 94: 5961-5966.
- 62 - Stockinger E.J. et al., 1997.** Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *PNAS USA* 94: 1035-1040.
- 63 - Zhou J. et al., 1997.** The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *The EMBO Journal* 16 (11):3207-3218.
- 64 - Gilmour S.J. et al., 1998.** Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold induced COR gene expression. *The Plant Journal* 16 (4): 433-442.
- 65 - Menke F.L.H. et al., 1999.** A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor- inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *The EMBO Journal* 18 (16): 4455-4463.
- 66 - Fujimoto S.Y. et al., 2000.** Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *The Plant Cell*, 12: 393-404.
- 67 - Hao D. et al., 1998.** Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *JBC* 273 (41): 26857-26861.
- 68- Liu et al. 1998.** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low- temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* (10) 1391-1406
- 69- Wilson K. et al., 1996.** A *Dissociation* insertion causes a semidominant mutation that increases expression of *TINY*, an Arabidopsis gene related to *APETALA2*. *The Plant Cell* (8) 659-671.
- 70- Klucher et al. 1996.** The *AINTEGUMENTA* gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell* (8) 137-153

- 71- Moose, S.P. and Sisco, P.H., 1996. *Glossy15*, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes Dev.* 10 (23), 3018-3027.
- 72- Chuck G. et al., 1998. The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA 2-like *indeterminate spikelet1*. *Genes and Development* (12) 1145-1154.
- 73- Allen M. D. et al., 1998. A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *The EMBO Journal* 17 (18): 5484-5496.
- 74- Kagaya Y. et al., 1999. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Research* 27 (2): 470-478.
- 75- Gazzarrini S. and McCourt P., 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 387-391.
- 76- Finkelstein R. and Gibson S., 2001. ABA and sugar interactions regulating development: cross talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* 5: 26-32.
- 77- Martin T. et al., 2002. Arabidopsis seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon : nitrogen availability. *Plant Physiol.* 128: 472-481.
- 78- Coruzzi G. and Zhou L., 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging "matrix effects". *Current Opinion in Plant Biology* 4: 247-253.
- 79- Coruzzi G. and Bush D. R., 2001. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiol.* 125: 61-64.
- 80- Fordham-Skelton T. and Lindsey K., 2000. Signaling in plants. *Genome Biology* 2 (1): reports 4001.1-4001.3.
- 81- Johnston M., 1999. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *TIG* 15 (1): 29-33.
- 82- Kruckeberg A. L. et al., 1998. How do yeast cells sense glucose? *BioEssays* 20.12: 972-976.
- 83- Lalonde S. et al., 1999. The dual function of sugar carriers : transport and sugar sensing. *The Plant Cell* 11: 707-726.
- 84- Meyer S. et al., 2000. AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in carpel cell layer. *The Plant Journal* 24 (6): 869-882.

- 85- Södeman E. et al., 2000.** Regulation and function of the Arabidopsis ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol.* 124: 1752-1765.
- 86- Nakamura S. et al., 2001.** Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 26 (6): 627-635.
- 87- Arroyo A. et al., 2002.** Three genes that affect sugar sensing: *ABI4*, *ABI5* and *CTR1*, are regulated by glucose in *Arabidopsis thaliana*. (*en prensa*)
- 88- Signora L. et al., 2001.** ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 28 (6): 655-662.
- 89- Roitsch T. et al., 1995.** Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol.* 108: 285-294.
- 90- Williams L. E. et al., 2000.** Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *TIPS* 5 (7): 283-290.
- 91- Ohta M. et al., 2001.** Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *The Plant Cell* (13): 1959-1968.
- 92- Ohta M et al., 2000.** Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *The Plant Journal* 22 (1): 29-38.
- 93- Perrey R et al., 1990.** Molecular cloning of a lupin-specific gene from a cDNA library of suspension-cultured cells of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Mol. Biol.* 15: 175-176.
- 94- Medina J et al., 1999.** The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.* 119: 463-469.
- 95- Jefferson R., 1987.** Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Report* 5: 387-405.
- 96- Cheng W-H. et al., 2002.** A unique short-chain dehydrogenasa/reductasa in *Arabidopsis* abscisic acid biosynthesis and glucose signalling. (*en prensa*)
- 97- Kang, J-y. et al., 2002.** *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 14:343-357.
- 98- Lopez-Molina L. et al., 2001.** A posgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *PNAS* 98 (8): 4782-4787.
- 99- Slocombe S. P. et al., 2002.** Identification of SnIP1, a novel protein that interacts with SNF1-related protein kinase (SnRK1). *Plant Mol. Biol.* 49: 31-44.

- 100- Farras R et al., 2001.** SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteosomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *The EMBO Journal* 20 (11): 2742-2756.
- 101- Li F. N. and Johnson M., 1997.** Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *The EMBO Journal* 16: 5629-5638.
- 102- Thelander M. et al., 2002.** Cloning by pathway activation in yeast : identification of an *Arabidopsis thaliana* F-box protein that can turn on glucose repression. *Plant Mol. Biol.* 49: 69-79.
- 103- van der Fits L. and Memelink J., 2001.** The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive element. *The Plant Journal* 25: 43-53.
- 104- Nole-Wilson S. and Krizek B. A., 2000.** DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Research* 28 (21): 4076-4082.
- 105- Banno H. et al., 2001.** Overexpression of *Arabidopsis ESR1* induces initiation of shoot regeneration. *The Plant Cell* 13: 2609-2618.
- 106- Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2000.** Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Op. in Plant Biol.* 3: 217-223.
- 107- Kizis D. et al., 2001.** Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett.* 498: 187-189.
- 108- Sakuma Y. et al., 2002.** DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 998-1009.
- 109- Memelink J. et al., 2001.** ORCAization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *TIPS* 6 (5): 212-219.
- 110- Martin T. et al., 1997.** Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *The Plant Journal* 11: 53-62
- 111- Godt D. et al., 1995.** Regulation of sucrose synthase expression in *Chenopodium rubrum*: characterization of sugar-induced expression in photoautotrophic suspension cultures and sink tissue specific expression in plants. *J. Plant Physiol.* 146 : 231-238.
- 112- Harter K. et al., 1993.** Light and sucrose dependent gene expression in photomixotrophic cell suspension cultures and protoplasts of rape (*Brassica napus* L.) *The Plant Journal* 4: 507-516.

- 113- Sonnewald et al., 1995.** Plant responses to sugar accumulation in transgenic tobacco plants. In *Carbon Partitioning and Source-Sink Interactions in Plants*, MA Madore & WJ Lucas, eds. (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists) pp. 246-257.
- 114- Szekeres et al., 1996.** Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and reetiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85: 171-182.
- 115- Weaver L. et al., 1998.** A comparison of the expression pattern of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* 37: 455-469.
- 116- Dijkwel D. et al., 1997.** Sucrose control of phytochrome A signalling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 9: 583-595.
- 117- Finkelstein R., 1994.** Mutation at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *The Plant Journal* 5 (6): 765-771.
- 118- Finkelstein R. and Lynch T., 2000.** The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell* 12: 599-609.
- 119- Gampala S. et al., 2002.** *ABI5* interacts with abscisic acid signaling effectors in rice protoplasts. *JBC* 277 (18): 1689-1694.
- 120- Zhang H. and Forde B., 2000.** Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* 51 (342 MP Special Issue): 51-59.
- 121- Jefferson R. et al., 1987.** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO J.* 13 : 3901-3907.
- 122- Kraakman L. et al., 1999.** Structure-function analysis of yeast hexokinase : structural requirements for triggerin cAMP signalling and catabolite repression. *Biochem. J.* 343: 159-168.
- 123- Pego j. V. et al., 1999.** Mannose inhibits *Arabidopsis thaliana* germination via a hexokinase-mediated sep. *Plant Physiol* 119: 1017-1023.
- 124- Purcell P. et al., 1998.** Antisense expression of a sucrose nonfermenting 1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant Journal* 14: 195-202.
- 125- Kuriyama I. et al., 1998.** Characterization of a calcium-dependent protein kinase of tobacco leaves that is associated with the plasma membrane and is inducible by sucrose. *Plant Cell Physiol* 39 (11): 1176-1183.

- 126- Kooter J. *et al.*, 1999. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *TIPS* 4 (9): 340- 347.
- 127- Mette M. F. *et al.*, 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO Journal* 19 (19): 5194-5201.
- 128- Gibson S. *et al.*, 2001. The *sugar-insensitive 1 (sis1)* mutante of Arabidopsis is allelic to *ctr1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280: 196-203.
- 129- Ghassemian M. *et al.*, 2000. Regulation of abscisic acid signalling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell* 12: 1117-1126.
- 130- Rook F. *et al.*, 2001. Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *The Plant Journal* 26(4): 421-433.
- 131- Herbers K. *et al.*, 1996. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase : posible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* 8: 793-803.
- 134- Rolland F. *et al.*, 2002. Sugar sensing and signalling in plants. *The Plant Cell, supplement*, S185-S205.
- 135- Chikano H. *et al.*, 2001. Two novel genes encoding SNF1-related protein kinases from *Arabidopsis thaliana*: differential accumulation of *AtSR1* and *AtSR2* transcripts in response to cytokinins and sugars, and phosphorylation of sucrose synthase by *AtSR2*. *Mol. Gen. Genet* 264: 674-681.
- 136- Swarup R. *et al.*, 2002. Auxin cross-talk: integration of signalling to control plant development. *Plant Molecular Biology* 49: 411-426 *Plant Molecular Biology* 49: 411-426.
- 137- Hansen H and Grossmann K. 2000. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiol.* 124: 1437-1448.
- 138- Higo K. *et al.*, 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database : 1999. *Nucleic Acids Research* 27 (1):297-300.
- 139- Logemann J. *et al.*, 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163: 16-20.
- 140- Pawlowsky K. *et al.*, 1994. Isolation of total, poly(A) and polisomal RNA from plants tissues. *Plant Mol. Biol. Manual* D5: 1-13.
- 141- Hwang Y. *et al.*, 1998. Three cis-elements required for rice α -amylase *AMY3D* expression during sugar starvation. *Plant Mol. Biol.* 36: 331-341.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA