

Una mutante de *Arabidopsis thaliana* por inserción de T-DNA es insensible a azúcares y tolerante al estrés abiótico

Benjamín Hernández-Campuzano¹, Patrick Van Dijck², Nelson Avonce², Gabriel Iturriaga¹ Ramón Suárez¹
Departamento de Biotecnología Ambiental¹, Department of Molecular Microbiology²
Universidad Autónoma del Estado de Morelos¹, Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB)²
Cuernavaca, Mor.; México¹, Leuven-Heverlee, Flanders; Belgica²
rsuarez@uaem.mx

Abstract— We report the characterization of a T-DNA knockdown mutant of *Arabidopsis thaliana*, insensitive to trehalose (*tin*). T-DNA insertion into the plant genome of *tin14*, is located 728 bp downstream of *AtBRP3* (plant specific TFIIB-related protein) coding region. This insertion displayed insensitivity to glucose, abscisic acid (ABA) and tolerance to osmotic stress (sorbitol) but not to salt stress (NaCl). Expression analysis of *AtBRP3* gene in *Arabidopsis* wild type plants shows induction upon treatment with ABA or under stress conditions such as drought, salt, cold and sorbitol but not freezing. Our results suggest that the plant specific transcription related factors to TFIIB play a key role in signalling by sugars, hormones and stress responses in *A. thaliana*.

Keyword— Abiotic stress, *Arabidopsis thaliana*, *AtBRP3* gene, trehalose insensitive (*tin*).

Resumen— Reportamos la caracterización de una mutante por inserción de T-DNA de *Arabidopsis thaliana*, insensible a trehalosa (*tin*). La inserción del T-DNA en la planta mutante *tin 14*, se localiza 728 bp río abajo de la región codificante del gen *AtBRP3*. La inserción provoca insensibilidad a glucosa, ácido abscísico (ABA), tolerancia al estrés osmótico (sorbitol), pero no a salinidad (NaCl). El análisis de la expresión de *AtBRP3* en plantas silvestres de *Arabidopsis*, muestra inducción por ABA o en condiciones de estrés: sequía, salinidad, sorbitol y bajas temperaturas; pero no a congelamiento. Nuestros resultados sugieren que los factores de transcripción relacionados a TFIIB, juegan un papel clave en la señalización por azúcares, hormonas y en la respuesta al estrés en *A. thaliana*.

Palabras claves—Estrés abiótico, *Arabidopsis thaliana*, gen *AtBRP3*, mutante insensible a trehalosa.

I. INTRODUCCIÓN

Los azúcares juegan diversos papeles biológicos en las plantas, y han sido propuestos como moléculas reguladoras en procesos importantes como germinación, embriogénesis, floración, la morfogénesis de la hoja y la raíz, la senescencia, la respuesta al daño físico y a patógenos, las cascadas génicas relacionadas al metabolismo, la respuesta al estrés y la división celular (Koch 1996; Moore and Sheen 1999; Sheen et al, 1999; Wobus and Weber 1999).

Para entender la señalización por azúcares y los procesos relacionados, el uso de plantas mutantes en las repuestas mediadas por carbohidratos han sido de suma importancia, pues han permitido entender las redes de regulatorias de genes relacionados con azúcares. Algunas especies de plantas insensibles a varios azúcares se han caracterizado por sus fenotipos de insensibilidad a: glucosa (*gin*), carbohidratos (*cai*), sacarosa (*sis*) (Smeekens y Rook 1997; Zhou et al, 1998; Sheen et al, 1999, Arenas-Huertero et al, 2000). La caracterización de estas mutantes ha contribuido al entendimiento de diversos mecanismos sobre la relación entre los azúcares, las vías de señalización mediadas por fitorreguladores y de otras moléculas en plantas (Sheen et al, 1999).

La trehalosa, es un disacárido no reductor (α -D-glucopiranosil-1, 1- α -D-glucopiranosida) que consiste en dos residuos de glucosa unidos por un enlace α -1-1 (Elbein et al, 2003), la cual se acumula en plantas bajo condiciones de estrés abiótico (Miranda et al, 2007; Suárez et al, 2009), pero también se

acumula en bacterias (Suárez et al, 2008), levaduras e invertebrados. Existen 5 vías de biosíntesis de trehalosa (Avonce et al, 2006). La vía mas ampliamente distribuida en el “árbol de la vida” es una reacción de dos pasos en donde la trehalosa-6-fosfato (T6P) es el precursor metabólico de la trehalosa; ésta es sintetizada por la condensación de la glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa por la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y finalmente la T6P, es defosforilada y convertida en trehalosa por la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP). La trehalosa puede ser hidrolizada a dos moléculas de glucosa por la enzima trehalasa (Elbein et al, 2003; Van Houtte et al., 2013). La trehalosa ha sido difícil de detectar en plantas superiores, lo cual sugiere que los niveles tan bajos de trehalosa (o T6P) pueden estar relacionados a otros procesos fisiológicos. (Müller et al, 1995; Rolland et al, 2006; Avonce et al, 2006; Iturriaga et al, 2009).

La trehalosa, tiene otros papeles moleculares mas allá de solo ser un azúcar de reserva y osmoprotector durante la desecación en microorganismos y “plantas de resurrección” (Adams et al, 1990; Iturriaga et al, 2000). Puede actuar también como molécula estructural en las paredes celulares de algunas bacterias (Djonović et al, 2013) y la T6P tiene un papel importante en controlar el flujo de la glucólisis en levaduras, inhibiendo la hexocinasa (Blázquez et al, 1993; Thevelein y Hohmann, 1995). En plantas, la trehalosa puede regular el metabolismo y las vías de señalización del estrés (Schluepmann et al, 2004; Avonce et al, 2004). Es un metabolito importante que esta relacionado con la regulación del crecimiento de las plantas y la respuesta al flujo de carbono (Eastmond et al, 2002, Eastmond & Graham, 2003). Un dato interesante es que la trehalosa no se acumula a niveles significativos en plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes del gen *AtTPS1*, pero sí se logró un incremento en la tolerancia a la sequía, lo cual puede ser consecuencia del mecanismo de señalización que dispara la trehalosa y que activa genes implicados en la tolerancia a este tipo de estrés (Avonce et al, 2004).

Una molécula importante en la señalización por azúcares es la hexocinasa (HXK), que es la enzima central de la glucólisis. La hexocinasa, es también un sensor y realiza funciones de interacción con otras señales relacionadas como nutrientes, luz, y fitohormonas, esto dispara cambios en las rutas metabólicas y reprime ciertos genes fotosintéticos, alterando la sensibilidad a las fitohormonas y estimulando el crecimiento en respuesta a la disponibilidad de azúcares (Jang et al, 1997; Moore et al, 2003; Rolland et al, 2006). La glucosa 6 fosfato (G6P), es el producto de la actividad enzimática de la HXK, y se ha demostrado que inhibe la actividad de la cinasa SnRK1 en plantas mono y dicotiledóneas, lo que sugiere que puede ser un mecanismo conservado en plantas (Zhang et al, 2009).

También la G6P esta involucrada en el metabolismo del carbono y la síntesis de trehalosa a partir de G6P y UDP glucosa (Paul et al, 2008). T6P actúa como regulador metabólico y de crecimiento e indirectamente inhibe la actividad de SnRK1 a concentraciones bajas (Zhang et al, 2009). Aunado a lo anterior, SNRK1 inicia la activación transcripcional a través de la fosforilación y la activación de distintas familias de factores de transcripción (TF) (Baena-Gonzalez et al, 2007).

Por otro lado, existe evidencia que apunta a que la trehalosa puede participar en la señalización por ABA en *Arabidopsis* en la vías de señalización del estrés, sugiriendo un papel de la TPS1 o sus productos en la regulación negativa por la vía de pendiente de la HXK (Avonce et al, 2004).

Para obtener mayor conocimiento del papel de la trehalosa como molécula señal y sobre su efecto en la respuesta al estrés abiótico, en el presente trabajo describimos el aislamiento y caracterización de una mutante por inserción de T-DNA de *A. thaliana* que es insensible a trehalosa (*tin:trehalose insensitive*).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material vegetal

Plantas *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) y de la mutante *tin14*, se estratificaron a 4°C durante 3 días. Las plantas fueron crecidas a 21°C con ciclos de 16h luz y 8h oscuridad en cámaras de crecimiento

en sustrato Metro Mix 200 y en cajas con medio de cultivo MS (Murashige and Skoog 1962). Para los experimentos de estrés, se utilizaron cajas con MS suplementado con NaCl 100mM y Sorbitol 200mM. Para los análisis de germinación, las semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas en diferentes concentraciones de ABA cis-trans isómero (+/-) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri), trehalosa 5mM y en 6% (p/v) de glucosa. Para los análisis de germinación y tolerancia al estrés se llevaron a cabo en medio MS, suplementado con sorbitol 200, 400, 600, 800 y 1000 mM; manitol 100, 200, 300, 400 y 500 mM y NaCl 100, 200, 300, 400 y 500 mM. Después de 7 días de crecimiento en cada tratamiento, se determinó el porcentaje de germinación.

B. Línea mutante *tin14* de *Arabidopsis thaliana*

La mutante insensible a trehalosa fue rescatada de un banco de mutantes por inserción de T-DNA (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory), mediante selección de la misma en medio MS y 5 mM de trehalosa. Las semillas que crecieron en presencia de trehalosa, fueron sometidas a una segunda ronda de selección para corroborar el fenotipo de insensibilidad al disacárido. Se llevaron a cabo retrocruzas y las plantas de la generación F1 se les permitió autopolinizarse; la insensibilidad a trehalosa y resistencia a kanamicina, se confirmó en las generaciones F2 y F3 en etapa de plántula. El mapeo de la inserción de T-DNA (DNA-Transferido) se obtuvo por rondas de amplificación por la técnica de TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced- Polymerase Chain Reaction) (Singer y Burke 2003), en plantas homocigotas de la línea *tin14*. La inserción del T-DNA y su posición en el genoma se determinó por secuenciación del producto del TAIL-PCR terciario y por la búsqueda de la región flanqueante en las bases de datos de TAIR (The Arabidopsis Information Resource) (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>).

C. Caracterización molecular de la mutante *tin14*

Para determinar la posición de la inserción en el genoma de la mutante *tin14*, se realizó el procedimiento de TAIL-PCR como lo describe Liu et al, 1995. Los oligonucleótidos específicos del borde derecho fueron: RB1, 5'GCCTCTCCACCCAAGCGGCCGAGAACCTG3', RB2, 5'GCAGATTATTTGGATTGAGAGTGAATATGAGAC3', RB3, 5'CGCAATAATGGTTTCTGACGTATGTGCTTAGC3'. También se usaron los oligonucleótidos degenerados AD1, AD2 and AD3. Las amplificaciones de PCR se realizaron usando ADN aislado de una planta mutante *tin14*. Las condiciones de amplificación utilizadas, fueron las reportadas por (Liu et al. 1995). Los fragmentos de ADN obtenidos, fueron clonados en un vector pCR-TOPOII (Invitrogen, Carlsbad, California) y verificados por secuenciación.

Para la amplificación por PCR del gen *AtBrp3* se usaron los oligonucleótidos 5'AAGAAAAGCAAACAATTAGTC3', y 5'CTTAAGATTTAGTACTGTTTAC3'. Las condiciones de amplificación fueron 94°C por 5 min, 94°C por 1 min, 55°C por 1 min (35 ciclos), y 72°C por 90s. El producto de PCR, se visualizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

D. Análisis de expresión mediante RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Se aisló ARN total de diferentes tejidos: raíz, hojas, y flores, mediante el reactivo Trizol (Invitrogen, St Louis, Missouri). La síntesis de cDNA, se realizó utilizando la transcriptasa reversa H (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) y oligo (dT). Los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar el fragmento del gen *AtBrp3* numero de acceso (At4g10680), del tamaño 493bp: 5'ATGAAAGAAGACGGAATTTGCTTGG3' y 5'CACGTTGGCTACTGCCGAGATCTC3'. Cada experimento de RT-PCR se realizó por triplicado y los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa 1% Tris-acetato EDTA al 1% teñidos con bromuro de etidio. Como control de un gen endógeno se utilizó el gen de ubiquitina (*ubi4* NM_122069.3) y los oligonucleótidos empleados fueron: 5'TCGCTCTTCACATCTCTTCG3' y 5'TGCATGAGACTCGAACAACC3'.

E. Análisis bioinformático

Se utilizó la base de datos del genoma de *Arabidopsis*, para la búsqueda de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos relacionadas al factor TFIIB, depositadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los números de acceso de la familia génica de *TFIIB* son: TFIIB1 (gi145360882), TFIIB2 (gi39545880), TFIIB3 (TFIIB3) (gi18406168), TFIIB4 (TFIIB4) (gi18410702), TFIIB5 (PBRP) (gi145334242), TFIIB6 (TFIIB6) (gi18413368). Los números de acceso de los genes *AtTFIIB* y *BRP* fueron: AtTFIIB1 (At3g10330), AtTFIIB2 (At2g41630), AtBRP2 (At3g29380), AtBRP4 (At3g57370), AtBRP3 (At4g10680). Para las proteínas de TFIIB de organismos diferentes a *Arabidopsis*, los números de acceso son: SUA7 (gi172777), DmTFIIB (gi7297699), OmTFIIB (gi50844459), ZmTFIIB (GRMZM26091586_P02), OsTFIIB (gi18481632), XITFIIB (gi65129). Para el análisis de los elementos regulatorios en *cis*, se empleó la base de datos PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

F. Análisis de la expresión de *AtBRP3* por microarreglos

Los patrones de expresión en diferentes etapas de desarrollo y anatómicos correspondientes al gen *AtBRP3*, fueron realizados empleando el programa Meta Analyzer Geneinvestigator V3 de *A. thaliana* (Zimmerman et al, 2004).

III. RESULTADOS

A. La mutante *tin14* es insensible a trehalosa, glucosa y ABA.

Diversos reportes han documentado la inhibición de la germinación ocasionada por diversos azúcares (glucosa, sacarosa, glicerol e inositol) y este análisis ha permitido el aislamiento de mutantes en plantas insensibles a azúcares (Eastmond et al. 2002; Schluempmann et al. 2004; Arenas-Huertero et al. 2000). Mediante un análisis exhaustivo utilizando el disacárido trehalosa (5 mM) como agente de selección, a partir del banco de mutantes por inserción de T-DNA, se lograron obtener 150 plantas insensibles a trehalosa, de las cuales al ser confirmadas en una segunda ronda de selección, solo 15 líneas *tin* corroboraron el fenotipo de insensibilidad. Las líneas insensibles a trehalosa fueron denominadas *tin1*, *tin2*, hasta *tin 15*. El fenotipo mas evidente de insensibilidad a trehalosa, se observó en la mutante *tin14*. Mediante TAIL-PCR, determinamos que la inserción del T-DNA en la mutante *tin14*, se encontraba localizado 728bp río abajo del gen *AtBRP3* (gi10680) específicamente en la posición de un elemento transponible (At4g10690).

Para caracterizar a fondo el fenotipo de insensibilidad de la mutante *tin14*, se evaluó la germinación en diferentes concentraciones de trehalosa, glucosa, y ácido abscísico (ABA), usando como control la planta silvestre (Figura 1). La mutante *tin14* presentó un desarrollo normal de cotiledones y raíces en presencia de 5mM de trehalosa; también se observaron diferencias en la longitud de la radícula cuando se comparó con la planta silvestre (Fig 1A). Estas diferencias de desarrollo entre plantas silvestres y *tin14* también fueron observadas en presencia de glucosa al 6% (Fig1B). Se ha reportado que las plantas insensibles a glucosa (*gin*), también desarrollan insensibilidad a ABA (Arenas-Huertero et al, 2000). Para corroborar si la mutante *tin14* mostraba insensibilidad a ABA, crecimos las semillas mutantes y silvestres en este fitorregulador. Los resultados permiten observar que la mutante *tin14* es insensible a 2.5µM de ABA al ser comparada con la mutante *abi4* (Fig. 1C), la cual es insensible a ácido abscísico (Finkelstein et al, 1998).

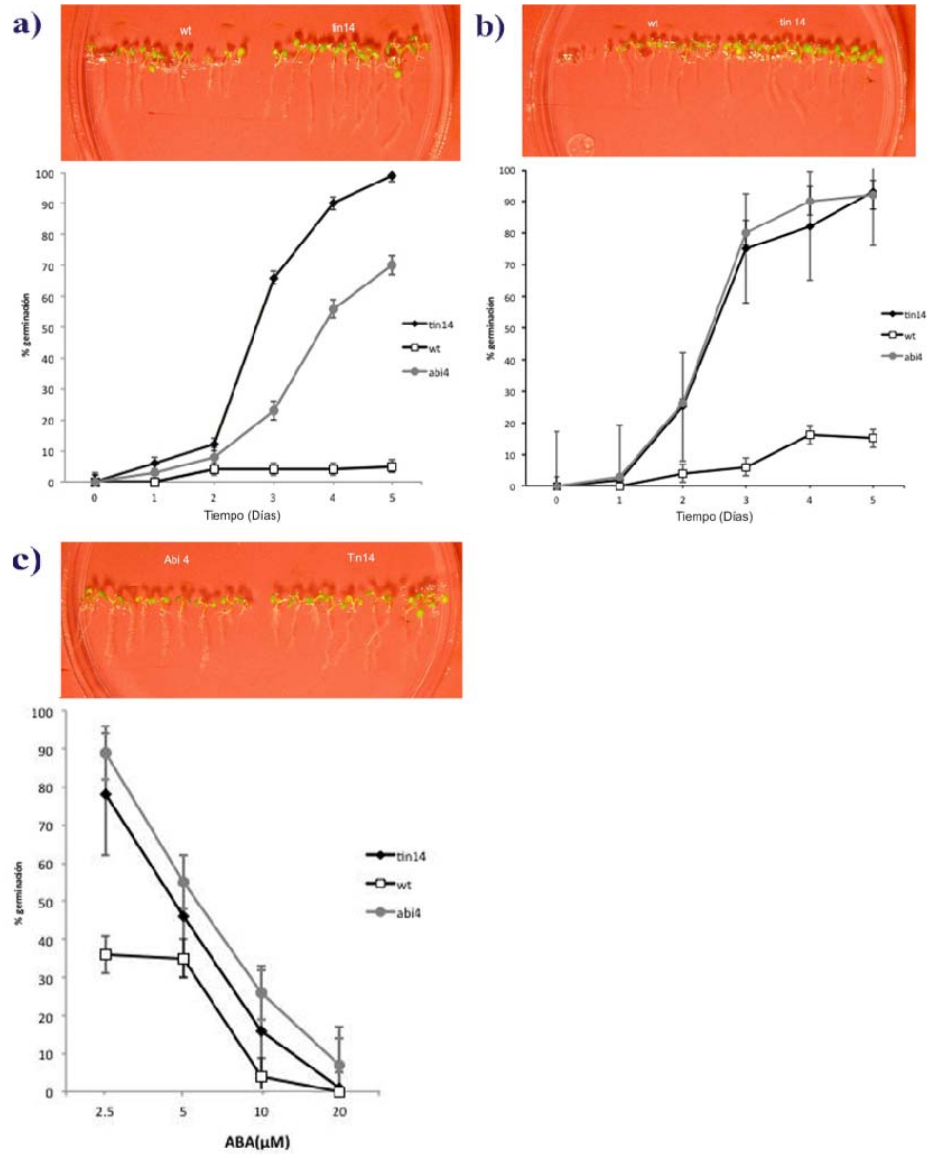


Figura 1. Cinética de germinación de *Arabidopsis thaliana* (Silvestre) wt, *abi4* and *tin14* (líneas mutantes). a) Trehalosa 5mM, b) Glucosa 6% and c) ABA. a) y b) La germinación fue cuantificada a los 5 días y c) la germinación se determinó a los 10 días. Como germinación nos referimos a la completa emergencia de la raíz. Cada punto en la gráfica representa el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras de error, representan la desviación estándar.

El ácido abscísico, juega un papel muy importante en la tolerancia al estrés abiótico (Arenas-Huerta et al. 2000), por esta razón examinamos la tolerancia de la mutante *tin14* a condiciones de estrés abiótico. Se evaluó la respuesta de la mutante *tin14* a sequía, estrés salino (NaCl) y estrés osmótico (manitol y sorbitol) (Fig. 2).

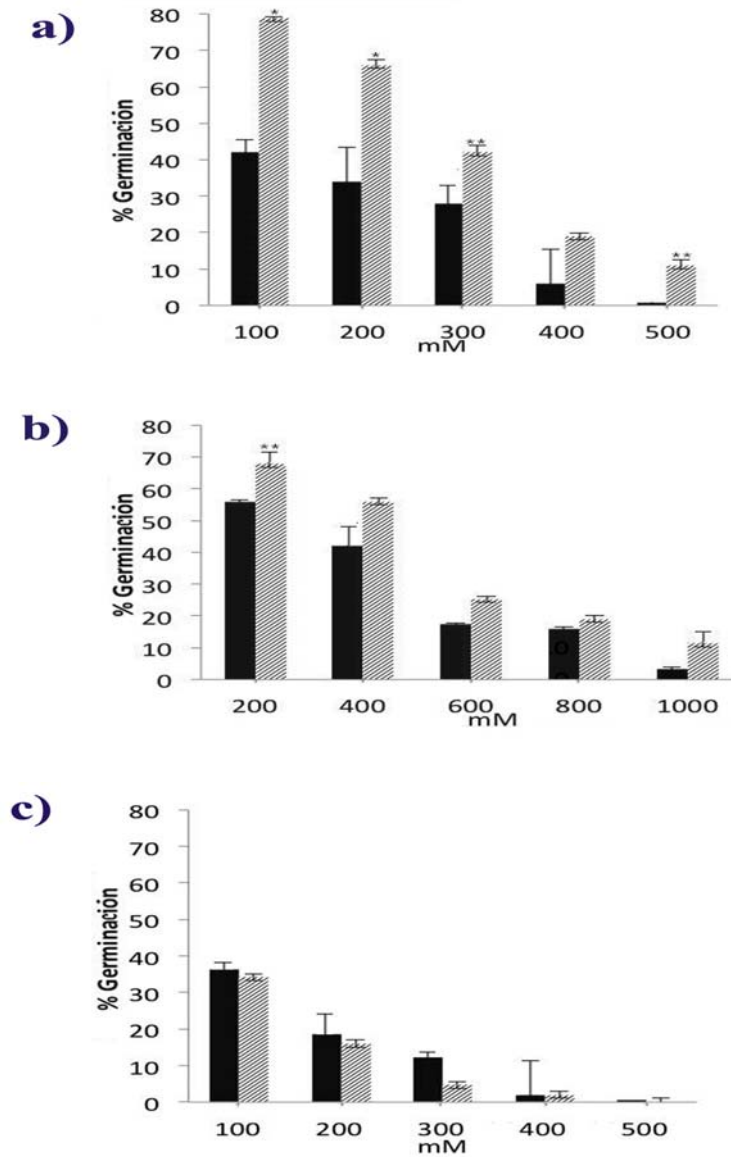


Figura 2. Efecto del estrés osmótico sobre la germinación de las semillas. Las barras grises representan a *tin14* y barras negras a Col 0. Las semillas silvestres y las de la línea *tin14* fueron sembradas en MS y con diferentes agentes osmóticos. a)Manitol, b)Sorbitol y c)NaCl. La germinación fué evaluada a los 7 días de exposición al agente osmótico (v2-test, **P < 0.05, *P < 0.001).

La mutante *tin14*, fue sometida a diferentes concentraciones de manitol, sorbitol y NaCl, mostrando una respuesta de tolerancia al estrés osmótico (Fig. 2). Además, mostró habilidad para germinar en 100 y 200mM de manitol, mientras que la línea silvestre, germinó pobremente (Fig. 2A). También observamos que las plantas *tin14* exhiben una tolerancia a 200mM de sorbitol (Fig. 2B). Sin embargo, no se observó diferencia significativa cuando la línea *tin14*, se germinó en distintas concentraciones de NaCl (Fig. 2C). La característica mas extraordinaria de la mutante *tin14* en comparación con la planta silvestre (Fig. 2A y 2B) en su capacidad de tolerar agentes osmóticos

B. Análisis de expresión del gen *AtBrp3* en diferentes órganos y bajo condiciones de estrés.

Mediante la herramienta Genevestigator, se analizó el patrón de expresión bajo diferentes condiciones de crecimiento. El análisis nos muestra una expresión máxima (unidades arbitrarias) en estrés osmótico tardío en raíces, y menor nivel de expresión a 8°C seguido de los niveles que se observan bajo condiciones de salinidad en las raíces y en menor nivel a 12°C. Se encontraron niveles mínimos en estrés osmótico temprano en raíces, y una expresión relativa por sequía temprana en raíces y salinidad temprana en raíces. Los niveles de expresión mas bajos en orden creciente fueron: estrés osmótico temprano, salinidad temprana en los tejidos aéreos de la planta y calor (Fig. 3a). Respecto a la etapa de desarrollo, es muy alta la expresión en semillas en germinación, plántulas y en flor madura (Fig. 3B). Esto correlaciona con los patrones de expresión observados en los experimentos de RT-PCR en la línea silvestre, pero no en la línea mutante.

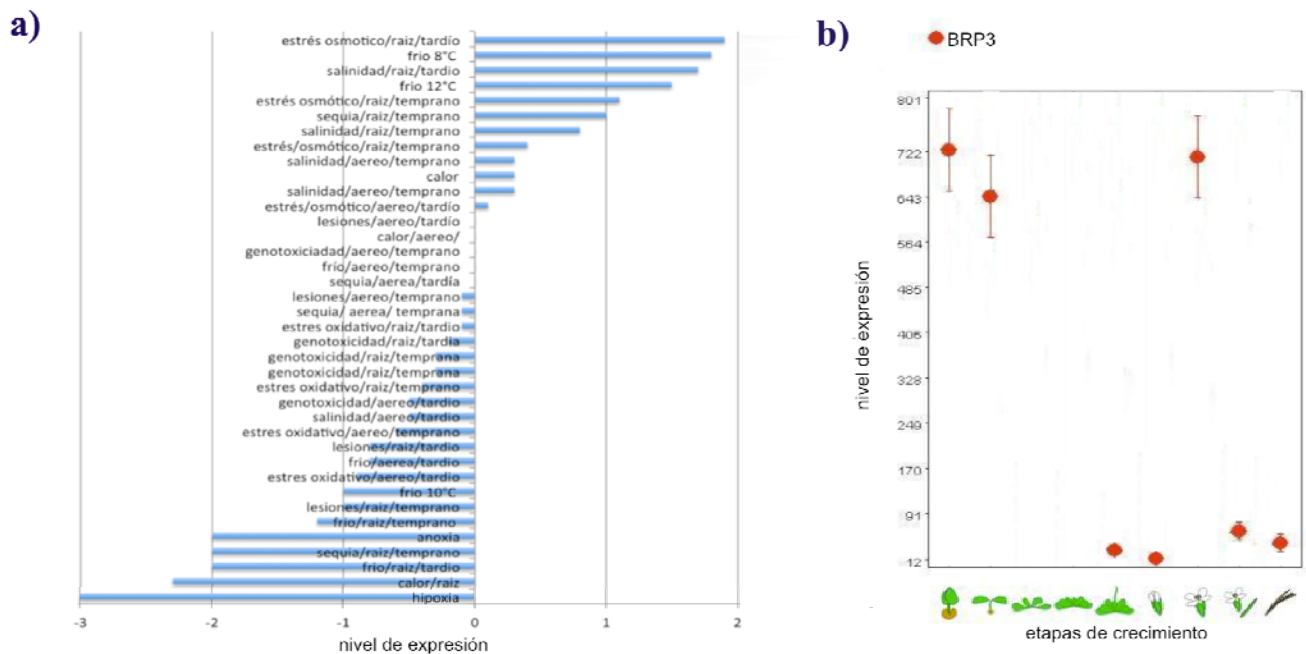


Figure 3. Análisis de expresión del gen *AtBRP3* obtenido del metaprofile de Genevestigator. a) Bajo diferentes condiciones de estrés. b) En diferentes etapas de desarrollo.

Para tratar de entender la relación entre *AtBRP3* y la respuesta al estrés, se llevó a cabo un análisis bioinformático para identificar los elementos regulatorios que actúan en *cis* de su promotor (Tabla 1). Este análisis reveló que algunos de estos elementos, están estrechamente relacionados al estrés: erd1 (early responsive to dehydration) (Nakashima et al. 1997). DRE “dehydration-responsive element” interacciones en *cis* con proteínas DREB (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). La caja CCAAT para el factor MYB como AtMYB1 y AtMYB2 (Shinozaki et al. 1992); cajas similares a rd22 para factores MYC (Abe et al. 1997); el elemento TGAC W, donde se unen los factores WRKY de estrés (Eulgem & Somssich 2007); y otros no relacionados al estrés como la caja GATA localizada en el promotor 35SCaMV.

Tabla 1. Elementos en *cis* localizados en la región promotora del factor BRP3

| Caja | Secuencia | Posición | Función reportada |
|-----------------|-----------|----------|--|
| AMYBOX1 | TAACARA | 813(+) | Secuencia conservada del gen de la alfa amilasa (Huang et al, 1990) |
| CAATBOX1 | CAAT | 98(+) | Secuencia promotora encontrada en el gen <i>legA</i> de chícharo (Shirsat et al, 1989). |
| MYB1AT | WAACCA | 929(+) | Sitio de reconocimiento de factores MYB en promotores de sequía del gen rd22 (Abe et al, 2003). |
| MYB2CONSENSUSAT | YAACKG | 762(+) | Sitio de reconocimiento del gen rd22 (Abe et al, 2003). |
| MYBCORE | CNGTTR | 279(+) | Sitio de unión de proteínas MYB: ATMYB1 and ATMYB2, de Arabidopsis; ATMYB2 esta relacionado con los genes de respuesta a estrés hídrico (Luscher et al, 1990). |
| MYBCOREATCYCB1 | AACGG | 762(-) | Activa genes reporteros que están relacionados con la fase M del ciclo celular y de ciclinas (Planchais et al, 2002). |
| MYCATRD22 | CACATG | 294(+) | Sitio de unión MYC a genes rd22 de <i>Arabidopsis thaliana</i> relacionado a la inducción por ABA (Abe et al, 1997). |
| WRKY71OS | TGAC | 354(+) | Sitio de unión de WRKY71, es un represor transcripcional en la vía de señalización por giberelinas (Xie et al, 2005). |

Los resultados obtenidos del análisis de Metaprofile fueron comparados con los obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativo. A los 4 y 7 días de edad, se expresa *AtBRP3* (Fig. 4A y 4B) y a 28 días en flor (Figura 4C). El análisis también demostró que existe un incremento en la expresión del gen *AtBrp3* en una concentración de 5µM de ABA, sugiriendo que *AtBRP3* es un punto de inicio en la percepción al estrés y señalización por ABA (Fig. 4E). También, se expresa *AtBrp3*, bajo condiciones de sequía, de bajas temperaturas (10°C) y en presencia de sorbitol, pero en presencia de NaCl, la expresión disminuye (Figura 4E).

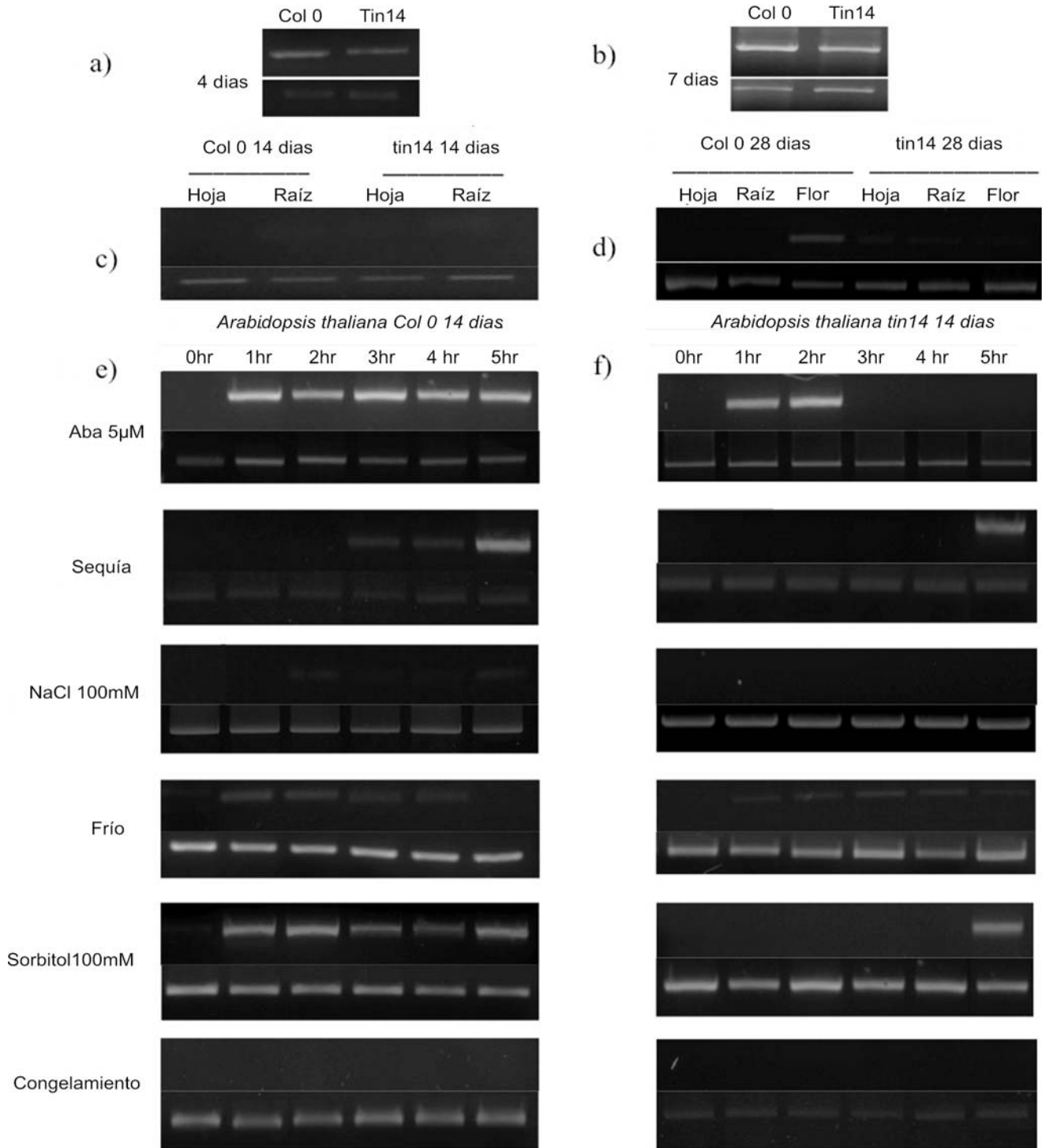


Figura 4. RT-PCR semicuantitativo para *BRP3* en *A. thaliana* a) Plántulas de 4 días; b) Plantas de 7 días; c) Plantas de 14 días; d) Plantas de 28 días; e) Plantas de silvestres, sometidas a diferentes tratamientos en orden descendente: ABA 5µM, sequía, NaCl 100 mM, frío 10°C , sorbitol 100 mM, y congelamiento; f) Plantas mutantes *tin14*, sometidas a diferentes tratamientos en orden descendente: ABA 5µM, sequía, NaCl 100 mM, frío 10°C , sorbitol 100 mM, y congelamiento

IV. DISCUSIÓN

La trehalosa está presente en cantidades trazas en la gran mayoría de las angiospermas, lo cual sugiere que el papel de la trehalosa en plantas superiores e inferiores es diferente (Schluepmann y Paulb, 2009). En este trabajo mostramos la relación que existe entre el metabolismo de trehalosa y la regulación de los generales factores de transcripción, ya que la inserción del T-DNA en *tin14*, compromete la regulación de *AtBRP3*. Esto produjo plantas mutantes de *A. thaliana*, insensibles a trehalosa y sugiere una interacción con al menos algunos de los miembros de la familia TFIIB que se sabe están involucrados en la tolerancia al estrés (Krysan et al. 1999, Wang 2008). Por otro lado, la disección molecular de los procesos de señalización en plantas empiezan a develar el papel crucial de los factores generales de la transcripción como actores moleculares centrales para integrar diversos fenómenos ambientales unidos a la respuesta y la adaptación de las plantas en la respuesta al estrés. La insensibilidad a trehalosa es un proceso relevante que podemos estudiar con detalle en plantas y en particular en la mutante *tin14*, además es relevante mencionar que la trehalosa se encuentra en niveles casi indetectables en plantas superiores, y cuando se aplica exógenamente, incrementa los niveles de almidón, reduce los niveles de sacarosa, inhibe la expansión de la hoja y la elongación de la raíz. A la fecha no existen reportes de mutantes de *Arabidopsis* insensibles a trehalosa por inserción de T-DNA (Wingler et al, 2000; Schluepmann et al, 2004; Bae et al, 2005).

Además, por la caracterización molecular de la mutante *tin14* podemos sugerir que la trehalosa está relacionada al estrés y a las respuestas mediadas por ABA. El análisis de expresión de *AtBrp3* muestra que este gen es inducido transitoriamente por frío, sorbitol y ABA. Esta observación implica que *AtBRP3* es un factor esencial para la inducción de genes debajo en la cascada de señalización que se relaciona al estrés. Las pruebas de germinación en sorbitol y manitol demuestran una mayor tolerancia de las plantas mutantes al estrés osmótico.

El hecho de que la mutante *tin14* insensible a trehalosa, sea también insensible a ABA y glucosa, sugiere que la regulación mediada por *AtBRP3* puede estar arriba en la cascada de señalización. Los niveles de expresión del transcrito de *AtBRP3* bajo condiciones de estrés disminuyeron en casi todas las condiciones evaluadas (ABA 5 μ M, salinidad y sorbitol 100mM). En contraste, a 10°C, NaCl 100mM y congelamiento no se encontraron diferencias (Figura 4F). Estos resultados sugieren que *AtBRP3* actúa como un regulador negativo de la transcripción en condiciones de estrés en las plantas silvestres debido a la repuesta disminuida de los niveles de expresión de *AtBRP3* en la mutante *tin14* pero que a su vez les confiere tolerancia al estrés.

Se conocen diversos factores de transcripción que están relacionados con la respuesta a estrés mediante la vía dependiente de ABA (Villalobos et al, 2004; Gutha y Reddy, 2008), pero ninguno de éstos son factores generales de transcripción. En base a nuestros resultados, proponemos un modelo de interacción múltiple mediado por *AtBRP3*, trehalosa, ácido abscísico y glucosa, y un mecanismo de regulación de *AtBRP3* por unión en *cis* a regiones regulatorias de algunos genes. La evidencia presentada aquí, sugiere interacciones negativas que confieren tolerancia al estrés osmótico, probablemente mediada por un mecanismo relacionado con ABA y la cascada de regulación de la glucosa. Para completar la integración de los miembros de la familia TFIIB y otras moléculas, es importante llevar a cabo otros estudios como la sobreexpresión e inhibición de los diferentes integrantes de la familia génica, así como la fusión de sus regiones promotoras con genes reporteros GUS/GFP en *A. thaliana*.

V. CONCLUSIÓN

Varias familias de genes en plantas superiores se han diversificado, dando lugar a diversas proteínas parálogas con funciones bioquímicas especializadas. Por ejemplo, los factores de transcripción generales de plantas tales como TFIIB se han expandido en número y en algunos casos realizan funciones

especializadas en el proceso de transcripción en la célula vegetal que impactan en procesos fisiológicos importantes. Este es el primer reporte en donde se involucra a un factor general de la transcripción, como un probable regulador en el proceso de señalización y percepción del estrés en plantas. Aunque, no descartamos que su función puede estar mediada por algún interactor, ya que los factores de transcripción interactúan con diferentes componentes de la maquinaria basal de la transcripción para ejercer su función.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo fue apoyado por recursos del proyecto CYTED-España 107PIC0312 y de CONACYT FOMIX 120159 otorgados a GI y RS. Agradecemos a la Dra. Patricia León, por proporcionarnos la mutante *abi4-1*. A la M.C. Nancy Hernández por el apoyo técnico. A Paul Gaytán y Eugenio López del Instituto de Biotecnología-UNAM, por la síntesis de oligonucleótidos.

REFERENCIAS

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling (2003) *Plant Cell* 15: 63-78
- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9:1859-1868
- Adams RP, Kendall E, Kartha KK (1990) Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochem Syst Ecol* 18:107-110
- Arenas-Huertero F, Arroyo a, Zhou Li, Sheen J, León P (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Dev.* 14:2085-2096
- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijk P, Thevelein JM, 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
- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G (2006) Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol Biol* 6:109
- Bae H, Herman E, Bailey B, Bae HJ, Sicher R (2005) Exogenous trehalose alters Arabidopsis transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. *Physiol Plantarum* 125:114-126
- Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. *Nature* 448:938-942
- Blázquez MA, Lagunas R, Gancedo C, Gancedo JM (1993) Trehalose-6- phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett* 329:51-54
- Djonović S, Urbach JM, Drenkard E, Bush J, Feinbaum R, Ausubel JL, Traficante D, Risech M, Kocks C, Fischbach MA, Priebe GP, Ausubel FM (2013) Trehalose biosynthesis promotes *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in plants. *PLoS Pathog.* 3:e1003217. doi: 10.1371/journal.ppat.1003217
- Eastmond PJ, van Dijken AJH, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JDG, Smeekens SC, Graham IA (2002) Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. *Plant J* 29:225-235
- Eastmond PJ, Graham IA (2003) Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Curr Opin Plant Biol* 3:231-235
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13:17-27

- Eulgem T, Somssich IE (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10: 366–371
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* 6:1043-1054
- Gutha LR, Reddy AR (2008) Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Mol Biol* 6:533-55
- Huang N, Sutliff TD, Litts JC, Rodriguez RL (1990) Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Mol Biol* 14:655-668
- Iturriaga G, Suárez R, Nova-Franco B (2009) Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3793-3810; doi:10.3390/ijms10093793
- Iturriaga G, Gaff DF, Zentella R (2000) New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose. *Aust J Bot* 48:153–158
- Jang JC, León P, Zhou L, Sheen J (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9:5-19
- Koch KE (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Phys Plant Mol Biol* 47: 509–540
- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR (1999) T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *Plant Cell* 11:2283-2290
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, and Whittier RF. (1995) Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8:457–463
- Luscher B, Eiseman RN (1990) New light on Myc and Myb. Part II. Myb. *Genes Dev.* 4:2235-2241
- Miranda J, Avonce, N, Suarez, R, Thevelein J, Van Djick P, Iturriaga, G (2007) A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic Arabidopsis. *Planta* (226) 1411-1421
- Moore B and Sheen J (1999) Plant sugar sensing and signaling a complex reality. *Trends Plant Sci.* 4: 250
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300:332-336
- Müller J, Boller T, and Wiemken A (1995) Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root-nodules of soybean and cowpea. *Planta.* 197:362-368
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497
- Nakashima K, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1997) A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 4:851-861
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang Y (2008) Trehalose metabolism and signaling. *Annu Rev Plant Biol* 59:417-441
- Planchais S, Perennes C, Glab N, Mironov V, Inze D, Bergounioux C (2002) Characterization of cis-acting element involved in cell cycle phase-independent activation of *Arath;CycB1;1* transcription and identification of putative regulatory proteins. *Plant Mol Biol.* 50:111-127
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:675-709
- Schluepmann H, Paulb M (2009) Trehalose metabolites in Arabidopsis-elusive, active and central. *Arabidopsis Book* 14:e0122

- Schluepmann H, van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M, Smeekens S (2004) Trehalose mediated growth inhibition of arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol* 135:879–890
- Sheen J, Zhou L, and Jang JC (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2:410–418
- Shinozaki K, Yamaguchi K, Urao T, Koizumi M (1992) Nucleotide sequence of a gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a myb homologue. *Plant Mol Biol* 3:493-499
- Shirsat A, Wilford N, Croy R, Boulter D (1989) Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Mol Gen Genet* 215:326-331
- Singer T, Burke E (2003) High-Throughput TAIL-PCR as a Tool to Identify DNA Flanking Insertions. *Methods Mol Biol* 236:241-271
- Smeekens S, and Rook F (1997) Sugar sensing and sugar mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol* 115:7–13
- Suárez R, Calderón C, Iturriaga G (2009) Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop Science* 49:1791–1799
- Suárez R., Wong A., Ramírez M., Barraza A., Orozco M., Cevallos M., Lara M., Hernández G., Iturriaga G (2008) Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in Rhizobia. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:958-966
- Thevelein JM, Hohmann S (1995) Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem Sci* 20(1):3-10
- Van Houtte H, Vandesteene L, López-Galvis L, Lemmens L, Kissel E, Carpentier S, Feil R, Avonce N, Beeckman T, Lunn JE, Van Dijck P (2013) Overexpression of the trehalase gene *AfTRE1* leads to increased drought stress tolerance in *Arabidopsis* and is involved in abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* 161(3):1158-1171
- Villalobos MA, Bartels D, Iturriaga G (2004) Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in *Arabidopsis* overexpressing the *CpMYB10* transcription factor gene. *Plant Physiol* 1:309-324
- Wang YH (2008) How effective is T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*? *J Biochem Tech* 1:11-20
- Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher RA (2000) Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124:105–114
- Wobus U, Weber H (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol Chem* 380:937–944
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ (2005) Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol.* 137:176-189.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-Acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6:251-264
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhureea D, Andralojc PJ, Mitchell RA, Powers SJ, Schluepmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol* 149:1860-1871
- Zhou L, Jang, JC, Jones TL, and Sheen, J (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *PNAS* 95:10294–10299
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136:2621-2632