

EL GENE *AtTPS1* DE *Arabidopsis thaliana* REGULA LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA SEÑALIZACIÓN POR ABA Y GLUCOSA.

Nelson Avonce¹, Oscar Mascorro-Gallardo², Patrick Van Dijk³, Johan Thevelein³ & Gabriel Iturriaga^{1*}.

¹Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62210;

²Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo; ³Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica. *Autor para correspondencia: fax 52-777-297030, iturri@cib.uaem.mx.

Palabras clave: ABA, estrés, trehalosa.

Introducción. La trehalosa es un disacárido no reductor que se acumula en una gran variedad de organismos que toleran el estrés abiótico. La biosíntesis de la trehalosa consiste en la conversión de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato a trehalosa-6-fosfato por medio de la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS1), para posteriormente defosforilarse a trehalosa por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) (1). En las plantas superiores la trehalosa no se acumula, lo cual excluye su papel como osmoprotector en este grupo de especies. Sin embargo, la expresión en levadura del cDNA del gen *AtTPS1* de *Arabidopsis thaliana* provoca una síntesis significativa del disacárido (2). En los últimos años, se ha encontrado en las bases de datos de secuencias génicas y ESTs que la mayoría de las plantas, incluyendo a las no tolerantes al estrés abiótico, expresan transcritos de *TPS1*. De hecho, *A. thaliana* tiene 11 genes de *TPS*, y al menos 8 de ellos se transcriben (3). Por lo tanto, además de su papel en la síntesis de trehalosa, *AtTPS1* podría tener otras funciones en *Arabidopsis*. Recientemente, se reportó que una mutante de *A. thaliana* producto de la inserción de un transposón en el gen *AtTPS1*, tiene un fenotipo de embrión letal (4).

En este trabajo se planteó sobreexpresar el cDNA del gen *AtTPS1* en *Arabidopsis thaliana* y analizar el fenotipo de las plantas.

Metodología. Plantas de *A. thaliana* fueron transformadas mediante infiltración al vacío mediada por *A. tumefaciens* (C58C1pGV2260) con una construcción que lleva el gen *AtTPS1* bajo el control del promotor 35S. Las líneas transgénicas homocigas (T₃) fueron seleccionadas por su resistencia a kanamicina (100% Kan^R) y el contenido de trehalosa fué determinado mediante análisis por HPLC. Las pruebas de tolerancia a la deshidratación se hicieron en plantas de 2 semanas de edad, dejando de regarlas hasta 2 semanas y posteriormente regándolas de nuevo. La expresión de *AtTPS1* y otros genes se determinó mediante RT-PCR semicuantitativo. Así mismo, la expresión de la proteína *AtTPS1* se determinó mediante un western utilizando un anticuerpo específico. El contenido de ABA se determinó mediante ELISA. Las pruebas de germinación se realizaron en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ABA o glucosa.

Resultados y discusión. Se obtuvieron 16 líneas independientes de la generación T₃ con una sola inserción del transgene *AtTPS1*, y que expresan el transcrito y la proteína correspondiente. Los niveles de trehalosa en las

diferentes líneas varían entre 1.5 hasta 2.5 veces más que en las plantas no transformadas. No se observaron alteraciones morfológicas o en el crecimiento a excepción de un retardo en la floración de 1–2 semanas. Además, las líneas transgénicas revivieron después de haber sido deshidratadas durante dos semanas y sus semillas fueron fértiles. Por otro lado, se encontró que las transgénicas fueron insensibles a la germinación en presencia de glucosa o ABA. En contraste con las silvestres, las plántulas transgénicas al germinar en glucosa son visiblemente más grandes, con hojas cotiledonarias verdes, bien expandidas y raíces completamente formadas. La germinación en presencia de diferentes concentraciones de ABA reveló una tasa de germinación más alta para las plantas transgénicas que sobreexpresan *AtTPS1*, aunque los niveles endógenos de ABA no cambian al compararlos con las plántulas silvestres. El análisis de la expresión de varios genes en las plántulas transgénicas mostró la inducción de los genes *ABI5*, *HXK1*, *HXK2*, *RBSC* y *APL3*, mientras que en la presencia de glucosa el gen *ABI4* se reprime. Además, la expresión de *AtTPS1* se reprime en las líneas transgénicas que expresan la *HXK* en antisentido.

Conclusiones. El gen *AtTPS1*, además de conferir tolerancia a la sequía, tiene un papel fundamental en la regulación de varios genes de la transducción de la señal por ABA y glucosa durante el desarrollo vegetativo de las plantas.

Agradecimiento. Este trabajo fue apoyado en parte por CONACYT No. 27703-N e ICGEB No. CRP/MEX98-01 (Trieste).

Bibliografía.

1. Paul, M., Pellny, T y Goddijn O. (2001) Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci.* 6: 197-200.
2. Blázquez, MA, Santos, E, Flores, CL Martínez-Zapater, JM Salinas, J y Gancedo, C. (1998) Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* 13: 685-689.
3. Leyman, B, Van Dijk, P y Thevelein, JM. (2001) An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci.* 6: 510-513.
4. Eastmond, PJ, van Dijken, AJH, Spielman, M, Kerr, A, Tissier, AF, Dickinson, HG, Jones, JDG, Smekeens, SC y 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: 225-23.

