



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Identificación de los elementos en *cis* que participan en la represión del gen
STP1 (SUGAR TRANSPORTER PROTEIN1) por glucosa”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ CORONEL

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. ELIZABETH CORDOBA MARTÍNEZ
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. SVETLANA SHISHKOVA
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Elizabeth Cordoba Martínez en el laboratorio 23 adscrito al Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Morelos.

Este trabajo se realizó con recursos del programa de apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) bajo el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con número de proyecto **IN207916**, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de proyecto **154392**, otorgados a la Dra. Elizabeth Cordoba Martínez.

Agradezco el apoyo otorgado a través de la beca de estudios de posgrado a nivel Maestría por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de becario **404555**.

Resumen

En las plantas, los azúcares desempeñan un papel esencial como sustratos para la producción de energía y de esta manera, puedan sustentar el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo. Por otro lado, también son capaces de actuar como moléculas señalizadoras, implicadas en la regulación de la expresión génica de diversas vías metabólicas y en el proceso de desarrollo. Por lo cual, las plantas cuentan con diversos mecanismos para detectar y responder ante las fluctuaciones en los niveles de azúcares. A través de diversos estudios realizados en las últimas décadas, se han identificado una gran variedad de genes implicados en el metabolismo del carbono y nitrógeno, que responden a cambios en las concentraciones de azúcares presentes en la planta. Se sabe que, la transcripción de una porción relativamente amplia del genoma de *Arabidopsis* (más de 2000 genes), se encuentra regulada directamente por las señales generadas por los niveles de azúcares. Mientras que otros genes, están probablemente afectados indirectamente por los cambios en las actividades metabólicas inducidas por las fluctuaciones en los niveles de éstos. Con el propósito de comprender los mecanismos involucrados en este tipo de respuestas, se pretende identificar a nuevos elementos que participan en las vías de señalización por azúcares. Diversos estudios han demostrado que la expresión del gen *STP1* (*SUGAR TRANSPORTER PROTEIN1*) se regula negativamente por la presencia de azúcares, de una manera relativamente rápida y robusta, aún en bajas concentraciones. Para identificar al(os) elemento(s) en *cis* que regulan la represión de *STP1* por azúcares, en el presente trabajo, se realizó un análisis de una región de 310 pb de la región promotora de dicho gen, que contiene diversos elementos en *cis* reconocidos por su participación en la regulación transcripcional por azúcares, y a partir de esta, se delimitó una región de 69 pb, que se encuentra situada entre los sitios -1275 a -1199 pb antes del sitio de inicio de la traducción, como necesaria para ejercer la represión por azúcares. Mediante un estudio paralelo realizado en el laboratorio, se identificó a un factor de transcripción que se une al elemento *CACATG* identificado en estas 69 pb en respuesta a azúcares, el cual contiene parte del núcleo del elemento G-box, implicado en diversas respuestas relacionadas con distintos tipos de estrés. El análisis de sustitución de bases de este elemento candidato reveló que éste es necesario para conferir la respuesta de represión de *STP1* en presencia de glucosa. Estos resultados permiten posicionar al elemento *CACATG*, como un nuevo elemento regulador en la represión por azúcares.

Abstract

In plants, the carbon compounds play an essential role as structural components and energetic compounds such as cellulose and glucose respectively for a proper plant development but also act as signaling molecules that regulate gene expression in plants. Therefore, plants have different mechanisms to detect and respond to fluctuations in their levels. Through several studies carried out in recent decades, a large variety of genes have been identified to respond to the sugars conditions during the different growth stages. In *Arabidopsis* genome, more than 2000 gene are directly regulated by signals generated by sugar levels, although a large number of genes that are regulated by sugars, only a few components involved in this regulation are known. In order to identify the elements involved in the response to sugars, in particular glucose, this work focuses on the study of the *STP1* (*SUGAR TRANSPORTER PROTEIN1*) gene, which is negatively regulated by the presence of glucose, in a relatively rapid and robust manner, even at low concentrations. The analysis of a fragment of 310 bp of their promoter region, containing several *cis*-elements recognised by their participation in the transcriptional regulation by sugars, and from this, a region of 69 bp was delimited, that is located between the -1275 to -1199 bp before the start of translation site, as necessary to perform the repression. Through a study conducted in the laboratory, it was possible to identify a transcription factor that binds to the *CACATG* element identified in this 69 bp in response to sugars, which contains part of the nucleus of the G-box element, involved in diverse responses related to different types of stress. The base-substitution analyses revealed that this element is necessary to confer the repression response of *STP1* in the presence of glucose. These results allow positioning the *CACATG* element, as a new regulating element in the repression by glucose.

Índice de contenido

1. Introducción	1
1.1 El metabolismo de los azúcares.....	2
1.2 La participación de los azúcares en el desarrollo de la planta	3
1.3 Regulación de la expresión génica por azúcares	4
1.3.1 Inducción de la expresión de genes mediada por azúcares	5
1.3.2 Represión de genes mediada por azúcares	6
1.4 Los azúcares como moléculas señalizadoras	7
1.4.1 El efecto de la sacarosa en la expresión de genes	8
1.4.2 La trehalosa y Trehalosa-6-fosfato como moléculas señalizadoras	9
1.4.3 El papel de la glucosa en la regulación de la expresión de diversos genes	11
1.5 Vías de señalización por glucosa en plantas	11
1.5.1 La HXK1 actúa como un sensor de glucosa en plantas	11
1.5.2 Vía dependiente de HXK1-independiente de glucólisis	13
1.5.3 Vía dependiente de HXK1-dependiente de glucólisis.....	14
1.5.4 Vía independiente de HXK1	14
1.6 Los componentes de las vías de señalización por glucosa en plantas	15
1.6.1 SnRK1 (Sucrose non-fermenting Related protein Kinase1).....	15
1.6.2 TOR (Target of Rapamycin)	16
1.7 La regulación a nivel transcripcional.....	17
1.7.1 Control transcripcional mediado por azúcares.....	21
2. Antecedentes	24
2.1 El gen <i>STP1</i> (<i>SUGAR TRANSPORTER PROTEIN1</i>).....	24
2.1.1 La regulación de <i>STP1</i> por azúcares	25
2.1.2 En la regulación de la expresión de <i>STP1</i> por glucosa no participan componentes de las vías hasta ahora descritas.....	26

2.1.3	Un fragmento de 310 pb de la región regulatoria 5' de <i>STP1</i> es esencial para la respuesta a glucosa	27
2.1.4	Identificación de los posibles elementos regulatorios en <i>cis</i> que están involucrados en la respuesta de <i>STP1</i> a glucosa.....	28
2.1.5	Perfil de proteínas de unión al fragmento de 310 pb que contiene a los elementos regulatorios en <i>cis</i> de respuesta a glucosa de <i>STP1</i>	30
3.	Justificación	31
4.	Hipótesis	32
5.	Objetivo General	32
5.1	Objetivos Particulares	32
6	Materiales y Métodos	33
6.1	Generación de las construcciones <i>GRE (Glucose Response Elements)</i>	33
6.2	Transformación de plantas de <i>Arabidopsis</i>	34
6.1.1	Desinfección de semillas	35
6.1.2	Selección de líneas transgenicas	35
6.3	Evaluación de las líneas transgenicas pBI121 y <i>GREmut</i> por PCR	36
6.3.1	Evaluación de las líneas transgenicas por actividad histoquímica de GUS.....	37
6.4	Tratamientos con azúcares.....	37
6.5	Análisis por experimentos tipo Northern	38
6.6	Generación de la construcción portadora de la mutación del elemento <i>CACATG</i>	40
6.6.1	Mutagénesis sitio-dirigida del elemento <i>CACATG</i> por PCR	40
6.6.2	Ligación del producto final de PCR	43
6.6.3	Análisis de colonias transformadas	43
6.6.4	Generación de la construcción reportera <i>GREmut (pBI121::GREmut::p35S)</i>	44
7	Resultados	46
7.1	Análisis <i>in silico</i> comparativo entre las regiones promotoras de genes homólogos de <i>STP1</i> en otras especies vegetales	46
7.2	Obtención de líneas homocigotas.....	50
7.3	Análisis de la regulación por azúcares en las líneas transgenicas <i>GRE</i>	54

7.4 Mutagénesis del elemento <i>CACATG</i>	57
7.5 Análisis de la regulación por azúcares en las líneas <i>GREmut</i>	60
7.6 Análisis de los promotores de genes regulados negativamente por glucosa	62
8 Discusión	64
8.1 Identificación de los elementos en <i>cis</i> involucrados en la represión del gen <i>STP1</i> por glucosa	64
8.2 El fragmento de 69 pb contiene a los elementos en <i>cis</i> que participan en la represión de <i>STP1</i> por glucosa	67
8.3 El elemento <i>CACATG</i> participa en la represión de <i>STP1</i> por glucosa	68
8.4 Posible mecanismo de represión de <i>STP1</i> por glucosa	69
9 Conclusiones	72
10 Perspectivas	73
11 Bibliografía	74

Índice de figuras

Figura 1. Diferentes vías de señalización por glucosa en plantas	13
Figura 2. Estructura y función de un gen y su región reguladora.....	19
Figura 3. La expresión de <i>STP1</i> se reprime por glucosa.....	25
Figura 4. La regulación de <i>STP1</i> por glucosa no se encuentra mediada por ninguna de las vías hasta ahora descritas	26
Figura 5. Análisis por eliminación de secuencias del promotor de <i>STP1</i>	29
Figura 7. Esquema de las construcciones que portan a las fusiones transcripcionales de los fragmentos <i>GRE</i> en el vector pBI101 y del vector pBI121	34
Figura 8. Esquema de la obtención de líneas transgenicas homocigotas	36
Figura 9. Esquema de los tratamientos realizados	38
Figura 10. Esquema de la mutagénesis sitio-dirigida del elemento <i>CACATG</i> , por el método de extensión por fragmentos sobrelapados	42
Figura 11. Esquema de la generación del plásmido pGEM-T:: <i>GREmut</i> ::p35S	44
Figura 12. Esquema de la construcción del vector <i>GREmut</i>	45
Figura 13. Distribución de los elementos regulatorios presentes en los promotores analizados de los genes homólogos de <i>AtSTP1</i> en distintas especies vegetales.....	49
Figura 14. Análisis de la actividad de GUS en las líneas transgenicas homocigotas	51
Figura 15. Selección de plantas transformadas con el plásmido pBI121	52
Figura 16. Análisis molecular de las plantas transformadas con el vector pBI121	53
Figura 17. Análisis de la regulación por azúcares en las plantas transgenicas <i>GRE</i> y pBI121	56
Figura 18. Mutación sobre el elemento <i>CACATG</i>	58
Figura 19. PCR en colonia para confirmar la presencia del vector pBI121:: <i>GREmut</i> ::p35S (<i>GREmut</i>) en las colonias transformadas de <i>A. tumefaciens</i>	59
Figura 20. Confirmación de las líneas <i>GREmut</i>	60
Figura 21. Análisis de la regulación por azúcares de las líneas <i>GREmut</i>	61
Figura 22. El elemento <i>CACATG</i> está presente en la región reguladora de diversos genes que son regulados por glucosa	63
Figura 23. Mecanismos de represión de <i>STP1</i> por glucosa	71

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de los elementos en cis contenidos en el fragmento de 310 pb de la región regulatoria 5' de <i>STP1</i> , que podrían estar involucrados en la regulación de dicho gen en respuesta a glucosa.....	29
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la mutagénesis sitio-dirigida del elemento <i>CACATG</i>	41
Tabla 3. Elementos en cis identificados en las regiones promotoras de los probables homólogos de <i>STP1</i> en diferentes especies.....	48

“Identificación de los elementos en *cis* que participan en la represión del gen *STP1 (SUGAR TRANSPORTER PROTEIN1)* por glucosa”

1 Introducción

Además de estar involucrados en numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos, tales como moléculas de almacén de energía, componentes estructurales de la pared celular, o sustratos para la síntesis de carbohidratos más complejos como el almidón. Los azúcares también son capaces de desempeñar una función similar al de las hormonas, actuando como mensajeros primarios implicados en la transducción de señales (Rolland *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2004). En plantas, la producción de azúcares mediante el proceso de la fotosíntesis es una actividad fundamental a lo largo de todo su ciclo de vida. Por lo cual, el transporte y consumo de azúcares, así como su almacenamiento, son procesos sumamente dinámicos y están acoplados a la fisiología celular, la identidad del órgano, las señales percibidas desde el exterior y a las distintas etapas de desarrollo en las que se encuentre la planta (Sheen *et al.*, 1999).

La habilidad que poseen las plantas para percibir los niveles de azúcares y desencadenar una respuesta consecuente, constituye un mecanismo de control que integra las condiciones ambientales externas como la luz, los nutrientes y los diversos tipos de estrés a los que se encuentra sometida, junto con los distintos programas de desarrollo que son dirigidos por hormonas (Koch *et al.*, 1996; Sheen *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2006). Durante varias décadas, los efectos que tienen los azúcares en la expresión génica, los cuales afectan a los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta, se han atribuido generalmente a alguno de los productos de su propio metabolismo y a la producción de energía. La negativa de considerar a los azúcares como moléculas señalizadoras se basó en el hecho de que se requieren altas concentraciones de éstos para tener un efecto similar al de las hormonas (Sheen *et al.*, 1999). Sin embargo, en los últimos años, diversos estudios han evidenciado que los procesos de percepción y señalización por azúcares se realizan incluso en concentraciones milimolares, en los cuales, podrían estar involucrados diferentes tipos de moléculas como enzimas y transportadores para percibir a los azúcares (Koch *et al.*, 1996; Sheen *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2002).

1.1 El metabolismo de los azúcares

La regulación de los niveles de azúcares en plantas es un proceso sumamente complejo. Como productores primarios, las plantas constan de órganos y tejidos que se encargan de sintetizar carbohidratos, los cuales son conocidos como tejidos fuente o exportadores; entre los cuales se encuentran las hojas maduras, capaces de realizar el proceso de fotosíntesis. Por otro lado, se encuentran los órganos que requieren del importe constante de fuente de carbono, conocidos como órganos consumidores o importadores, como son las raíces, los tallos y las hojas jóvenes. En general, la disponibilidad de azúcares está vinculada con el crecimiento y desarrollo de la planta, pero no se sabe exactamente cómo se lleva a cabo la regulación de este proceso (Rolland *et al.*, 2006). La integración de este tipo de señales con el metabolismo es de suma importancia para las plantas, por lo tanto, las vías de señalización por azúcares deben de estar bastante coordinadas con la disponibilidad de otros nutrientes esenciales como son el nitrógeno, fosfato, sulfato y las distintas condiciones de luz, a las que se someten (Koch *et al.*, 1996; Sheen *et al.*, 1999; Gupta y Kaur, 2005; Rolland *et al.*, 2006).

El metabolismo de los carbohidratos, especialmente la síntesis y degradación del almidón, de la celulosa y de la sacarosa, son fundamentales para el desarrollo de la planta; por lo cual, es importante comprender los mecanismos involucrados en estos procesos. La sacarosa es una molécula clave en el metabolismo de los azúcares, debido a que se transporta preferentemente desde las hojas hacia todas las células de la planta (Rolland *et al.*, 2006). Por su parte, el almidón actúa como una molécula de almacén de energía en las células; su descomposición en moléculas más sencillas como las hexosas y su posterior degradación, asegura la disponibilidad de energía y nutrientes durante los períodos de baja actividad fotosintética como la germinación y los periodos de oscuridad. Debido a que las plantas son organismos sésiles, han evolucionado para adquirir y aprovechar la disponibilidad de nutrientes que aseguren su supervivencia. Por lo tanto, su capacidad para responder a diversos estímulos adversos requiere de una coordinación sumamente compleja de varios y diversos mecanismos que le permiten integrar sus respuestas con su metabolismo, crecimiento y desarrollo. La variación en los niveles de azúcares presentes en la planta a lo largo de su ciclo de vida, proporciona una amplia gama de señales que la planta debe ser capaz de interpretar para generar una respuesta acorde (Koch *et al.*, 1996).

En las plantas, la expresión de diversos genes como los implicados en la síntesis de polisacáridos y de pigmentos, los de proteínas de almacenamiento, así como genes

asociados con las respuestas de defensa y la respiración, se promueve por altas concentraciones de azúcares. Por el contrario, la privación de azúcares induce la expresión de genes implicados en la fotosíntesis y en la movilización de recursos para obtener energía a partir de la degradación de almidón, lípidos o proteínas (Koch *et al.*, 1996; Rolland *et al.*, 2006).

1.2 La participación de los azúcares en el desarrollo de la planta

Los azúcares poseen diversos efectos en el crecimiento y desarrollo de la planta. Los niveles de acumulación de los transcritos de un gran número de genes son afectados por cambios en los niveles de azúcares presentes en la planta (Price *et al.*, 2004; Lastdrager *et al.*, 2014). El crecimiento de la planta implica un aumento en el volumen celular, en la tasa de división celular, y en la actividad de los programas de desarrollo que especifican la identidad de tejidos y órganos. Los mecanismos moleculares que conducen a la división y expansión celular dependen en gran medida de la disponibilidad de fuente de carbono para proporcionar energía y biomasa (Lastdrager *et al.*, 2014). Se evidenció la expresión de las ciclinas del tipo D CYCD2 y CYCD3, los cuales son dos reguladores del ciclo celular y además promueven la generación de nuevas células, es inducida por la presencia de azúcares, promoviendo así la progresión del ciclo celular (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). La transición a la fase de expansión celular comienza con la inactivación de las ciclinas y de diversas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs; *cycline-dependent kinases*). La expansión celular es modulada principalmente por la turgencia, sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares que la controlan. Aunado a esto, la expresión ectópica de las CDKs inhibe la expresión de un regulador negativo de la división celular denominado *KRP* (*KIP-RELATED PROTEIN*) en *Arabidopsis*, lo cual sugiere que una disminución en la tasa de división celular propicia un aumento en la tasa de expansión celular.

Los niveles de azúcares son temporal y espacialmente regulados en la planta. Las diversas enzimas que participan en el metabolismo y transporte de los azúcares, son esenciales para poder regular el crecimiento y desarrollo de la planta de una manera precisa, como ocurre en la transición entre la fase vegetativa y la fase generativa (Rolland *et al.*, 2006). Los transportadores de sacarosa y las invertasas regulan la distribución de azúcares y de los metabolitos derivados de estos, entre los tejidos consumidores y los tejidos fuente, lo cual afecta el crecimiento.

Por otro lado, también se ha reportado que los distintos tipos de azúcares son capaces de desempeñar diversos papeles en la regulación de los procesos fisiológicos en cada uno de

los estadios de desarrollo de la planta (Rolland *et al.*, 2006; Smeekens *et al.*, 2009; Eveland y Jackson, 2012;). Durante el proceso de germinación y el desarrollo temprano de la planta, los niveles exógenos de azúcares desempeñan un papel muy importante. La presencia de bajas concentraciones de manosa (10 mM), es capaz de inhibir la germinación de semillas de *Arabidopsis* (Pego *et al.*, 1999). Mientras que, la adición de ABA (ácido abscísico) en concentraciones micromolares, también posee un efecto inhibitorio durante la germinación (Pego *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la adición de glucosa (60mM), la cual es un azúcar metabolizable, es capaz de contrarrestar los efectos inhibitorios del ABA y de la manosa (Pego *et al.*, 1999). Sin embargo, en otras etapas del desarrollo de la plántula, los azúcares, como la glucosa, también actúan como inhibidores cuando están presentes en concentraciones que van desde 30 a 300 mM. Este efecto inhibitorio no es debido al estrés osmótico que puede generar la presencia de este azúcar (Price *et al.*, 2003).

Además de regular el desarrollo vegetativo, los azúcares como la glucosa en el meristemo apical del brote (SAM), son esenciales para inducir el proceso de floración en *Arabidopsis* (Bernier y Perilleux, 2005). Durante la inducción floral, se presenta un incremento en el flujo de transporte de carbohidratos desde las hojas. Diversos ensayos, utilizando plantas crecidas en oscuridad, han demostrado que el suministro de sacarosa a las partes aéreas de la planta, se encarga de promover los procesos de morfogénesis y el desarrollo floral (Bernier y Perilleux, 2005). Por otro lado, la sacarosa y la glucosa participan en la regulación de la transición entre el ciclo celular y el endociclo (ciclo celular en el cual las células replican su genoma sin intervención de la mitosis incrementando la ploidía, para contribuir al crecimiento y desarrollo de los órganos y tejidos) y en la acumulación de moléculas de reserva durante el desarrollo del embrión (Borisjuk *et al.*, 2003).

1.3 Regulación de la expresión génica por azúcares

Se ha establecido que los azúcares desempeñan un papel muy importante en la regulación de la interacción entre los tejidos fuente y los consumidores, y en la supervivencia de la planta, ante distintos tipos de estrés (Roitsch, 1999; Borisjuk *et al.*, 2003; Bläsing *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2002). Debido a ello, se han realizado diversos estudios para dilucidar los mecanismos mediante los cuales, los azúcares, son capaces de regular la expresión de una gran variedad de genes que codifican para proteínas involucradas en diversos procesos metabólicos. Tales procesos se inducen o reprimen, dependiendo de las concentraciones de azúcares en la célula (Sheen *et al.*, 1999; Price *et al.*, 2004; Rolland *et al.*, 2006). Se han empleado diversos sistemas para identificar elementos en *cis* y factores en *trans*

involucrados en la respuesta a azúcares en plantas. A partir de estos estudios, se demostró que la regulación por azúcares de diversos genes, puede estar mediada por distintos mecanismos (Sheen *et al.*, 1999). Price y colaboradores (2004) sugirieron que es necesaria la síntesis *de novo* de algunos factores en *trans* para llevar a cabo la represión de ciertos genes en respuesta a azúcares. El papel de los azúcares no está limitado a la regulación a nivel transcripcional, puesto que también son capaces de regular genes de manera post-transcripcional, induciendo cambios en la estabilidad del mRNA, a nivel de la traducción o en la estabilidad de las proteínas (Rook *et al.*, 1998; Rolland *et al.*, 2006). En *Arabidopsis*, se han identificado y caracterizado un gran número de genes que son inducidos por la exposición a prolongados períodos de oscuridad, conocidos como *DIN (DARK INDUCED)*. Además, estos genes también se inducen durante la senescencia y cuando las concentraciones de azúcares son bajas, mientras que, un aumento en la concentración de la sacarosa, glucosa o 2-desoxiglucosa reprimen su expresión. Este efecto no se presenta al utilizar manitol ni tampoco 3-O-metilglucosa como fuente de carbono (Fujiki *et al.*, 2001). Diversos análisis, utilizando inhibidores de la actividad de diversas fosfatasa y cinasa, han demostrado que los procesos de señalización en respuesta a bajas concentraciones de azúcares, involucran la fosforilación o desfosforilación de una gran variedad de proteínas (Fujiki *et al.*, 2000).

Price y colaboradores (2004) determinaron el efecto de la glucosa en los perfiles transcripcionales de plántulas de *Arabidopsis* y encontraron que, en presencia de glucosa (150 mM), se indujo la acumulación de 444 genes mientras que disminuyó la abundancia de 534. Estos genes se encuentran involucrados en diversos procesos como la fotosíntesis, el metabolismo de nitrógeno, lípidos, carbohidratos, la síntesis de hormonas, la transducción de señales, el transporte de metabolitos a través de membrana; así como en la utilización de otras fuentes de carbono. Hasta el momento, se han descrito múltiples vías de transducción de señales por azúcares en las plantas, cuyos componentes incluyen receptores/sensores iniciales, factores en *trans* y elementos en *cis*. Es a partir de estas cascadas de señalización que se transmiten e interpretan muchas de las señales generadas por los niveles de azúcares.

1.3.1 Inducción de la expresión de genes mediada por azúcares

Las altas concentraciones de azúcares en el interior de la célula, inducen la expresión de genes implicados en el almacenamiento de carbohidratos y proteínas, en el metabolismo de la sacarosa, en la defensa ante el ataque de patógenos y en el metabolismo secundario.

La aplicación de azúcares en hojas y pecíolos escindidos de la batata (*Ipomoea batatas*) induce la expresión de los genes que codifican para la esporamina A y la β -amilasa, los cuales, participan en el almacenamiento de azúcares en la raíz (Nakamura *et al.*, 1991).

Diversos genes involucrados en el metabolismo de la sacarosa, particularmente la sacarosa sintasa y la invertasa, están rigurosamente regulados por azúcares. El gen que codifica para la sacarosa sintasa (*SUS*), se regula positivamente por altas concentraciones de glucosa en distintas especies como la papa (*Solanum tuberosum*), el arroz (*Oryza sativa*), el haba (*Vicia faba*) y en *Chenopodium rubrum* (Karrer y Rodríguez, 1992; Heim *et al.*, 1993; Godt *et al.*, 1995). Un estudio del perfil transcriptómico en *Arabidopsis* reveló que la sacarosa regula positivamente los niveles de los transcritos de diversos genes que participan en la biosíntesis de antocianinas, incluyendo a los que codifican para las enzimas fenilalanil-amonio liasa (*PAL*), chalcona sintasa (*CHS*), chalcona isomerasa (*CHI*), dihidroflavonol reductasa (*DFR*) y de un factor transcripcional encargado de regular la vía de síntesis de antocianinas, denominado *PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1* (*PAP1*) (Solfanelli *et al.*, 2006). Cuando ocurre un aumento en los niveles endógenos de azúcares se induce la expresión de genes asociados con la captación y fijación del nitrógeno. En plantas de *Arabidopsis* adaptadas a la oscuridad, la disponibilidad de sacarosa es capaz de reemplazar el suministro de luz necesario para inducir la acumulación del transcrito de la enzima nitrato reductasa (*NR1*) (Cheng *et al.*, 1992). Por otro lado, el suministro de sacarosa, durante períodos prolongados de oscuridad, es capaz de inducir la expresión de un par de transportadores de nitrato en raíz (Lejay *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que los azúcares actúan en diversos pasos en el proceso de asimilación del nitrógeno y viceversa (Lejay *et al.*, 1999).

1.3.2 Represión de genes mediada por azúcares

En las células fotosintéticamente activas, cuando el suministro de sacarosa es superior a la demanda de fuente de carbono por parte de las células consumidoras se induce la represión de diversos genes que participan en el proceso de la fotosíntesis, como un mecanismo de control por retroalimentación. Una serie de ensayos de expresión transitoria en protoplastos de mesófilo de maíz (*Zea mays*) demostró que, en presencia de azúcares, se reprime de manera específica la actividad transcripcional de diversos genes fotosintéticos como *CAB* (*CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN*) y de la subunidad menor de la ribulosa bifosfato carboxilasa (*rbcS*; *ribulose biphosphate carboxylase Small subunit*) (Sheen, 1990). En cultivos celulares de *C. rubrum* disminuye el nivel de transcrito del gen *rbcS*, en presencia

de altas concentraciones de glucosa (Krapp *et al.*, 1993). En *Arabidopsis*, los azúcares reprimen la expresión de los genes *rbcS* y de la plastocianina (*PC*; *Plastocyanin*), de manera completamente independiente de la luz (Dijkwel *et al.*, 1996).

Por otra parte, las altas concentraciones de azúcares también reprimen a una gran variedad de genes implicados en la removilización de reservas de fuente de carbono, como el almidón, y del catabolismo de lípidos. Durante el proceso de germinación y el desarrollo temprano de la plántula en *Arabidopsis*, los lípidos almacenados en la semilla se convierten en sacarosa y se transportan al embrión para proporcionar energía e intermediarios metabólicos, para el posterior desarrollo y crecimiento de la planta, donde el ciclo del glioxilato desempeña un papel crucial. Se ha demostrado que, en células de pepino (*Cucumis sativa*), la inducción de la expresión de los genes que codifican para las enzimas malato sintasa (*MS*) e isocitrato liasa (*ICL*), se puede revertir mediante la adición de sacarosa o glucosa al medio (Graham *et al.*, 1994).

En cereales, durante el proceso de germinación y el desarrollo temprano de la planta, el escutelo, la aleurona y el endospermo, actúan como una fuente de carbono no fotosintética. La enzima α -amilasa secretada por la aleurona y el escutelo se encarga de degradar el almidón almacenado en el endospermo a azúcares más simples, los cuales se transportan posteriormente hacia el embrión (Thomas y Rodríguez, 1994). La expresión del gen de la α -amilasa (*α -Amy*) en arroz, se induce por giberelinas y bajas concentraciones de azúcares, y se reprime cuando los niveles de glucosa y sacarosa aumentan (Yu *et al.*, 1991). También se ha reportado que los azúcares metabolizables, como la glucosa, reprimen la expresión del gen *α -AMY* en embriones de arroz y cebada (Perata *et al.*, 1997; Umemura *et al.*, 1998).

1.4 Los azúcares como moléculas señalizadoras

Los azúcares modulan diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, mediante la regulación de la expresión de una gran variedad de genes. La manera mediante la cual, los azúcares son capaces de inducir cambios en la expresión de genes no está del todo clara y, además, no en todos los casos se conoce la molécula que desencadena la cascada de señalización (Gibson, 2005). A pesar de que la sacarosa y la glucosa parecen detectarse de manera directa por diversos sensores, en algunos casos, otros tipos de azúcares, como la trehalosa o algún metabolito derivado de la glucosa, pueden ser los verdaderos desencadenantes de la cascada de señalización (Gibson, 2005). Diversos estudios han demostrado que la trehalosa-6-fosfato (T6P) participa en el control de algunas

de las respuestas a azúcares en plantas (Eastmond *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha sugerido que muchas de las respuestas en realidad dependen de los cambios en la relación C:N presentes en la planta (Coruzzi *et al.*, 2001). En diversos estudios se han utilizado una gran variedad de análogos metabolizables y no metabolizables de la glucosa y sacarosa para tratar de averiguar cuál de estas moléculas, y cuáles de los pasos de su metabolismo y transporte dentro de las células, se perciben como señales por parte de la planta. Sin embargo, existen diversos problemas potencialmente significativos asociados con el uso de los análogos de la glucosa y sacarosa en la caracterización de las vías de señalización en respuesta a azúcares, como son el estrés osmótico, el agotamiento del fosfato disponible en la célula y las fluctuaciones en la relación C/N (Gibson, 2005).

En las últimas décadas se han identificado diversos componentes que participan en las vías de señalización por azúcares en *Arabidopsis*. Estos avances se han logrado principalmente utilizando dos estrategias. La primera consiste en el uso de genes reporteros fusionados a la región promotora de un gen, cuya expresión se encuentra regulada por azúcares, este método fue empleado para identificar diversas mutantes como *sucrose uncoupled (sun)* (Dijkwel *et al.*, 1996), *reduced sucrose response (rsr)* (Martin *et al.*, 1997) e *impaired sucrose induction (isi)* (Rook *et al.*, 2001), las cuales mostraron una alteración en la expresión del gen reportero en respuesta a azúcares. La segunda estrategia se basa en el hecho de que las plantas tipo silvestre de *Arabidopsis*, son incapaces de germinar en presencia de altas concentraciones de azúcares (principalmente glucosa, a una concentración de 300 mM). Con base en este fenotipo, se han aislado y caracterizado diversas mutantes capaces de germinar y desarrollarse en medio con altos niveles de azúcares, tales como *glucose insensitive (gin)* (Zhou *et al.*, 1998), *sugar insensitive (sis)* (Laby *et al.*, 2000), *mannose insensitive germination (mig)* (Pego *et al.*, 2000) y *sucrose insensitive growth (sig)* (Pego *et al.*, 2000), entre otras. Por otro lado, esta misma estrategia ha servido para identificar a diversas mutantes con una mayor sensibilidad a los azúcares, comparadas con plantas del tipo silvestre como *glucose supersensitive (gss)* (Pego *et al.*, 2000), *sucrose super sensitive (sss)* (Pego *et al.*, 2000) o *pleiotropic regulatory locus1 (pr1)* (Nemeth *et al.*, 1998).

1.4.1 El efecto de la sacarosa en la expresión de genes

El hecho de que la sacarosa sintasa o la invertasa pueden catalizar la hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa, dificulta distinguir la señalización específica de la sacarosa de la derivada de las hexosas. Sin embargo, diversos experimentos han evidenciado que la

sacarosa se percibe por las células a través de un mecanismo distinto del que se utiliza para detectar a las hexosas (Chiou y Bush, 1998; Rolland *et al.*, 2006). Se ha reportado que la sacarosa reprime los niveles del transcrito de un gen que codifica para un transportador de sacarosa y protones del tipo “*simporter*” en remolacha (*Beta vulgaris*) y, además, el efecto de la sacarosa en la expresión del gen no se replica por el suministro de concentraciones equimolares de sorbitol o hexosas (Chiou y Bush, 1998). Por otra parte, la adición de manoheptulosa, un inhibidor de la actividad de la hexocinasa, no fue capaz de abolir el efecto de la sacarosa, este dato indica que la vía de señalización en respuesta a sacarosa no requiere de la participación de hexocinasa como sensor (Chiou y Bush, 1998). En *Arabidopsis*, la expresión de un factor transcripcional de la familia bZIP, denominado ATB2, se reprime a nivel traduccional por la presencia de concentraciones fisiológicas de sacarosa. Este efecto no se produce al utilizar concentraciones equimolares de glucosa, fructosa, maltosa, lactosa o rafinosa (Rook *et al.*, 1998). Además, se ha reportado que en la región 5' UTR (“*Unstralated Region*”) del gen ATB2, existe una secuencia altamente conservada que es esencial para que ocurra la respuesta de represión en presencia de sacarosa (Wiese *et al.*, 2004). Otro gen que codifica para el factor transcripcional de la familia bZIP, denominado *AtbZIP2*, posee la misma secuencia altamente conservada, y también se regula negativamente a nivel traduccional por la presencia de sacarosa, lo cual indica que existe una vía de señalización por sacarosa encargada de regular la traducción de diversos factores de transcripción de la familia bZIP (Wiese *et al.*, 2004).

1.4.2 La trehalosa y Trehalosa-6-fosfato como moléculas señalizadoras

La biosíntesis de la trehalosa, un disacárido no reductor que se encuentra en muy bajas concentraciones en el interior de la célula, requiere de la participación de dos enzimas clave, la trehalosa-6-fosfato sintasa (*TPS*) y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (*TPP*). Por una parte, la TPS cataliza la formación de trehalosa-6-fosfato (T6P) a partir de una molécula de UDP-glucosa y otra molécula de glucosa-6-fosfato (G6P). Mientras que, la TPP es la encargada de desfosforilar a la T6P produciendo trehalosa. A su vez, la trehalosa puede ser metabolizada en dos moléculas de glucosa por una trehalasa (Ramon y Rolland, 2007). El genoma de *Arabidopsis* cuenta con 11 posibles genes que codifican para TPS y 10 para TPP (Leyman *et al.*, 2001). Se ha reportado que en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), la síntesis de trehalosa regula el flujo de glucosa en el proceso de la glucólisis. Mientras que la T6P, actúa como un regulador inhibiendo la actividad de la enzima hexocinasa (Thevelein y Hohmann, 1995). Además, se evidenció que plántulas de *Arabidopsis*

expuestas a altas concentraciones de trehalosa (25 mM) presentaron una reducción en la elongación de la raíz y un incremento en los niveles de almidón en los brotes, sin que éstos afectaran los niveles de azúcares solubles. Asimismo, se detectó un aumento en los niveles de actividad de la enzima AGPasa (ADP-glucosa pirofosforilasa) y un incremento en la expresión del gen *ApL3* (el cual codifica para la subunidad mayor de la ADP-glucosa fosforilasa), las cuales catalizan el paso limitante en la síntesis de almidón (Wingler *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que la adición de trehalosa promueve la acumulación de T6P, lo cual inhibe el proceso de crecimiento en ausencia de otros azúcares metabolizables (Schluepmann *et al.*, 2004). Estos resultados coinciden con lo observado en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan el gen que codifica para la TPS, las cuales presentaron altos niveles de T6P y almidón, aunado a un incremento en la actividad AGPasa (Kolbe *et al.*, 2005). Por otro lado, la sobre-expresión del gen que codifica para la TPP en plantas transgénicas, provocó un decremento en los niveles de T6P e impidió la activación de la AGPasa, aún en presencia de sacarosa o trehalosa (Kolbe *et al.*, 2005). Un aumento en los niveles de azúcares y T6P en *Arabidopsis*, inducen la actividad redox de la AGPasa, lo cual sugiere que la T6P es capaz de actuar como una señal metabólica implicada en la percepción de los niveles de fuente de carbono presentes en la célula (Lunn *et al.*, 2006). Un gran número de análisis por microarreglos, han demostrado que la disponibilidad de los azúcares y los niveles de nitrógeno en la célula, son importantes en la regulación de los genes que codifican para las enzimas TPS y TPP (Wang *et al.*, 2003; Contento *et al.*, 2004, Price *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha demostrado que la trehalosa es capaz de actuar como protector ante distintos tipos de estrés en diversas especies de plantas y levaduras. En *Arabidopsis*, la sobreexpresión del gen *AtTPS1*, aumenta los niveles de T6P presentes en la planta, que se correlacionan con un incremento en los niveles de trehalosa, lo cual aumenta la tolerancia a sequía y disminuye la sensibilidad a altas concentraciones de glucosa durante el desarrollo temprano de la planta. Además de permitir la germinación en presencia de concentraciones inhibitorias de ABA (Avonce *et al.*, 2004). Sin embargo, debido a la ausencia de altas concentraciones de trehalosa en las plantas, se le atribuye a la T6P el papel de fungir como una molécula señal que induce la respuesta de tolerancia ante distintos tipos de estrés, en lugar de la capacidad osmoprotectora de la trehalosa (Gibson, 2005).

1.4.3 El papel de la glucosa en la regulación de la expresión de diversos genes

La glucosa actúa como una molécula señalizadora en la regulación de la expresión génica y en los procesos de crecimiento y desarrollo. La identificación y caracterización de un gran número de genes implicados en la percepción y señalización por glucosa, como la hexocinasa1 (HXK1), RGS1 (un regulador negativo de la actividad de la proteína G) y la SnRK1 (Sucrose non-fermenting Related Protein1) han facilitado la comprensión de los mecanismos de señalización por azúcares en plantas (Rolland *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007).

Price y colaboradores (2004) determinaron el efecto de la glucosa en los perfiles transcripcionales de plántulas de *Arabidopsis*, y encontraron que en presencia de glucosa (150 mM), se indujo la acumulación de 444 genes mientras que disminuyó la acumulación de 534. Estos genes se encuentran involucrados en diversos procesos como la fotosíntesis, el metabolismo de nitrógeno, lípidos, carbohidratos, la síntesis de hormonas, la transducción de señales, el transporte de metabolitos a través de membranas, así como la regulación de genes implicados en la utilización de otras fuentes de carbono.

1.5 Vías de señalización por glucosa en plantas

1.5.1 La HXK1 actúa como un sensor de glucosa en plantas

En muchos organismos, las hexocinasas actúan como sensores de azúcares y se encuentran conservados en las plantas (Rolland *et al.*, 2006). Además de su actividad catalítica en la vía de glucólisis (donde se encarga de transferir un grupo fosfato desde una molécula de ATP a una hexosa), se ha determinado que la HXK1 es capaz de percibir los niveles de hexosas presentes en las células, y desencadenar un tipo de respuesta acorde a éstos (Xiao *et al.*, 2000; Smeeckens *et al.*, 2009). Por lo tanto, se reconoce a esta enzima como un sensor de hexosas, principalmente de glucosa. Además, se ha evidenciado que la HXK1 también actúa como un sensor de glucosa en las mitocondrias, independientemente de su papel en la glucólisis. Desde la década de los 70's, se estableció que la enzima HXK2 de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), participa en la represión de genes mediada por glucosa (Rolland *et al.*, 2000).

La participación de la HXK1 como sensor de glucosa está sustentada por tres enfoques distintos. El primero de ellos se basa en el hecho de que se necesita que la molécula de glucosa sea fosforilada para que se perciba como una señal (Smeeckens, 2000; Loreti *et al.*, 2000). En segundo lugar, la represión por glucosa se revierte por la inhibición de la

expresión de la HXK1 en líneas transgénicas de *Arabidopsis*, mientras que, las líneas transgénicas que sobre-expresan HXK1 son hipersensibles a glucosa (Jang *et al.*, 1997). En tercer lugar, líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan a la *YHXK2* (un heterólogo de HXK1 que posee actividad catalítica, y además actúa como un sensor en levadura), mostraron una actividad de fosforilación similar al de las líneas sobre-expresoras de la HXK1, pero no fueron capaces de fenocopiar el efecto de hipersensibilidad a glucosa, por lo cual se concluyó que la HXK1 desempeña un papel específico como sensor de glucosa (Jang *et al.*, 1997; Smeekens, 2000). La HXK1 es capaz de translocarse al núcleo donde interactúa con la subunidad B del complejo V_1 de la H^+ -ATPasa vacuolar (VHA-B1) y con la partícula reguladora de la subunidad 19S del proteasoma (RPTB5), para formar un complejo que regula transcripcionalmente la expresión de los genes fotosintéticos *CAB2* y *CAB3*, mediante la unión del complejo a la región promotora de estos genes (Cho *et al.*, 2006).

Con base en la participación de la HXK1 en la regulación de la expresión de diversos genes en presencia de glucosa, Xiao y colaboradores (2000), propusieron la existencia de tres vías distintas de respuesta a glucosa en *Arabidopsis*. La primera es la vía dependiente de HXK1-independiente de glucólisis, la cual propone que la hexocinasa actúa como un sensor; la segunda es la vía HXK1-dependiente de glucólisis, ésta involucra el papel metabólico de la hexocinasa y, por último, la vía independiente de la HXK1 (Figura 1).

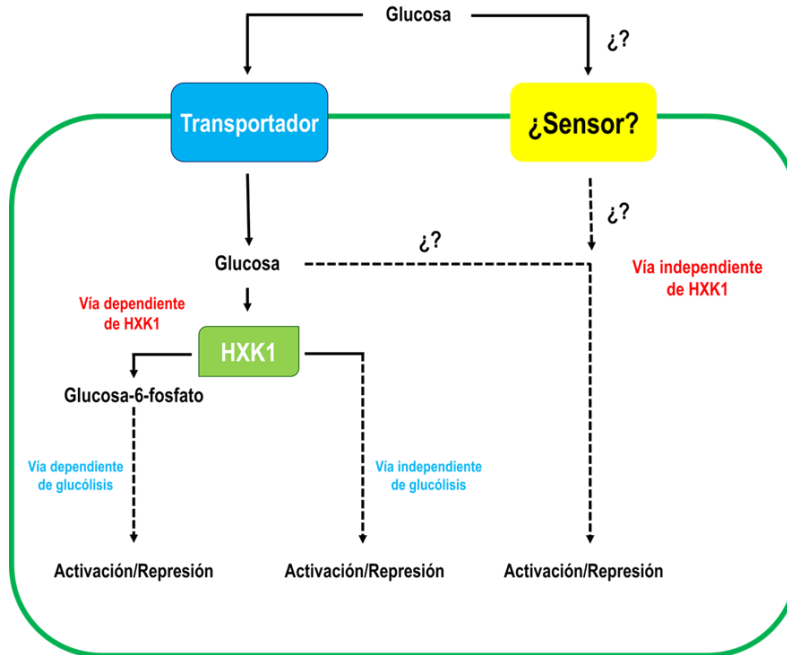


Figura 1. Diferentes vías de señalización por glucosa en plantas (Basado en Xiao y colaboradores, 2000).

1.5.2 Vía dependiente de HXK1-independiente de glucólisis

En esta vía, la expresión de diversos genes está regulada por la actividad como sensor de HXK1, independientemente de su actividad catalítica. Esto se demostró mediante la sobre-expresión de *YHXK2*, un heterólogo de la HXK1 en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), el cual no tuvo ningún efecto en la expresión de diversos genes fotosintéticos (Xiao *et al.*, 2000). De igual forma, un ensayo de expresión transitoria en protoplastos de maíz, demostró que la reducción de la expresión de varios genes que participan en la fotosíntesis como CAB, *rbcS* y la subunidad δ de la ATPasa de tilacoide (*atp- δ*) está relacionada con las bajas concentraciones de glucosa (1-10 mM), y no con los niveles de la glucosa en su forma fosforilada, la glucosa-6-fosfato (G6P) (Jang y Sheen, 1994). Por otro lado, se ha demostrado otros tipos de azúcares como la fructosa, la manosa o la 2-desoxiglucosa (2-DGlc) las cuales también son fosforiladas por HXK1, pueden provocar la represión de varios genes (Jang y Sheen, 1994). La 2-DGlc es un análogo de la glucosa que se transporta al interior de la célula y posteriormente se fosforila por la HXK1, generando 2-desoxiglucosa-6-fosfato, el cual no es metabolizable por la vía de la glucólisis. Por otro lado, este tipo de inhibición puede bloquearse por la manoheptulosa, un inhibidor competitivo de la actividad de la HXK1 (Jang y Sheen, 1994). Contrario a ésto, una gran variedad de azúcares que no pueden ser transportados al interior de las células, como la L-glucosa, o aquéllos que no pueden ser fosforilados por la HXK1 (como 6-desoxiglucosa y 3-O-metilglucosa), o algunos

intermediarios de la glucólisis (gliceraldehído-3-fosfato, fosfoenolpiruvato o piruvato), no causan este tipo de represión (Jang y Sheen, 1994).

Por esta vía se regula la expresión de diversos genes relacionados con procesos fotosintéticos, como *CAB* y *PC* (*Plastocyanin*), y con el metabolismo del nitrógeno como *NR1* (*Nitrate reductase 1*), entre otros (Rolland *et al.*, 2006). El posterior aislamiento y caracterización de la mutante insensible a glucosa *gin2* (*glucose insensitive 2*) en *Arabidopsis* estableció la importancia de la HXK1 en la señalización por glucosa (Moore *et al.*, 2003).

1.5.3 Vía dependiente de HXK1-dependiente de glucólisis

El análisis de los patrones de expresión de los genes *PR1* y *PR5* (*Pathogen-Related1* y *5*), cuya expresión está regulada positivamente por la presencia de glucosa, en líneas sobre-expresoras de la *HXK1* (*p35S::AtHXK1*), demostró que en presencia de glucosa había una mayor expresión de los genes *PR* en comparación con plantas del tipo silvestre. Mientras que, en líneas silenciadas de la *HXK1* (*p35S::antiAtHXK1*) no hubo expresión de tales genes en presencia de glucosa, lo cual indica que es necesaria la participación de la *HXK1* para la inducción de estos genes (Xiao *et al.*, 2000). Por otra parte, el análisis de líneas transgénicas que expresaban a un gen heterólogo de *HXK1* proveniente de levadura (*Saccharomyces sp.*), denominado *YHXK2* (el cual posee actividad catalítica, pero carece de la función sensora de *HXK1* en plantas), demostró que había un aumento en la expresión de los genes *PR* en presencia de glucosa, cuando estos eran comparados con plantas del tipo silvestre (Xiao *et al.*, 2000) demostrando que se requiere la actividad catalítica de la *HXK1*, y sugiriendo que alguno de los metabolitos intermediarios en la glucólisis como la glucosa 6-P (Toroser *et al.*, 2000) o el acetato (Sheen *et al.*, 1990) podrían actuar como las señales desencadenadas por la presencia de azúcares.

1.5.4 Vía independiente de HXK1

El efecto de la glucosa en la expresión de los genes que codifican para las enzimas *AGPasa*, *CHS* (Chalcona sintasa), *PAL* (Fenilalanina amonio-liasa) y *ASN1* (Asparagina sintasa), resulta ser similar entre plantas de *Arabidopsis* del tipo silvestre y diversas mutantes, en líneas sobre-expresoras y líneas silenciadas del gen de la *HXK1*, en *Arabidopsis* (Xiao *et al.*, 2000; Ramon *et al.*, 2008), indicando que este efecto es completamente independiente de la *HXK1*. Esta vía agrupa a otras en las que no interviene la actividad como sensor o catalítica de la *HXK1*, pero en la que están involucrados diversos

factores como cinasas del tipo SnRK1 (Sucrose non Fermenting related protein Kinase1), el complejo TOR (Target Of Rapamycin) y proteínas G, entre otros componentes (Rolland *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007).

1.6 Los componentes de las vías de señalización por glucosa en plantas

El análisis de la regulación de las señales por glucosa, ha resultado ser todo un reto, debido a lo complicado que resulta separar el metabolismo de la glucosa con los mecanismos de percepción y señalización de la glucosa. En las plantas, la señalización por glucosa comienza cuando la molécula es percibida como una señal por una proteína que actúa como sensor, el cual, al recibir la señal, propicia una cascada de reacciones que modulan la expresión de una gran variedad de genes que actúan en diversos procesos mediante la participación de diversas proteínas reguladoras. Estas proteínas pueden servir como activadores o represores de la expresión de algún gen o grupo de genes en particular. Durante la última década, se han comenzado a desentrañar la amplia gama de funciones y acciones que desempeñan los tres reguladores maestros: HXK1, SnRK1 (KIN10/11) y TOR en *Arabidopsis*.

1.6.1 SnRK1 (Sucrose non-fermenting Related protein Kinase1)

Las proteínas cinasas de levadura SNF1 (*Sucrose Non-Fermenting 1*) y sus ortólogos en mamíferos, AMPK (*AMP-Activated protein Kinase*), y en plantas, SnRK1 (*SNF1 Related Kinase 1*), representan una subfamilia de cinasas de Ser/Thr altamente conservadas a través de la evolución (Baena-Gonzalez y Sheen, 2007). SnRK1 presenta la misma función que sus homólogos en levadura y mamíferos: inducir la expresión de genes que están reprimidos por la presencia de glucosa, mediante la fosforilación, en ausencia de glucosa, de enzimas que participan en diversos procesos metabólicos, para cubrir el suministro y demanda de energía (Halford *et al.*, 2002). En respuesta a estrés metabólico, estas cinasas se encargan de reprimir las vías anabólicas y activar vías catabólicas a través de la regulación de la expresión génica, o de la fosforilación de enzimas clave (Jossier *et al.*, 2009). En plantas, SnRK1 actúa como un integrador de las señales de estrés y energía, provocando un cambio en la transcripción de diversos genes, y controlando el crecimiento y desarrollo de la planta. Se ha demostrado que la glucosa-6-fosfato (G6P) puede bloquear la actividad de SnRK1; esto es consistente con represión de la actividad de algunos de sus genes blanco por glucosa en plántulas y células de la hoja. Por otro lado, se ha demostrado

que la actividad de SnRK1 es inducida por sacarosa, bajas concentraciones de glucosa y períodos prolongados de oscuridad o ayuno (Smeekens *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

En respuesta a bajos niveles de energía en *Arabidopsis*, SnRK1 induce la expresión de cerca de 300 genes relacionados con la removilización de nutrientes, para proporcionar fuentes alternativas de energía a través del catabolismo de aminoácidos, sacarosa, almidón y lípidos (Baena-Gonzalez y Sheen, 2007). La actividad de SnRK1 desencadena la inducción coordinada de genes que codifican para las enzimas fosfoenolpiruvato carboxicinasa (*PEPCK*), piruvato fosfato di-cinasa (*PPDK*), piruvato cinasa (*PK*), glutamato deshidrogenasa (*GDH*) y asparagina sintetasa (*ASN1*; también conocida como *DARK-INDUCED 6*). Se ha sugerido que estos genes forman parte de un ciclo que se encarga de generar asparagina para removilizar el nitrógeno sin gastar tanta energía en condiciones de oscuridad, estrés y privación de nutrientes (Baena-Gonzalez y Sheen, 2007).

1.6.2 TOR (Target of Rapamycin)

TOR (Target of Rapamycin) es una cinasa de proteínas excepcionalmente grande (2481 aa), con múltiples repeticiones y dominios reguladores en el extremo N-terminal y un dominio cinasa en Ser/Thr hacia el extremo C-terminal. Forma parte de un complejo proteínico altamente conservado en levaduras, plantas y mamíferos. TOR actúa percibiendo los niveles de glucosa y, en base a ellos, realiza cambios en la transcripción global de genes involucrados en diversos procesos metabólicos (Smeekens *et al.*, 2009).

En eucariotas, la percepción de nutrientes y las señales de los factores de crecimiento conducen a la activación de la vía de señalización por TOR, la cual controla el crecimiento, desarrollo y senescencia (Smeekens *et al.*, 2009). En levadura y mamíferos, TOR forma dos complejos estructurales y funcionales TORC1 (TOR Complex 1) y TORC2 (TOR Complex 2). Estos complejos comparten algunos componentes en común, aunque reclutan y regulan diversos sustratos para controlar una gran variedad de procesos biológicos como: la regulación de la biogénesis de ribosomas, el inicio de la traducción y la inducción del metabolismo primario. Actualmente, no se conoce la composición exacta de estos complejos en plantas (Xiong *et al.*, 2003). Sin embargo, algunos de los componentes y efectores de mTORC1 (mammalian TOR Complex 1), han sido identificados en *Arabidopsis*, por similitud de secuencias (Xiong *et al.*, 2003). La función de TOR en la conexión entre la disponibilidad de nutrientes y energía con otras señales ambientales, para coordinar el crecimiento, desarrollo y supervivencia está altamente conservada en plantas, levaduras y

animales (Baena-González y Sheen, 2007). Aunado a esto, se ha determinado que, los niveles de mayor expresión de TOR se presentan durante el estado embrionario y que la actividad de TOR es esencial para llevar a cabo los procesos de reprogramación del transcriptoma, activación del meristemo de la raíz y el desarrollo de la planta en general (Xiong *et al.*, 2003).

Diversos avances han revelado que TOR se activa por glucosa y auxinas, y participa en la regulación del desarrollo y crecimiento de la planta, como es en el caso de la floración, y en el proceso de senescencia. Al parecer esta regulación ocurre mediante la modulación de la traducción, la transcripción, la autofagia y el metabolismo (Deprost *et al.*, 2007). La inhibición parcial de la actividad de TOR ocasiona una expresión limitada de genes, lo cual se corroboró a través de un análisis metabolómico a gran escala, en el que se detectó la acumulación de ciertos metabolitos. Se sabe que la reducción de la expresión de la actividad cinasa de TOR, o una mutación en uno de los genes identificados del complejo, denominado *LST8-1 (LETHAL WITH SEC-13 PROTEIN8)*, ocasionan un retraso en el crecimiento y presentan acumulación de almidón, lípidos, aminoácidos, intermediarios del ciclo de Krebs y de ciertos metabolitos secundarios (Moreau *et al.*, 2012). Una deficiencia parcial en la actividad de TOR, reduce la expresión de genes involucrados en varios procesos anabólicos, pero activa a varios genes que participan en procesos catabólicos como la respuesta a estrés y patógenos (Deprost *et al.*, 2007; Caldana *et al.*, 2013; Sheen, 2014).

La vía de señalización de glucosa por TOR activa distintos genes relacionados con la glucólisis, ciclo de Krebs, cadena de transporte de electrones de la mitocondria y síntesis de proteínas ribosomales. Lo cual sugiere que TOR es un regulador maestro altamente conservado en plantas, que actúa en el control de la traducción y en el metabolismo de carbono (Deprost *et al.*, 2007; Caldana *et al.*, 2013; Sheen 2014).

1.7 La regulación a nivel transcripcional

Las plantas, como organismos multicelulares han desarrollado complejos patrones de expresión génica que varían a lo largo de su ciclo de vida y en respuesta a diversas señales de su entorno. El control transcripcional es el mecanismo más importante mediante el cual se regulan los niveles, condiciones y ubicación en los que se expresa un determinado gen (Gaston y Jayamaran, 2003; Silva-Porto *et al.*, 2013).

Por definición, un promotor es el principal modulador de la regulación génica. Este comprende la región 5' localizada por arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS: *Transcription Start Site*) de un gen, y contiene los sitios de unión de los complejos de RNA polimerasas requeridos para la transcripción (Silva-Porto *et al.*, 2013).

Los promotores constan de dos regiones denominadas proximal y distal (Figura 2). La región proximal está formada por una zona que abarca desde -250 a +250 pb adyacentes al TSS, y contiene una secuencia continua de DNA denominada "núcleo del promotor", localizada entre las posiciones -35 a +35 con respecto al TSS, la cual es necesaria para guiar el inicio del proceso de transcripción de manera eficiente. Generalmente, el núcleo contiene una secuencia consenso rica en Timina y Adenina denominada caja TATA (5' *TATANAA* 3'), localizada en la posición -30 a -25 con respecto al TSS, la cual es reconocida por una subunidad del factor de transcripción general TF_{II}D, denominada TBP (*TATA-binding protein*), que facilita la formación del complejo de pre-iniciación (Butler y Kadonaga, 2002). Para el caso de aquellos genes que no poseen la secuencia TATA (como los genes de *housekeeping*), utilizan en su lugar diversas secuencias como *CAAT-box* (5' *CC(CT)ACCTCT* 3'), *GC-box* (5' *GGGCGG* 3'), o algunas secuencias distales específicas (SDE) en cualquier caso, TBP siempre está involucrado (Butler y Kadonaga, 2002; Silva-Porto *et al.*, 2013). Ocasionalmente, arriba de la caja TATA, se encuentra un motivo denominado BRE (*TG_{II}B recognition element*), el cual facilita la unión de TF_{II}B al núcleo del promotor (Butler y Kadonaga, 2002). Aproximadamente 30 nucleótidos por abajo del sitio de inicio de la transcripción, se localiza otro elemento denominado DPE (*Downstream Promoter Element*) reconocido por un factor asociado a TBP, llamado TAF (*TBP-associated factor*), cuya función es mejorar la unión de TBP al promotor (Juven-Gershon y Kadonaga, 2010).

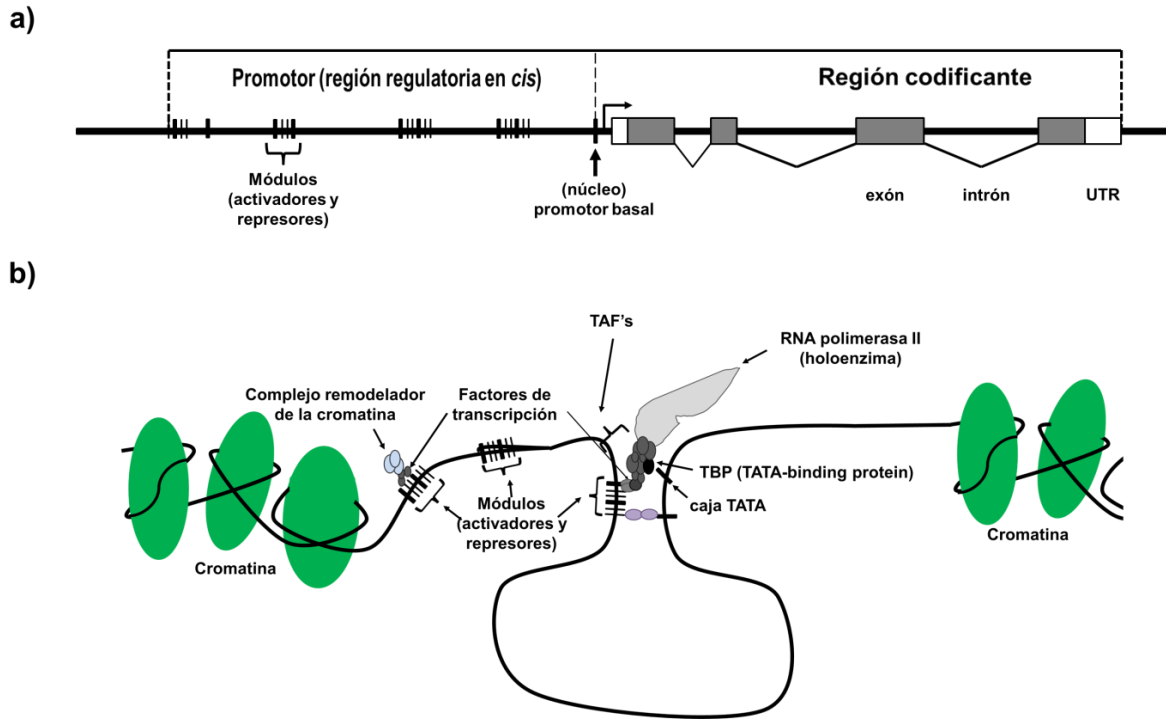


Figura 2. Estructura y función de un gen y su región regulatoria. a) Estructura general de un gen eucariota, se muestra la posición relativa de la región codificante, del promotor basal y los sitios de unión de factores transcripcionales (barras verticales). La posición de los sitios de unión de diversos factores transcripcionales es distinta para cada gen. b) Proceso de transcripción. La transcripción comienza con la formación del PIC (*Pre-Initiation Complex*), el cual incluye a la RNA polimerasa II, la proteína de unión a la caja TATA (TBP), de los factores de transcripción asociados a TBP (TAF's). Por otra parte, también se requiere de la participación de diversos factores de transcripción que se unen a la región regulatoria del gen para modular su expresión, y de los complejos remodeladores de la cromatina, los cuales permiten que la localización en la cual se encuentra un determinado gen, se vuelva más accesible para la maquinaria basal de la transcripción (Modificado de Wray y colaboradores, 2003).

La transcripción de un gen empieza con la formación de un complejo de iniciación que se compone de la RNA polimerasa II (RNA pol II) y los factores de transcripción en la región promotora cerca de la caja TATA. Esta región es esencial para el posicionamiento correcto y para la orientación del complejo de pre-iniciación (*PIC: Pre-Initiation Complex*). Este proceso consiste en la unión de la RNA pol II a los factores transcripcionales basales del complejo TF_{II}D, incluyendo a TBP, y además de los factores asociados a TBP, denominados TAF's (*TBP Associated Factors*); en seguida se unen los demás factores transcripcionales generales denominados TF_{II}A, TF_{II}B, TF_{II}F, TF_{II}E y TF_{II}H.

Por otro lado, al complejo PIC también se pueden unir otros factores transcripcionales que interactúan de manera específica con los elementos regulatorios en *cis* (*CRE: Cis*

Regulatory Elements) presentes en los promotores de sus genes blanco, los cuales pueden situarse incluso a grandes distancias, con respecto a la posición de los genes que regulan, en un intervalo que puede abarcar desde 200 pb hasta decenas e incluso centenas de kb. Estos factores, se requieren para la expresión de un gen de manera tejido-específica, o para su regulación temporal, y se clasifican en activadores si incrementan la expresión de un determinado gen, o en represores, si se encargan de disminuirla (Juven-Gershon y Kadonaga, 2010). Los mecanismos que permiten que los elementos distales se aproximen al promotor para modular la expresión génica durante la transcripción, implican el plegamiento del ADN mediado por cambios conformacionales en la estructura tridimensional del ADN y la cromatina (Hernandez-Garcia y Finer, 2013).

En algunos casos, los promotores no necesariamente actúan de manera individual, y la transcripción de un gen se incrementa o disminuye significativamente por diversos elementos, localizados incluso a grandes distancias con respecto al TSS del gen que regulan, y que se consideran como parte del núcleo del promotor. Los elementos que conforman la región distal del promotor y participan en la regulación espacio-temporal del gen, se conocen como “activadores” (enhancers) (cuando se encargan de promover la expresión del gen), o como “silenciadores” (cuando participación en la represión del gen) (Butler y Kadonaga, 2002). Los activadores son secuencias de entre 100 a 200 pb que pueden estar localizadas a cientos e incluso miles de pb por arriba o por abajo del TSS e incluso se han encontrado en intrones (He *et al.*, 2010). A diferencia del elemento TATA-box, los activadores no requieren tener una posición fija o establecida con relación al promotor y, por lo tanto, pueden operar en las dos direcciones (Figura 2) (Butler y Kadonaga, 2002; He *et al.*, 2010).

La regulación de los genes eucarióticos se basa principalmente en la modulación del complejo de la RNA pol II, por medio de interacciones específicas con los distintos factores transcripcionales. Cuando el complejo se une a la región promotora de un determinado gen, su composición puede cambiar en respuesta a diversos factores y señales exógenas y endógenas. De esta forma es posible formar un gran número de combinaciones posibles, capaces de regular y coordinar la expresión de diversos genes, ante determinadas condiciones. Por lo tanto, un factor de transcripción es capaz de modular la expresión de distintos genes en respuesta a los estímulos percibidos por la planta. Los factores transcripcionales también están sometidos a regulación por diversos mecanismos, entre los

cuales se encuentran la autorregulación, modificaciones post-traduccionales, degradación mediada por el proteasoma y el transporte al núcleo (Butler y Kadonaga, 2002).

1.7.1 Control transcripcional mediado por azúcares

Las plantas, como organismos multicelulares, han desarrollado patrones complejos de expresión génica que varían a lo largo de su ciclo de vida, y en respuesta a diversas señales de su entorno. En los organismos eucariotas y procariotas, la represión de genes mediada por azúcares es un sistema regulador fundamental y ubicuo para ajustarse a los cambios en la disponibilidad de nutrientes. En microorganismos, los azúcares metabolizables como la glucosa y la sacarosa, reprimen la expresión de genes que codifican para enzimas relacionadas con el metabolismo de otras fuentes de carbono (Lu *et al.*, 1998; Rolland *et al.*, 2006).

Al igual que en microorganismos, en plantas la represión de genes por azúcares, permite hacer frente de manera efectiva a los cambios en las fuentes de carbono disponibles. Por otro lado, la represión de genes por un exceso en los niveles de azúcares, proporciona un mecanismo adicional para mantener un balance entre la producción y demanda de azúcares en diversos órganos y tejidos. Al paso de los años, se han reportado diversos genes que se regulan a nivel transcripcional por azúcares. A pesar de ello, se conoce muy poco acerca de los mecanismos que regulan dicha respuesta.

El primer elemento de respuesta a azúcares fue identificado en la región promotora de dos genes distintos que codifican para las proteínas esporamina y β -amilasa y está constituido por las secuencias 5' TTATCC 3', SP8a (5' ACTGTGCA 3') y SP8b (5' TACTATT 3') y se demostró que tal elemento es responsable de inducir la expresión de estos genes por sacarosa en la batata (Ishigo y Nakamura, 1994). Posteriormente, un análisis por eliminación de secuencias internas del promotor del gen β -Amy evidenció la presencia de una secuencia de 82 pb localizada entre las posiciones -901 a -820 pb, con respecto al sitio de inicio de la transcripción, que participa en la regulación positiva de dicho gen en presencia de azúcares. En esta región se localiza la secuencia 5' TGGACGG 3', la cual participa en la inducción de la expresión del gen en presencia de azúcares. La eliminación o sustitución de este elemento en el promotor del gen β -Amy, suprime el efecto de los azúcares en la inducción del gen (Maeo *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha comprobado que el factor transcripcional Spf1 es capaz de unirse a los elementos SP8a y SP8b y de actuar como un regulador negativo de la represión mediada

por sacarosa (Ishiguro y Nakamura, 1994). Sun y colaboradores (2003) identificaron a tres denominadas como: SUSIBA1 (SUgar Signaling in BArlley1), SUSIBA2 y SUSIBA 3, las cuales reconocen al elemento SP8a (Sun *et al.*, 2003). Al analizar la secuencia de la proteína SUSIBA2, fue posible identificar dos dominios WRKY altamente conservados, que comparten dos motivos de dedos de zinc, los cuales están involucrados en la unión de estas proteínas a los elementos en la secuencia de DNA. Se ha sugerido que el dominio WRKY, localizado hacia el extremo C-terminal, es el responsable de la unión de la proteína con el DNA, mientras que el otro dominio WRKY está involucrado en la interacción proteína-proteína (Sun *et al.*, 2003). Además, un ensayo de movilidad electroforética demostró que SUSIBA2 es capaz de unirse al elemento W-box (5' TGAC 3'), y a otros tres elementos de respuesta a azúcares denominados: SURE-a (SUgar Responsive Element-a), SURE-b y SURE-c que reconoce la secuencia 5' CACTT/CCA 3' (Sun *et al.*, 2003). Un análisis posterior de disección del gen para la esporamina A, el cual se induce por ABA y azúcares en la batata permitió reconocer un promotor mínimo (Spo^{min}) que contiene regiones que actúan negativamente y dos motivos de respuesta al metabolismo de carbohidratos (CMSRE; *Carbohydrate Metabolite Signal Responsive Elements*), denominados CMSRE-1 (5' TGGACG 3') y CMSRE-2, además del motivo SPa (Morikami *et al.*, 2005).

El análisis de las regiones promotoras de diversos genes que codifican para la enzima α -amilasa en cebada, trigo y arroz permitió identificar a las secuencias consenso AMYBOX1 (5' TAACARA 3') y AMYBOX2 (5' TATCCAT 3') involucradas en la represión del gen α -AMY3 en presencia de glucosa durante el proceso de germinación; así como a los elementos TACGTA, CGACG y CCTTT (Toyofuku *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2006). El análisis de la región promotora del gen α -AMY3 en arroz, permitió identificar a los elementos GC-box, G-box y TATCCA; los cuales participan en la represión de dicho gen por glucosa y que están contenidos dentro de una región denominada *secuencia SRS (Sugar Response Sequence)*, localizada entre las posiciones -186 y -8 pb antes del sitio de inicio de la transcripción (Lu *et al.*, 1998). Se ha demostrado que el elemento TATCCA, es capaz de interactuar con diversos factores transcripcionales del tipo MYB como MYBS1 y MYBS2, los cuales están implicados en la regulación de la transcripción de diversos genes en presencia de azúcares en arroz. Por otra parte, la expresión de estos genes, también se regula por los niveles de azúcares presentes; en presencia de altos niveles de glucosa disminuyen los niveles del transcrito de MYBS1, mientras que los de MYBS2 aumentan. Esto sugiere que existe un mecanismo que regula la expresión de estos factores transcripcionales, los cuales, a su vez, se encargan de modular la expresión de sus genes

blanco (Toyofuku *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002). Por otro lado, también se reportó que el elemento *TATCCA* participa en la respuesta a giberelinas (GA) del gen de la α -amilasa en arroz durante el proceso de germinación, lo que sugiere que la regulación de la expresión de dicho gen por azúcares y hormonas, pueden ocurrir por un mecanismo común (Lu *et al.*, 1998).

La secuencia central del elemento de unión a WRKY (*W-box*) está presente en la región promotora del gen que codifica para la enzima β -amilasa en trigo, cebada y avena (Rushton *et al.*, 1995). El elemento *W-box* también se encuentra en diversos genes que están involucrados en la defensa de las plantas (Du y Chen, 2000). Por otra parte, el motivo *G-box* (5' *CACGTG* 3') está en los promotores de un gran número de genes regulados por azúcares y se ha involucrado en el control transcripcional mediado por fitocromos (Martinez-Garcia *et al.*, 2000). El elemento *B-box* es similar al elemento *CCACGTGG* de respuesta a ABA (Pla *et al.*, 2003). Diversos estudios han señalado la existencia de un vínculo entre las vías de señalización por nutrientes, como el caso de los azúcares, con la respuesta a distintos tipos de estrés bióticos y abióticos (Rolland *et al.*, 2006). El elemento *G-box* y otro estrechamente asociado a éste, denominado *S-box* (5' *CACCTCCA* 3'), se encuentran presentes en las regiones promotoras de diversos genes regulados por luz (Acevedo-Hernandez *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha reportado que en presencia de ABA se induce la acumulación del transcrito de la β -amilasa en la batata (Ohto *et al.*, 1992). Mientras que la inducción de la enzima β -faseolina por la aplicación de ABA, se modula por un mecanismo dependiente de sacarosa (Bustos *et al.*, 1998). Estos datos sugieren que los elementos *W-box* y *G-box* participan en los procesos de señalización por azúcares para regular la transcripción de diversos genes (Rolland *et al.*, 2002).

2 Antecedentes

Los azúcares son capaces de modular la expresión de diversos genes a nivel transcripcional, a través de una red compleja de transducción de señales que permiten que los azúcares sean reconocidos como señales y puedan desencadenar una serie de respuestas que afectan de manera positiva o negativa la expresión de aproximadamente 2000 genes en *Arabidopsis* (Price *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). No obstante, se requiere de un mayor esfuerzo para identificar a los diversos componentes de las diferentes vías de transducción de señales, y con ello poder generar una interpretación sobre como ocurre la interacción entre los elementos regulatorios en *cis* y los factores transcripcionales para modular de manera diferencial y coordinada la expresión de los genes que responden a los azúcares presentes en las células (Ho *et al.*, 2011). A pesar de los avances que se han realizado en los últimos años, sólo se han identificado algunos componentes que participan en estas vías de señalización, como es el caso de algunos sensores, y unos cuantos factores transcripcionales como es el caso de algunos factores del tipo MYB y bZIP (Rolland *et al.*, 2006; Hanson y Smeekeens, 2009). Por lo cual, las vías de señalización por azúcares aún permanecen con componentes que no se han identificado. Una de las estrategias que se ha empleado para identificar a algunos de los componentes de estas vías ha sido caracterizar la forma mediante la cual se regulan diversos genes en respuesta a azúcares, los cuales se posicionan en la parte terminal de las vías de señalización para posteriormente utilizarlos para identificar a proteínas reguladoras que se unen a los elementos en *cis* posicionados en la región regulatoria de tales genes, con la finalidad de identificar los componentes reguladores de esa vía.

2.1 El gen *STP1* (*SUGAR TRANSPORTER PROTEIN1*)

Dentro del grupo de genes regulados por glucosa, se encuentra el gen *STP1* (*SUGAR TRANSPORTER PROTEIN1*), el cual codifica para un co-transportador (tipo “*simporter*”) de monosacáridos y H⁺, que pertenece a una familia de 14 miembros altamente conservada en plantas que median el transporte de hexosas en diferentes tejidos. La proteína *STP1* es altamente hidrofóbica y presenta una longitud de 522 aminoácidos y una masa molecular estimada de 57 kDa. La estructura de esta proteína consta de 12 dominios transmembranales que se encuentran separadas por regiones hidrofílicas de aproximadamente 63 aminoácidos. Mientras que los extremos amino y carboxilo-terminal se localizan hacia la parte intracelular (Büttner y Sauer, 2000; Sherson *et al.*, 2003; Büttner, 2010). La caracterización funcional de *STP1* es *Schizosaccharomyces pombe* y

Saccharomyces cerevisiae (Sauer et al., 1990; Stolz et al., 1994) demostró que este presenta una alta afinidad por la glucosa ($KM \leq 50\mu M$), además también es capaz de transportar otros monosacáridos como 3-O-metil glucosa (3OMG), D-xilosa, L-arabinosa y D-galactosa. Los miembros de la familia génica *STP*, se expresan en un tejido o en etapas de desarrollo específicos, siendo *STP1* el miembro con los niveles de expresión más altos, detectados en tejidos fotosintéticos como hojas y tallos (Johnson et al., 2006).

2.1.1 La regulación de *STP1* por azúcares

En un estudio realizado por Price y colaboradores (2004) se evidenció que varios miembros de la familia génica de *STP*: *STP1*, *STP4*, *STP13* y *STP14*, se encuentran regulados negativamente por azúcares, siendo *STP1* el gen que presenta un mayor nivel de represión (Büttner, 2010). Además, en un análisis por microarreglos realizado por Harmer y colaboradores (2000) se observó un aumento en los niveles del transcrito de *STP1* en oscuridad, y una disminución de los mismos en presencia de luz. Sin embargo, no se estableció si ésto fue el resultado de la regulación directa por la luz, o por la presencia de fotoasimilados sintetizados en condiciones de iluminación, ya que estos transportadores son reprimidos por azúcares como la sacarosa y la glucosa (Büttner, 2010). Se ha demostrado que el nivel del transcrito de *STP1* disminuye rápidamente, minutos después de la adición de glucosa (Figura 3). Esta respuesta es similar a la de otros genes que se reprimen por glucosa como *DIN6* (*DARK-INDUCED 6*), aunque la represión de éste requiere de un tiempo más prolongado para afectar el nivel del transcrito (Figura 3) (Price et al., 2006; Cordoba et al., 2015).

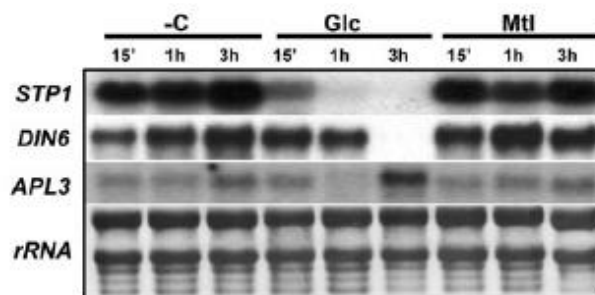


Figura 3. La expresión de *STP1* se reprime por glucosa. Evaluación de la expresión de *STP1* en distintos intervalos por Northern-blot. Plántulas de 12 días de edad fueron sometidas a distintos tratamientos: sin fuente de carbono (-C), con 150 mM de glucosa (Glc) o con 150 mM de manitol (Mtl), por diferentes intervalos (15 min, 3h y 6h). La rápida represión de *STP1* por glucosa contrasta con la respuesta de los genes *DIN6* (el cual requiere un tiempo más prolongado para su represión) y *APL3* (regulado positivamente por glucosa) (Tomado de Cordoba y colaboradores, 2015).

2.1.2 En la regulación de la expresión de *STP1* por glucosa no participan componentes de las vías hasta ahora descritas

Con la finalidad de establecer si en la respuesta de represión por glucosa de *STP1*, participa alguno de los componentes de las vías de señalización por azúcares, hasta ahora descritos, se analizaron los niveles del transcrito de *STP1* en líneas mutantes en alguno de los componentes de las vías conocidas, siendo éstas las mutantes *gin2* (mutante de la HXK1), *kin10* (mutante de la subunidad α catalítica de la cinasa SnRK1) y *rgs1-1* (mutante en la proteína reguladora de la proteína G, RGS1) (Figura 4). En cada una de estas mutantes, el nivel de acumulación del transcrito de *STP1* disminuyó después de la adición de glucosa, de manera similar a los niveles detectados en las plantas del tipo silvestre (Col-0). Por otra parte, en ausencia de glucosa no se detectó disminución de los niveles de *STP1* en ninguna de estas líneas mutantes. Estos resultados indicaron que ninguno de los factores analizados desempeña un papel importante en la regulación de *STP1* por azúcares y, por lo tanto, sugiere que la represión de *STP1* podría ocurrir mediante una vía de señalización aún no descrita (Cordoba *et al.*, 2015).

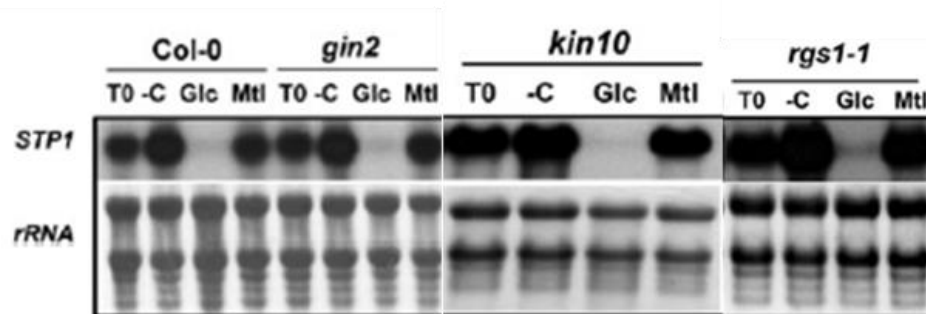


Figura 4. La regulación de *STP1* por glucosa no se encuentra mediada por ninguna de las vías hasta ahora descritas. Se analizó la expresión de *STP1* en plantas tipo silvestre (Col-0) y en las mutantes *gin2*, *kin10* y *rgs1-1*, de 12 días de edad, por Northern-blot, utilizando 10 μ g de RNA total. Plantas de 10 días de edad fueron crecidas durante dos días en un medio sin fuente de C y posteriormente sometidas a distintos tratamientos: con medio sin fuente de carbono (-C), o con 150 mM de glucosa (Glc), o con 150 mM de manitol (Mtl), durante 6 horas. T0 corresponde al control previo a cada tratamiento (Modificado de Cordoba y colaboradores, 2015).

Debido a que las plantas poseen la capacidad de distinguir los tipos de azúcares a través de su percepción y/o vías de señalización, se realizó un análisis de la expresión de *STP1*, empleando a distintos análogos de la glucosa, como la manosa (la cual se transporta al interior de la célula y se fosforila por una HXK, pero se metaboliza lentamente), y 3-OmGlucosa (que se transporta al interior de la célula, pero no es fosforilable) para

determinar el tipo de azúcares que son capaces de desencadenar la respuesta de represión de dicho gen. En este análisis se determinó que la señal que induce la represión de *STP1*, es un azúcar fosforilable como la glucosa o la manosa (Cordoba *et al.*, 2015). Por otra parte, el hecho de que la represión de dicho gen no requiera de la participación de la HXK1 como sensor, nos indica que existe algún otro sensor, diferente a HXK1, que se encarga de percibir a los azúcares fosforilables para regular la expresión de *STP1* (Cordoba *et al.*, 2015).

A pesar de que se ha demostrado que ninguno de los componentes de las vías de señalización por azúcares, hasta ahora descritos, como la cinasa SnRK1, o la proteína G, son necesarios para la represión de *STP1* por azúcares (Cordoba *et al.*, 2015), se ha evidenciado que en el genoma de *Arabidopsis*, existen cinco genes relacionados con HXK1 (Granot *et al.*, 2013; Cordoba *et al.*, 2015), algunos de ellos poseen una actividad enzimática clara (tipos A y B) mientras que otros denominados HKL (*Hexokinase-like*), que aparentemente carecen de dicha habilidad, podrían desempeñar funciones reguladoras (Xiao *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2009; Cordoba *et al.*, 2015).

2.1.3 Un fragmento de 310 pb de la región regulatoria 5' de *STP1* es esencial para la respuesta a glucosa

Para caracterizar el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo la regulación de *STP1*, Cordoba y colaboradores (2015) fusionaron un fragmento de 2.4 kb (a partir del sitio de inicio de la traducción) de la región regulatoria 5' de *STP1*, que incluye al 5' UTR y a una parte de la región intergénica, al gen reportero de GUS y generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Al analizar los niveles de expresión de GUS (fusionado al fragmento de 2.4 kb) en presencia de glucosa por Northern-blot, estos autores observaron un patrón de respuesta similar a la del gen endógeno de *STP1*, lo cual permitió concluir que los elementos *in cis* que confieren la regulación por glucosa de *STP1*, están contenidos en el fragmento de 2.4 kb y, además, se evidenció que dicha regulación ocurre a nivel transcripcional.

Un análisis más detallado en plantas transgénicas de *Arabidopsis* portadoras de una serie de deleciones sucesivas de la región regulatoria de 2.4 kb de *STP1* en fusión con el gen reportero de GUS, permitió determinar que los elementos que actúan *in cis*, responsables de la represión por glucosa de *STP1*, se encuentran dentro de un fragmento de 310 pb del promotor (-1022 a -1332 pb antes del sitio de inicio de la traducción "ATG") (Figura 5).

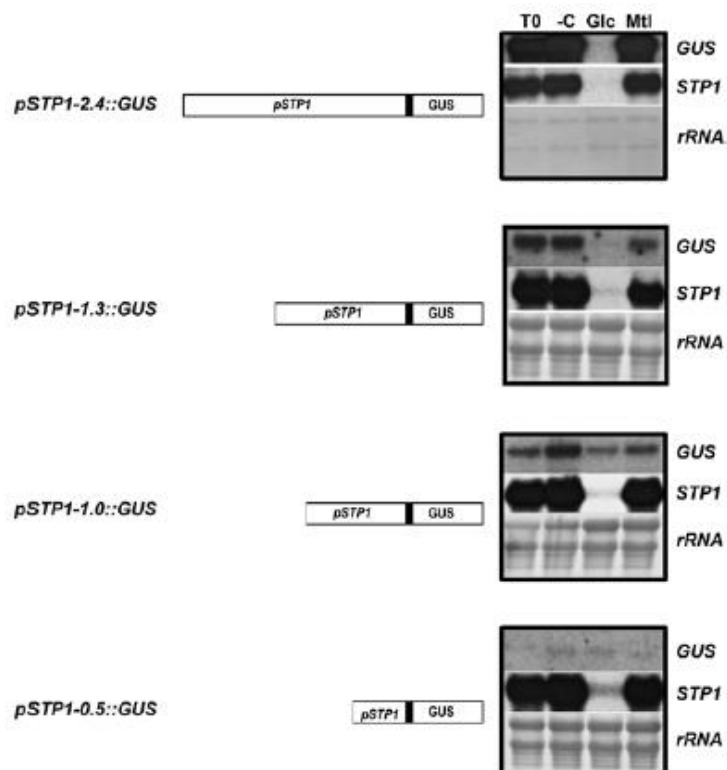


Figura 5. Análisis por eliminación de secuencias del promotor de *STP1*. Se analizaron los niveles de expresión del transcrito de GUS, por Northern-blot, en plántulas de *Arabidopsis* de 12 días de edad que contienen: 2.4, 1.3, 1.0 y 0.5 kb de la región reguladora 5' de *STP1*, fusionados al gen reportero de GUS (*pSTP1::GUS*). Las plantas fueron sometidas a un ayuno de carbono durante 2 días y después se transfirieron a distintos medios: sin fuente de carbono (-C), o con 150 mM de glucosa (Glc), o con 150 mM de manitol (Mtl), por 6 horas. T0 corresponde al control previo a cada tratamiento (Tomado de Cordoba y colaboradores, 2015).

2.1.4 Identificación de los posibles elementos regulatorios en *cis* que están involucrados en la respuesta de *STP1* a glucosa

Un análisis *in silico* del fragmento delimitado de 310 pb, de la región promotora de *STP1*, utilizando la base de datos PLACE (Plant Cis-Elements), reveló la presencia de 11 elementos potenciales que pertenece a ocho motivos distintos, descritos como elementos que participan en la represión por azúcares en distintos genes de diversas especies vegetales (Cordoba *et al.*, 2015) (Figura 6 y Tabla 1).

CCAATGCTGCATCCCATGAAACAAATTAATTCCAAGAACATATCCAAAACG
AATTTAATGTATCCAAATAGATCAAGAAAATTAGTTGGACCGTCGAATGAA
ATGCGATCCTTGCTGATTAGCACATGACGTGTTTATTTTGGCCACCAT
TCCACCGACCTCAACTCTTCTTTTGGTAAAATTTATGTTTATGATATCTTG
TGATACACAAATTTATTACTATTTGGTACATTTTGAAGTATTTGTTTTTGCAT
GATATATGACGTTAATTTGAACTGATATTAGTCAATTTATGGGTACAAA

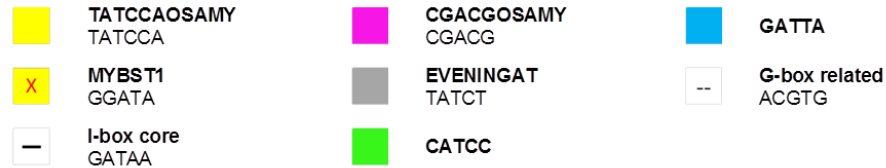


Figura 6. Elementos en *cis* que participan en la regulación por azúcares presentes en la región de 310 pb del gen *STP1* (Modificado de Cordoba y colaboradores, 2015).

Tabla 1. Descripción de los elementos en *cis* contenidos en el fragmento de 310 pb de la región regulatoria 5' de *STP1*, que podrían estar involucrados en la regulación de dicho gen en respuesta a glucosa (Higo *et al.*, 1999).

Elemento	Secuencia	Descripción
CATCC	CATCC	Identificado por medio de un análisis global de los genes regulados por azúcares en <i>Arabidopsis</i> (Li <i>et al.</i> , 2006).
TATCCAOSAMY	TATCCA	Necesario para conferir la represión por glucosa del gen α - <i>Amy3D</i> en arroz (Lu <i>et al.</i> , 1998).
MYBST1	GGATA	Este motivo es reconocido por factores transcripcionales del tipo MYB y está asociado con la regulación transcripcional por azúcares de diversos genes que también son regulados por la luz, además, es parcialmente complementario al motivo <i>TATCCA</i> de represión por azúcares en arroz (Lu <i>et al.</i> , 2002).
I-Box core	GATAA	Secuencia conservada de la región <i>rio arriba</i> de genes regulados por la luz. (Manzara <i>et al.</i> , 1991). Está asociado con la regulación transcripcional por azúcares, de diversos genes que también son regulados por la luz, además, es parcialmente complementario al motivo <i>TATCCA</i> de represión por azúcares (Lu <i>et al.</i> , 2002).
CGACGOSAMY3	CGACG	Secuencias ricas en GC en la región promotora de los genes <i>Amy3E</i> y <i>Amy3D</i> de arroz. Participa en la inducción de la expresión de estos genes en respuesta a bajos niveles de azúcares (Hwang <i>et al.</i> , 1998).
EVENINGAT	TATCT	Identificado por medio de un análisis global de los genes regulados por azúcares en <i>Arabidopsis</i> (Li <i>et al.</i> , 2006).
GATTA	GATTA	Identificado por medio de un análisis global de los genes regulados por azúcares en <i>Arabidopsis</i> (Li <i>et al.</i> , 2006).
G-box related	ACGTG	Identificado por medio de un análisis global de los genes regulados por azúcares en <i>Arabidopsis</i> (Li <i>et al.</i> , 2006).

2.1.5 Perfil de proteínas de unión al fragmento de 310 pb que contiene a los elementos regulatorios en *cis* de respuesta a glucosa de *STP1*

Una vez identificada la región de 310 pb, se procedió a identificar factores transcripcionales o proteínas reguladoras que posiblemente participen en la regulación de la expresión del gen *STP1* en respuesta a glucosa, mediante el análisis de los patrones diferenciales de proteínas que se unan a esta región (Cruz-López, 2015). Se realizó una serie de ensayos del tipo “*DNA pull-down*”, utilizando aislados de proteínas nucleares de plantas de *Arabidopsis* sometidas a un tratamiento con glucosa, o con manitol (como control de estrés osmótico) y se obtuvo el perfil proteínico de cada uno de estos tratamientos. A continuación, se procedió a secuenciar a cada una de las proteínas obtenidas en los ensayos por medio de LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*) y se obtuvo un listado de 10 proteínas que fueron localizadas únicamente en los ensayos realizados en presencia de glucosa, que posiblemente participen en la represión de *STP1*. Entre estos candidatos destacan el factor transcripcional del tipo bHLH, denominado: JAM1 (At2g46510; *JASSOCIATED MYC2-LIKE*).

Para poder determinar el efecto de los elementos en *cis* presentes en el fragmento de 310 pb en la respuesta de represión por glucosa del gen *STP1*, se generaron cuatro construcciones que contienen una serie de eliminaciones sucesivas, generadas a partir del fragmento original de 310, fusionadas a un promotor alterno y a un gen reportero. Las distintas versiones del fragmento, contienen un determinado número de los elementos en *cis*, denominados como “*elementos GRE*” (*Glucose Response Elements*), identificados previamente por Cordoba y colaboradores (2015). En el presente trabajo se procedió a analizar el patrón de expresión conferido por cada una de las construcciones generadas (denominadas como “*fragmentos GRE*”) en respuesta a glucosa, en plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

3 Justificación

Es muy bien conocido el papel que desempeñan los carbohidratos como sustratos del metabolismo del carbono. A su vez, los azúcares, como algunas hexosas, son moléculas importantes de señalización que pueden alterar los niveles de expresión génica en las plantas (Büttner y Sauer, 2000).

A través de la caracterización de mutantes en la respuesta a azúcares se han identificado algunos de los componentes que forman parte de las tres vías de señalización de glucosa hasta ahora descritas. Se han identificado componentes que actúan después de la percepción por la molécula sensora HXK1; así como algunos factores de transcripción. Sin embargo, en las vías de señalización por azúcares hasta ahora reconocidas aún existen componentes que no se han identificado. Con el objetivo de identificar nuevos elementos en las vías de señalización por azúcares y, en específico de la glucosa, estamos interesados en el estudio de los mecanismos de regulación de genes cuya expresión se encuentra modulada por azúcares.

Mediante el estudio de la regulación del gen *STP1* se ha establecido que este gen se regula por una vía independiente de la HXK1, que no involucra la participación de la proteína SnRK1, ni componentes de la regulación mediada por la proteína G. El análisis de la región promotora de *STP1* permitió determinar que la regulación por azúcares ocurre a nivel de la transcripción y, además, se estableció que los posibles elementos en *cis* que participan en esta respuesta, se encuentran dentro de una región de 310 pb en su promotor. Estos aspectos de la regulación de *STP1* por azúcares, y en particular por glucosa, hacen de estos elementos herramientas idóneas para identificar a los componentes que conforman la vía de señalización implicada en su regulación. En este sentido, se pretende identificar al o a los elementos en *cis* en el promotor de *STP1* que participan en la represión por glucosa.

4 Hipótesis

Los elementos de respuesta a azúcares identificados dentro de la región regulatoria de 310 pb en el promotor del gen *STP1*, participa en la represión por glucosa.

5 Objetivo General

Identificar al elemento en *cis* en el promotor del gen *STP1* que participa en la represión por glucosa.

5.1 Objetivos Particulares

- Realizar un análisis *in silico* comparativo entre las regiones promotoras de genes homólogos de *STP1* en otras especies vegetales.
- Obtener líneas homocigotas de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que porten a los elementos en *cis* fusionados al promotor 35S del CaMV.
- Analizar la regulación por glucosa en cada una de las líneas transgénicas con las distintas construcciones.
- Identificar a los posibles motivos en *cis* involucrados en la respuesta a glucosa en la región acotada.
- Realizar la mutación del(os) elemento(s) candidato(s) para ejercer la represión de la expresión de *STP1* por glucosa.
- Evaluar la respuesta de represión por glucosa del (o de los) elemento(s) en *cis* mutado(s) en plantas transgénicas.

6 Materiales y Métodos

6.1 Generación de las construcciones *GRE* (*Glucose Response Elements*)

Las construcciones se generaron previamente por fusión de los fragmentos *GRE* (*Glucose Response Elements*) que contienen a los elementos en *cis* implicados en la represión por glucosa del gen *STP1*, con el promotor 35S (p35S) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), en fusión transcripcional con el gen reportero que codifica para la enzima β -glucoronidasa (GUS), *uidA*, en el vector pBI101. Estas fusiones transcripcionales se encuentran flanqueadas junto con el gen que confiere resistencia a kanamicina (*nptII*, *neomycin phosphotransferaseII*), para la selección de las plantas transgénicas, por los bordes del T-DNA (Figura 7a). Cabe mencionar que la primera versión de los fragmentos *GRE*, contiene un fragmento mayor (338 pb), al inicialmente acotado, debido a que los oligonucleótidos empleados, no permitieron la amplificación por PCR del fragmento de 310 pb.

Los fragmentos de 281, 253 y 177 pb, se generaron a partir del fragmento inicial de 310 pb por amplificación por PCR, introduciendo los sitios de restricción *HindIII* hacia el extremo 5' y *KpnI* hacia el 3', y se clonaron en el vector pGEM-T. Por otra parte, se amplificó un fragmento de 904 pb del p35S a partir del vector pBI121, introduciendo los sitios *KpnI* y *SacI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, y se clonó en el vector pGEM-T. Además, el p35S contiene un sitio de restricción *BamHI* interno posicionado hacia el extremo 3'. A continuación se realizó una doble digestión de los distintos vectores pGEM-T que portan a cada una de las diferentes versiones del fragmento *GRE* de 338, 281, 253 y 177 pb, con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* para introducir un fragmento de 904 pb del p35S (el cual fue obtenido mediante la digestión del vector pGEM-T::p35S) en el extremo 3' de dichos fragmentos. Finalmente, los fragmentos *GRE* en las diferentes versiones (de 338, 281, 253 y 177 pb), fusionados al p35S, se subclonaron entre los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101, sustituyendo al p35S propio del vector, generando las construcciones *GRE338*, *GRE281*, *GRE253* y *GRE177*, respectivamente. Como control del efecto de los elementos *GRE* sobre la regulación del p35S se utilizó el vector pBI121, el cual porta entre los bordes del T-DNA el gen que codifica para la enzima β -glucoronidasa de *E. coli* (GUS), bajo la regulación del p35S y con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (*NOS*), y el gen *nptII*, como marcador de selección en plantas (Figura 7b).

Finalmente, cada una de las construcciones y el plásmido pBI121 (control), fueron transferidos a la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* para transformar plantas de *Arabidopsis*.

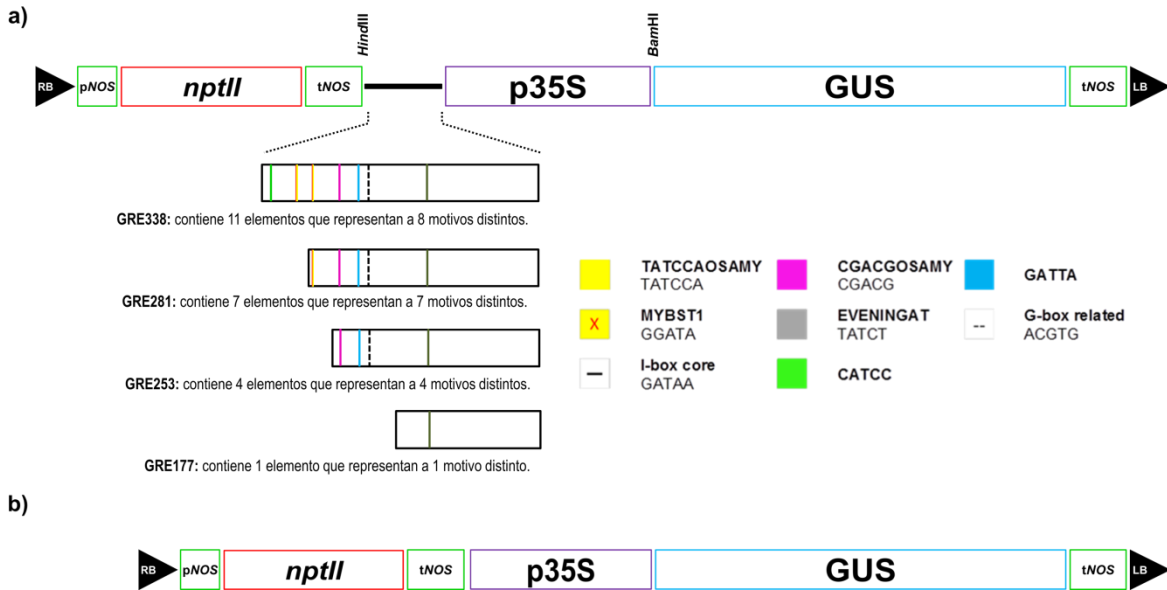


Figura 7. Esquema de las construcciones que portan a las fusiones transcripcionales de los fragmentos GRE en el vector pBI101 y del vector pBI121. Se muestra el T-DNA que porta a las construcciones, en a) y el plásmido pBI121 utilizado como control, en b). **a)** Las construcciones contienen diferentes fragmentos generados a partir de un fragmento inicial de 338 pb del promotor de *STP1*, de 281, 253 y 177 pb (fragmentos GRE), fusionados por el extremo 3' al p35S (904 pb) entre los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101, en fusión transcripcional con el gen reportero de *GUS*. **b)** Se muestra el T-DNA del plásmido pBI121, que contiene al p35S fusionado al gen reportero de *GUS*. Se muestran los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) del T-DNA el cual contiene además, el gen marcador que confiere resistencia a kanamicina (*nptII*), con las secuencias regulatorias para su expresión en plantas: pNOS y tNOS, promotor y terminador de la nopalina sintasa, respectivamente. La figura no está a escala.

6.2 Transformación de plantas de *Arabidopsis*

Durante el presente trabajo, se generaron las líneas pBI121 (control) y GREmut (que contienen la mutación del elemento 5'-CACATG-3', ver adelante). Las plantas de *Arabidopsis Col-0*, se transformaron por el método de "inmersión floral" descrito por Clough y Bent (1998). Se utilizaron plantas adultas conteniendo silicuas y flores, las cuales fueron eliminadas dejando sólo los botones florales cerrados.

Se crecieron cultivos de *A. tumefaciens* C58C1 que portan al vector pBI121 o a la versión GREmut durante 16-20 h a 30°C, en agitación constante (300 rpm). Los cultivos se centrifugaron (a 7,000 rpm, a 4°C, durante 15 min) para formar una pastilla celular, la cual

se resuspendió en el medio de infiltración (sales MS, 0.5x; sacarosa, 5%; Silwet L-77, 0.05%), generando una agro-suspensión. Las plantas se colocaron en una cámara de vacío, con los botones florales sumergidos en la agro-suspensión y sometidas a vacío (-50 kPa) durante un minuto, posteriormente se rociaron con agua y se transfirieron en posición horizontal a una charola. Después de 12 h, las plantas se enjuagaron con agua destilada, para remover el exceso de la agro-suspensión, y se colocaron en posición vertical. Cuando la planta finalizó su ciclo reproductivo, aproximadamente 20 días después de la transformación, se realizó la primera colecta de las semillas.

6.2.1 Desinfección de semillas

Las semillas se desinfectaron superficialmente con etanol industrial durante 1 minuto, se sometieron a un lavado con hipoclorito de sodio al 20% durante 7 minutos. A continuación, se enjuagaron 4 veces con agua destilada y finalmente, se incubaron a 4°C durante 72 h para su estratificación. Las semillas se sembraron de acuerdo a los requerimientos de cada uno de los experimentos.

6.2.2 Selección de líneas transgenicas

Las plantas transgenicas, correspondientes a las líneas control pBI121 y a las *GREmut*, se seleccionaron en medio GM 1x (sales basales de Murashige y Skoog con vitaminas de Gamborg, 4.44 g/L; MES, 0.5 g/L; sacarosa, 10 g/L y agar, 8 g/L; pH 5.7), suplementado con kanamicina (50 µg/mL, Km⁵⁰). Siete días después de la germinación, se seleccionaron cinco plántulas resistentes que correspondieron a la generación (F₁) y se trasplantaron a sustrato vegetal Metro-Mix 200 (Grace Sierra, Milpitas, CA, USA) en donde crecieron y se permitió la autopolinización de cada una de ellas.

Para la obtención de las líneas homocigotas correspondientes a cada construcción y al control pBI121, se analizó la segregación de la generación F₂, seleccionando aquellas que provenían de una población que mostró una segregación de 3:1 (resistentes: sensibles, 75% de plantas resistentes) al agente selectivo (Km⁵⁰), lo que indicó la presencia de una sola copia del transgen de interés en cada línea, con una alta probabilidad. Posteriormente, las plantas seleccionadas se trasplantaron a sustrato, se permitió su autopolinización, y una vez concluido el ciclo reproductivo de la planta, se procedió a recolectar la semilla, correspondiente a la generación F₃ (Figura 8). Para confirmar a las líneas en estado homocigoto, la generación F₃ se sembró en el mismo medio selectivo y se seleccionaron

las poblaciones de semillas en las que la resistencia a Km^{50} , se presentara en 100% de las plantas germinadas.

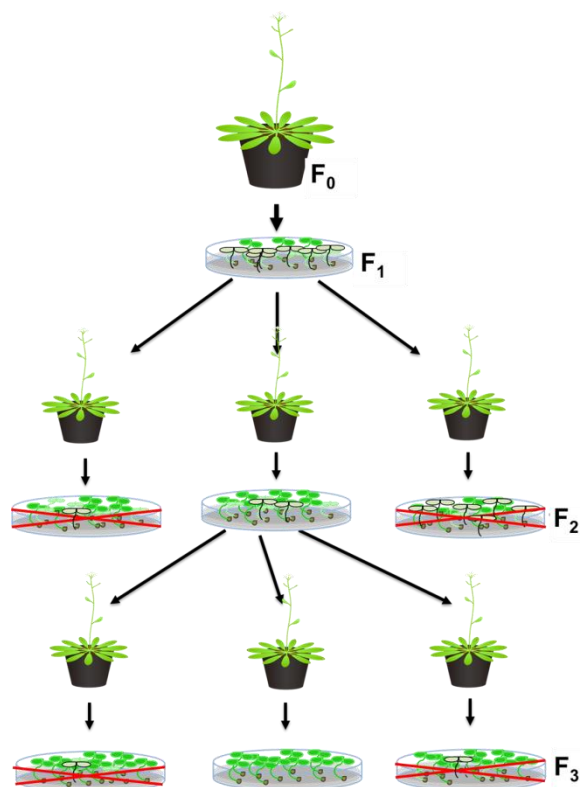


Figura 8. Esquema de la obtención de líneas transgénicas homogotas. Semillas de la generación F₁ fueron obtenidas a partir de plantas transformadas por el método de “*inmersión floral*” (F₀), sembradas en medio GM 1x, suplementado con kanamicina (50 μ g/mL, Km^{50}) y transferidas a sustrato para obtener la F₂. Las semillas obtenidas (F₂) fueron analizadas para determinar su segregación en medio selectivo suplementado con Km^{50} , esperando obtener un patrón de segregación de 3:1 (resistentes: sensibles), confirmando con mayor probabilidad la presencia de una sola inserción del transgen. A partir de individuos de la F₂ resistentes a Km^{50} , se obtuvo la F₃, que fue finalmente evaluada para designar a las líneas homogotas, donde el 100% de los individuos mostraron resistencia al agente selectivo.

6.3 Evaluación de las líneas transgénicas pBI121 y GREmut por PCR

La presencia de los transgenes de las plantas transformadas con el pBI121, o con la construcción GREmut, se corroboró mediante un análisis por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando DNA genómico de las plantas seleccionadas. Para el caso de las plantas transgénicas que portan el T-DNA del vector pBI121 se emplearon los oligonucleótidos 35SUp (5' CGA AAA CTG TGG AAT TGA TCA GC 3') y GUS4R (5' ACC ATC AGC TTA TCG AAT C 3') para amplificar un fragmento de 1350 pb que corresponde

al extremo 3' del p35S y parte de la región codificante de GUS. Mientras que, para las líneas transgénicas con la construcción *GREmut* se utilizaron el par de oligonucleótidos pSTP1-1346FwH (5' *CTT TAT AAG AAA AAG CTT TGC TGC ATC* 3') y GUS4R (5' *ACC ATC AGC TTA TCG AAT C* 3'), los cuales amplifican un fragmento de 2100 pb, correspondiente al fragmento de 338 pb, el p35S y parte de la región codificante de GUS.

Las condiciones utilizadas en las reacciones de PCR fueron: una fase inicial de desnaturalización a 95°C por 3 min; seguido de 40 ciclos con una fase de desnaturalización a 95°C durante 30 s, una fase de alineamiento a 55°C durante 30 seg y una fase de extensión a 72°C de 1 min por kb, y un ciclo final de extensión a 72°C por 3-5 min.

6.3.1 Evaluación de las líneas transgénicas por actividad histoquímica de GUS

Para corroborar la presencia del transgen en las plantas seleccionadas, se efectuó el ensayo histoquímico de actividad de GUS. Se utilizaron plántulas de diez días de edad, crecidas en el medio selectivo con Km⁵⁰. Las plantas se transfirieron a microtubos de 1.5 mL con 500 µL de buffer de reacción (buffer de fosfato de sodio, 100 mM, pH 7; EDTA, 10 mM; Ferricianuro de potasio, 0.5 mM; Ferrocianuro de potasio, 0.5 mM; TRITON X-100 al 0.1%, con 1 µg/mL del sustrato X-gluc [ácido 5-bromo-4-bromo-3-indolil glucurónidico]), e incubadas a 37°C por 16 h. Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a retirar la solución, y posteriormente fueron clarificadas siguiendo el protocolo descrito por Cordoba y colaboradores (2015), que consistió en remover los pigmentos de la plántula, a través de una serie de 5 lavados con etanol al 70% durante 1 h cada uno. A continuación, se rehidrataron por incubación en soluciones con 50% y 30% de etanol durante 15 min cada una, y se transfirieron a una solución 0.24 N de HCl y 20% metanol y se incubaron a 62°C por 1 h. Enseguida se transfirieron nuevamente a una solución 7% NaOH y 20% metanol y se incubaron por 25 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las plántulas se rehidrataron en una serie de soluciones de 40%, 20% y 10% de etanol durante 15 min cada una. Finalmente, las plántulas se conservaron en una solución 50% de glicerol y 2% DMSO, para analizarse en el microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1500) 1x.

6.4 Tratamientos con azúcares

Para efectuar los tratamientos de las plantas se utilizaron cuatro lotes de 50 semillas de cada una de las líneas, las cuales se desinfectaron como se describió anteriormente. Las semillas se sembraron en matraces con 50 mL de medio MS líquido 0.1x con 0.5% de

sacarosa, y se mantuvieron en agitación continua (90 rpm), en fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, durante diez días. Una vez transcurrido el tiempo, el medio se reemplazó por medio MS 0.1x sin fuente de carbono (-C, ayuno de fuente carbonada), manteniendo a las plantas bajo las mismas condiciones de crecimiento durante 48 h. Al finalizar este segundo período, el medio sin carbono se sustituyó por nuevo medio MS 0.1x, sin fuente de carbono (-C, considerado como un control del efecto del cambio de medio, y ausencia de carbono), o con 150 mM glucosa (como el tratamiento para determinar el efecto de la presencia de azúcares), o con 150 mM de manitol (utilizado como control osmótico), por un periodo de 6 h, en agitación continua (90 rpm). Además, se consideró un control que representa las condiciones iniciales (T0), previas a realizar los tratamientos (Figura 9).

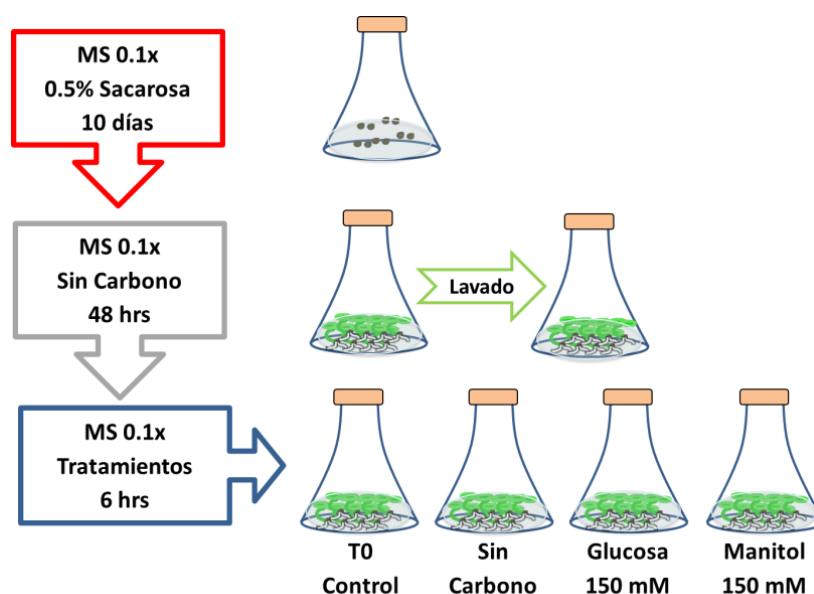


Figura 9. Esquema de los tratamientos realizados. Se sembraron 50 semillas por tratamiento, en medio MS 0.1x líquido con 0.5% de sacarosa. Después de 10 días se reemplazó el medio por medio MS 0.1 x líquido sin fuente de carbono por 48 h. Por último, se realizaron una serie de tratamientos con medio MS 0.1x sin fuente de carbono, o con 150 mM de glucosa, o con 150 mM de manitol por 6 h. T0 representa las condiciones previas a los tratamientos.

6.5 Análisis por experimentos tipo Northern

Tras realizar los tratamientos anteriormente descritos, se procedió a recolectar cada una de las muestras en N₂ líquido. Para purificar el RNA total de cada muestra, el tejido vegetal se trituró utilizando un mortero previamente enfriado con N₂ líquido.

El tejido pulverizado se transfirió a un microtubo de 1.5 mL, se añadió 1 mL de TRIzol®, y se homogenizó utilizando un vortex. A continuación, las muestras se incubaron a

temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de cloroformo, se mezcló utilizando un vortex y las muestras se centrifugaron por 15 min a 4°C, a 12,000 g. La fase acuosa se transfirió a un microtubo de 1.5 mL, se añadieron 500 μ L de isopropanol y se precipitó durante 20 h a -20°C.

El RNA se recuperó por centrifugación (12,000 g a 4°C durante 10 min), se decantó el sobrenadante, se realizó un lavado con etanol al 75% y se centrifugó a 12,000 g durante 5 min, a 4°C. La pastilla que se formó, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 μ L de agua ultrapura, calentando las muestras a 65°C por 10 min. Se cuantificó la concentración de las muestras de RNA y se procedió a cargar 10 μ g de cada una en un gel desnaturalizante al 1.5% de agarosa con 2% de formaldehído, en buffer de carga (formaldehído al 25%, formamida al 62.5% y MOPS 1x). La electroforesis se realizó en buffer MOPS 1x a 80V. Al término de la corrida, el gel se enjuagó varias veces con agua destilada para eliminar el exceso de formaldehído. A continuación, el RNA se transfirió a una membrana de nylon (Hybond N⁺ Amersham, GE Healthcare Life Sciences) por capilaridad, con SSC 10x (NaCl 1.5M, citrato de sodio 0.15M; pH 7.0) por aproximadamente 18 h. El RNA se fijó a la membrana con luz UV, utilizando un UV-Stratalinker (Stratagene®). A continuación, se corroboró la transferencia de las muestras a la membrana por tinción con azul de metileno (acetato de sodio 0.5M, pH 5.2 y azul de metileno al 0.03%). La membrana se secó y se almacenó en una toalla de papel a temperatura ambiente hasta el momento de la hibridación.

Para la obtención de la sonda de GUS, se utilizaron como templado el vector pBI101 y los oligonucleótidos GUS3F (5' CGA AAA CTG TGG AAT TGA TCA GC 3') y GUS4R (5' ACC ATC AGC TTA TCG AAT C 3'), para amplificar por medio de PCR, un fragmento de 866 pb que corresponde a la región codificante del gen reportero de GUS. Para la sonda del gen *STP1*, se utilizó el par de oligonucleótidos STP1-1 (5' TGC TAT AGT GGT TGT AAC GTT CAT T 3') y STP1-2 (5' GGC TAA TAC ACT TTT TCC TTT ACG ACA 3'), y como templado el plásmido que porta el fragmento de 499 pb, correspondiente al extremo 3' del gen *STP1*, localizada entre las posiciones 2,261 a 2,760 pb, con respecto al sitio de inicio de la traducción.

Para el marcaje radioactivo de las sondas de DNA se siguió el protocolo proporcionado por el proveedor (Amersham). Se utilizaron 50 ng de las sondas, las cuales se mezclaron con 5 μ L de "Primer solution", se incubaron a 95°C, durante 5 min e inmediatamente después se transfirieron a hielo, para posteriormente agregar el resto de los componentes de la

reacción: 10 µL de “labelling buffer” 1x, 2 µL de enzima Kleenow 1U/µL, el agua necesaria para llevar el volumen de reacción a 50 µL y por último 50 µCi de [α^{32} P]-dCTP. La reacción de marcaje se incubó a 37°C por 2 h, y después se desnaturalizó a 95°C.

La membrana se colocó en un tubo de hibridación, y se prehibridó durante 12 h con 20 mL de buffer de hibridación (buffer de fosfatos 1M, pH 7.2; SDS, 20%; EDTA, 0.5M y albúmina bovina fracción V al 1%), a 65°C en un horno Hybrid Shake ‘n’ Stack (Thermo Scientific). La hibridación se realizó a 65°C, por 16-18 h, agregando la sonda previamente desnaturalizada.

Después de la hibridación, se realizaron los siguientes lavados: 2 lavados con SSC, 2x y SDS, 0.1%; 2 lavados con SSC, 0.5x y SDS, 0.1%; 2 lavados con SSC, 0.1x y SDS, 0.1%; a 65°C, durante 15 min cada uno y un último enjuague con SSC, 0.1x a temperatura ambiente. Se efectuaron distintas exposiciones de placas autoradiográficas (Kodak; BioMax MS film) con la membrana radioactiva, a -80°C y finalmente, se revelaron para la obtención de la señal.

6.6 Generación de la construcción portadora de la mutación del elemento CACATG

6.6.1 Mutagénesis sitio-dirigida del elemento CACATG por PCR

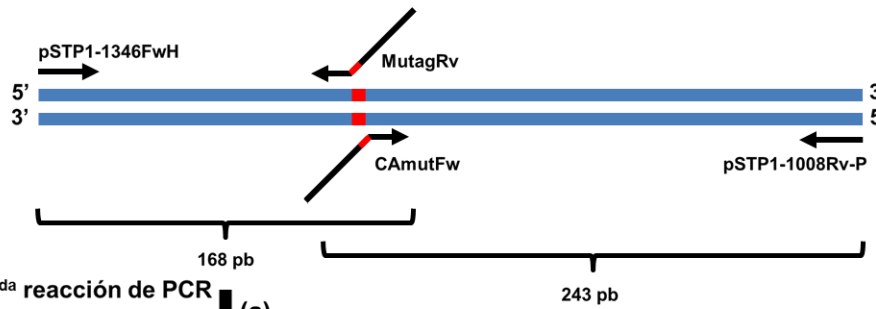
Este método se diseñó para cambiar un nucleótido o una secuencia corta de DNA con una alta eficiencia. El primer paso consistió en sintetizar una cadena de DNA complementaria a una cadena molde, excepto por la secuencia que se desea mutar (Clyde *et al.*, 1978). Para generar la mutación del elemento CACATG, se utilizaron cuatro oligonucleótidos, dos de los cuales son complementarios en una parte de su secuencia, incluyendo la mutación del elemento CACATG (CACATG>GCTTAT) (Figura 10). Se llevaron a cabo dos reacciones paralelas de PCR en una de ellas se amplificó un fragmento de 168 pb, con el par de oligonucleótidos pSTP1-1346FwH (el cual introduce el sitio de restricción *Hind*III en el extremo 5' del fragmento, Tabla 2) y MutagRv (que porta la mutación del elemento CACATG, Tabla 2) (Figura 10a). En la segunda reacción se amplificó un fragmento de 243 pb, utilizando el par de oligonucleótidos CAMutFw (que porta la mutación del elemento CACATG y es parcialmente complementario a MutagRv, Tabla 2) y pSTP1-1008R-P (que introduce el sitio de restricción *Kpn*I en el extremo 3' del fragmento, Tabla 2) (Figura 10b). Los fragmentos se purificaron a partir de gel de agarosa utilizando una columna (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega®), y se utilizaron como molde y cebador en

los ciclos iniciales de una tercera reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos pSTP1-1346Fw-H y pSTP1-1008R-P, posicionados en los extremos de los fragmentos (Figura 10c). Como producto final se obtuvo el fragmento original de 338 pb con el cambio secuencia CACATG>GCTTAT (Figura 10c).

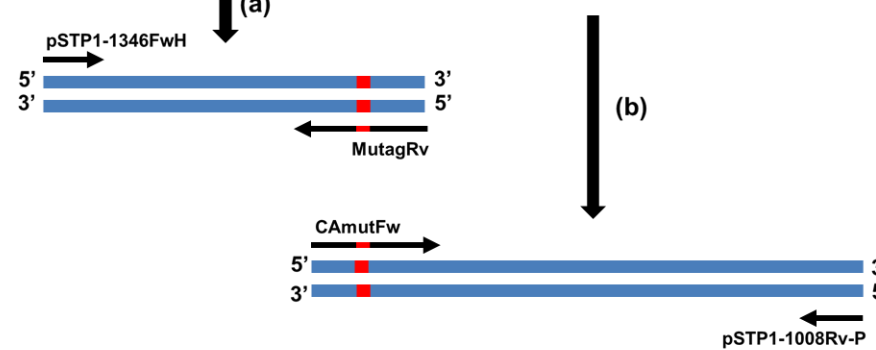
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la mutagénesis sitio-dirigida del elemento CACATG.

Oligonucleótido	Secuencia	Observaciones
pSTP1-1346FwH	5' CTT TAT AAG AAA AAG CTT TGC TGC ATC 3'	Contiene el sitio de restricción <i>Hind</i> III (AAG CTT)
CAMutFw	5' GCG ATC CTT GCT GAT TAG GCT TAT ACG TGT TCA TTT ATT TTT GCC ACC ATT CCA CCG 3'	Porta la mutación del elemento CACATG (CAC ATG>GCT TAT)
MutagRv	5' GGC AAA AAT AAA TGA ACA CGT ATA AGC CTA ATC AGC AAG GAT CGC TAA AGT AAG CTG CC 3'	Porta la mutación del elemento CACATG (CAC ATG >GCT TAT)
pSTP1-1008R-P	5' GGC AAA AAT AAA TGA ACA CGT ATA AGC CTA ATC AGC AAG GAT CGC ATT TCA TTC GAC GGT CC 3'	Contiene el sitio de restricción <i>Kpn</i> I (ATA AGC)

1^{era} reacción de PCR



2^{da} reacción de PCR



3^{era} reacción de PCR

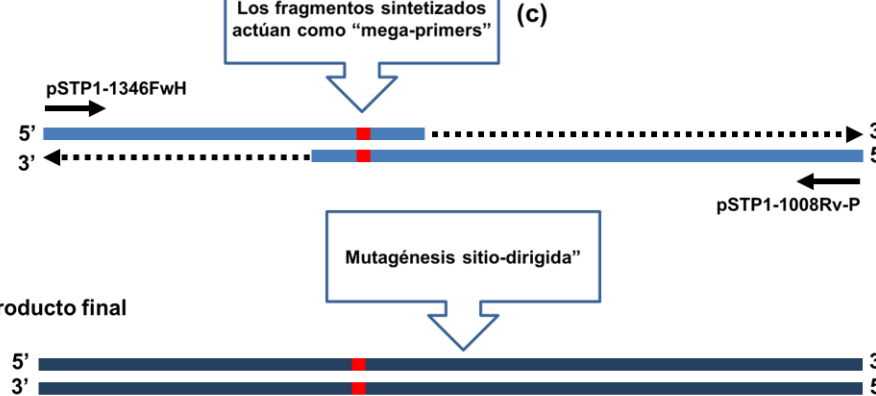


Figura 10. Esquema de la mutagénesis sitio-dirigida del elemento **CACATG**, por el método de extensión por fragmentos sobrelapados. (a) En una reacción de PCR se amplificó un fragmento de 168 pb, mientras que en otra reacción (b), se amplificó un fragmento de 243 pb. Los fragmentos sintetizados se mezclan y funcionan en una tercera reacción como "megaprimers" (c), ya que contienen una región complementaria (de 45 pb), donde se ubica la mutación. El fragmento original de 338 pb se reconstituyó por la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos pSTP1-1346FwH y pSTP1-1008Rv. Los oligonucleótidos CAMutFw y MutagRv portan la mutación del elemento CACATG (—).

6.6.2 Ligación del producto final de PCR

El fragmento de 338 pb que porta la mutación del elemento CACATG se purificó (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega®), cuantificó (Nanodrop®, ND-1000) y se clonó en el vector pGEM®-T Easy Vector System I, de acuerdo al protocolo del fabricante (Promega®), utilizando una relación inserto: vector de 3:1. Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5α por electroporación (1.8 mV por 3.9 ms) con 2 µL de la reacción de ligación, con un MicroPulser™ (BIO-RAD), y enseguida se transfirieron a un tubo de ensayo con 1 mL de medio LB líquido. Las células se recuperaron por una hora a 37°C, con agitación (300 rpm). Posteriormente, se procedió a sembrar las células en caja Petri con medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 µg/mL), IPTG (0.5 mM) y X-Gal (80µg/mL) y, se incubó a 37°C durante 20 h.

6.6.3 Análisis de colonias transformadas

Se verificó la presencia del inserto (fragmento de 338 pb) por medio de PCR en colonia, utilizando el par de oligonucleótidos pSTP1-1346FwH y pSTP1-1008R-P (Tabla 2). El protocolo de amplificación incluyó una fase inicial de desnaturalización a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos con una fase de desnaturalización a 95°C durante 30 s, una fase de alineamiento a 55°C durante 30 seg y una fase de extensión a 72°C durante 30 s; y un ciclo final de extensión a 72°C por 3 min. La presencia y el tamaño esperado del inserto, se confirmaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

Una vez corroborada la clonación del fragmento de interés se procedió a extraer el DNA plasmídico por el método de pequeña escala por lisis bacteriana (Miniprep; High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche). Se efectuaron cultivos de las colonias transformadas en medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron en agitación (300 rpm) a 37°C, durante 16 h. Una vez transcurrido el tiempo, se transfirieron 1.5 mL del cultivo a un microtubo, se centrifugó (13,000 rpm por 2 min) y se descartó el sobrenadante. Las muestras se purificaron y posteriormente se cuantificaron (Nanodrop® ND-1000). La presencia de la mutación se corroboró por secuenciación. Para realizar la secuenciación del fragmento *GREmut* en el vector pGEM-T, se emplearon los oligonucleótidos m13/pUC -40 FORWARD (5' *GTT TTC CCA GTC ACG TTG TA-3'*) y m13/pUC REVERSE (5' *TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC 3'*)

6.6.4 Generación de la construcción reportera *GREmut* (pBI121::*GREmut*::p35S)

Una vez purificado el vector pGEM-T::*GREmut*, se realizó una doble digestión durante un periodo de 16 horas, utilizando las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI*. Por otra parte, utilizando las mismas enzimas de restricción, se digirió el plásmido pGEM-T::p35S, escindiendo un fragmento de 904 pb, que corresponde al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (p35S). El p35S fue introducido al pGEM-T::*GREmut* por ligación entre los sitios *KpnI* y *SacI*, utilizando una reacción inserto: vector de 3:1.

Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α con el producto de ligación y se corroboró la presencia de la construcción por medio de PCR en colonia, utilizando el par de oligonucleótidos pSTP1-1346FwH (5' CTT TAT AAG AAA AAG CTT TGC TGC ATC 3') y 35S-Rv (5' GGT TTC CGG ATA TTA CCC TTT GTT G 3'), los cuales amplificaron un fragmento de 910 pb, correspondiente a la fusión del elemento *GREmut* con el p35S, generando la construcción pGEM-T::*GREmut*::p35S (Figura 11).

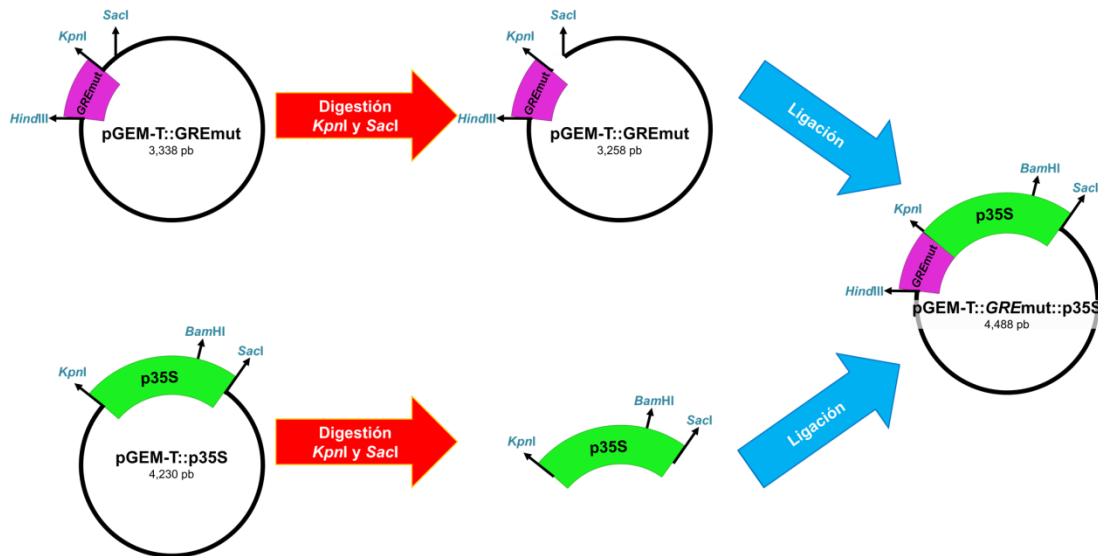


Figura 11. Esquema de la generación del plásmido pGEM-T::*GREmut*::p35S. Los plásmidos pGEM-T::*GREmut* y pGEM-T::p35S fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI*. El fragmento de 904 pb correspondiente al p35S fue clonado en el extremo 3' del fragmento *GREmut* entre los sitios *KpnI* y *SacI* para generar el vector pGEM-T::*GREmut*::p35S.

Para generar la fusión con el gen reportero de GUS, el fragmento correspondiente al elemento *GREmut* con el p35S, se escindió con una doble digestión con las enzimas *HindIII* y *BamHI*. Este fragmento se introdujo entre los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBI121,

reemplazando al p35S propio del vector (Figura 12), por una reacción de ligación, utilizando una relación inserto: vector de 5:1. Se transformaron células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes y se seleccionaron en medio LB suplementado con Km⁵⁰. La presencia del plásmido con la fusión de interés, se corroboró por PCR en colonia, utilizando el par de oligonucleótidos pSTP1-1346FwH y GUS4R para amplificar un fragmento de 2100 pb. De esta manera, se obtuvo el vector *GREmut*, el cual porta al fragmento *GREmut*, en fusión con el extremo 5' del p35S y con el gen reportero de GUS, en el vector del sistema binario, pBI121 (Figura 12).

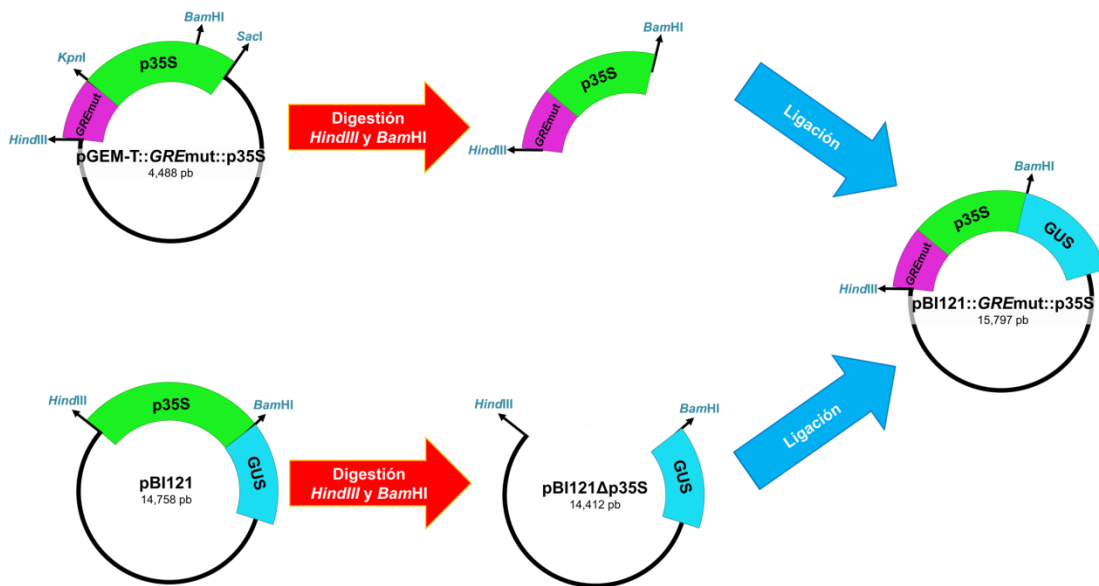


Figura 12. Esquema de la construcción del vector *GREmut*. El fragmento correspondiente al elemento *GREmut* y al *p35S* fueron transferidos en los sitios *HindIII* y *BamHI*, en sustitución del *p35S* en el vector *pBI121*.

7 Resultados

7.1 Análisis *in silico* comparativo entre las regiones promotoras de genes homólogos de *STP1* en otras especies vegetales

Para determinar si alguno de los ocho motivos localizados en el fragmento de 310 pb de la región promotora de *AtSTP1* está participando en su represión en presencia de glucosa, se realizó un análisis *in silico* comparativo de las regiones promotoras de los genes homólogos de *STP1* de otras especies vegetales. Para ello se procedió a identificar a los posibles ortólogos de *STP1* en otras especies, utilizando la base de datos de “Phytozome” (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Aunque se considera que la longitud promedio de un promotor eucariota es de 1 kb (Kristiansson *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2011) se utilizaron 2.4 kb por arriba del sitio de inicio de la traducción de cada uno de los genes en este análisis. Considerando que los genes que se regulan de la misma manera pueden presentar elementos regulatorios en *cis* en común, se realizó un estudio comparativo de las regiones promotoras de los genes homólogos de *STP1*. Se identificaron 11 homólogos de *STP1* (a nivel de secuencia de la proteína) en ocho especies, dentro de los cuales sólo dos se encuentran descritos en la literatura. Uno de ellos es el gen *VvHT1* (*Vitis vinifera* Hexose Transporter1), el cual codifica para un transportador de monosacáridos en uva (*Vitis vinifera*), y cuya expresión se regula positivamente por sacarosa y ABA y, negativamente por un aumento en los niveles de glucosa (Conde *et al.*, 2006); el otro es el gen *MdHT4* (*Malus domestica* Hexose Transporter4), que comparte un 93.8% de identidad a nivel de proteína con *AtSTP1* y se expresa principalmente en los frutos maduros del manzano (*Malus domestica*) (Wei *et al.*, 2014).

Se procedió a analizar la región promotora de cada uno de los genes identificados en la base de datos, con la finalidad de encontrar a alguno de los ocho elementos identificados previamente en *AtSTP1*, lo cual indicaría que tal elemento estaría actuando como un elemento de respuesta a azúcares en cada uno de los homólogos. Sin embargo, el análisis demostró que todos los elementos también están presentes en la región promotora de todos los genes consultados. Por lo tanto, no fue posible identificar de esta manera a un elemento único, compartido entre los diferentes promotores que pudiera reconocerse como un elemento de represión por azúcares (Tabla 3).

Como se muestra en la Figura 13, en cada una de las regiones regulatorias de los homólogos de *STP1*, fue posible identificar la presencia de al menos una repetición de cada

uno de los elementos presentes en el fragmento de 310 pb de *AtSTP1*. Por lo tanto, no fue posible identificar de esta manera a un elemento único, compartido entre los promotores, que podría reconocerlo como un elemento de represión por azúcares. En el presente análisis, se identificó que el elemento EVENINGAT (5' TATCT 3') se encuentra en múltiples ocasiones a lo largo de todas las secuencias de los genes homólogos de *AtSTP1* (Figura 13, banda gris). Se ha demostrado que la expresión de diversos genes, incluyendo a *AtSTP1*, se encuentra sometida a múltiples mecanismos de regulación, además de los azúcares (Stadler *et al.*, 2003; Haydon *et al.*, 2013).

Cabe mencionar que el arreglo en el que se encuentran algunos de los elementos en los promotores de estos genes es similar al que encontramos en el fragmento de 310 pb de *STP1* (Figura 13; recuadros anaranjados), lo cual sugiere que algunos de estos elementos estarían participando en la represión del gen en respuesta a glucosa. Por ejemplo, el elemento TATCCAOSAMY (5' TATCCA 3') se encuentra repetido en al menos dos ocasiones en todas las secuencias y, estas repeticiones muestran un arreglo en tándem con una separación de 13-25 pb. En el promotor del gen α -*Amy3D* de arroz existen dos elementos *TATCCA* que están separados por 15 pb (Lu *et al.*, 1998) (Figura 13; Flecha púrpura). Además, la mayoría de las repeticiones del elemento *TATCCA* se encuentran sobrepuestas con los elementos MYBST1 (5' GGATA 3'), el cual es complementario al elemento *TATCCA* (Hwang *et al.*, 1998), y a I-box (5' GATAA 3'), en un arreglo similar al descrito para el gen *RAmy3D* en arroz (Toyofuku *et al.*, 1998) (Figura 13; Flecha azul).

Tabla 3. Elementos en *cis* identificados en las regiones promotoras de los probables homólogos de *STP1* en diferentes especies. Los números indican las posiciones de cada elemento con respecto al sitio de inicio de la traducción de cada gen.

Gen	Motivos en <i>cis</i>							
	5' TATCCA 3' 5' TGGATA 3'	5' GGATA 3' 5' TATCC 3'	5' GATAA 3' 5' TTATC 3'	5' CGACG 3' 5' CGTCG 3'	5' TATCT 3' 5' AGATA 3'	5' CATCC 3' 5' GGAIG 3'	5' GATTA 3' 5' TAATC 3'	5' ACGTG 3' 5' CACGT 3'
<i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtSTP1</i>)	-1291; -1270	-1286; -1265	-1287; -1266	-1234	-1131	-1323	-1208	-1202
<i>Vitis vinifera</i> (<i>VvHT1</i>)	-748; -563; -541; -493	-834; -753; -717; -558; -546; -427	-2316; -2132; -2076; -1258; -559; -426; -234; -156	-2443; -2430; -945	-2312; -1471; -1262; -1196; -1106; -1054; -300; -216; -213; -161	-2116; -2002; -1703; -1588; -1384; 1361; -1290; -1090	-1780; -1622; -1202; -1180; -1042; -177; -164	-673; -624; -245
<i>Malus domestica</i> (<i>MdHT4</i>)	-1796; -1063; -1052; -650; -302	-1803; -655	-2386; -1963; -1500	-1239; -1136	-2382; -2313; -1959; -1800; -716; -166	-1308; -790; -511	-2169; -2141; -1635; -1094; -946; -420	-2294; -1864; -1457; -1180; -923
<i>Arabidopsis lyrata</i>	-1454; -1285; -1264; -737; -729; -252	-2034; -1521; -1459; -1280; -1259; -808; -742; -734; -257	-2281; -2259; -2035; -1458; -1412; -1281; -809; -778; -546; -403; -265; -256; -140	-2270; -281	-1408; -1366; -1122; -902; -775; -495; -408; -270; -164; -118	-1317; -836; -71	-520; -456; -129; -120	-1442; -1337; -1196
<i>Boechea stricta</i>	-1445; -1280; -1259; -779; -264	-1951; -1450; -1275; -1254; -843; -784; -269	-1738; -1680; -1649; -1449; -1403; -1276; -1255;	-1223	-2395; -2393; -1734; -1653; -1581; -1399; -1361; -1245; -1120; -967; -808; -282	-1312; -371	-2389; -2190; -1959; -1716; -1633; -1203; -1197; -891; -885; -492	-1433; -1331; -1191
<i>Eucalyptus grandis</i>	2292; -1259; -1197; -1032; -726	-2287; -1398; -1254; -1192; -1131; -997; -721	-2309; -2243; -1854; -1529; -1193; -998; -972	-584	-2305; -2247; -1858; -1525; -1476; -1324; -1037; -976; -748	-2159; -1588; -1574	-2196; -1879; -1806; -1596; -1005; -49	-1505; -227
<i>Eucalyptus grandis</i>	-2354; -2343; -2164; -1928; -1853; -1260	-2349; -2338; -2159; -1968; -1923; -1848; -1255; -928; -750;	-2332; -2160; -1969; -1849; -1256; 1233; -685; -460	-139	-2221; -1521; -1229; -690; -583; -464; -436; -387; -188	-2035; -2029	-2167; -2095; -1163; -758; -404; -396	-1461
<i>Theobroma cacao</i>	-1383; -926; -916	-1378; -1198; -1071; -1063; -921; -911	-1602; -1572; -1379; -1113; -922; -912; -648; -641; -602; -550; -508	-937	-1018; -826; -652; -598; -586; -546; -254	-2502; -2122; -1390	-2193; -805; -558; -540; -271	-1362; -1050; -1017; -980; -935; -822; -621
<i>Fragaria vesca</i>	-905; -876; -768; -636; -330	-2303; -1125; -900; -871; -631; -325; -315	-2175; -2038; -1822; -1475; -1389; -861; -844; -764; -632; -448; -316	-931; -828	-2369; -2042; -1818; -1399; -1065; -865; -848; -818; -457; -452; -152	-1769; -895; -720	-2133; -1986; -1799; -1788; -742; -600; -585; -515; -405; -278	-2292; -604
<i>Fragaria vesca</i>	-905; -874; -768; -630; -330	-2303; -1125; -900; -870; -631; -325; -301	-2175; -2038; -1822; -1475; -1389; -861; -844; -764; -632; -448; -316	-930; -829	-2369; -2042; -1818; -1399; -1065; -865; -848; -818; -457; -452; -152	-1770; -899; -720	-2133; -1986; -1799; -1788; -742; -600; -585; -515; -405; -278	-2292; -604
<i>Mimulus guttatus</i>	-589; -549; -369; -353; -306	-584; -554; -415; -364; -358; -301	-959; -874; -837; -766; -594; -414; -365; -357; -302	-2450	-2342; -2050; -870; -500	-2416; -1876; -1326; -1522	-2276; -1738; -1592; -1237; -1193; -1113; -350; -290; -255; -191; -105	-2280; -1567; -1208; -857; -558
<i>Boechea stricta</i>	-1445; -1280; -1259; -779; -264	-1951; -1450; -1275; -1254; -784; -269	-2073; -1738; -1680; -1649; -1585; -1449; -1403; -1276; -844; -812	-1223	-2462; -2395; -1734; -1653; -1581; -1399; -1120; -1071; -967	-1312; -371	-2389; -2190; -1959; -1716; -1633; -1203; -891; -492	-1433; -1331; -1191

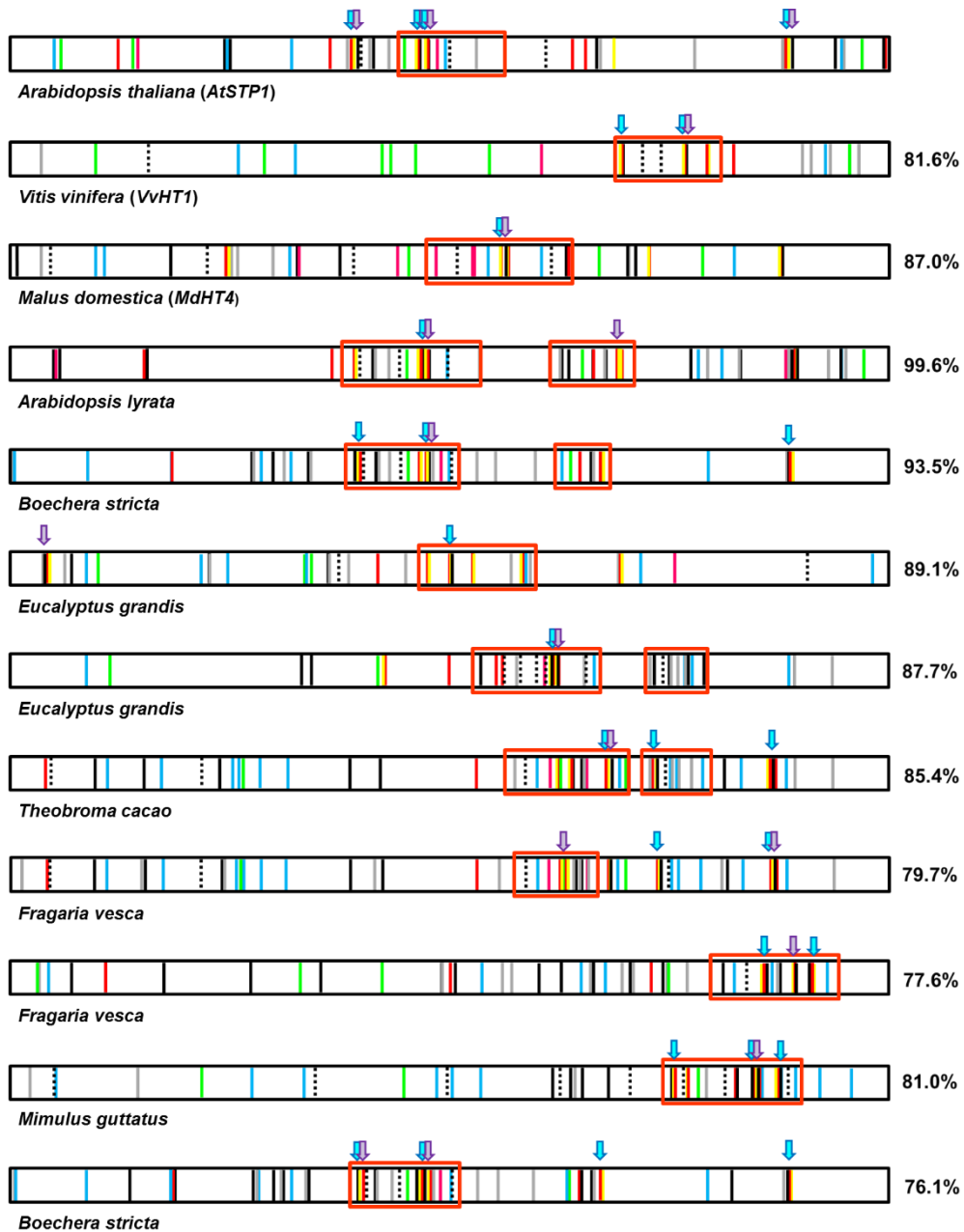


Figura 13. Distribución de los elementos regulatorios presentes en los promotores analizados de los genes homólogos de *AtSTP1* en distintas especies vegetales. Los recuadros negros representan 2.4 kb de la región regulatoria de cada uno de los homólogos de *AtSTP1*, los elementos regulatorios en *cis* esta representado por una franja de color, de acuerdo a la tabla que se presenta abajo. Los números indican el porcentaje de homología, a nivel de proteína, que presentan cada uno de los genes con respecto a *AtSTP1*. (caja anaranjada) corresponde a las zonas de la región regulatoria que presentan una mayor densidad de elementos. (flecha púrpura) indica una repetición en tándem del motivo *TATCCA*. (flecha azul) representa la localización de los motivos encontrados en la región promotora del gen *RAMY3D*.

7.2 Obtención de líneas homocigotas

Para analizar las líneas homocigotas *GRE*, se utilizaron los fragmentos de 338, 281, 253 y 177 pb de la región promotora de *STP1*, fusionados al p35S y al gen reportero de GUS, se seleccionaron las líneas independientes de la generación F₂ de cada construcción, que mostraron un 75% de plántulas resistentes al agente selectivo kanamicina (50µg/mL, Km⁵⁰), lo cual indicaba que probablemente portaban una sola inserción del transgen. A partir de éstas, se seleccionaron individuos resistentes a Km⁵⁰ y se obtuvo la siguiente generación (F₃), en la cual se corroboró el estado homocigoto del transgen por presentar una segregación de 100% de resistencia a Km⁵⁰. A partir de esta generación, se seleccionaron tres líneas independientes para cada construcción: *GRE338* (1)-4-1, (2)-1-1 y (6)-1-1; *GRE281* (2)-4-1, (3)-2-1 y (7)-2-1; *GRE253* (2)-4-1, (3)-1-1 y (4)-1-1; *GRE177* (1)-1-1, (3)-2-1 y (2)-4-1.

Con la finalidad de determinar si los elementos en *cis* que portan los fragmentos *GRE*, modificaban la expresión conferida por el p35S, el cual es un promotor fuerte y constitutivo, las líneas transgenicas fueron evaluadas por el ensayo histoquímico de actividad de GUS. Se sembraron semillas de las líneas seleccionadas en medio GM 1x suplementado con Km⁵⁰ y se ensayaron plántulas de 12 días para la detección de la actividad de GUS. Los resultados de este análisis demostraron que las plantas presentaron una clara actividad del gen reportero en todos los tejidos. La actividad de GUS se detectó en los cotiledones, así como en las hojas verdaderas y en las raíces, y en menor medida en el epicótilo de todas las plantas ensayadas, por lo tanto, esto permitió determinar que los elementos en *cis*, contenidos en cada uno de los fragmentos, no alteraron la actividad del p35S, bajo las condiciones analizadas al presentarse de manera homogénea en los tejidos (Figura 14).

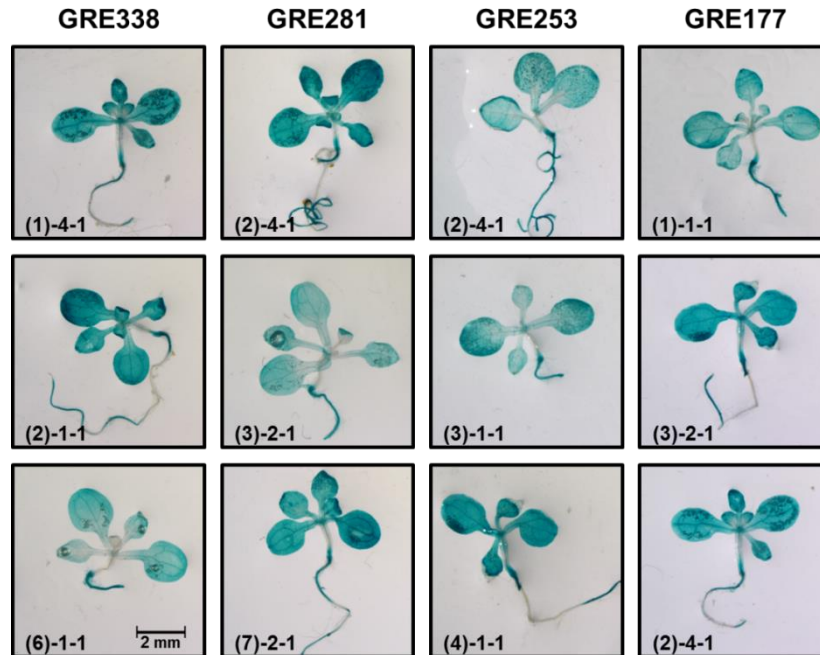


Figura 14. Análisis de la actividad de GUS en las líneas transgénicas homocigotas. Se muestran plántulas de 12 días, pertenecientes a las 3 líneas independientes seleccionadas para cada construcción, teñidas por actividad histoquímica de GUS, crecidas en medio GM 1x con Km⁵⁰.

Por otra parte, se generaron las líneas transgénicas control, las cuales fueron transformadas con el plásmido pBI121 y que por tanto contienen la fusión del p35S con el gen reportero de GUS y del gen que confiere resistencia a kanamicina. Las semillas provenientes de las plantas transformadas con el pBI121 se sembraron en medio GM 1x con Km⁵⁰ y se seleccionaron plántulas resistentes, las cuales mostraron una coloración verde de los cotiledones y un desarrollo normal del sistema radical con respecto a las plantas sensibles, las cuales presentaron falta de pigmentación y un desarrollo pobre (Figura 15).

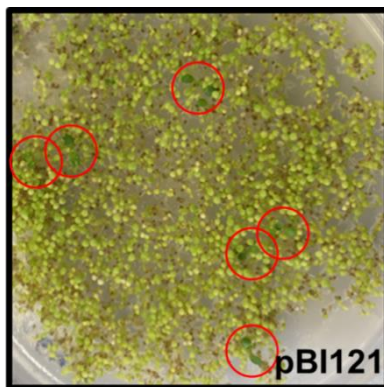


Figura 15. Selección de plantas transformadas con el plásmido pBI121. Se muestra la selección inicial, a partir de semillas de las plantas F_0 transformadas con el vector pBI121, en medio GM 1x suplementado con Km^{50} . Las plantas resistentes mostraron enverdecimiento de los cotiledones, lo cual sugiere la integración del transgen de selección (*nptII*) (círculos rojos).

Las plantas seleccionadas (F_1) se transfirieron a sustrato y en éstas se corroboró la presencia del transgen por medio de un análisis por PCR (Figura 16a y b). En seis de las plantas analizadas se presentó amplificación positiva de la fusión del p35S con el gen de GUS, mientras que en tres sólo se detectó una baja concentración del producto de la amplificación (Figura 16b). Para corroborar el estado transgenico de las seis plantas positivas al análisis por PCR, se ensayó una hoja de cada planta por actividad de GUS. Se observó tinción abundante en toda la lámina en cuatro de las hojas analizadas (plantas 26, 29, 31 y 36), lo que corresponde al patrón esperado en la actividad de GUS al encontrarse bajo el control del p35S. Mientras que, en las dos hojas restantes (plantas 22 y 24) se presentó una tinción muy tenue (Figura 16c). Se obtuvo semilla de cada una de las seis líneas transgenicas que corresponden a la F_2 . Posteriormente, se seleccionaron líneas independientes de la generación F_2 que mostraron un 75% de plantas resistentes a Km^{50} , lo cual denota con alta probabilidad la presencia de una sola inserción del transgen; éstas fueron trasplantadas a sustrato para obtener la generación F_3 . Para continuar con la obtención de las líneas pBI121 (control) en estado homocigoto, se seleccionaron las plantas (29), (31) y (36). A continuación, se procedió a confirmar el estado transgenico de las tres líneas seleccionadas en la F_3 . Se sembraron en medio GM 1x suplementado con Km^{50} y se ensayaron plántulas de 12 días para la detección de la actividad de GUS. Este análisis demostró que todas las plantas mostraron una coloración azul en los cotiledones, hojas verdaderas y en las raíces. Por lo cual, se resolvió que todas las plantas de la generación F_3 de cada una de las líneas seleccionadas, continúan expresando al gen reportero de GUS, al presentar actividad en todos los tejidos de la planta (Figura 16d).

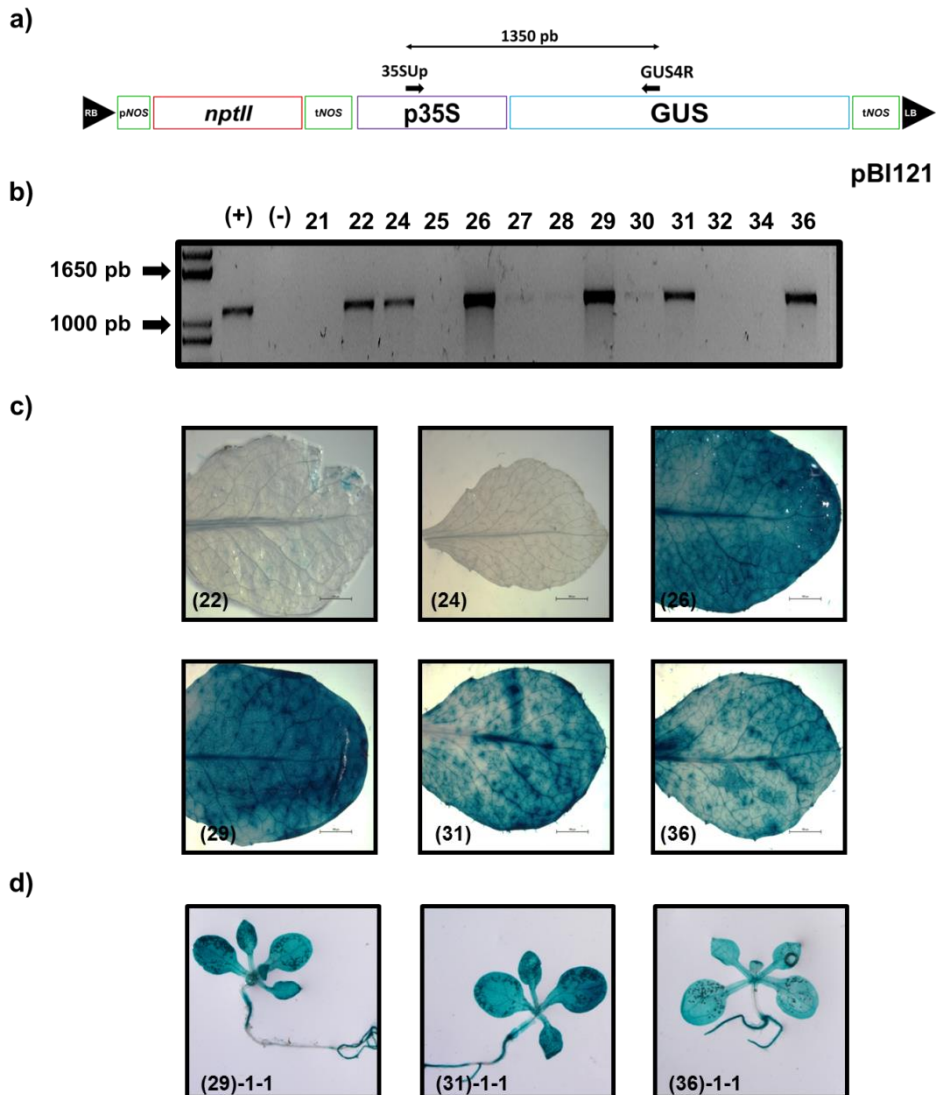


Figura 16. Análisis molecular de las plantas transformadas con el vector pBI121. **a)** Esquema del vector pBI121, se muestra la posición y el tamaño del fragmento amplificado con los oligonucleótidos 35SUp y GUS4R. **b)** Confirmación por PCR de la presencia de la fusión del p35S con el gen reportero de GUS. Se utilizó DNA genómico con los oligonucleótidos 35SUp y GUS4R (ver métodos, sección 6.3), para amplificar un fragmento de 1350 pb. (+), Control positivo, vector pBI121 purificado. (-), Control negativo, mezcla de reacción sin templado. **c)** Imágenes de las hojas de plantas adultas de la F₁ de las líneas transgénicas independientes que mostraron amplificación positiva del transgen, seleccionadas para generar las líneas homocigotas control, pBI121. **d)** Imágenes de plántulas de 12 días de la F₃, que pertenecen a las líneas independientes seleccionadas para efectuar los tratamientos.

7.3 Análisis de la regulación por azúcares en las líneas transgenicas *GRE*

Con el propósito de delimitar aún más la región que contiene a los elementos en *cis* de represión por azúcares, plantas de las diferentes líneas transgenicas *GRE* (*GRE338*, *GRE281*, *GRE253* y *GRE177*) y de las líneas control pBI121 se sometieron a tratamientos con glucosa (Glc). Las plantas se crecieron (en cuatro lotes de 50 semillas por línea) en medio líquido suplementado con sacarosa (0.5%), por 10 días y, posteriormente, se sometieron a un ayuno de fuente carbonada (sustituyendo el medio por uno carente de carbono) por dos días. Al término del ayuno de carbono, las plantas se sometieron a diferentes tratamientos: el medio se sustituyó por uno sin fuente de carbono (-C), o con 150 mM de glucosa (+Glc), o con 150 mM de manitol (+Mtl), por 6 h. Las plantas se colectaron y se purificó el RNA total para analizar la acumulación del transcrito de GUS (como gen reportero), y del gen *STP1* (control endógeno del tratamiento de Glc), por experimentos tipo Northern. Cabe mencionar que no se utilizó la actividad del reportero (GUS) para establecer sus niveles de expresión, debido a que estudios previos mostraron que la actividad de GUS es alta y muy estable, por lo cual no habría sido posible observar la represión bajo las condiciones analizadas (Cordoba *et al.*, 2015).

Se analizaron los niveles de expresión del gen reportero de GUS en tres líneas independientes de cada una de las cuatro construcciones, con sus respectivos duplicados experimentales. Como se muestra en la Figura 17, en las plantas de las líneas pBI121 no se presentaron cambios significativos en los niveles del transcrito de GUS bajo ninguno de los tratamientos; únicamente en presencia de 150 mM de glucosa se observó una ligera disminución en los niveles de acumulación del transcrito, lo cual podría sugerir que la presencia de glucosa afecta la expresión conferida por el p35S sin embargo, esta reducción nunca llegó a ser similar a los niveles que se presentaron en las líneas *GRE* (ver más adelante). Por lo que respecta a las plantas de las líneas *GRE338*, *GRE281* y *GRE253*, se observó que los niveles de acumulación del transcrito de GUS mostraron una reducción en presencia de Glc, comparados con los iniciales, previos a cada tratamiento (T₀), y con los tratamientos de -C y Mtl, evidenciando que los elementos contenidos en cada uno de estos fragmentos son capaces de promover la represión en presencia de glucosa de la expresión conferida por el p35S (Figura 17). Por lo que corresponde a la expresión de *STP1* en estas líneas, se observó claramente, con respecto al tiempo inicial (T₀), una reducción en los niveles del transcrito de *STP1* en las plantas sometidas al tratamiento con 150 mM de Glc

y, no así en las condiciones de ausencia de carbono (-C), ni en presencia de 150 mM de manitol (+Mtl). Esto indicó que, estando bajo la regulación del p35S ninguno de los tratamientos ejerció alteraciones en la expresión del gen reportero pero que el tratamiento de Glc fue efectivo ya que mostró la represión que se esperaba en la región regulada de esta manera en el promotor de *STP1* (como control endógeno de la represión por azúcares).

Por otro lado, en las plantas de las líneas *GRE177*, los niveles de acumulación del transcrito de GUS, en presencia de 150 mM de Glc, no mostraron una reducción, manteniéndose en niveles similares a los observados en los tratamientos sin fuente de carbono (-C) y con 150 mM de manitol (+Mtl). Nuevamente, la acumulación del transcrito del gen *STP1* en la línea *GRE177* presentó una disminución en presencia de Glc, mientras que en las condiciones de -C y Mtl, los niveles del transcrito no mostraron cambios con respecto al control inicial (T0). Esto permite concluir que el fragmento de 177 pb carece de los elementos de represión por Glc y, por lo tanto, estos elementos se encuentran ubicados entre los fragmentos de 253 y 177 pb del promotor de *STP1*, en una región de 76 pb. Sin embargo, debido a que para realizar la clonación de cada uno de los distintos fragmentos *GRE* en el vector pBI101 se generaron los sitios de restricción *HindIII* y *KpnI* hacia los extremos 5' y 3' respectivamente, únicamente se considera una región de 69 pb, como necesaria para conferir la represión del gen en respuesta a glucosa.

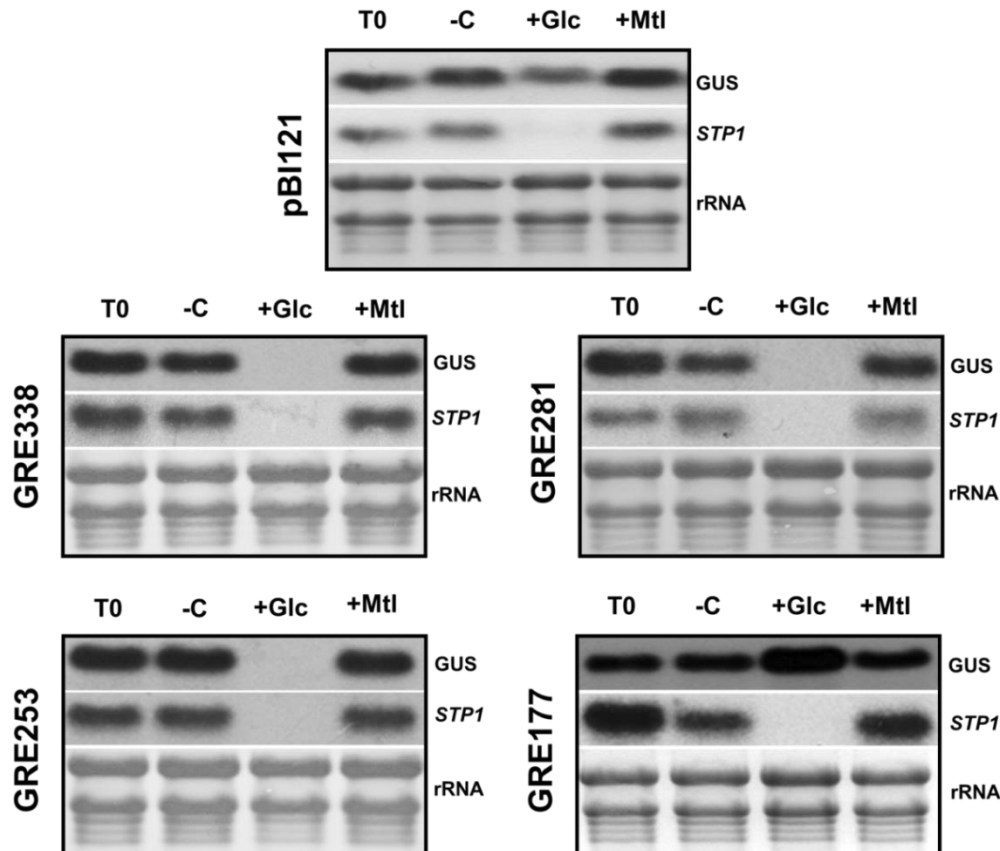


Figura 17. Análisis de la regulación por azúcares en las plantas transgénicas GRE y pBI121. Se analizó la expresión de GUS y *STP1* en plántulas de 12 días de las líneas pBI121, *GRE338*, *GRE281*, *GRE253* y *GRE177*, bajo tratamiento de 2 días en un medio sin fuente de C, y posteriormente sometidas a distintos tratamientos por 6 h: sin fuente de carbono (-C), o con 150 mM de glucosa (+Glc), o con 150 mM de manitol (+Mtl). Tiempo 0 (T0), corresponde al control previo a cada tratamiento. Se utilizaron 10 µg de RNA total y cada membrana se hibridó con las sondas de *STP1* y *GUS*. Como control de carga se muestra la tinción de los RNA ribosomales con azul de metileno.

El fragmento delimitado de 69 pb se ubica entre las posiciones -1244 y -1174 pb, con respecto al sitio de inicio de la traducción del gen *STP1*. En este fragmento se encuentran tres motivos distintos que han sido reportados como elementos de respuesta a azúcares en la literatura. El primero de ellos, el elemento CGACGOSAMY (5' CGACG 3') que se identificó originalmente en la región promotora del gen *α-Amy3D* en arroz, y que se requiere para la represión de dicho gen en presencia de glucosa (Hwang *et al.*, 1998). El segundo corresponde al elemento GATTA (5' GATTA 3') que se encontró mediante un análisis de microarreglos, el cual reveló que la secuencia que corresponde a este elemento, está presente en la región regulatoria de diversos genes que se reprimen por la presencia de glucosa (Li *et al.*, 2006). Por último, el elemento G-box related (5' ACGTG 3'), es parte de la

secuencia consenso de 11 pb (5' C/A-ACACGTGGCA 3') del elemento *G-box* (Lu *et al.*, 1998) este elemento se reportó por primera vez en la región 5' UTR del gen que codifica para la subunidad menor de la enzima Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa Oxidasa (*rbcS*) y participa en la regulación de este gen por azúcares (Salinas *et al.*, 1992). Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que en la represión participara algún elemento no reconocido hasta este momento.

7.4 Mutagénesis del elemento CACATG

Además de los tres elementos de respuesta a azúcares que han sido identificados en la región regulatoria de diversos genes en distintas especies vegetales, que continúan estando presentes en el fragmento de 69 pb; un trabajo realizado anteriormente en el laboratorio, permitió identificar al elemento *CACATG*, el cual ha sido asociado como un motivo de respuesta a distintas hormonas y a estrés (Li *et al.*, 2007; Nakata *et al.*, 2013). Por lo cual, el determinar si tal elemento también participa como el sitio de reconocimiento de un factor transcripcional que participa en la regulación de la expresión génica en respuesta a las fluctuaciones en los niveles de glucosa presentes en la célula, resulta ser bastante novedoso e interesante.

Considerando que una proteína se uniera de forma específica a estos elementos reguladores en *cis* para ejercer la represión por Glc del gen *STP1* paralelamente a este trabajo, se identificaron proteínas de unión al fragmento de 310 pb de la región promotora de *STP1*, mediante un ensayo de *DNA pull-down*, en presencia de Glc. A partir del análisis de las proteínas identificadas se generó una lista de 10 proteínas que podrían estar participando en la represión de *STP1* en respuesta a glucosa (Cruz-López, 2015). Dentro de estos candidatos, destaca el factor transcripcional AIB (*ABA INDUCIBLE*; At2g46510), el cual se caracteriza por contener dominios de unión a DNA del tipo bHLH y, por participar como un regulador de la respuesta a ABA (Li *et al.*, 2007). Este factor también se ha identificado como JAM1 (*JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE*) y, se ha reportado que las proteínas con dominios bHLH participan como represores en las vías de señalización por ácido jasmónico (JA). Nakata y colaboradores (2013) identificaron a AIB/JAM1 como un represor pasivo que interfiere con la actividad de diversos factores transcripcionales, previniendo la unión de éstos al motivo consenso 5' *CACATG* 3'. De manera coincidente, en el caso del promotor del gen *STP1*, este motivo está localizado en la región previamente acotada de 69 pb, entre las posiciones -1208 y -1202 pb, con respecto al sitio de inicio de la traducción.

Para determinar el posible papel del elemento *CACATG* en la respuesta a azúcares, se procedió a realizar la mutación en la versión del fragmento de 338 pb por medio de reacciones de PCR, se sustituyó la secuencia del elemento *CACATG* por la secuencia 5' *GCTTAT* 3'. El fragmento amplificado de 338 pb, con el elemento *CACATG* mutado (*GREmut*), fue clonado en el vector pGEM-T, y se corroboró por secuenciación la presencia de la mutación. Esta mutación no generó ningún elemento que pudiera participar en la respuesta a azúcares en el fragmento de interés (Figura 18).

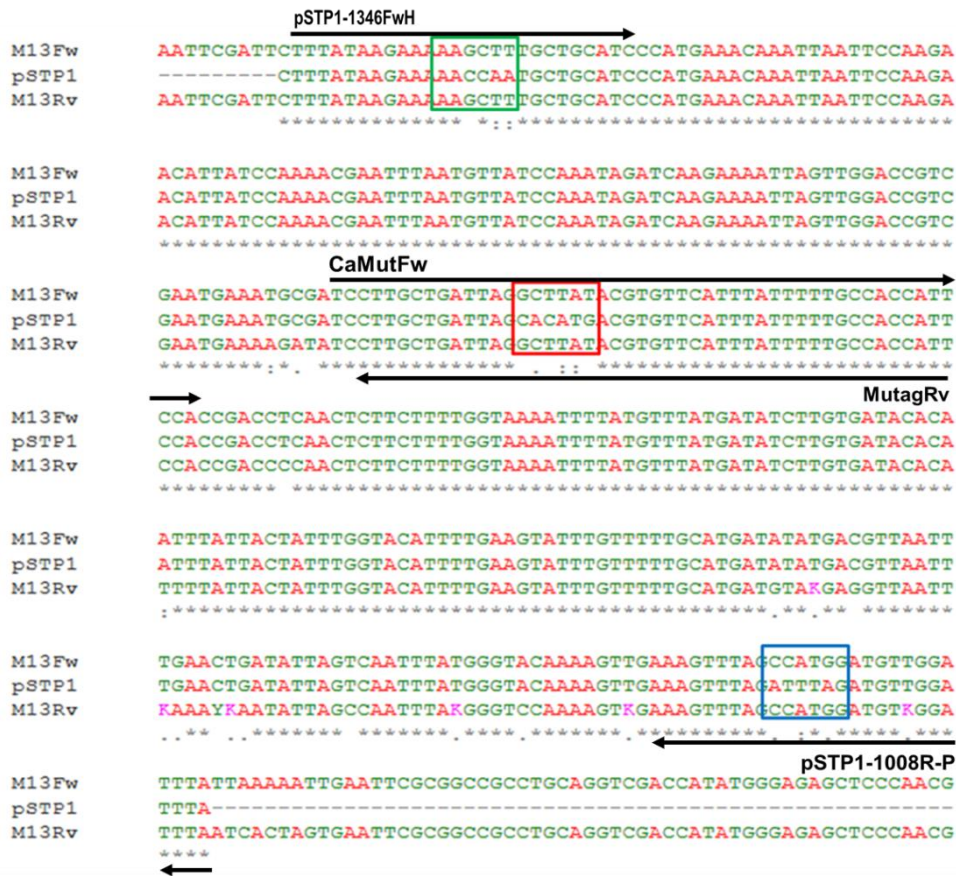


Figura 18. Mutación sobre el elemento *CACATG*. Alineamiento con los resultados de la secuenciación de la construcción pGEM-T::*GREmut*::p35S que presenta la mutación de 6 pb del fragmento *GRE* (*CACATG*>*GCTTAT*) contra el fragmento de la region promotora del gen *STP1* (caja roja), y los cambios en la secuencia generados para introducir los sitios de restricción *HindIII* (caja verde) y *KpnI* (caja azul). Además se muestra la posición de los oligonucleótidos empleados para realizar los cambios en la secuencia.

Posteriormente, se clonó al p35S delante del fragmento *GREmut*, generando la construcción pGEM-T::*GREmut*::p35S. Finalmente, la fusión del fragmento *GREmut* con el p35S se subclonó en el vector pBI121, entre los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI*, en sustitución del p35S propio del vector, generando la construcción *GREmut*. A continuación,

se procedió a transformar células electrocompetentes de *A. tumefaciens* C58C1 con la construcción *GREmut*, y se confirmó la presencia del plásmido portador de la construcción por medio de PCR en colonia (Figura 19).

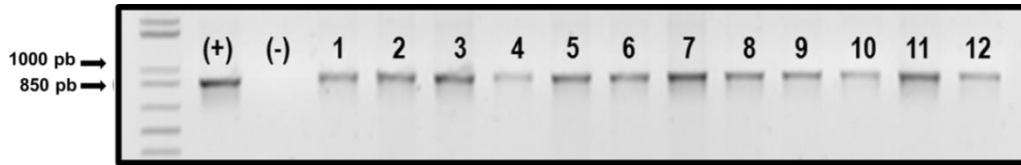


Figura 19. PCR en colonia para confirmar la presencia del vector pBI121::*GREmut*::p35S (*GREmut*) en las colonias transformadas de *A. tumefaciens*. El tamaño del fragmento amplificado corresponde a 910 pb, utilizando los oligonucleótidos pSTP1-1346Fw-H y 35S-Rv. (+), Control positivo, vector pBI121::*GREmut*::p35S purificado. (-), Control negativo, mezcla de reacción sin templado. (1-12), Colonias de *A. tumefaciens* analizadas.

Una vez corroborada la presencia del vector *GREmut* en *A. tumefaciens*, se transformaron plantas de *Arabidopsis* ecotipo Columbia (Col-0) por el método de inmersión floral. Se permitió su autopolinización y se colectó la semilla (F_1). Las semillas de la F_1 se sembraron para seleccionar a las plantas transgénicas en medio GM 1x suplementado con Km^{50} . Se seleccionaron 17 plántulas resistentes que fueron analizadas por PCR y actividad de GUS. Se confirmó el estado transgénico de nueve plantas F_1 (*GREmut*2, 3, 4, 5, 8, 12, 13, 15 y 17) por medio de PCR, utilizando DNA genómico (Figura 20a y b). Por medio de un ensayo de actividad histoquímica de GUS en hojas de roseta se observó coloración azul en la lámina de cada una de las hojas analizadas (Figura 20c). Se procedió a obtener la semilla de cada línea que corresponden a la F_2 y, se seleccionaron aquellas que presentaron un 75% de plantas resistentes a Km^{50} para obtener la generación F_3 . Se seleccionaron las líneas (4), (5) y (8). Al igual que las líneas *GRE* y pBI121 (control), se procedió a reafirmar el estado transgénico de las líneas seleccionadas en la F_3 , para lo cual se sembraron semillas de las líneas seleccionadas en medio GM 1x suplementado con Km^{50} y, se analizaron plántulas de 12 días en ensayos para la detección de la actividad de GUS. Los resultados de este análisis mostraron una clara actividad del gen reportero en todos los tejidos de la planta. La actividad de GUS se detectó en los cotiledones, en las hojas verdaderas y en las raíces, distribuida homogéneamente en los tejidos (Figura 20d).

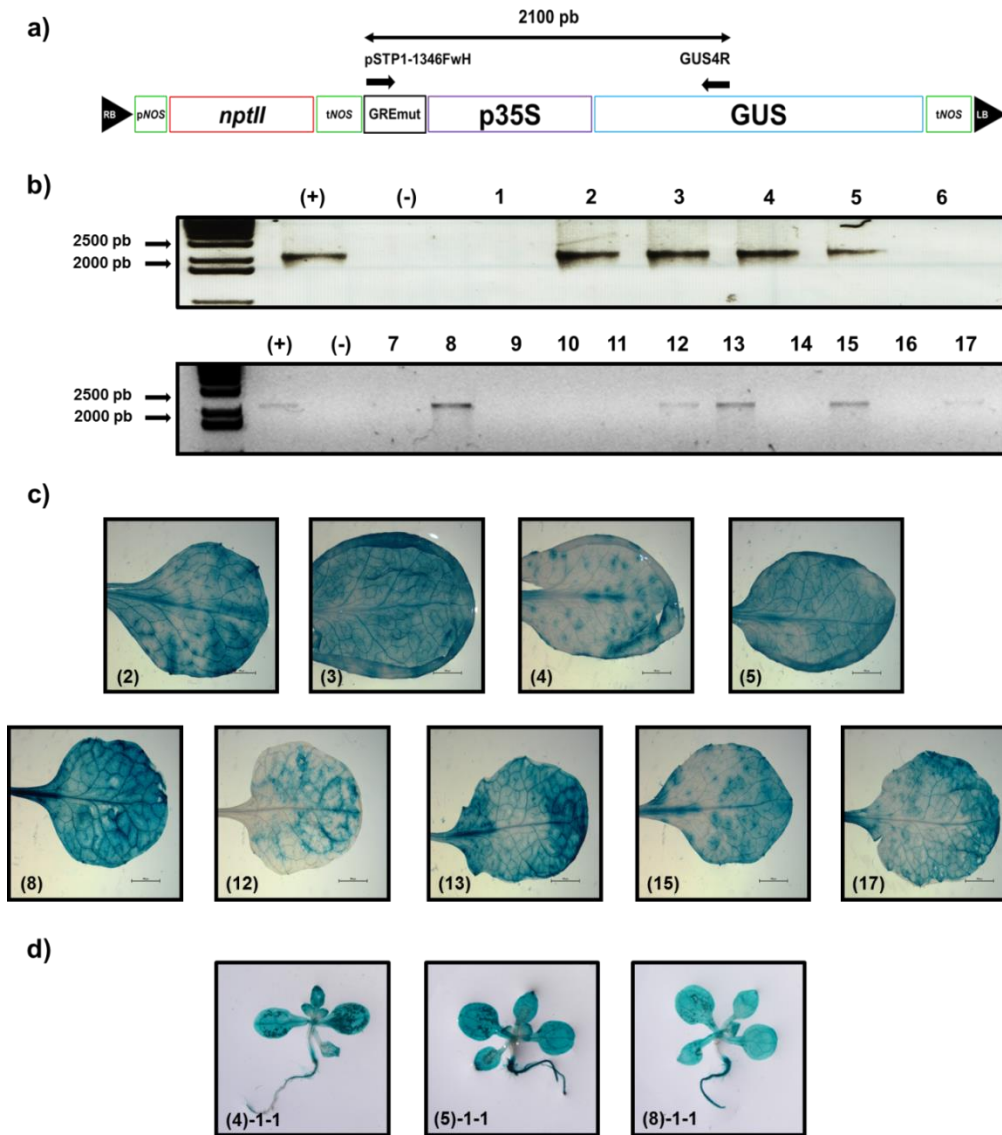


Figura 20. Confirmación de las líneas GREmut. **a)** Esquema de la construcción GREmut, entre los bordes del T-DNA del vector pBI121, se muestra la posición y el tamaño del fragmento amplificado con los oligonucleótidos pSTP1-1346FwH y GUS4R. **b)** Análisis por PCR, utilizando DNA genómico, con los oligonucleótidos pSTP1-1345FwH y GUS4R. El tamaño esperado corresponde a un fragmento de 2100 pb. (+), Control positivo: construcción GREmut. (-), Control negativo: mezcla de reacción sin incluir el templado. **c)** Imágenes de las hojas de plantas adultas de la F₁ de las líneas transgénicas independientes que mostraron actividad histoquímica de GUS. **d)** Imágenes de plántulas de 12 días de la F₃, que pertenecen a las líneas independientes seleccionadas para obtener a las líneas en estado homocigoto.

7.5 Análisis de la regulación por azúcares en las líneas GREmut

Para determinar la participación del elemento *CACATG* en la represión de *STP1* por glucosa se mutó la secuencia de este elemento (*CACATG*>*GCTTAT*) en la versión del fragmento *GRE338* fusionado con el p35S y el gen reportero de GUS y posteriormente se

obtuvieron plantas transgénicas. Para evaluar el efecto de esta mutación en la regulación del gen reportero por azúcares, se procedió a analizar los niveles de acumulación de los transcritos de GUS y *STP1* en cuatro líneas transgénicas, en tratamientos con Glc y Mtl. Como se muestra en la Figura 21, los niveles de expresión de GUS se mantuvieron sin cambios, comparados con los niveles iniciales previos a cada tratamiento (T0). Con respecto a los tratamientos sin fuente de carbono (-C) y con Mtl no se detectaron cambios drásticos en la acumulación del transcrito de GUS en presencia de Glc. Estos resultados sugieren que el elemento *CACATG* es suficiente para conferir la represión por Glc, debido a que la mutación de este elemento derivó en la pérdida de la represión por glucosa. El efecto de represión por azúcar se confirmó mediante el análisis de los niveles del mensajero del gen endógeno *STP1*. Como se muestra en la Figura 21, la presencia de Glc promovió la disminución de los niveles del transcrito de *STP1* con respecto al T0, mientras que se mantuvieron en niveles similares en los tratamientos sin carbono (-C) y con Mtl, lo cual validó la efectividad de los tratamientos.

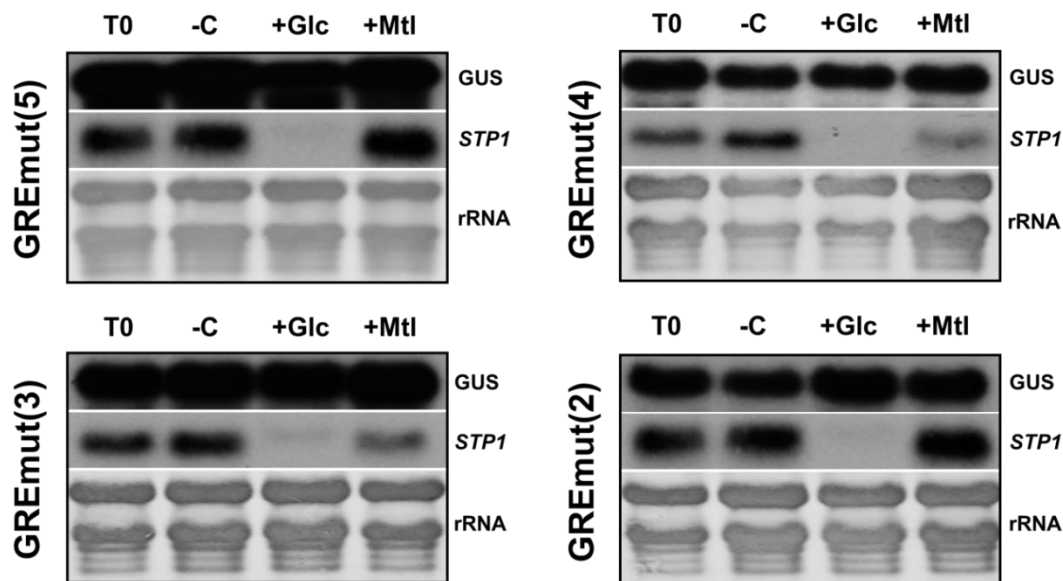


Figura 21. Análisis de la regulación por azúcares de las líneas GREmut. Se muestra el análisis de expresión de los genes de GUS y *STP1* por experimentos tipo Northern, en las cuatro líneas GREmut independientes. Se analizaron plántulas de 12 días de edad sometidas a 2 días de ayuno de fuente de C y posteriormente a tratamientos sin fuente de carbono (-C), o con 150 mM de glucosa (+Glc) o con 150 mM de manitol (+Mtl), durante 6 horas. T0 indica los niveles de GUS y *STP1* iniciales, previos a cada tratamiento. Se utilizaron 10 µg de RNA total y cada membrana se hibridó con las sondas de *STP1* y GUS. Como control de carga se muestra la tinción de los rRNA ribosomales con azul de metileno.

7.6 Análisis de los promotores de genes regulados negativamente por glucosa

Una vez establecido que el elemento *CACATG* participa en la represión de *STP1* por glucosa, se procedió a analizar si tal elemento se encuentra presente en la región regulatoria de 2.4 kb de los homólogos de *STP1* en otras especies vegetales. La identificación del elemento *CACATG* en cada una de las secuencias, apoyaría la idea de que estos genes están regulados por un mecanismo común. Para este análisis también se consideraron diversos miembros de la familia génica STP: *STP4* (At3g19930), *STP10* (At3g19940), *STP13* (At5g26340), *STP14* (At1g77210) y, algunos otros genes que se regulan negativamente por glucosa, y en cuya represión no está involucrada la HXK1: *ASN1* (At3g473409; Lam *et al.*, 1998), *UGP* (At3g03250; Kleczkowski *et al.*, 2004), *SAUR32* (*SMALL AUXIN UPREGULATED RNA 32*; At2g46690), *GASA4* (*GAST1 PROTEIN HOMOLOG 4*; At5g15230; Zhong *et al.*, 2015) y *CYCD1* (*CYCLIN D1*; At1g70210; Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). La secuencia regulatoria 5' de cada uno de los genes nombrados anteriormente se obtuvo mediante la herramienta en línea: Seq-viewer (www.arabidopsis.org).

Los resultados obtenidos en este análisis, demostraron que el elemento *CACATG* está representado en al menos una ocasión en cada uno de los promotores de los genes analizados. Además, el hecho de que este elemento se conserve en la región regulatoria de los genes homólogos a *STP1* en distintos organismos vegetales; así como en diversos genes cuya expresión se regula negativamente por un aumento en los niveles de azúcares (Figura 22), sugiere que el motivo *CACATG* podría participar en la regulación de la expresión de tales genes en respuesta a glucosa. Sin embargo, debido a que la posición en la que se encuentra este elemento no se conserva en los promotores de estos genes, es probable que se requiera de la presencia de otras secuencias que permitan que tal elemento sea reconocido como el sitio de unión para factores transcripcionales que regulen de manera negativa la respuesta a glucosa.

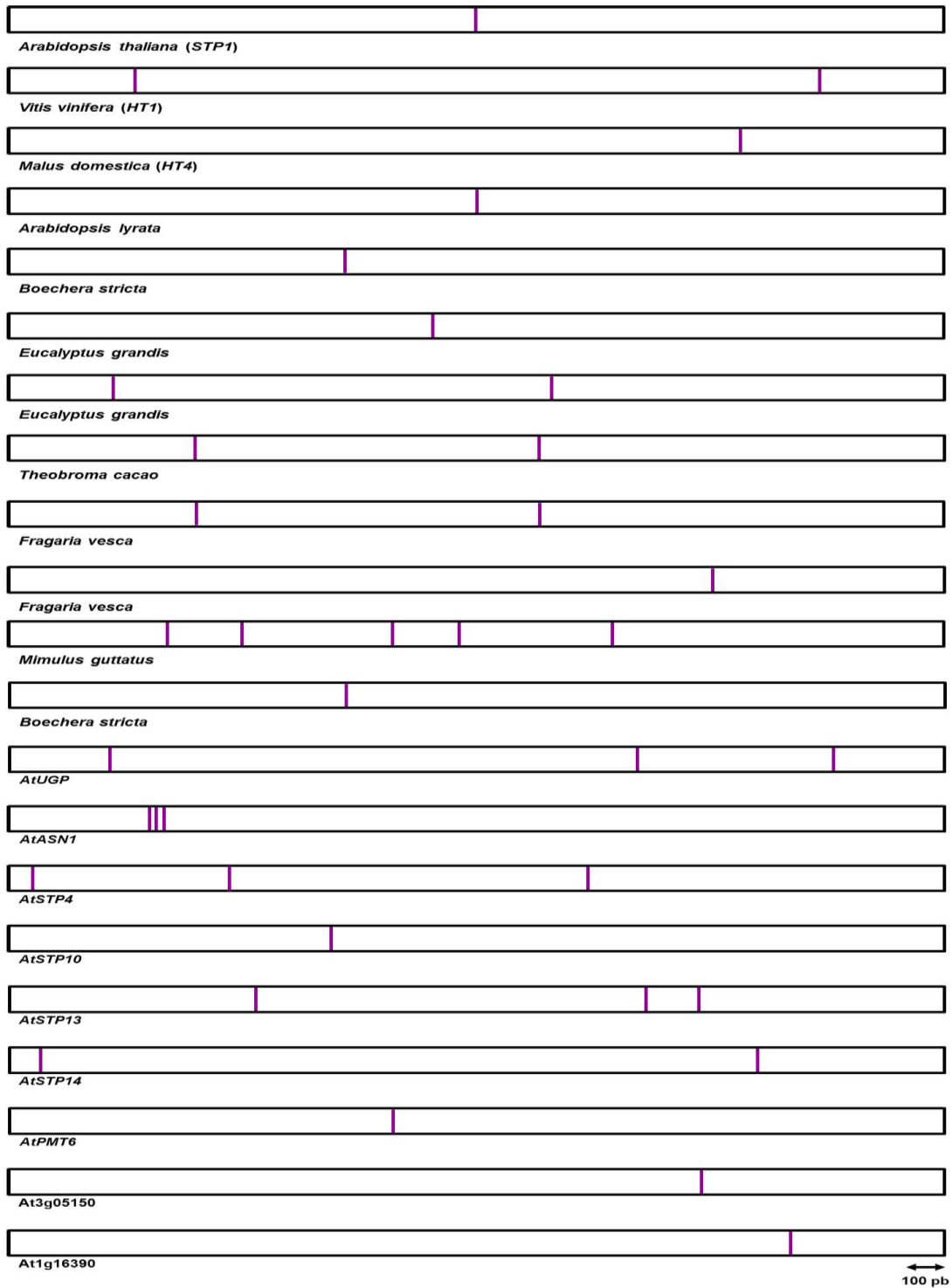


Figura 22. El elemento **CACATG** está presente en la región regulatoria de diversos genes que son regulados por glucosa. En la figura están representados 2.4 kb de la región regulatoria de los homólogos de *STP1*, y de diversos genes que se ha reportado que su expresión es regulada negativamente por un aumento en los niveles de azúcares, como es el caso de algunos miembros de la familia génica STP. (■) Representa a cada una de las repeticiones del elemento *CACATG*.

8 Discusión

La señalización por azúcares es un proceso sumamente complejo mediante el cual se desencadena una serie de respuestas que involucran la participación de numerosos factores de transcripción, los cuales, a su vez, son capaces de regular la expresión de diversos genes (Hwang *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1998; Tofokuyu *et al.*, 1998; Rolland *et al.*, 2002). En las últimas décadas se han llevado a cabo varios análisis que han aportado datos importantes para comprender los mecanismos que permiten que los azúcares puedan inducir o reprimir la expresión de una gran variedad de genes, como es el caso de diversos transportadores de azúcares, o de algunos genes implicados en la síntesis y removilización de azúcares como *INV*, *SUS* (Koch, 2004) o el gen que codifica para la AGPasa (Kolbe *et al.*, 2005), además de otros implicados en la fotosíntesis como *CAB1* y *rbcS* (Sheen *et al.*, 1990; Koch *et al.*, 1996; Jang *et al.*, 1997, Rolland *et al.*, 2002; Rolland y Sheen, 2005; Koch, 2004; Rolland *et al.*, 2006; Eveland y Jackson, 2012). Es por ello que estamos interesados en conocer más y entender mejor estos mecanismos de regulación. En particular, en este trabajo, se propuso identificar los elementos en *cis* que participan en la regulación por azúcares a nivel transcripcional y, de esta manera, dilucidar algunos de los componentes de las cascadas de señalización involucrados en este tipo de respuesta. Los datos de este trabajo permitieron identificar al motivo *CACATG* como un nuevo elemento de respuesta a glucosa, cuya presencia es necesaria para conferir la represión del gen *STP1*, en respuesta a un aumento en los niveles de este azúcar.

8.1 Identificación de los elementos en *cis* involucrados en la represión del gen *STP1* por glucosa

Se ha evidenciado que los niveles de los transcritos de algunos genes que codifican para miembros de la familia de transportadores de azúcares STP (SUGAR TRANSPORTER PROTEIN), presentan una alta sensibilidad a los cambios en los niveles de azúcares (Price *et al.*, 2004; Villadsen y Smith, 2004). En la región de 310 pb del promotor de *STP1*, la cual es necesaria para que ocurra la represión en presencia de glucosa, identificada previamente en nuestro laboratorio, están presentes diversos motivos en *cis* que se reconocen como elementos de respuesta a azúcares en otros genes y por lo cual podrían participar en la regulación de *STP1* por glucosa (Cordoba *et al.*, 2015).

Los análisis por remoción de secuencias en promotores han permitido identificar regiones importantes para su regulación (Zarka *et al.*, 2003; Cominelli *et al.*, 2011). Este tipo de

análisis han sido empleados extensamente para identificar secuencias importantes para la regulación de diversos genes en respuesta a azúcares en plantas (Ishiguro y Nakamura, 1994; Toyofuku *et al.*, 1998; Maeo *et al.*, 2005). Sin embargo, tan sólo un número limitado de estos estudios han demostrado que tales secuencias sean capaces de reprimir la expresión de un gen, fusionado a un promotor fuerte, como el p35S, en respuesta a un aumento en los niveles de glucosa (Toyofuku *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1998; Girin *et al.*, 2007). Por lo cual, hasta la fecha, no se ha podido determinar si las secuencias que confieren la represión de genes en respuesta a los niveles de azúcares, pueden actuar de manera autónoma, o requieren de un contexto específico para su función reguladora.

Diversos estudios han demostrado que existen secuencias que son lo bastante específicas y fuertes como para llegar a inhibir la expresión del p35S. Un ejemplo de ellos es el trabajo descrito por Cai y colaboradores (2007) quienes manipularon el funcionamiento del p35S mediante la fusión de una serie de elementos denominados *LPSE (Leaf and Panicle/Stem-specific Element)*, que fueron capaces de conferir regulación específica sobre tal promotor. El análisis de la fusión transcripcional del fragmento original de 338 pb al p35S nos permitió corroborar los resultados obtenidos por Cordoba y colaboradores (2015), en los cuales se evidenció que la presencia de alguno(s) de(los) elemento(s) contenidos en el fragmento, son suficientes para conferir la represión de un gen, que es regulada por un promotor fuerte y constitutivo como lo es el p35S por glucosa.

A través del análisis *in silico* de los promotores de genes homólogos de *STP1* en otras especies vegetales, se demostró que todos los elementos reguladores en *cis* de respuesta a azúcares, localizados en la región de 310 pb, también se encuentran en los promotores analizados. Además, en todos estos promotores fue posible identificar algunas zonas altamente pobladas de elementos de respuesta a azúcares, cuyo arreglo se asemeja al que se encontró en el fragmento de 310 pb, siendo más parecida entre los organismos filogenéticamente más cercanos, como es el caso de *A. thaliana* y *Arabidopsis lyrata*. Esto sugiere que los elementos reguladores en *cis*, y el mecanismo de regulación que actúan para reprimir la expresión de *STP1* en *Arabidopsis*, podrían actuar del mismo modo en la regulación de los genes homólogos. Por otro lado, la presencia de múltiples copias del elemento EVENINGAT (5' TATCT 3') en la región promotora de los diversos homólogos de AtSTP1 respalda la idea de que los niveles de azúcares influyen directamente en la regulación circadiana de diversos genes, sugiriendo una interconexión entre ambos mecanismos reguladores (Haydon *et al.*, 2013).

A pesar de que los análisis *in silico* de elementos regulatorios en *cis* han llegado a ser importantes para la identificación de estos elementos dentro de las regiones promotoras, éstos únicamente pueden ser considerados como un referente de la posible participación de dichos elementos en la regulación de la expresión del gen en condiciones específicas. El hecho de que las secuencias que conforman a estos elementos sean de un tamaño tan reducido (4-8 nt en promedio), ocasiona que frecuentemente se identifique a un gran número de posibles elementos por los algoritmos actuales de predicción. En los genomas más grandes, como es el caso de los organismos eucariotas, es posible encontrar un gran número de copias de secuencias cortas que pertenecen a un mismo elemento, a pesar de ello, y de acuerdo a su localización y accesibilidad, únicamente una pequeña porción de estas copias podría ser funcional y permitir la unión de proteínas *in vivo* (Hardison y Taylor, 2012; Hernandez-Garcia y Finer, 2014). Un claro ejemplo de esto es el motivo GATA1 (GATA-binding factor1) cuya secuencia (5' GATA 3') se repite en al menos 8 millones de veces en el genoma de ratón (*Mus musculus*), y de los cuales, solamente 15,000 de estas secuencias, funcionan como sitio de unión de un factor transcripcional (Zhang *et al.*, 2009). Por lo tanto, resulta esencial la comprobación de la funcionalidad de estos elementos de manera experimental.

Estudios previos han demostrado que existen secuencias regulatorias en *cis* que son capaces de regular la expresión de un gen fusionado al p35S mínimo (p35Smin, ~136 pb), en respuesta a un cambio en los niveles de azúcares (Chan *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1998; Girin *et al.*, 2007). Sin embargo, este trabajo es el único del que tenemos conocimiento, en el cual, se demostró que la presencia de un elemento regulatorio en *cis* es capaz de reprimir la expresión de un gen conferida por el p35S completo. Por lo que respecta a este estudio, se demostró que en las líneas *GRE338*, *GRE281* y *GRE253*, está(n) presente(s) el(los) elemento(s) de respuesta a glucosa, que podría(n) estar participando en la represión de *STP1*. Mientras que, en la línea *GRE177*, la acumulación de los niveles del transcrito de *GUS* indica que en estas 177 pb ya no está presente ninguno de(los) elemento(s) involucrados en la respuesta de represión por glucosa bajo las condiciones analizadas. Estos resultados permiten concluir que existe una región de 69 pb, donde se encuentran incluidos tres elementos identificados por el análisis *in silico* que corresponden a tres tipos de motivos que podrían estar participando en la represión del gen *STP1* por glucosa.

A pesar de que los resultados obtenidos en este análisis no contemplan la participación de los motivos TATCCAOSAMY (5' TATCCA 3') y SREATM (5' TTATCC 3') que se ha

demostrado experimentalmente que ambos elementos participan en la respuesta de represión génica por azúcares (Lu *et al.*, 1998; Tatematsu *et al.*, 2005). Es importante considerar que las construcciones GRE empleadas en este trabajo se encuentran regulando a un promotor alternativo, el p35S; por lo cual no es posible descartar del todo la participación de estos motivos en la regulación por glucosa del *STP1*, debido a que estos se encuentran fuera de su contexto genómico en donde podrían ser relevantes para que ocurra este tipo de respuesta.

8.2 El fragmento de 69 pb contiene a los elementos en *cis* que participan en la represión de *STP1* por glucosa

Entre la línea *GRE253*, que aún presenta la respuesta de represión por glucosa y la línea *GRE177*, la cual mostró pérdida de esta represión, se encuentra una región de 69 pb que aún conserva tres de los elementos reguladores en *cis*, identificados inicialmente *in silico* por Cordoba y colaboradores (2015). Estos elementos, denominados CGACGOSAMY (5' CGACG 3'), GATTA, G-box "related" (5' ACGTG 3'), están relacionados con la regulación de diversos genes en respuesta a azúcares en distintas especies vegetales. Por lo que respecta a los tres elementos contenidos en la región de 69 pb, los elementos CGACGOSAMY y G-box "related" actúan en la modulación de las respuestas de represión por glucosa en arroz (Lu *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 1998). Mientras que, el elemento GATTA sólo ha sido propuesto como un elemento de represión por azúcares a través del análisis de expresión global, en *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2006). De esta manera, mediante el análisis de las distintas construcciones *GRE*, en presencia o ausencia de glucosa, se logró acotar una región de 69 pb, la cual contiene al menos a un elemento en *cis* que participa en este tipo de respuesta y, por tanto, parece desempeñar un papel fundamental en la represión de *STP1* por altos niveles de glucosa.

Aunado a lo anterior, un ensayo del tipo *DNA pull-down* que se realizó en paralelo a este trabajo, reveló la presencia del factor transcripcional AIB/JAM1 (Cruz-López, 2015), y sugirió que este factor reconoce y se une a algún elemento específico ubicado en el fragmento de 310 pb en presencia de glucosa (150 mM). AIB/JAM pertenece a la familia de factores transcripcionales con dominio bHLH ("basic Helix-Loop-Helix") (Li *et al.*, 2007; Nakata *et al.*, 2013). La secuencia canónica que reconocen los factores transcripcionales bHLH es el hexámero conocido como E-box (5' CANNTG 3') (Massari y Murre, 2000). Se ha reportado que el factor transcripcional AIB/JAM1 actúa como un represor a nivel transcripcional, regulando las vías de señalización por ácido jasmónico de manera negativa

(Nakata *et al.*, 2013), a partir del reconocimiento de variantes de la E-box, siendo una de éstas el elemento 5' CACATG 3'. Asimismo, en la región acotada de 69 pb se identificó a la secuencia 5' CACATG 3', localizada entre los -1208 y -1202 pb antes del sitio de inicio de la traducción. Por lo cual, el hecho de que se haya identificado a un factor transcripcional que se una a la región de 310 pb únicamente en presencia de Glc, y dado que una de las secuencias que es reconocida por dicho factor transcripcional (5' CACATG 3') se conserve dentro de la región que se acotó durante el presente análisis, hicieron de éste un candidato prioritario para determinar su posible participación en la represión de *STP1* por Glc a pesar de que no existen reportes previos que lo relacionen con la respuesta a azúcares.

8.3 El elemento CACATG participa en la represión de *STP1* por glucosa

El análisis de las líneas *GREmut* evidenció que no existe un cambio significativo en respuesta a azúcares entre los niveles de acumulación del transcrito de GUS en el tratamiento con Glc, con respecto a los tratamientos sin fuente de carbono y de manitol. Los resultados de este análisis demostraron que la mutación del elemento CACATG resultó en la pérdida total de la represión por azúcares, indicando que este elemento participa en la represión de *STP1* en respuesta a glucosa bajo las condiciones analizadas. Actualmente no existe un antecedente que relacione directamente al elemento CACATG con la respuesta a azúcares en plantas. Sin embargo, un gran número de reportes lo han relacionado con la regulación de la expresión génica en respuesta a distintos tipos de estrés como: sequía (Abe *et al.*, 1997) o luz (Acevedo-Hernandez *et al.*, 2005) y también a distintas hormonas como ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993; Abe *et al.*, 1997), auxinas y brasinoesteroides (Nemhauser *et al.*, 2004; Walcher y Nemhauser, 2012) y ácido jasmónico (Dombrecht *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011, Qi *et al.*, 2011).

Adicionalmente, el elemento CACATG también se puede catalogar como una variante del elemento E-box (*Enhancer-box*); ya que, la secuencia consenso de este tipo de elemento es el hexámero 5' CANNTG 3' (donde "N" puede ser cualquier nucleótido) (Massari y Murre, 2000). Los factores transcripcionales que reconocen al elemento E-box, y a diversas variantes de éste, poseen un dominio del tipo bHLH (Heim *et al.*, 2003). Este dominio consiste en dos α -hélices anfipáticas (encargadas de estabilizar la dimerización entre proteínas) que están separadas por una pequeña secuencia de aminoácidos que forman un giro en β . Además, cada proteína del tipo bHLH, posee una región básica que ayuda a mediar el reconocimiento entre el factor de transcripción y el motivo E-box en la región

regulatoria de diversos genes (Ellenberg *et al.*, 1994). Dependiendo del motivo en la secuencia de DNA, los factores transcripcionales del tipo bHLH poseen una afinidad por un conjunto diferente de residuos básicos que dependen de la identidad de las dos bases centrales (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Por ejemplo, el motivo palindrómico G-box (5' CACGTG 3'), involucrado en el control de la expresión génica mediado por fitocromos y a diversos tipos de estrés como sequía y a hormonas como ABA y ácido jasmónico (Martínez-García *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2006); o el motivo S-box (5' CACCTG 3') que está presente en las regiones promotoras de diversos genes que se regulan por la luz (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005).

Las secuencias que corresponden a los motivos del tipo G-box, o a alguna de sus variantes, están presentes al menos una vez en aproximadamente el 30% de las regiones 5' regulatorias de todos los genes de *Arabidopsis* (Dombrecht *et al.*, 2007). Debido a ello, y al vasto número de factores transcripcionales del tipo bHLH (~147 miembros en *Arabidopsis*; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003) que podrían unirse a esta secuencia, es lógico pensar que no todos los genes que contienen esta secuencia estén regulados por el mismo factor transcripcional. Un estudio previo reportó que existen bases conservadas adicionales en las secuencias que flanquean el hexámero del motivo G-box que participan en la unión del factor transcripcional MYC2 al DNA; además, la sustitución de alguna de estas bases, es capaz de alterar la capacidad de unión del factor transcripcional a la secuencia del DNA (Dombrecht *et al.*, 2007). Por ejemplo, un cambio de base en la segunda pirimidina (**C**) que conforma a las secuencias reconocidas por MYC2 (5' CACGTG 3', 5' CACATG 3' y 5' CACGTT 3') disminuyen drásticamente su capacidad de unión al DNA (Dombrecht *et al.*, 2007). Por ello es posible que la presencia de una adenina (**A**) en la cuarta base del hexámero que compone a este elemento (5' CACATG 3') pueda ser esencial para que éste actúe como el sitio de unión para factores transcripcionales que participen en la respuesta a glucosa.

8.4 Posible mecanismo de represión de *STP1* por glucosa

En los organismos eucariotas, el inicio de la transcripción es el punto principal en el cual se regula la expresión de un determinado gen. Este proceso es regulado mediante la unión específica de diversos factores transcripcionales a elementos en *cis* en la región regulatoria de sus genes blanco. Estos factores pueden actuar activando y/o reprimiendo la transcripción (Gaston y Jayaraman, 2003; Krogan y Long, 2009).

En este trabajo se evidenció que el elemento *CACATG* emula la represión por glucosa en el contexto del p35S, indicando que es capaz de participar en la regulación por glucosa de *STP1*. Los datos indican que la secuencia que de este motivo funciona como el sitio de unión de un factor transcripcional que actúa como un regulador negativo de la expresión de este gen. Por otro lado, es posible que el factor transcripcional tipo bHLH AIB/JAM1 corresponda a uno de los elementos reguladores en *trans* de la expresión de *STP1* y, por tanto, uno de los componentes en una vía de señalización por glucosa que aún no ha sido descrita (Cruz-Lopez, 2015). Sin embargo, la unión de AIB/JAM1 al promotor de *STP1* y, en específico al elemento *CACATG* no ha sido comprobada experimentalmente. Aunado a esto, se ha evidenciado que AIB/JAM1 es capaz de actuar como un represor interfiriendo con la unión de algunos activadores como MYC2 en la vía de señalización por ácido jasmónico, con el cual comparte los mismos sitios de unión, entre los cuales se encuentra la secuencia 5' *CACATG* 3' (Nakata *et al.*, 2013). El alineamiento de las secuencias de AIB/JAM1 con otros factores del tipo bHLH como MYC2, MYC3 y MYC4 demostró que tal diferencia en la actividad se debe a que la región acídica de las proteínas MYC2/3/4, que actúa como un dominio de activación no se conserva en AIB/JAM1 (Fernandez-Calvo *et al.*, 2001; Nakata *et al.*, 2013),

Sin embargo, debido a que hasta este momento no se han identificado mas componentes que participen en la regulación por glucosa en *STP1*, que se posicionen por encima del factor transcripcional o que actúen como los sitios de reconocimiento para otro tipo de factores (activadores o represores) en base a los resultados obtenidos en este trabajo, es probable que, en respuesta a la presencia de glucosa, AIB/JAM1 reconozca y se una a la secuencia 5' *CACATG* 3' dentro del fragmento *GREmut*. La unión de este factor transcripcional estaría provocando la inhibición de la expresión del gen (Figura 23a). Por otro lado, este modelo no descarta la posibilidad de que algún otro elemento que puede estar localizado en la secuencia que corresponde al p35S o al gen reportero de GUS, permita que bajo las condiciones analizadas el elemento *CACATG* actúe como el sitio de unión para un represor como AIB/JAM1. Por otro lado, el factor transcripcional en cuestión, también podría actuar como un co-represor, interaccionando con un represor que reconocería al motivo *CACATG*, interfiriendo en ambos casos, con la transcripción del gen (Figura 23b).

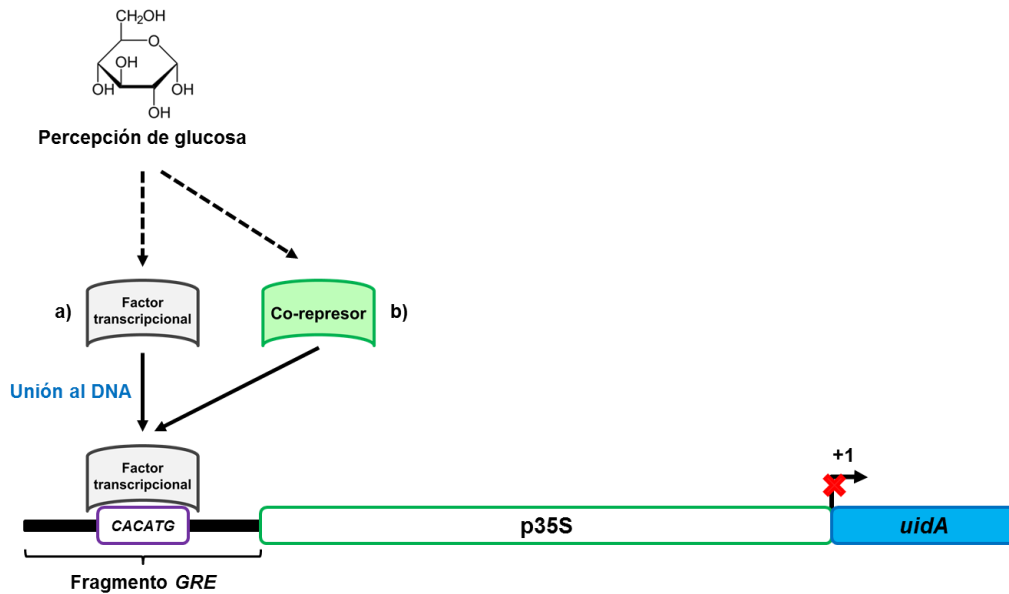


Figura 23. Mecanismos de represión de *STP1* por glucosa. a) En presencia de glucosa, un factor transcripcional, como AIB/JAM1, reconoce y se une al elemento *CACATG* en la región promotora de *STP1*, interfiriendo con la expresión del gen. b) La presencia de glucosa permite que una proteína que actúa como un co-represor pueda unirse a un represor que interactúa con el elemento *CACATG* para reprimir la expresión del gen.

Por otra parte, la existencia de más motivos en *cis* ubicados en la región acotada de 69 pb, reconocidos por participar en la represión por azúcares, no excluye la posibilidad de que éstos pudieran permitir la unión de un represor de manera cooperativa al promotor de *STP1* y, a la falta de uno, se pierda la represión. Sin embargo, ya que la represión se pierde completamente en las líneas mutantes del elemento *CACATG* (*GREmut*) indica que este elemento es suficiente para mediar la represión, y que posiblemente exista una interacción con un factor que se una a algún otro de los elementos en *cis* y que en conjunto, formen un complejo represor de la transcripción.

De esta manera, el resultado novedoso en este trabajo consistió en asociar al motivo en *cis*, con la secuencia 5' *CACATG* 3', como un elemento de represión en la vía de señalización por glucosa. Además, la caracterización del elemento *CACATG*, aporta información necesaria para comprender y dilucidar los diversos mecanismos de señalización mediante los cuales los azúcares y, en específico la glucosa, regulan la expresión de diversos genes.

9 Conclusiones

Las diferentes versiones de los fragmentos *GRE* (338, 281 y 253 pb) fueron suficientes para conferir la represión por glucosa al p35S.

Se acotó una región de 69 pb que contiene a los elementos necesarios para la represión del gen *STP1* por glucosa bajo las condiciones analizadas.

Los resultados obtenidos en este estudio, identificaron al motivo *CACATG* del promotor de *STP1* como un componente del mecanismo de represión por glucosa. Sin embargo, no se descarta la participación de algún otro elemento presente en la región acotada de 69 pb (*CGACGOSAMY*, G-box “related” y *GATTA*). Por otra parte, debido a que el análisis del fragmento original de 310 pb de respuesta a glucosa fue aislado de su contexto genómico, no es posible descartar del todo a los elementos que se encuentran fuera del fragmento de 69 pb (*TATCCAOSAMY*, *MYBST1*, I-box core, *EVENINGAT* y *CATCC*).

Se evidenció por primera vez, la participación del motivo *CACATG* como un elemento en *cis* implicado en la represión por glucosa.

10 Perspectivas

Para corroborar la participación del elemento *CACATG* en la represión por glucosa es necesario analizarlo en el contexto genómico del gen *STP1*. El análisis por ensayos del tipo Northern de líneas que presenten la mutación del motivo *CACATG* ($pSTP1^{CACATG>CGTTAT}::STP1$) en la región regulatoria de *STP1*, corroboraría la participación de este motivo en la represión por glucosa.

Para determinar el papel que podría estar desempeñando el factor transcripcional AIB/JAM1 en la represión de *STP1* por glucosa, es necesario analizar el patrón de expresión del transcrito de *STP1* en la mutante de *AIB/JAM1* (*jam1-1* [SAIL_536_F09]).

Es probable que, para que ocurra la represión por glucosa se requieran de otros motivos, ubicados en la región de 69 pb, que actúen de manera cooperativa con el motivo *CACATG* en la represión de *STP1*. Por lo cual, sugerimos analizar la participación de alguno de los otros de los elementos candidatos presentes en la región de 69 pb.

11 Bibliografía

- Acevedo-Hernandez G.J., Leon P, Herrera-Estrella L.R. 2005. Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. **Plant J.** 43 (4):506-519.
- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo J.O, Van Dijck P, Thevelein J.M, Iturriaga G. 2004. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. **Plant Physiol.** 136:3649–3659.
- Baena-González E, Sheen J. 2007. Convergent energy and stress signaling. **Trends Plant Sci.** 13, 474-482.
- Baud S, Vaultier M.N, Rochat C. 2004. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. **J. Exp. Bot.** 55: 397-409.
- Bernier G, Périlleux C. 2005. A physiological overview of the genetics of flowering time control. **Plant Biotech.** J 3: 3-16.
- Bläsing O.E, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R. 2005. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal expression in Arabidopsis. **Plant Cell.** 17: 3257-81.
- Blazquez M.A, Green R, Nilsson O, Sussman M.R, Weigel D. 1998. Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. **Plant Cell.** 10: 791-800.
- Borisjuk L, Rolletscheck H, Walenta S, Panitz R, Wobus U, Weber H. 2003. Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within *Vicia faba* embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. **Plant J.** 36: 318-329.
- Bustos M.M, Iyer M, Gagliardi S.J. 1998. Induction of a β -phaseolin promoter by exogenous abscisic acid in tobacco: Developmental regulation and modulation by external sucrose and Ca^{2+} ions. **Plant Mol. Biol.** 37: 265–274.
- Butler J.E.F, Kadonaga, J.T. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. **Genes Dev.** 6, 2583–2592.
- Büttner M, Sauer N. 2000. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. **Biochim. Biophys. Acta.** 1465, 263-274.
- Büttner M. 2010. The *Arabidopsis* sugar transporter (AtSTP) family: an update. **Plant Biol.** 12, Suppl 1, 35–41.
- Cai M, Wei J, Li X, Xu C, Wang S. 2007. A rice promoter contains both novel positive and negative *cis*-elements for regulation of green tissue-specific gene expression in transgenic plants. **Plant Biotech. J.** 5: 664-674.
- Caldana C, Li Y, Leisse A, Zhang Y, Bartholomaeus L, Fernie A.R, Willmitzer L, Giavalisco P. 2013. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 73:897–909. [PubMed: 23173928].
- Chan M, Chao Y, Yun S. 1994. Novel gene expression system for plant cells based on induction of α -Amylase promoter by carbohydrate starvation. **J. Biol. Chem.** 269: 17635-17641.
- Chen P, Chiang C, Tseng T, Yu S.M. 2006. Interaction between Rice MYGBA and the Gibberellin Response Element Controls Tissue-Specific Sugar Sensitivity of α -amylase Genes. **Plant Cell.** 18. 2326-2340.
- Chen Q, Sun J, Zhai Q, Zhou W, Qi L, Xu L, Wang B, Chen R, Jiang H, Qi J, Li X, Palme K, Li C. 2011. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor MYC2 Directly Represses *PLETHORA* Expression during Jasmonate-Mediated Modulation of the Root Stem Cell Niche in *Arabidopsis*. **Plant Cell.** 23(9): 3335-3352.

- Cheng CL, Acedo G.N, Cristinsin M, Conkling M.A. 1992. Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. **P.N.A.S. USA**. 89: 1861-1864.
- Chiou T.J, Bush D.R. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 95: 4784-4788.
- Cho Y.H, Yoo S.D, Sheen J. 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. **Cell**. 127: 579-589.
- Ciereszko, I., Johansson, H., and Kleczkowski, L.A. 2001. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. **Biochem. J.** 354, 67-72.
- Clyde S, Hutchison A, Marshal E, Shirley P, Smith M. 1978. Mutagenesis at a Specific Position in a DNA Sequence. **J. Biol. Chem.** 253: 6551-6560.
- Clough S.J, Bent A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 16, 735-743.
- Cominelli E, Galbiati M, Albertini A, Fornara F, Conti L, Coupland G, Tonelli C. 2011. DOF-binding sites additively contribute to guard cell-specificity of AtMYB60 promoter. **Plant Biol.** 11: 162-175.
- Conde C, Agasse A, Glissant D, Tavares R, Geros H, Delrot S. 2006. Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. **Plant Physiol.** 141: 1563-1577.
- Contento A.L, Kim S.J, Bassham D.C. 2004. Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. **Plant Physiol.** 135: 2330-2347.
- Cordoba E, Aceves-Zamudio D, Hernández-Bernal A, Ramos-Vega M, León P. 2015. Sugar regulation of SUGAR TRANSPORTER 1 (*STP1*) expression in *Arabidopsis thaliana*. **J. Exp. Bot.** 66, 147-159.
- Coruzzi G.M, Zhou L. 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. **Curr. Opin. Plant Biol.** 4: 247-253.
- Cowell I.G. 1994. Repression versus activation in the control of gene transcription. **Trends Biochem Sci**, 19:38-42.
- Cruz-López M.I. 2015. Búsqueda de proteínas de unión a la región regulatoria del gen *STP1* (*SUGAR TRANSPORTER PROTEIN1*) en respuesta a azúcares en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. Cuernavaca, México.
- Dekkers, B.J., Schuurmans, J.A., and Smeekens, S.C. 2008. Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in *Arabidopsis*. **Plant Mol. Biol.** 67: 151-167.
- Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M. 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. **EMBO Rep.** 8; 864-870.
- Despres C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D, Fobert P.R. 2003. The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. **Plant Cell** 15: 2181-2191.
- Dijkwel P.P, Kock P, Bezemer R, Weisbeek P.J, Smeekens S. 1996. Sucrose Represses the Developmentally Controlled Transient Activation of the Plastocyanin Gene in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. **Plant Physiol.** 110: 455-463.
- Dodd A.N, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd J.M, Millar A.J, Webb A.A. 2005. Plant circadian clocks increases photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. **Science**. 309(5734):630-3.

- Dombrecht B, Xue G.P, Sprague S.J, Kirkegaard J.A, Ross J.J, Reid J.B, Fitt G.P, Sewelam N, Manners J.M, Kazan K. 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. 19(7):2225-45.
- Du L, Chen Z. 2000. Identification of genes encoding receptor- like protein kinases as possible target of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. **Plant J**. 24 837–847.
- Eastmond P.J, Graham I.A. 2003. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate? **Curr. Opin. Plant Biol**. 6, 231–235.
- Ellenberger, T; Fass, D; Arnaud, M; Harrison, S C. 1994. "Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer". **Genes Dev**. 8 (8): 970–980.
- Fujiki Y, Ito M, Nishida I, Watanabe A. 2000. Multiple Signalling in Gene Expression during Sugar Starvation. Pharmacological Analysis of *din* Gene Expression in Suspension-Cultured Cell of *Arabidopsis*. **Plant Phys**. 124. 1139-1147.
- Fujiki Y, Yoshikawa Y, Sato T, Inada N, Ito M, Nishida I, Watanabe A. 2001. Darkinducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. **Plant Physiol**. 111: 345-352.
- Gancedo J.M. 2008. The early steps of glucose signalling in yeast. **FEMS Microbiol Rev**. 32: 673-704.
- Gaston K, Jayaraman P.S. 2003. Transcriptional repression in eukaryotes: repressor and repression mechanism. **Cell Mol. Life Sci**. 60: 721-741.
- Gazzarrini S, McCourt, P. 2001. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. **Curr. Opin. Plant Biol**. 4, 387–391.
- Gibson S.I. 2000. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. **Plant Physiol**. 124, 1532–1539.
- Gibson S.I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Curr. Opin. Plant Biol**. 8, 93–102.
- Girin T, Lejay L, Wirth J, Widiez T, Palenchar P.M, Nazoa P, Touraine B, Gojon A, Lepetit M. 2007. Identification of a 150 bp *cis*-acting element of the *AtNRT2.1* promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant. **Plant. Cell Env**. 30: 1366-1380.
- Graham I.A, Denby K.J, Leaver C.J. 1994. Carbon Catabolite Repression Regulates Glyoxylate Cycle Gene Expression in Cucumber. **Plant Cell**. 6: 761-772.
- Godt D.E, Riegel A, Roitsch T. 1995. Regulation of sucrose synthase expression in *Chenopodium rubrum*: characterization of sugar induced expression in photoautotrophic suspension cultures and sink tissue specific expression in plants. **J. Plant Phys**. 146: 231-238.
- Granot D, David-Schwartz R, Kelly G. 2013. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. **Frontiers in Plant Sci**. 4, 44.
- Gupta A.K, Kaur N. 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plant. **J. Biosci**. 30(5), 761-776.
- Gupta A, Singh M, Laxmi A. 2015. Interaction between glucose and brassinosteroids during the regulation of lateral root development in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**. 168: 307-20.
- Halford N, Hey S, Jhurreea D, Laurie S, Mckibbin R, Paul M, Zhang Y. 2002. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. **J. Exp. Bot**. 382: 467-475.

- Harmer S.L, Hogenesch J.B, Straume M, Chang H.S, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps J.A, Kay S.A. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. **Science**. 290, 2110–2113.
- Harmer S.L, Kay S.A. 2000. Microarrays: determining the balance of cellular transcription. **Plant Cell**. 12: 613–616.
- Hattori T, Totsuka M, Hobo T, Kagaya Y, Yamamoto-Toyoda A. 2002. **Plant Cell Physiol**. 43(1): 136–40.
- Haydon M.J, Hearn T.J, Bell L.J, Hannah M.A, Webb A.A. 2013. Metabolic regulation of circadian clocks. **Semin. Cell. Dev. Biol**. 24: 414–421.
- He H.H, Meyer C. A, Shin H, Bailey S.T, Wei G, Wang Q. 2010. Nucleosome dynamics define transcriptional enhancers. **Nature Gen**. 42, 343–347.
- Heim M.A, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar, Bailey P.C. 2003. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor in Plants: A Genome-Wide Study of Protein Structure and Functional Diversity. **Mol. Biol. Evol**. 20(5): 735–747
- Heim U, Weber H, Bäumlein H, Wobus U. 1993. A sucrose-synthase gene of *Vicia faba* L.: expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. **Planta**. 191: 394–401.
- Hernandez-Garcia C.M, Finer J.J. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. **Plant Sci**. 217–218: 109–19.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. **Nucleic Acids Res**. 27(1): 297–300.
- Himmelbach A, Iten M, Grill E. 2000. Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. **Philos. Trans. R. Soc. Lon. B Biol Sci**. 353(1374): 1439–44.
- Ho S, Chao Y, Tong W, Yu S. 2001. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. **Plant Physiol**. 2 125: 877–890.
- Hwang Y.S, Karrer E.E, Thomas B.R, Chen L, Rodriguez R.L. 1998. Three cis-elements required for rice *alpha*-amylase *Amy3D* expression during sugar starvation. **Plant Mol. Biol**. 36, 331–341.
- Ikeda M, Ohme-Takagi M. 2009. A novel group of transcriptional repressors in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiol**. 50(5): 970–5.
- Ishiguro S, Nakamura K. 1994. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and α -amylase from sweet potato. **M.G.G**. 244: 563–571.
- Jang J.C, Leon P, Zhou L, Sheen J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. **Plant Cell**. 9: 5–19.
- Jang J.C, Sheen J. 1994. Sugar sensing in Higher Plants. **Plant Cell**. 6: 1665–1679.
- Johnston M, Kim J.H. 2005. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Soc. Trans**. 33: 247–252.
- Johnson D.A, Hill J.P, Thomas M.A. 2006. The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages. **BMC Evol. Biol**. 6, 64–84.

- Jossier M, Bouly J.P, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Hawley S, Hardie D.G, Thomas M. 2009. SnRK1 (SNF1 Related Kinase) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 59, 316-326.
- Juven-Gershon T, Kadonaga J.T. 2010. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. **Dev. Biol.** 339. 225-229.
- Karrer EE, Rodriguez R.L. 1992. Metabolic regulation of rice alpha-amylase and sucrose synthase genes in planta. **Plant J.** 2: 517-523.
- Kleczkowski L.A, Geisler M, Ciereszko I, Johansson H. 2004. UDP-Glucose Pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. **Plant Physiol.** 143(3): 912-918.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annu. Rev. Plant Phys. and Plant Mol. Biol.** 47, 509-540.
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P. 2005. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. **P.N.A.S USA.** 102: 11118-11123.
- Krapp A, Hofmann B, Schäfer C, Stitt M. 1993. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? **Plant J.** 3: 817-828.
- Kristiansson E, Thorsen M, Tamas M.J, Nerman O. 2009. Evolutionary Forces Act on Promoter Length; Identification of Enriched *Cis*-Regulatory Elements. **Mol. Biol. Evol.** 26(6): 1299-1307.
- Krogan N.T, Long J.A. 2009. Why so repressed? Turning off transcription during plant growth and development. **Curr. Opin. Plant Biol.** (5):628-36.
- Laby R.J, Kincaid M.S, Kim D, Gibson S.I. 2000. The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. **Plant J.** 23: 587-596.
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick J.W, Frommer W.B, Ward J.M. 1999. The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. **Plant Cell.** 11 (4):707-726.
- Lam H.M, Hsieh M.H, Coruzzi G. 1998. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 16: 345-753.
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S. 2014. Sugar signals and the control of plant growth and development. **J. Exp. Bot.** 65(3): 799-807.
- Leyman B, Van Dijck P, Thevelein J.M. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. **Trends Plant Sci.** 6: 510-513.
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive F, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A. 1999. Molecular and functional regulation of two NO₃- uptake systems by N- and C status of *Arabidopsis* plants. **Plant J.** 18: 509-519.
- Leon P, Sheen J. 2003. Sugar and hormone connections. **Trends Plant Sci.** 8: 110–116.
- Li Y, Lee K.K, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan M.W. 2006. Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. **Genome Research.** 16, 414–427.
- Li H, Sun J, Xu Y, Jiang H, Wu X, and Li C. 2007. The bHLH type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in *Arabidopsis*. **Plant Mol. Biol.** 65: 655–665.

- Loreti E, Alpi A, Perata P. 2000. Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. **Plant Phys.** 123 (3):939-948.
- Lu C.A, Ho T.H, Ho S.L, Yu S.M. 2002. Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of alpha-amylase gene expression. **Plant Cell.** 14: 1963-1980.
- Lu C.A, Lin C.C, Lee K.W, Chen J.L, Huang L.F, Ho S.L, Liu H.J, Hsing Y.I, Yu S.M. 2007. The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. **Plant Cell.** 19: 2484-2499.
- Lu C.A, Lim E.K, Yu S.M. 1998. Sugar response sequence in the promoter of a rice alpha-amylase gene serves as a transcriptional enhancer. **J. Biol. Chem.** 273:10120-10131.
- Lunn J.E, Feil R, Hendriks J.H, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible W.R, Carillo P, Hajirezaei M.R, Stitt M. 2006. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Biochem. J.** 397: 139-148.
- Maeo K, Tomiya T, Hayashi K, Akaike M, Morikami A, Ishiguro S, Nakamura K. 2001. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for beta-amylase of sweet potato. **Plant Mol. Biol.** 2001 Jul;46(5):627-37.
- Manzara T, Carrasco P, Grisse W. 1991. Developmental and organ specific-changes in promotor DNA-protein interactions in the tomato rbcS gene family. **Plant Cell.** 3: 1305-1316.
- Martin T, Hellmann H, Schmidt R, Willmitzer L, Frommer W.B. 1997. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. **Plant J.** 11: 53-62.
- Martinez-Garcia J.F, Huq E, Quali P.H. 2000. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcriptional factor. **Science.** 288; 859-863.
- Massari M.E, Murre C. 2000. Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eukaryotic organisms. **Mol. Cell. Biol.** 20, 429-440.
- Meing C, Wei J, Xianghua L, Caiguo X, Shiping W. 2007. A rice promoter containing both novel positive and negative cis-elements for regulation of green tissuespecific gene expression in transgenic plants. **Plant Biol. J.** 5: 664-674.
- Michael T.P, Mockler T.C, Breton G, McEntee C, Byer A, Trout J.D, Hazen S.P, Shen R, Priest H.D, Sullivan C.M. 2008. Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. **PLoS Genet.** 4: e14.
- Moreau M, Azzopardi M, Clement G, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette M.L, Taconnat L, Renou J.P, Robaglia C, Meyer C. Mutations in the *Arabidopsis* homolog of *LST8/GbetaL*, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. **Plant Cell.** 2012; 24:463-481. [PubMed: 22307851].
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W.H, Liu Y.X, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. **Science.** 300:332-336. [PubMed: 12690200].
- Morikami A, Matsunaga R, Tanaka Y, Suzuki S, Mano S, Nakamura K. 2005. Two cis-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene from sweet potato in transgenic tobacco. **Mol. Genet. Genomics.** 272: 690-99.

- Nakamura K, Ohto MA, Yoshida N, Nakamura K. 1991. Sucrose-Induced Accumulation of beta-Amylase Occurs Concomitant with the Accumulation of Starch and Sporamin in Leaf-Petiole Cuttings of Sweet Potato. **Plant Physiol.** 96: 902-909.
- Nakata M, Mitsuda N, Herde M, Koo A.J.K, Moreno J.E, Howe G.A, Ohme-Takagi M. 2013. A bHLH-Type Transcription Factor, ABA INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, Acts as a Repressor to Negatively Regulate Jasmonate Signalling in *Arabidopsis*. **Plant Cell.** 25: 1641-1656.
- Nemeth K, Salchert K, Putnoky P, Bhalerao R, Koncz-Kalman Z, Stankovic- Stangeland B, Bakó L, Mathur J, Okrész L, Stabel S, Geigenberger P, Stitt M, Rédei G.P, Schell J, Koncz C. 1998. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. **Genes Dev.** 12: 3059-3073.
- Nemhauser J.L, Mockler T.C, Chory J. 2004. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. **PLoS Biol.** 2: E258.
- Ohto M, Nakamura-Kito K, Nakamura K. 1992. Induction of expression of genes coding for sporamin and b-amylase by polygalacturonic acid in leaf-petiole cuttings of sweet potato. **Plant Physiol.** 99; 422-427.
- Ohto M, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K. 2001. Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. **Plant Phys.** 127, 252-261.
- Pego J.V, Kortstee A.J, Huijser C, Smeekens S. 2000. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. **J. Exp. Bot.** 51, 407-416.
- Perata P, Matsukura C, Vernieri P, Yamaguchi J. 1997. Sugar Repression of a Gibberellin-Dependent Signaling Pathway in Barley Embryos. **Plant Cell.** 9: 2197-2208.
- Pla M, Vilardell J, Guiltinan M.J, Marotte W.R, Niogret M.F, Quatrano R.S, Pages M. 1993. The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rap28*. **Plant Mol. Biol.** 21; 259-266.
- Porto M.S, Nobrega-Pinheiro M.P, Guevara Lyra-Batista V, Cavalcanti dos Santos R, de Albuquerque Melo Filho P, de Lima L.M. 2013. **Mol. Biotechnol.** doi:10.1007/s12033-013-9713-1.
- Price J, Laxmi A, St.-Martin S.K, Jang J.C. 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Cell.** 16, 2128-2150.
- Price J, Li T.C, Kang S.G, Na J.K, Jang J.C. 2003. Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 132: 1424-1438.
- Qi T, Song S, Ren Q, Wu D, Huang H, Chen Y, Fan M, Peng W, Ren C, Xie D. 2011. The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeated/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell.** 23: 1795-1814.
- Ramon M, Rolland F. 2007. Plant development: introducing trehalose metabolism. **Trends Plant Sci.** 12: 185-188.
- Ramon M, Rolland F, Sheen J. 2008. Sugar Sensing and Signaling. **Arabidopsis Book.** 10.1199/tab.0117.
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy J.M, Murray J.A. 2000. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. **Mol. Cell. Biol.** 20(13): 4513-21.
- Roitsch T. 1999. Source-sink regulation by sugars and stress. **Curr. Opin. Plant Biol.** 2: 198-206.

- Rolland F, Baena-González E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. **Annu. Rev. Plant Biol.** 57, 675-709.
- Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14 Suppl: S185-205.
- Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C, Bevan MW. 2001. Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. **Plant J.** 26(4):421-33.
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeeckens S. 1998. Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* *ATB2* bZIP transcription factor gene. **Plant J.** 15: 253-263.
- Rose M, Albig W, Entian K.D. 1991. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinase PI and PII. **Eur. J. Biochem.** 199: 511–518.
- Rushton P.J, Macdonald H, Huttly A.K, Lazarus C.M, Hooley R. 1995. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of *a-Amy2* genes. **Plant Mol. Biol.** 29 691–702.
- Salinas J, Oeda K, Chua N.M. 1992. Two G-box related sequence confer different expression patterns in transgenic Tobacco. **Plant Phys.** 4: 1485-1493.
- Schluepmann H, van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M, Smeeckens S. 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. **Plant Physiol.** 135: 879-890.
- Sivitz A.B, Reinders A, Johnson M.E, Krentz A.D, Grof C.P, Perroux J.M, Ward J.M. 2007. *Arabidopsis* sucrose transporter AtSUC9. High-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. **Plant Physiol.** 143: 188-198.
- Sheen J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. **Plant Cell.** 2: 1027- 1038.
- Sheen J. 2014. Master Regulators in Plant Glucose Signalling Network. **PMC.** (57)2: 67-79.
- Sheen J, Zhou L, Jang J.C. 1999. Sugars as signaling molecules. **Curr. Opin. Plant Biol.** 2, 410–418.
- Sherson S.M, Hemman G, Wallace G, Forbes S, Germain V, Stadler R, Bechtold N, Sauer N, Smith S.M. 2000. Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of *Arabidopsis* seeds and seedlings to sugars. **Plant J.** 24(6): 849-857.
- Smeeckens S. 2000. Sugar-Induced Signal Transduction in Plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.** 51: 49-81.
- Smeeckens S, Ma J, Hanson J, Rolland F. 2009. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. **Curr. Opin. Plant Biol.** 13, 1-6.
- Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P. 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 140: 637-646.
- Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S, Jansson C. 2003. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. **Plant Cell.** 15:2076-2092.
- Thevelein J.M, Hohmann S. 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? **Trends Biochem. Sci.** 20: 3-10.

- Thiel G, Lietz M, Hohl M. 2004. How mammalian transcriptional repressors work. **Eur. J. Biochem**, 271:2855-2862.
- Thomas B.R, Rodriguez R.L. 1994. Metabolite Signals Regulate Gene Expression and Source/Sink Relations in Cereal Seedlings. **Plant Physiol.** 106: 1235-1239.
- Thum K.E, Shasha D.E, Lejay L.V, Coruzzi G.M. 2003. Light- and Carbon-Signaling Pathways. Modeling Circuits of Interaction. **Plant Phys.** 132, 440-452.
- Thum K.E, Shin M.J, Palenchar P.M, Kouranov A, Coruzzi G.M. 2004. Genome-wide investigation of light and carbón signaling interactions in *Arabidopsis*. **G. Biol.** 5:R10.
- Toledo-Ortiz G, Hug E, Quail P.H. 2003. The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. **Plant Cell.** 15(8): 1749-70.
- Toyofuku K, Umemurab T, Yamaguchi J. 1998. Promoter elements required for sugar-repression of the *RAmy3D* gene for α -amylase in rice. **FEBS Letter.** 428. 275-280.
- Toroser D, Plaut Z, Huber S. 2000. Regulation of a Plant SNF-1 Related Protein Kinase by Glucose-6-Phosphate. **Plant Phys.** 123, 403-411.
- Umemura T, Perata P, Futsuhara Y, Yamaguchi J. 1998. Sugar sensing and alpha-amylase gene repression in rice embryos. **Planta.** 204: 420-428.
- Villadsen D, Smith S.M. 2004. Identification of more than 200 glucoseresponsive Arabidopsis genes none of which responds to 3-O-methylglucose or 6-deoxyglucose. **Plant Mol. Biol.** 55, 467-477.
- Walcher C.L, Nemhauser J.L. 2012. Bipartite promoter element required for auxin response. **Plant Physiol.** 158(1):273:282.
- Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford N.M. 2003. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. **Plant Physiol.** 132: 556-567.
- Wei X, Liu F, Chen C, Ma F, Li M. 2014. The *Malus domestica* sugar transporter family: identifications base don genome and expression profiling related to the accumulation of fruits sugars. **Front Plant Sci.** 5:569.
- Wiese A, Elzinga N, Wobbes B, Smeekens S. 2004. A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. **Plant Cell.** 16: 1717-1729.
- Wild M, Daviere J.M, Cheminant S, Regnault T, Baumberger N, Heintz D, Baltz R, Genschik P, Achard P. 2012. The Arabidopsis *DELLA RGA-LIKE3* is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. **Plant Cell.** (24)-8: 3307-3319.
- Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher R.A. 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 124: 105-114.
- Wray G.A, Hahn M.W, Abouhfei E, Balhoff J.P, Pizer M, Rockman M.V, Romano L.A. 2003. The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. **Mol. Biol. Evol.** 20(9): 1377-1419.
- Xiao W, Sheen J, Jang J.C. 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. **Plant Mol. Biol.** 44: 451-461.
- Xiong Y, McCormack M, Lei L, Xian C, Sheen J. 2013. Glc-TOR signalling leads transcriptome reprogramming and meristem activation. **Nature.** 496 (7444): 181-186.

- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1993. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Gen. Genet.** 238(1-2):17-25.
- Yamamoto Y.Y, Yoshioka Y, Hyakumachi M, Obokata O. 2011. Characteristic of Core Promoters Type with respect to Gene Structure and Expression in *Arabidopsis thaliana*. **DNA Res.** 18(5): 333-342.
- Yu S.M, Kuo Y.H, Sheu G, Sheu Y.J, Liu L.F. 1991. Metabolic derepression of alpha-amylase gene expression in suspension-cultured cells of rice. **J. Biol. Chem.** 266: 21131-21137.
- Zarka D.G, Vogel J.T, Cook D, Thomashow M.F. 2003. Cold induction of *Arabidopsis* CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. **Plant Physiol.** 133:910-18.
- Zhang Y, He J. 2015. Sugar-induced plant growth is dependent of brassinosteroids. **Plant Signal Behav.** 10(12): e1082700.
- Zhang Y, Primavesi L.F, Jhurrea D, Andralojc P.J, Mitchell R.A, Powers S.J, Schluepmann H, Delatte T, Winkler A, Paul M.J. 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. **Plant Phys.** 149:1860-1871.
- Zhong C, Xu H, Wang S, Li L, Zhang S, Wang X. 2015. Gibberellic acid-stimulated *Arabidopsis*6 serves as an Integrator of giberellin, abscisic acid, and glucose signaling during seed germination in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 169(3): 2288-2303.
- Zhou L, Jang J.C, Jones T.L, Sheen J. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. **P.N.A.S USA.** 95, 10294-10299.