

R. 13591

TD  
472

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE GENETICA

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
en folio 183 número 144 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 14 SET 1995

El Jefe del Negociado de Tesis,

*Rena Raffalli*

ESTRUCTURA Y ANALISIS DE LA REGULACION TRANSCRIPCIONAL  
DEL GEN TSW12 DE TOMATE

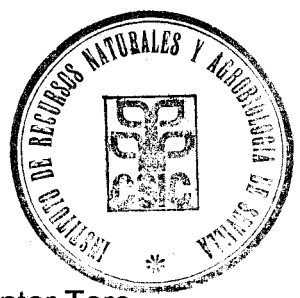
Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología por  
Olga de Pozo Cañas, licenciada en Biología

Sevilla, Septiembre, 1995

Director:

*J. A. Pintor Toro*

Dr. José Antonio Pintor Toro



*Olga del Pozo*

Olga del Pozo

## **I. INTRODUCCION**

1. El problema de la salinidad en la agricultura
2. Respuestas de las plantas en condiciones de salinidad
3. Efectos del tratamiento salino a largo plazo en la planta.
4. Respuesta molecular en la planta en situaciones de estrés
5. Obtención de plantas resistentes a salinidad
6. Papel del ABA en el estrés salino
7. Regulación del mecanismo de la expresión génica en condiciones de estrés
8. El ácido jasmónico
9. Unas proteínas llamadas PLTPs

## **II. MATERIALES Y METODOS**

### **1. MATERIAL BIOLÓGICO**

- 1.1 Material vegetal; cultivo y manejo
  - 1.1.1. Especies vegetales utilizadas
  - 1.1.2. Esterilización de semillas
  - 1.1.3. Cultivo hidropónico
  - 1.1.4. Tratamientos del material vegetal
  - 1.1.5. Cultivo *in vitro*
- 1.2. Bacterias
- 1.3. Vectores

### **2. PURIFICACION DE ADN**

- 2.1. Purificación de plásmidos bacterianos
- 2.2. Purificación de ADN total de *Agrobacterium tumefaciens*
- 2.3. Purificación de ADN de fagos
  - 2.3.1. Purificación de ADN de fagos a partir de medio sólido
  - 2.3.2. Purificación de ADN de fagos a partir de medio líquido
  - 2.3.3. Purificación de ADN de fagos a partir de gradiente de CsCl
- 2.4. Aislamiento de ADN total de plantas

### **3. MANIPULACION DE ADN**

- 3.1. Cuantificación del ADN
- 3.2. Electroforesis en geles de agarosa

**3.3. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa**

**3.4. Tratamientos enzimáticos del ADN**

**3.4.1. Restricción**

**3.4.2. Desfosforilación**

**3.4.3. Generación de extremos romos**

**3.4.3.1. Relleno de extremos 5' prominentes**

**3.4.3.2. Relleno de extremos 3' prominentes**

**3.4.4. Ligación**

**3.4.5. Obtención de fragmentos delecionados de ADN**

**3.4.6. Marcaje radiactivo de sondas de ADN**

**4. TRANSFORMACION DE *E.coli***

**4.1. Preparación de *E.coli* competente**

**4.2. Transformación**

**5. ANALISIS SOUTHERN**

**5.1. Digestión de ADN genómico y electroforesis**

**5.2. Transferencia del ADN a membrana**

**5.3. Hibridación ADN/ADN**

**6. ANALISIS NORTHERN**

**6.1. Obtención de ARN total de plantas**

**6.2. Electroforesis desnaturizante de ARN y transferencia a filtro**

**7. AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN POR PCR**

**7.1. PCR a partir de bacterias**

**8. HIBRIDACION DE COLONIAS**

**9. HIBRIDACION *IN SITU***

**9.1. Marcaje de ARN**

**9.1.1. Preparación de los fragmentos a marcar**

**9.1.2. Marcaje con digoxigenina**

**9.2. Preparación de secciones de tejidos**

**9.2.1. Preparación de porta-objetos tratados con poli-D-lisina**

**9.2.2. Fijación de tejidos vegetales e inclusión en parafina**

**9.2.3. Seccionamiento de los tejidos**

**9.3. Pretratamiento de las secciones**

#### 9.4. Hibridación

#### 9.5. Detección de los híbridos y análisis de los resultados

### 10. CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA DE *L. esculentum*

#### 10.1. Digestión parcial del ADN genómico

#### 10.2. Gradiente de sacarosa

#### 10.3. Ligación

#### 10.4. Empaquetamiento *in vitro*

#### 10.5. Titulación de la genoteca

#### 10.6. Escrutinio de la genoteca.

### 11. SECUENCIACION

#### 11.1. Desnaturalización de la muestra

#### 11.2. Geles de secuencia

### 12. EXTENSION DE CEBADOR (*Primer extension*)

#### 12.1. Marcaje del oligonucleótido

#### 12.2. Hibridación del ARN con el cebador

#### 12.3. Reacción de la transcriptasa reversa

#### 12.4. Hidrólisis y precipitación del cDNA

#### 12.5. Resolución en gel de secuenciación

### 13. ANALISIS DE PROTEINAS

#### 13.1. Método de extracción general

#### 13.2. Cuantificación proteica

##### 13.2.1. Método de Bradford

##### 13.2.2. Método de Lowry

#### 13.3. Electroforesis monodimensional

### 14. ANALISIS WESTERN

#### 14.1. Transferencia de proteínas a membranas

#### 14.2. Inmunodetección con anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina

### 15. INMUNOLocalIZACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO

#### 15.1. Preparación de las ultrasecciones

#### 15.2. Inmunodetección de proteína A unida a partículas de oro

#### 15.3. Análisis morfométricos y estereológicos de las secciones

## **16. TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS DE MESOFILO DE HOJA DE TABACO**

### **16.1. Aislamiento de protoplastos de tabaco**

### **16.2. Transfección de protoplastos de tabaco**

#### **16.2.1. Transfección de protoplastos mediante Polietilenglicol (PEG)**

#### **16.2.2. Transfección de protoplastos mediante electroporación**

## **17. TRANSFORMACION DE TOMATE MEDIANTE BOMBARDEO DE PARTICULAS**

### **17.1. Preparación del material**

### **17.2. Preparación de las partículas**

### **17.3. Precipitación del ADN**

### **17.4. Bombardeo con microproyectiles**

## **18. TRANSFORMACION ESTABLE DE PLANTAS DE TABACO**

### **18.1. Transformación de *A. tumefaciens***

#### **18.1.1. Preparación de *A. tumefaciens* competente**

#### **18.1.2. Transformación de *A. tumefaciens***

### **18.2. Transformación de plantas de tabaco vía *A. tumefaciens***

#### **18.2.1. Preparación de las células de *A. tumefaciens***

#### **18.2.2. Transformación de discos de hoja de tabaco**

#### **18.2.3. Aislamiento y regeneración de plantas de tabaco transformadas**

## **19. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GLUCURONIDASA (Gus)**

### **19.1. Cuantificación de la actividad Gus por fluorimetría**

#### **19.1.1. Ensayo fluorimétrico Gus en protoplastos de tabaco**

#### **19.1.2. Ensayo fluorimétrico Gus en plantas transgénicas de tabaco**

#### **19.1.3. Calibrado del Fluorímetro TKO 100**

#### **19.1.4. Cálculo de la actividad Gus**

### **19.2. Detección histoquímica de la actividad Gus por tinción con X-Gluc.**

## **III. RESULTADOS**

### **1. EXPRESION DEL GEN Tsw12**

#### **1.1. Análisis *northern***

##### **1.1.1. Acumulación del mensajero tsw12 en flores de tomate**

##### **1.1.2. Acumulación del mensajero tsw12 en plantas de tomate tratadas con ácido jasmónico y ácido salicílico**

##### **1.1.3. Análisis de la expresión del gen Tsw12 en respuesta a tratamientos con ABA, NaCl y manitol en mutantes *flacca***

## **1.2. Hibridación *in situ* en plántulas de tomate**

## **2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN Tsw12**

### **2.1. Aislamiento del gen Tsw12**

### **2.2. Mapa de restricción del fago Tsw12-1**

### **2.3. Secuencia de nucleótidos; determinación del inicio de transcripción y descripción de elementos reguladores del gen Tsw12**

### **2.4. Presencia de elementos reguladores descritos en otros promotores de genes regulados por estrés**

### **2.5. Comparación con la secuencia de otras LTPs**

## **3. ESTUDIO DE LA REGULACION TRANSCRIPCIONAL DEL GEN Tsw12**

### **3.1. Construcción de genes quiméricos: promotor Tsw12/ $\beta$ -glucuronidasa**

#### **3.1.1. Fusión traduccional**

#### **3.1.2. Fusión transcripcional**

#### **3.1.3. Obtención de versiones delecionadas del promotor Tsw12**

### **3.2. Expresión transitoria**

#### **3.2.1. Expresión transitoria en protoplastos de mesófilo de hoja de tabaco**

#### **3.2.2. Experimentos de bombardeo de partículas**

##### **3.2.2.1. Bombardeo sobre plántulas de tomate. Señales implicadas en la germinación**

##### **3.2.2.2. Bombardeo sobre hoja adulta de tomate. Respuesta a la sal**

### **3.3. Expresión espacial y temporal del promotor Tsw12 en plantas transgénicas de tabaco**

#### **3.3.1. Transformación estable de plantas de tabaco**

#### **3.3.2. Análisis cuantitativo de la expresión en tejido vegetativo. Respuesta a NaCl y ABA**

##### **3.3.2.1. Plantas transformadas con el promotor completo**

##### **3.3.2.2. Plantas transformadas con las deleciones del promotor.**

##### **Identificación de secuencias en *cis***

- Caracterización de la deleción  $\Delta$ -522

- Caracterización de la deleción  $\Delta$ -314

- Caracterización de la deleción  $\Delta$ -221

- Caracterización de la deleción  $\Delta$ -69

- Visión de conjunto del comportamiento de las deleciones

#### **3.3.3. Análisis cuantitativo durante la germinación en plantas transformadas con el promotor completo**

#### **3.3.4. Análisis cuantitativo en semillas de plantas transformadas con las deleciones del promotor Tsw12**

#### **3.3.5. Regulación espacio-temporal de la expresión del promotor completo**

##### **3.3.5.1. Expresión en la semilla madura**

- 3.3.5.2. Expresión durante la germinación
- 3.3.5.3. Expresión en tejido vegetativo
- 3.3.5.4. Expresión en flores de tabaco
- 3.3.6. Análisis funcional de las deleciones del promotor

#### **IV. DISCUSION**

1. Valoración del papel del ABA la inducción del gen Tsw12 en condiciones de estrés osmótico y salino en mutantes *flacca* de tomate.
2. Efecto de la herida mecánica, del ácido jasmónico y del ácido salicílico sobre la expresión del gen Tsw12.
3. Patrón espacial y temporal de la actividad del promotor Tsw12. Posible función fisiológica.
  - 3.1. Fusión traduccional: Localización subcelular de la proteína híbrida Tsw12:GUS
  - b Expresión específica de tejido descrita en miembros de la familia de las LTPs
  - 3.3. Fusión transcripcional: expresión del gen Tsw12, comparación con otras LTPs y posible papel fisiológico
  - 3.4. Similitudes y discrepancias entre las LTPs y otras proteínas implicadas en defensa
4. Secuencias reguladoras en *cis* de la expresión del gen Tsw12

#### **V. BIBLIOGRAFIA**

## **INTRODUCCION**



## 1) EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD EN LA AGRICULTURA

Las plantas, al ser organismos sésiles, están sometidas a condiciones ambientales desfavorables; éstas incluyen temperaturas extremas, anoxia, radiación excesiva, déficit de agua, concentraciones excesivas de sales o metales pesados y el ataque por patógenos. Estos factores impiden que la planta exprese totalmente su potencial genético de crecimiento, desarrollo y reproducción limitando, por tanto, el rendimiento de las cosechas y la distribución de las especies vegetales. El efecto que la sal produce en la planta depende de las características y de la severidad del estrés y del genotipo y el estadio de desarrollo de la planta

La salinización de los suelos es uno de los problemas más graves actualmente, sobre todo en zonas dependientes de irrigación. Las causas de la salinización de los terrenos se deben a las características geológicas del suelo, a efectos de los agentes atmosféricos, sobre todo en las regiones áridas y costeras (Tanji 1990) y a la explotación de los cultivos de regadío por utilización de aguas de mala calidad. Este efecto, causado por factores humanos se ha denominado salinización secundaria.

Se ha estimado la extensión global de los terrenos afectados por la salinidad entre 400 y 950 millones de hectáreas (Szabolcs, 1989). Entre un 30-40% de los 230 millones de hectáreas irrigadas están afectadas por el mismo problema (Epstein et al., 1980). En España, la extensión de terrenos salinizados se estimó en 840.000 hectáreas en 1983 (Alberto et al., 1983). Sin duda, la cifra actual debe superar este número con creces debido al carácter progresivo del problema.

La optimización de los sistemas de riego, minimizando la evaporación, y la regeneración del terreno afectado mediante sistemas de drenaje y lavado de sales con aguas de buena calidad, constituyen soluciones al problema, aunque, debido a los elevados costes, la puesta en práctica es limitada. Otra solución al problema consiste en la obtención de variedades de plantas que presenten mayor tolerancia a la salinidad. Este objetivo ha sido prioritario en los programas de mejora vegetal, ya que la mayor parte de las especies cultivadas son sensibles a la sal. A pesar de los esfuerzos realizados, hasta el momento, no se han obtenido variedades más resistentes mediante mejora clásica, debido a la complejidad de este carácter.

Actualmente existen grandes esperanzas de obtener soluciones al problema debido a los avances en el conocimiento de los mecanismos fisiológicos implicados en la respuesta de las plantas al estrés salino y a la identificación de genes y proteínas que participan en

estos procesos. La información obtenida, junto con la puesta a punto de los sistemas de transformación y regeneración de numerosas especies de plantas abren nuevas expectativas para solucionar un viejo problema.

## **2) RESPUESTAS DE LAS PLANTAS A LA SALINIDAD**

La salinidad tiene en la planta dos efectos importantes; un efecto osmótico, debido al descenso del potencial hídrico del suelo y un efecto iónico, ligado a perturbaciones nutricionales y tóxicas. El efecto osmótico es un componente del estrés hídrico y del estrés por frío, de ahí que existan algunas respuestas comunes en estas situaciones de estrés. Las plantas, para poder sobrevivir en un ambiente salino, deben hacer frente al estrés osmótico resultante de la deficiencia hídrica y a la toxicidad iónica que afecta a procesos metabólicos como la actividad enzimática, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrientes y la fotosíntesis.

Cuando el potencial hídrico del suelo se reduce, el agua se hace menos accesible para la planta. En estas condiciones, las células vegetales tienen que equiparar el potencial osmótico interno con el del medio externo, absorbiendo iones y/o sintetizando compuestos orgánicos.

Las plantas halófitas están adaptadas al medio salino, pudiendo completar su ciclo vital en condiciones salinas de 100-200 mM. Estas plantas absorben iones del medio y los utilizan como principal agente osmótico. Para evitar la toxicidad de los iones salinos, los almacenan en la vacuola, estabilizando la presión osmótica del citoplasma (con menor volumen que la vacuola) mediante la síntesis de compuestos orgánicos osmocompatibles. Las plantas halófitas presentan otras adaptaciones de tipo morfológico para reducir la pérdida de agua u optimizar la absorción de agua del suelo: hojas de pequeño tamaño, menor número de estomas por unidad de superficie, cutícula engrosada, aumento de la relación volumen/ superficie, y un gran desarrollo radicular.

Las plantas glicófitas, entre las que se encuentran la mayoría de las plantas cultivadas, son sensibles a la sal. Estas plantas son incapaces de regular los flujos iónicos a nivel celular de forma tan efectiva como lo hacen las halófitas, por tanto, para evitar los efectos tóxicos, expulsan activamente los iones  $\text{Na}^+$  contra gradiente y mantienen la concentración de  $\text{K}^+$  mediante el uso de transportadores específicos. La composición de la membrana citoplasmática radicular se altera para reducir la permeabilidad pasiva y hacerla más estable frente a los efectos dañinos de los iones. Estas plantas realizan una partición de iones a nivel de órganos y tejidos (Lauchli and Epstein, 1990), acumulando la sal que absorben en las raíces y en el tallo. De esta forma, se minimiza la exposición a la sal del aparato fotosintético foliar y de los meristemos. Como las plantas glicófitas son

incapaces de absorber grandes cantidades de iones y transportarlos a la vacuola como las halófitas, necesitan sintetizar mayor cantidad de osmolitos orgánicos, (o solutos compatibles). La naturaleza de estos compuestos varía según la especie, pueden ser aminoácidos (prolina), metilaminas (glicinabetaína, prolinabetaína,  $\beta$ -alaninabetaína), alcoholes polyhídricos (D-sorbitol, D-manitol), monosacaridos y disacáridos (sacarosa, glucosa, fructosa), ciclitols (D-pinitol, L-quebrachitol, myo-inositol) o compuestos terciarios sulfónicos (dimetilsulfoniopropionato). La síntesis y transporte de grandes cantidades de osmolitos orgánicos, el transporte activo de iones inorgánicos y la compartimentalización de los solutos orgánicos e inorgánicos requieren un gran gasto de energía metabólica, que hace que el crecimiento de la planta se reduzca (Stavarek and Rains, 1985; Yeo, 1983).

La presencia de altas concentraciones iónicas en el medio causan trastornos nutricionales por interferencia, antagonismo y competición en la absorción de otros iones esenciales. La relación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  con respecto a otros iones puede ser muy grande y causar deficiencias de nutrientes que están a concentraciones más bajas. Cuando el ión  $\text{Na}^+$  predomina sobre el ión  $\text{K}^+$  el requerimiento principal de la planta es el  $\text{K}^+$  en cantidades adecuadas (Rains and Epstein, 1967) produciéndose por ello una mayor selectividad en el transporte del  $\text{K}^+$ . A pesar de esto, las plantas presentan deficiencias en este ión. La absorción del  $\text{NO}_3^-$  se inhibe inicialmente en presencia de la sal (concretamente, se debe a efectos aniónicos) aunque posteriormente se recupera (Aslam et al., 1984). Los iones  $\text{Na}^+$  causan desequilibrio en el transporte y metabolismo del  $\text{Ca}^{++}$ , afectando a su vez a otros iones. Cuando la relación  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  es elevada, los efectos son deletéreos; la membrana sufre daños irreversibles y el crecimiento se afecta notablemente (Läuchli and Epstein, 1970; Cramer et al., 1988). La adición de  $\text{Ca}^{++}$  a concentraciones de 3-10 mM protege a las plantas creciendo en medio salino de los efectos adversos del ión  $\text{Na}^+$  (LaHaye and Epstein, 1971).

Se ha observado en plantas creciendo con concentraciones moderadas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{3-}$  u otros iones, reducción del crecimiento o la aparición de daños específicos. Este efecto se ha denominado toxicidad iónica. Los efectos tóxicos son más comunes en plantas leñosas, ya que tienen poca capacidad de excluir los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  de sus hojas y además, su ciclo vital es muy largo, por ello, sufren toxicidad incluso en suelos moderadamente salinos.

### **3) EFECTOS EN LA PLANTA DEL TRATAMIENTO SALINO A LARGO PLAZO**

Las plantas glicófitas que crecen en suelo salino durante largos períodos de tiempo, desarrollan mecanismos sucesivos de protección. Cuando los tallos y peciolos se saturan de sal, esta penetra en las hojas. La vacuola de las plantas glicófitas tiene un cierto efecto tampón de los iones  $\text{Na}^+$  (Binzel, 1988), (pero no es tan efectivo como en las células de las plantas halófitas) y una vez colmada, los iones pasan a la pared celular o al citoplasma. Si los iones se depositan en la pared celular, la muerte de la célula se produce por una pérdida de turgencia y por deshidratación; si se acumulan en el citoplasma, la muerte se produce por envenenamiento. La pérdida de tejido fotosintético tiene lugar primero en las hojas más viejas, es decir, en las que llevan más tiempo transpirando con sal. La exposición continua de la planta a la sal hace que el problema afecte progresivamente a hojas más jóvenes. La planta comienza a morir cuando la proporción de hojas muertas se acerca a la de producción de hojas nuevas; el aporte de fotosintato se reduce, el crecimiento decae y se produce la muerte de la planta. Esta cadena de acontecimientos sólo son observables en plantas creciendo en presencia de sal durante un período de tiempo largo. En exposiciones más cortas, los efectos se deben fundamentalmente al efecto osmótico.

Según el modelo bifásico de crecimiento vegetal en condiciones salinas (Munns and Termaat, 1986), inicialmente, el crecimiento de la planta se reduce transitoriamente debido al descenso del potencial hídrico del suelo. Este efecto es casi inmediato y no da tiempo a que afecte a las células que retrasan su crecimiento (Gollan et al., 1986), lo cual sugiere la existencia de un mensajero que comunique las señales inhibitorias desde las raíces a los tejidos verdes.

A más largo plazo, la progresiva acumulación de iones salinos en las hojas produce pérdida de tejido fotosintético y cuando la tasa de muerte foliar es mayor que la de expansión de hojas nuevas, se produce la muerte de la planta. En las variedades más sensibles, las plantas mueren antes bien porque las sales llegan antes a las hojas o porque la vacuola es incapaz de compartimentalizar altas concentraciones de iones como en las variedades tolerantes.

### **4) RESPUESTA MOLECULAR DE LA PLANTA A ESTRES SALINO-OSMOTICO**

Durante la exposición a sal o en períodos de desecación se producen cambios en la expresión génica que controlan la mayoría de las respuestas de la planta a corto y largo plazo. Se han detectado numerosas variaciones de los productos génicos mediante 2-DPAGE y se han aislado genes a partir de genotecas de cDNA que se expresan diferencialmente en estas condiciones. El aislamiento y caracterización de estos genes tiene dos objetivos fundamentalmente, analizar la respuesta a nivel molecular de la planta frente a éstas

condiciones y determinar cuáles son la vías de inducción de estos genes. Las funciones de muchos de los genes aislados se desconocen, las de otros, se infieren por comparación con las distintas bases de datos disponibles de la secuencia deducida de aminoácidos.

Los genes que se expresan en estas condiciones deben desempeñar distintas funciones; promueven la tolerancia celular, participando en mecanismos de protección del citoplasma, en el ajuste osmótico del interior de la célula y en cambios metabólicos; regulan la expresión génica, bien controlandola directamente (factores de transcripción) o participando en la señalización y reconocimiento del estrés; alteran la estructura celular produciendo cambios en la membrana plasmática y en la pared celular; otros son consecuencia del estrés, se expresan por daño celular.

El mecanismo de regulación es complejo y por el momento, no es bien comprendido en su mayor parte. Es interesante el hecho de que múltiples estreses pueden compartir la misma vía de transducción, esto se evidencia por el papel del ABA en la inducción de genes idénticos bajo distintos tipos de estrés. Otra hecho interesante y que hace más difícil la comprensión del problema, es la respuesta génica distinta al mismo estrés en distintos tejidos y en distintos estadíos de desarrollo dentro de una misma planta. Por otra parte, la respuesta obtenida depende de la severidad de las condiciones de experimentación a las que se someten las plantas,(Radin, 1993).

A continuación, se describen grupos de genes o productos génicos que participan en la respuesta de las plantas a condiciones de estrés salino-osmótico.

### **1) Genes que probablemente desempeñan funciones de protección de estructuras celulares**

Los genes Lea (late embryogenesis abundant) se acumulan durante las etapas de desecación de la semilla (Dure et al., 1981; Galau et al., 1986; Baker et al., 1986) y, algunos de ellos, también lo hacen en tejidos vegetativos en respuesta a estrés hídrico o a ABA (Yamaguchi et al., 1989; Godoy et al., 1990). Se han aislado en distintas especies y en general son proteínas citoplasmáticas muy solubles y abundantes, lo cuál descarta una posible función enzimática. En función de la estructura de la proteína se clasifican en distintos grupos. Uno de estos grupos, las dehidrinas, se han localizado subcelularmente en el citoplasma (Mundy and Chua, 1988; Neven et al., 1993; Schneider et al., 1993) y también en el núcleo (Godoy et al., 1994; Saghar et al., 1994; Godoy-Luna et al, 1994).

Entre las funciones que se han propuesto para este tipo de proteínas están: el secuestro de iones, la unión a moléculas de agua, la protección proteínas participando en su renaturalización, y la protección de membranas (revisado por Dure, 1993). Estas supuestas funciones se apoyan en la secuencia deducida de aminoácidos y en la expresión característica de estas proteínas. Hasta el momento, no se ha podido demostrar que la

presencia de estas proteínas en condiciones de estrés sea determinante para la tolerancia de las células a condiciones de desecación (Ooms et al., 1993; Still et al., 1994); la sobreexpresión de estas proteínas en plantas transgénicas tampoco han dado lugar a individuos más tolerantes a la desecación (Iturriaga et al., 1992).

## 2) Genes que realizan funciones de ajuste osmótico

Como se ha descrito previamente, las células compensan su interior osmóticamente mediante la síntesis de osmolitos compatibles. Estos compuestos parecen estar también implicados en la protección de la estructura de la membrana y en la estabilización de proteínas y actividades enzimáticas (Carpenter et al., 1989; Crowe et al., 1993, ). Algunas de las enzimas reguladoras de la síntesis de estos osmolitos se han aislado y caracterizado, induciéndose su expresión en situaciones de estrés hídrico, (Weretilnyk et al.; 1990, Bartles et al., 1991; Mc Cue and Hansons, 1992; Vernon and Bohnert, 1992; Ishitani et al., 1995; Yoshida et al., 1995).

Para la regulación iónica durante el estrés salino, hace falta integrar las funciones de las distintas ATPasas de la célula junto con las de otros transportadores de iones y moléculas. Así mismo, la estructura y permeabilidad de la membrana también contribuye a la determinación de la composición iónica.

El gradiente de  $H^+$  generado por  $H^+$  ATPasas y pirofosfatasa facilita el transporte de iones y solutos en plantas. La subunidad 70Kd de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana del tonoplasto, así como una ATPasa dependiente de  $Ca^{++}$  del retículo endoplásmico y una  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática se inducen y regulan por sal (Perez-Prat et al., 1992, Narashima et al., 1991, Reuveni et al., 1990). Los niveles de los transcritos de subunidades individuales de ATPasas también se alteran en estas condiciones (Surowy and Boyer, 1991)

Recientemente se han aislado genes cuyos productos tienen seis dominios transmembrana con una estructura de canal, cuya función consiste en el transporte de agua. Hasta el momento, no se ha podido demostrar que estas proteínas, denominadas aquaporinas, cotransporten iones o metabolitos junto con las moléculas de agua, (revisado por Chrispeels and Maurel, 1994). Este tipo de proteínas abunda en la membrana del tonoplasto y en la membrana plasmática de las células vegetales. La expresión de estos genes se correlaciona con la elongación celular (Ludevid et al., 1992; Daniels et al., 1994) y algunos miembros de esta familia, aislados en guisante y en *Arabidopsis* se inducen en condiciones de estrés osmótico (Guerrero et al., 1990; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992).

La composición y grado de saturación de los lípidos de la membrana plasmática condicionan en gran parte las características de ésta. Los resultados obtenidos en estudios comparativos entre especies con distinta tolerancia a la sal, indican que la regulación del

metabolismo de esteroides es crítica en la permeabilidad de las membranas (Hirayama and Mihara, 1987; Finkelstein and Sommerville, 1989).

### **3) Genes relacionados con la protección frente a patógenos**

Existen dos tipos de proteínas que se inducen en condiciones de salinidad y estrés hídrico, la osmotina y las proteínas transportadoras de fosfolípidos (PLTPs), a las que se les ha atribuido un papel en el control de patógenos. El ataque por patógenos así como la acción de distintos estreses ambientales, pueden producir daños o cambios en el volumen celular produciéndose una pérdida de turgor que permite la detección de la pérdida de agua a nivel celular.

La osmotina se identificó inicialmente como una de las proteínas mayoritarias en la célula (hasta el 12% con respecto al total) tras la adaptación de suspensiones celulares al medio salino (Singh et al., 1985). Posteriormente se ha demostrado que la osmotina pertenece a un grupo de proteínas que permeabiliza la membrana de los hongos (ref). Con respecto a las PLTPs, algunos miembros se inducen por desecación (Plant et al., 1992), salinidad (Torres-Schumann et al., 1992) y por frío (Hughes et al., 1992). Se han realizado ensayos *in vitro* en los cuáles el crecimiento de patógenos se inhibe en presencia de la proteína purificada (Terras et al., Molina et al., ). Posteriormente se estudiará la posible función de estas proteínas en detalle.

### **4) Genes que participan en procesos metabólicos**

Cuando la célula pierde agua, se desencadenan procesos que ajustan el metabolismo celular a las nuevas condiciones hídricas produciéndose una inhibición del crecimiento y alteraciones en el desarrollo. El caso más drástico ocurre en la planta halófila *Mesembryanthemum crystallinum*, en la que en condiciones de estrés osmótico o alta sal, la ruta fotosintética C3 se reemplaza por la CAM, que reduce enormemente la pérdida de agua por transpiración. Este cambio se produce gracias a la activación transcripcional de los genes de las enzimas Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GaPDH) implicadas en esta ruta (Cushman et al., 1990). Otras enzimas participantes también se inducen diferencialmente en estas condiciones.

En situaciones de estrés (salino, desecación, frío, alta intensidad de luz y exposición a agentes químicos), se producen daños en los tejidos debido al estrés oxidativo. Se han clonado algunos genes que se inducen en condiciones de estrés hídrico o salino que codifican proteínas con funciones antioxidantes o detoxificadoras (Dhindsa et al., 1991; Kiyouse et al., 1994; Holland et al., 1993; Mittler et al., 1994).

También tienen lugar cambios que afectan a la pared celular. En condiciones de deficiencia hídrica, se altera la extensibilidad y la conductividad hídrica de la pared celular (Iraki et al., 1989), se reduce el contenido de proteínas ricas en arabinogalactanos, disminuye la renovación de carbohidratos de pared y la red de

celulosa-extensina así como del contenido de extensina inmovilizada (Bressan et al., 1990; Zhu et al., 1993). Se han identificado proteínas de pared que se inducen específicamente por NaCl y ABA (Bozarth et al., 1973; Covarrubias et al., 1995; Deutch and Winicov, 1995).

#### **5) Genes que codifican proteínas reguladoras**

Recientemente se ha aislado un factor de transcripción perteneciente a la familia MYB que se induce en condiciones de estrés hídrico (Yamaguchi-Shinozaki, ). Se han identificado otros genes que potencialmente pudieran estar implicados en la regulación y señalización de procesos durante períodos de deficiencia hídrica como una proteína kinasa, factores de transcripción (Nelson et al., 1994) y una proteína que se une a ARN (Breiteneder et al., 1994). Este grupo de proteínas se estudiará posteriormente con mayor detenimiento.

#### **5) OBTENCION DE PLANTAS RESISTENTES A LA SALINIDAD**

Uno de los problemas para la obtención de plantas más tolerantes a sal por métodos de mejora clásica es la capacidad de adaptación epigenética de las células vegetales, lo cuál dificulta la selección de los verdaderos mutantes que aparecen raramente.

Las descripciones referentes a genes que contribuyen individualmente a la tolerancia a la sal son escasas, entre ellas están los responsables de la exclusión del Cl<sup>-</sup> en ciertas variedades de soja (Abel, 1969), de la acumulación de prolina en un mutante de cebada (Kueh and Bright, 1982) y ciertos mutantes del helecho *Ceratopteris richardii* en el cuál los mecanismos fisiológicos aún no se han determinado. En este último caso se ha utilizado la generación haploide gametofítica para la selección de la tolerancia a sal y se han obtenido evidencias de la participación de un sólo gen (Warne and Hickok, 1987). Esta estrategia de selección no es posible en la mayoría de las plantas.

Se han seleccionado mutantes de *Arabidopsis* capaces de germinar en presencia de elevadas concentraciones de NaCl (Saleki, R. et al., 1993). Las mutaciones son recesivas y definen tres grupos de complementación. Esta tolerancia no se da en otros estadios de desarrollo de la planta. La directriz a seguir en este tipo de estrategia consiste en seleccionar genes o mutaciones que confieran tolerancia en otras etapas de desarrollo de la planta y aunarlas en un solo individuo que presentaría una mayor tolerancia durante su ciclo vital completo.

La utilización de líneas celulares vegetales tiene como ventajas con respecto a la utilización de la planta entera la facilidad de obtención de mutantes, más fácilmente



seleccionables y, por otra parte, la posibilidad de utilización de cultivos haploides. Se han obtenido resultados prometedores mediante la selección *in vitro* en distintas especies (Vajrabhaya et al., 1989; Freytag et al., 1990; Jain et al., 1991; Sumaryati et al., 1992). En la mayoría de los casos se han utilizado cultivos embriogénicos o de embriones somáticos, que tienen mayor capacidad de regeneración que los callos o las suspensiones celulares utilizadas normalmente. Los protoplastos además de proveernos de un cultivo de células individuales, presentan una ventaja adicional en la selección de tolerancia a la sal y es que al estar inevitablemente adaptados osmóticamente, permiten la selección de tolerancia a iones específicos.

Otra estrategia utilizada consiste en transformar plantas con genes que mejoren la tolerancia a la sal. El principal problema radica en la identificación y aislamiento de estos genes. Este camino es prometedor ya que existen variedades de plantas sensibles con mayor tolerancia que pueden servir como fuentes de obtención y manipulación de estos genes. Otro escollo a superar es la baja eficiencia en la transformación de determinadas especies debido a la escasa capacidad de regeneración que presentan, como es el caso de las monocotiledóneas, entre las que se encuentran especies de gran valor agronómico.

Las plantas de tabaco transformadas con el gen bacteriano que codifica la enzima manitol 1-fosfato deshidrogenasa, sintetizan y acumulan manitol (Tarczynski, et al., 1993). Estas plantas creciendo en presencia de NaCl, son más tolerantes que las plantas no transformadas, aunque el crecimiento en estas condiciones se retarda seriamente. Recientemente, se ha demostrado que plantas transgénicas de tabaco que acumulan fructanos (moléculas ausentes en esta especie) son más resistentes a la desecación (Pilon-Smiths, et al., 1995) que las plantas silvestres o no transformadas. En esta misma línea están los intentos de reducir la inhibición por producto de la enzima que cataliza el paso final en la síntesis de prolina, (Delauney and Verma, 1993) y la introducción de los genes de la ruta de biosíntesis de betaína en plantas de tabaco (Holmström et al., 1994; Rathinasabapathi et al., 1994).

Existe una línea crítica de fisiólogos vegetales que argumentan que para la obtención de plantas realmente tolerantes a la salinidad, los biólogos moleculares deberían enfocar sus esfuerzos en manipular la expresión y la estructura de las proteínas de membrana que afectan el transporte de sal en raíces o de las proteínas que modifican la composición de la savia que fluye hacia las hojas (Munns, 1993). Justifican su postura en el hecho de que una vez que la sal penetra en las células, es cuestión de tiempo que sobrevenga la muerte celular y hasta el momento no se ha descrito ningún genotipo tolerante cuyas enzimas citoplásmicas sean más tolerantes a la sal. Hasta las enzimas de las especies halófitas más tolerantes presentan una sensibilidad a los iones salinos similar

a la de las enzimas de las plantas glicófitas más sensibles (revisado por Flowers et al., 1977; Munns et al., 1983).

## 6) PAPEL DEL ABA EN LA MEDIACION EN LA RESPUESTA AL ESTRES

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal presente en todas las plantas superiores. También se ha identificado en mamíferos, hongos, briófitas y en algunas bacterias. Desde el punto de vista químico, es un sesquiterpenoide sintetizado a partir del ácido mevalónico por la ruta de los carotenoides (Taylor et al., 1988; Zeevart and Creelman, 1988).

El ABA participa en diversos procesos fisiológicos; en el cierre estomático, durante el desarrollo de la semilla (influencia y regula procesos como la síntesis de material de reserva, el inicio y mantenimiento de la dormancia, la pérdida de agua y la adquisición de la tolerancia a la desecación) y en respuesta a condiciones ambientales adversas que afectan a la disponibilidad de agua, como la salinidad, la desecación y el frío. La respuesta de la planta a procesos mediados por ABA está determinada por los niveles de la hormona y por la sensibilidad a ésta del tejido competente. Los procesos fisiológicos que se han detallado van acompañados de cambios en la expresión génica (excepto en el cierre estomático).

Los experimentos realizados con mutantes han sido definitivos para discernir el papel del ABA en la modulación transcripcional de los genes que participan en los procesos descritos. Existen dos tipos de mutantes, deficientes en la síntesis e insensibles al ABA; ambos se reconocen fenotípicamente porque se marchitan fácilmente y/o tienen el estadio de dormancia de la semilla reducido. Estos efectos se corrigen por aplicación exógena de ABA en los mutantes deficientes en la síntesis. Los mutantes insensibles se seleccionaron porque germinaban y/o no detenían su crecimiento a concentraciones de ABA inhibitorias para el silvestre.

Se han descrito mutantes deficientes en la síntesis de ABA en patata, guisante, maíz y *Arabidopsis*. En el tomate, sistema utilizado para este trabajo, existen mutantes afectados en tres loci distintos, *sitiens (sit)*, *flacca (flc)* y *notabilis (not)* que contienen un 15%, 26% y 49% de los niveles de ABA con respecto al silvestre. En los mutantes *sit* y *flc*; no se produce acumulación de ABA en las hojas por efecto del estrés hídrico; en

cambio, en los mutantes *not*, se incrementa ligeramente el contenido (revisado por Koornneef, 1984).

La síntesis de ABA en plantas se produce probablemente a partir de un precursor C-40 como la violoxantina, una xantofila derivada de los carotenos. La xantoxina, seguramente derivada de la violoxantina, se oxida hasta ABA aldehído que es convertido en ABA mediante la enzima ABA-aldehído oxidasa. El mutante *flacca* está afectado en este último paso. La producción de xantoxina está regulado por estrés hídrico (Parry, 1993) y se necesita la transcripción y traducción de estas enzimas durante el estrés hídrico para conseguir los elevados niveles de ABA.

Los mutantes insensibles al ABA tienen niveles endógenos normales de ABA. Los mutantes obtenidos en *Arabidopsis (abi)* están afectados en cinco loci distintos (Kornbeef et al., 1984; Finkelstein, 1994) y están probablemente afectados en la vía de transducción de señales iniciada por el ABA.

En especies en las que no se han descrito mutantes de ABA, se utilizan inhibidores de la biosíntesis de carotenoides, como la fluoridona o el norfluorazón, aunque los resultados no son tan claros debido a los efectos pleiotrópicos que producen.

En semilla se han identificado numerosos productos génicos que se acumulan durante la maduración de la semilla y se inducen precozmente por aplicación exógena de ABA en embriones. En un principio se pensó que las variaciones de las concentraciones de ABA durante el desarrollo de la semilla constituirían las señales endógenas que controlarían los programas de expresión génica. No obstante, existen genes que son inducibles en embriones inmaduros tanto por aplicación exógena de ABA como por estrés osmótico, sin que exista un incremento significativo en el contenido endógeno de ABA (revisado por Giraudat et al., 1994).

Hughes y Galau (Ref) han postulado que la aparición de numerosos mensajeros en embriones se ajustan a programas temporales de expresión que podrían estar controlados por factores de desarrollo (todavía sin identificar), durante la "maduración" y "postabscisión".

En la expresión de los genes de reserva en semillas, la variación del contenido endógeno de ABA no parece ser la señal que controle la expresión, ya que ésta apenas se afecta en los mutantes de ABA. En cambio, la expresión de los genes *Lea* se afecta cuantitativamente en mutantes de ABA y parece estar directamente correlacionada con el contenido endógeno de esta hormona aunque probablemente esté también correlacionada con factores adicionales de desarrollo. Experimentos realizados con mutantes biosintéticos de ABA indican que las variaciones en el contenido endógeno de ABA en el silvestre parecen controlar la inducción de la dormancia de la semilla pero no es, sin embargo, el regulador primario de las otras respuestas analizadas (revisado por Giraudat et al., 1994 y Chandler and Robertson, 1994).

El incremento endógeno de ABA en la planta adulta en condiciones de estrés ambiental (por desecación, salinidad o frío ) y la capacidad de la planta no estresada de simular muchas de las respuestas morfológicas y fisiológicas a estas condiciones ambientales por aplicación exógena de ABA propusieron a esta hormona durante mucho tiempo como el mediador esencial en la activación de la respuesta de la planta a estas condiciones. El ABA parece ser responsable del cierre estomático en condiciones de deficiencia hídrica.

Se ha demostrado de forma concluyente que existen genes que requieren elevados niveles endógenos de ABA para su expresión en condiciones de estrés hídrico (Cohen et al., 1990; Pla et al., 1991; Lang et al., 1992), por tanto, se pueden clasificar como dependientes de ABA. Existe otra categoría de genes que se expresan por aplicación exógena de ABA pero que se expresan en mutantes deficientes en la síntesis en condiciones de estrés hídrico (Gilmour et al., 1991; Nordin et al., 1991; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993; Tomashow, 1993; Welin et al., 1994; ). Por otra parte, existen otros genes en los que el ABA no participa en su regulación transcripcional en condiciones de deficiencia hídrica (Guerrero et al., 1990; Houde et al., 1992; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992; Takahashi et al., 1994; Silhavy et al., 1995). En función de estos datos, el ABA debe actuar como mediador en varios tipos de estreses ambientales pero sólo en algunas de las rutas participantes y no como coordinador general de la respuesta, como se suponía. Diversos tipos de experimentos apuntan a que las rutas dependientes e independientes de ABA que operan durante las condiciones de estrés interactúan en la regulación de la expresión en respuesta a la desecación ó a estrés osmótico (Mäntylä et al, 1995).

Con respecto a la vía de transducción de señales iniciada por el ABA aún no se ha identificado el receptor de esta hormona, aunque se tienen evidencias de la existencia de sitios de unión a la hormona tanto en la cara intracelular (Allan et al, 1994) como extracelular de la membrana plasmática (Anderson et al., 1994; Gilroy and Jones, 1994).

Esta vía de transducción se está empezando a diseccionar, ya que recientemente se han clonado los loci afectados en los mutantes insensibles ABI1 y ABI3. La mutación *abi1*, es dominante (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994), y el producto génico ABI1 tiene un dominio con gran homología con una fosfatasa 2C de serina/treonina y otro dominio N-terminal de unión a  $Ca^{2+}$ . Por otra parte, existen bastantes evidencias acerca de la participación del  $Ca^{2+}$  en la respuesta al ABA, al menos durante el cierre estomático (Gilroy et al., 1991). El gen *Abi3* es homólogo al gen *Vp1* (*Viviparous-1* ) de maíz, (McCarthy et al, 1991; Giraudat et al., 1992); ambos forman parte de una nueva familia de activadores transcripcionales. Este tema ha sido recientemente revisado por Bowler y Chua, (1995).

## 7) REGULACION DE LA EXPRESION GENICA EN CONDICIONES DE ESTRES HIDRICO/SALINO

El ABA ha ocupado gran parte de la atención de los grupos de investigación que trabajan en temas de estrés, por ello, los mecanismos transcripcionales regulados por esta hormona son los mejor conocidos, aunque se están empezando a dilucidar los componentes de otras vías independientes de ABA.

Los mecanismos a través de los que actúa el ABA involucran control transcripcional y/o una serie de eventos post-transcripcionales como el procesamiento del transcrito, estabilidad del ARNm, control traduccional y la actividad y recambio proteico (revisado por Chandler and Robertson, 1994 y Hetherinton and Quatrano, 1993).

La respuesta de cada gen a las señales celulares viene definida en último caso por las secuencias de ADN que contienen. El análisis de promotores de genes que se regulan por ABA, desecación o salinidad permite identificar los componentes terminales de la cascada de transducción de señales iniciadas en estas situaciones celulares. Este análisis se compone de tres pasos esenciales:

a) identificación de un elemento en *cis* presente en promotores de genes regulados por ABA, alta sal o estrés osmótico, b) caracterización de los factores en *trans* que actúan con el elemento en *cis* definido, c) análisis funcional del factor en *trans* y el elemento en *cis* para probar que la regulación por ABA o por estrés salino -osmótico es conferida por su interacción *in vivo*.

### a) Identificación de los factores en *cis*;

Se han identificado distintos elementos en *cis* necesarios para activar la transcripción en respuesta al ABA denominados ABRE (ABA-Response Element).

<u>Elemento</u>	<u>gen</u>	<u>secuencia</u>	<u>referencia</u>
Em1A	Em	GGACACGTGGC	(Marcotte et al., 1989)
motivo1	rab16A	COGTAOCTGGCGC	(Mundy et al., 1990)
hex-3	sintético	GGACGOGTGGC	(Lam and Chua, 1991)
Sph	C1	TCCATGCATGCAC	(Hattori et al., 1992)
?	CDeT27-45	AAGCCCAAATTTCA- -CACAGCCCGATAACCG	(Nelson et al., 1992)

Los secuencias ABRE mejor caracterizados son los correspondientes al elemento Em1A presente en el gen Em (Marcotte et al., 1989) y el motivo del gen rab16A cuyo consenso es 5'-C/TACGTG-3'. Esta secuencia ABRE coincide con el consenso de las cajas G descritas en promotores de plantas que responden a estímulos tan diversos como la luz (Schulze-Lefert et al., 1989), herida (Hermann et al., 1988), desecación (Mundy and Chua, 1988), y a reguladores endógenos como la auxina (Liu et al., 1994), el ácido jasmónico (Mason et al., 1993) y el ácido salicílico (Qin et al., 1994).

La secuencia hex-3 es otra ABRE que difiere del consenso anterior en una sola base (Lam and Chua, 1991). Otra ABRE distinta debe actuar en el caso del gen C1 (Hattori et al., 1992); el promotor de este gen responde a ABA y es transactivado por el gen regulador *Vp* a través del elemento SphI. Existen genes cuya expresión es dependiente de ABA o que responden al ABA y cuyos promotores carecen de las secuencias ABREs descritas, (Plant et al., 1991; Michel et al., 1993). Esto implicaría la existencia de secuencias ABREs diferentes a las descritas pero que realizan la misma función.

Recientemente Shen y Ho (1995), han determinado que la secuencia ABRE es necesaria pero no suficiente para la respuesta al ABA en el promotor HVA22 de cebada. Para la obtención de altos niveles de inducción por ABA es necesaria, además de la secuencia ABRE, una secuencia adaptadora en *cis* denominada CE1 (Coupling Element) cuya secuencia es TGACCACCGG (en este caso concreto). Esta secuencia está presente en otros promotores que responden a ABA y es muy probable que existan distintas secuencias adaptadoras al igual que existen distintas secuencias ABREs.

Recientemente se ha publicado una secuencia en *cis* involucrada en la respuesta a condiciones de desecación, alta sal y frío. Esta caja, denominada DRE (Dehidration-Responsive Element) consta de nueve pares de bases, TACCGACAT y media estas respuestas independientemente del ABA (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994).

## **b) Caracterización de los factores en *trans* .**

El control de la transcripción génica se produce mediante interacciones de proteínas (factores de transcripción) con secuencias de ADN dentro del núcleo. Generalmente, interaccionan varios factores de transcripción que a su vez sufren modificaciones para actuar concertadamente y afectar la expresión génica final.

Se han identificado varias proteínas nucleares que se unen específicamente a las secuencias ABRE de distintos promotores (Guiltinan et al., 1990; Mundy et al., 1990; Vilardell et al., 1991). Todas las proteínas aisladas hasta el momento pertenecen al grupo estructural de factores de transcripción "leucine zipper" o cremallera de leucinas

(bZIP). Estas proteínas contienen un dominio estructural en la región carboxiterminal y otro dominio funcional (en la región aminoterminal. La región carboxiterminal está muy conservada y es rica en leucinas, confiriendo a este dominio la capacidad de formar una estructura en  $\alpha$ -hélice anfipática que determina la zona de unión a secuencias en *cis* y la dimerización, pudiendo formar homo o heterodímeros. La región aminoterminal es muy variable y permite la interacción con otras proteínas. Este grupo de proteínas están muy conservadas y extendidas; se describieron inicialmente en humanos, (ref) y se han aislado también representantes de esta familia en levaduras.

Otro tipo de factores de transcripción relacionados con la activación transcripcional en condiciones de estrés osmótico pertenecen a la familia MYB. El gen *Atmyb2* de *Arabidopsis* homólogo de esta familia, se induce en condiciones de desecación y desaparece cuando se restaura la hidratación celular. La inducción de este gen también se produce por tratamiento con ABA y NaCl (Urao et al.,1993), sin embargo, la región promotora de este gen carece de secuencias ABRE descritas previamente. Se ha demostrado que este factor de transcripción se une a la secuencia consenso myb 5' TAACTG 3'.

### **c) Análisis funcional del factor en *trans* y el elemento en *cis***

Mediante ensayos de unión realizados *in vitro* con extractos proteicos de plantas tratadas con ABA y secuencias ABRE previamente caracterizadas, se detectó la presencia de complejos específicos de ADN/proteína. Estos complejos no se detectaban o estaban menos representados cuando los extractos proteicos procedían de plantas no tratadas o control (Ref). Se han aislado varios clones cuyos productos génicos se unen *in vitro* a las secuencias ABRE.

El factor EmBP-1 (Guiltinan et al.,1990) de trigo se clonó por su interacción con la caja Em1a, aunque falta por demostrar en experimentos funcionales *in vivo* que este factor actúa como activador transcripcional regulado por ABA.

El factor TAF-1 de tabaco se aisló porque se unía específicamente al motivo I (Oeda et al., 1991). La construcción consistente en un tetrámero del motivo I ligado al extremo 5' del promotor mínimo -90CaMV 35S fusionado al gen GUS, se introdujo en plantas tabaco establemente. No se detectó activación transcripcional en condiciones control ni por aplicación exógena de ABA. Se encontró transactivación del motivo I tras bombardear las hojas transformadas de tabaco con el gen *Taf-1*, aunque la expresión no aumenta tras el tratamiento con ABA. Estos resultados indican que este gen regula genes que no responden a ABA, que tienen en su promotor secuencias tipo caja G. Por tanto, conviene enfatizar la importancia de los análisis funcionales *in vivo* para la correcta valoración de la función de estos genes como factores de transcripción en las condiciones descritas.

## Modelo de actuación de los factores de transcripción regulados por ABA

La secuencia conservada ABRE T/CACGTG o la caja G es reconocida por todos los miembros de la familia bZIP, así pues ¿cómo pueden distinguir los factores de transcripción las secuencias conservadas de las cajas G en distintos y numerosos promotores para conferir la expresión específica de cada gen?. Parte de este problema parece estar resuelto, debido a la identificación de elementos adaptadores con distintas secuencias en *cis* en otros promotores que responden a distintos estímulos vía caja G. Parte de la especificidad de la respuesta vendría dada por la secuencia del elemento adaptador. Dada la gran variabilidad de la secuencia de aminoácidos de la región aminoterminal de las proteínas bZip, las interacciones del elemento adaptador u otras proteínas implicadas con esta región serían específicas en cada caso. También se ha demostrado que las sustituciones en los nucleótidos del entorno inmediato a la caja G alteran la especificidad de unión (revisado por Quatrano et al, 1993).

Existen múltiples evidencias que apoyan que las proteínas VP1, ABI 3 y GF14 (McCarthy et al., 1991; Giraudat et al., 1992; de Vetten et al., 1992) actúan como activadores transcripcionales. La proteína VP1 no se une al ADN, sin embargo, podría mediar la interacción entre las proteínas unidas a EMBP1 (que estaría unida al sitio ABRE) y las proteínas que se unan al elemento adaptador que estaría reconociendo a su elemento en *cis*.

## 8) EL ACIDO JASMONICO

El ácido jasmónico (JA) se describió por primera vez como un constituyente de la fragancia del aceite esencial de *Jasminum grandiflorum* (Demole et al., 1962). El éster metílico del ácido jasmónico (MeJA), conocido como metil jasmonato y compuestos relacionados, se encuentran extendidos por todo el reino vegetal (Meyer et al., 1984), así como en algas y hongos (Sembdner and Parthier, 1993). Se sintetizan a partir del ácido linoleico y químicamente son ciclopentanonas. Afectan al crecimiento y desarrollo de las plantas de forma pleiotrópica. El MeJA, se libera en las plantas en respuesta a varios estreses; por herida o ataque por patógenos (Creelman et al., 1992), por tratamiento de tejidos vegetales con paredes de hongos (Dittrich et al., 1992) o en tejidos sujetos desecación o estrés osmótico (Parthier et al., 1992). Los jasmonatos se transportan sistémicamente a través del floema en las plantas afectadas por herida.

Las respuestas al jasmonato que se producen en la planta parecen estar correlacionadas con alteraciones en la expresión génica. Se inducen nuevos polipéptidos (Parthier et al., 1987), se reprime selectivamente la síntesis de otros polipéptidos





(Weidhase et al., 1987), y en tratamientos a largo plazo, se paraliza el mecanismo general de biosíntesis de proteínas. La expresión génica se afecta en múltiples niveles; actúan en la activación transcripcional, en el procesamiento y estabilidad post-transcripcional del ARNm, en la traducción y en procesos post-traduccionales que incluyen la modificación y degradación proteica (revisado por Reinbothe et al. 1994).

### **Relación entre el ABA y el JA y herida mecánica**

La herida mecánica produce la acumulación de determinados polipéptidos, cuya función debe estar relacionada con la cicatrización de la herida y con la prevención de la invasión de patógenos. Muchos de estos polipéptidos se inducen por tratamiento con JA y también con ABA. Se ha sugerido que el JA y sus derivados actúen como moléculas señal en respuesta a herida (Farmer and Ryan, 1990).

El JA y el ABA se liberan en respuesta a la herida mecánica sistémica y localmente. Los genes inducidos por JA mejor caracterizados son los inhibidores de proteinasa (Pin) I y II (ref). Estos genes se inducen por herida mecánica, por aplicación exógena de ABA y de JA y no por desecación (Hildman et al 1992), por tanto, las rutas de transducción en las que participa el ABA durante la desecación y por herida deben ser distintas. Los mutantes deficientes en la síntesis de ABA de patata (*droopy*) y tomate (*sitiens*) no acumulan PinII tras la herida mecánica; el tratamiento con ABA o JA restituye la expresión del gen PinII, por tanto el JA actúa en alguna etapa de la ruta de transducción tras la intervención del ABA. Existen evidencias de la inducción por herida mecánica de la actividad lipasa; esta actividad liberaría ácido linolénico, que es el precursor del JA. Se cree que en los primeros estadios de la respuesta a herida, la síntesis de JA es dependiente de ABA, controlando éste probablemente la inducción de alguna enzima biosintética del ácido jasmónico (Hildman et al. 1992; revisado por Giraudat et al., 1994).

## **9) UNAS PROTEINAS DE PLANTAS LLAMADAS PLTPs**

### **Los lípidos en las plantas**

Existe actualmente un gran interés desde el punto de vista científico y económico en elucidar las rutas enzimáticas involucradas en la síntesis y degradación de lípidos, en la caracterización de las enzimas más relevantes y de los mecanismos que regulan la composición de las membranas y de los lípidos de reserva.

La composición lipídica celular de plantas superiores se ha relacionado con la capacidad de resistencia a distintos tipos de estrés; existen datos que atribuyen a la composición lipídica de la membrana plasmática en plantas superiores la capacidad de supervivencia a temperaturas extremas (Ref). Por otra parte, toda la superficie de las plantas en contacto con la atmósfera está recubierta por capas de material lipídico,

cutinas, ceras y suberinas que reducen la pérdida de agua e impiden la entrada de patógenos.

### **Síntesis de glicerolípidos**

Las células vegetales presentan una serie de características exclusivas que las diferencia de las animales. Existen diferencias en la composición lipídica de las membranas vegetales frente a las de animales y de hongos, fundamentalmente en la composición de las membranas cloroplásticas.

Los ácidos grasos y lípidos no se transportan entre las células de las plantas superiores, cada célula es autónoma en la síntesis de lípidos, variando la composición lipídica ampliamente de un tipo celular a otro.

La síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el cloroplasto, mientras que la síntesis de lípidos tiene lugar en el cloroplasto (vía procariótica) y en el retículo endoplásmico (vía eucariótica). La actividad de la aciltransferasa es específica en cada uno de los orgánulos, de forma que los lípidos sintetizados en los plástidos tienen un ácido graso de 16 carbonos (C16) en el segundo carbono del glicerol y los sintetizados en el retículo llevan un ácido graso de 18 carbonos (C18) en esta misma posición. Este "marcado" molecular permite estimar el flujo relativo de lípidos entre los dos ciclos y ha permitido determinar que una porción substancial de los lípidos sintetizados en el retículo son reimportados hacia el cloroplasto.

Se han obtenido resultados sumamente reveladores en experimentos realizados con mutantes de *Arabidopsis*. Los mutantes *act1* son deficientes en la primera enzima de la vía procariótica, que tiene actividad glicerol 3-fosfato (G3P) acil-transferasa. Como resultado de esta mutación, todos los ácidos grasos son exportados hacia el retículo y, por lo tanto, todos los lípidos contienen ácidos grasos C18. No obstante, el contenido neto de lípidos permanece constante; se retiene la misma cantidad de lípidos en el retículo pero se exportan tres veces más lípidos de retorno al cloroplasto que en el silvestre. Es, por tanto, importante determinar el mecanismo mediante el cuál el retículo dirige el tráfico celular de lípidos, no sólo hacia el cloroplasto, sino hacia el resto de los orgánulos celulares. Hasta el momento no se ha identificado tráfico vesicular entre el retículo y el cloroplasto ni tampoco contacto directo con otros orgánulos.

### **Papel atribuido a las PLTPs**

Las PLTPs o proteínas transportadoras de fosfolípidos se purificaron por primera vez en laboratorios que trabajaban con lípidos. Estas proteínas se han propuesto como candidatas para la realización de las funciones de distribución y transporte de lípidos celulares, ya que tienen la capacidad de transferir lípidos entre membranas *in vitro*, aunque esta función de transferencia no se ha demostrado aún *in vivo*. Estos polipéptidos, de unos 9 kD llegan a constituir hasta un 4% del total de la proteína soluble obtenida de homogeneizados crudos de hoja; son por tanto, de los polipéptidos más abundantes. No obstante, la participación de éstas proteínas en el tráfico de lípidos entre orgánulos a través del citoplasma (Kader, 1990), se cuestiona actualmente. A medida que se obtuvieron nuevos datos sobre la regulación y localización de la expresión de estos genes, las hipotéticas funciones asociadas a las LTPs han ido cambiando. Se demostró que los ARNm correspondientes a una LTP de cebada se unían a polirribosomas del RE rugoso y se translocaban al lumen cotraduccionalmente (Madrid, 1991). Como medida conciliadora, se atribuyó a estas proteínas el papel de transferir lípidos dentro del sistema de endomembranas, (aunque la proteína carece de la señal de retención típica de plantas). Esta teoría se desechó posteriormente, ya que suspensiones celulares procedentes de embriones somáticos de zanahoria excretaban la proteína EP2 (perteneciente al grupo de las PLTPs) al medio de cultivo (Sterk et al en 1991). En la planta adulta, la proteína EP2 se localizó en la pared celular; en principio mediante protocolos de extracción de proteínas específicos de proteínas de pared y posteriormente por localización subcelular mediante técnicas inmunohistoquímicas. Esta localización subcelular se ha corroborado en otras LTPs de otras especies, (Thoma et al.,; Pyee et al.,).

### **Características generales de las LTPs**

Se han aislado LTPs en numerosas especies y constituyen un grupo de proteínas con gran homología. El peso molecular oscila entre unos 8.8 y 9.7 kD y el punto isoeléctrico es básico. Todas contienen un péptido señal y son hidrofílicas. Contienen unos residuos aminoacídicos muy conservados L-K-S(N/G)-A(I)-A (en las posiciones 54-58 en la proteína TSW12 madura), y una región compuesta por residuos cargados D-R-K(R)(Q) (del 43 al 45), situada en el dominio más hidrofílico. La disposición de 8 residuos de cisteínas, que contienen este grupo de proteínas, está estrictamente conservada. Se cree que estas cisteínas forman puentes disulfuro, pero hasta ahora, sólo se ha demostrado la existencia de uno de ellos (Takishima et al., 1988). La posición de los residuos de prolina también está conservada.

### **CARACTERIZACION PREVIA DEL cDNA TSW12**

La caracterización del clon de cDNA correspondiente al mensajero del gen TSW12 se realizó previamente en nuestro laboratorio. El cDNA se aisló de una genoteca de cDNA de plántulas de tomate tratadas con 10 g/l NaCl y 10  $\mu$ M ABA durante 24 horas. El mensajero *tsw12* se expresa durante la germinación de la planta, alcanzando el máximo nivel de expresión cuando la plántula tiene 5 días de edad (cuando la radícula mide unos 15 mm). A partir de este momento, el nivel del mensajero disminuye rápidamente hasta hacerse indetectable cuando la plántula expande los cotiledones. La expresión durante la germinación aumenta por tratamientos con 10g/l NaCl o por calor. En la planta adulta, la aparición del mensajero sólo se produce por tratamiento con NaCl o en menor grado, con ABA. La expresión se localiza en peciolo, tallos y hojas (de mayor a menor), y no se detecta en raíces. Los niveles de acumulación de la proteína TSW12 aumentan con la duración del tratamiento salino, llegando a ser una de las proteínas mayoritarias tras tratamientos prolongados. Mediante la técnica de impresión de tejidos sobre membranas de nitrocelulosa, se ha localizado la proteína en la epidermis y en el tejido vascular de tallos y peciolo tratados con sal.

## **MATERIAL Y METODOS**

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1. Material vegetal; cultivo y manejo

#### 1.1.1. Especies vegetales utilizadas

Se han utilizado plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) var. Rutgers-Marglobe, procedentes de semillas adquiridas a la casa Semillas Batlle S.A. (Barcelona); plantas de tomate de la variedad Rheinlands Ruhm cv. y plantas mutantes isogénicas *flacca* (flc), deficientes en la síntesis de ácido abscísico obtenidas gracias a semillas inicialmente provistas por C.M. Rick, (Tomato Genetics Stock Center, California). Para los experimentos de transformación heteróloga se han utilizado plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) var. Xanthi.

#### 1.1.2. Esterilización de semillas

Las semillas se esterilizan mediante lavados sucesivos en etanol absoluto (30 s), en hipoclorito sódico 2% (20 min), y finalmente en agua estéril (al menos tres lavados). Las semillas esterilizadas y embebidas durante 24 h en agua, se colocan sobre papel de filtro estéril y saturado en agua autoclavada y se incuban a 25°C en oscuridad.

#### 1.1.3. Cultivo hidropónico

Las plántulas de tomate y tabaco con los cotiledones expandidos se adaptan mediante algodón hidrófobo o con esponjas en contenedores con las raíces sumergidas en solución Hoagland II (Jones et al., 1982) diluida al 50%, con aireación y se cultivan en cámaras con intensidad de luz y humedad controladas, bajo un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25°C y 18 °C de temperatura respectivamente. Este procedimiento también se ha utilizado para la multiplicación vegetativa de plantas de tomate y tabaco. Para ir adecuando las plántulas a las nuevas condiciones de humedad, los primeros días se cubren con bolsas de plástico transparente, que se van abriendo progresivamente en los días sucesivos.

#### Solución nutritiva de Hoagland II

**Macronutrientes:** 1 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 6 mM  $\text{KNO}_3$ , 4 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ . Las sales se diluyen a partir de una solución stock 1M de cada una.

**Micronutrientes:** 46.25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 9.15  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.76  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.32  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.11  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Se añaden a partir de una solución stock 1000 x.

**Solución de hierro:** 10 ppm Sequestrene® (Ciba Geigi). Se añade a partir de una solución stock al 0.5%.

### 1.1.3. Tratamientos del material vegetal

Las plantas adultas de tomate se sometieron a tratamientos con ABA (100  $\mu$ M), NaCl (10 g/L), y manitol (300 mM), añadiendo estos compuestos directamente a la solución Hoagland. Los tratamientos llevados a cabo en plantas adultas de tabaco, se realizaron en las mismas condiciones, sólo que las concentraciones de NaCl y manitol se incrementaron hasta 15 g/L y 400 mM, ya que esta especie muestra una mayor resistencia a la sal y a la desecación que el tomate.

Los tratamientos realizados con ácido salicílico y ácido jasmónico se llevaron a cabo pulverizando las plantas con las soluciones previamente preparadas.

### 1.1.5. Cultivo *in vitro*

La manipulación del tejido vegetal se realiza en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo horizontal, con medios autoclavados y pinzas y bisturís esterilizados por calor. El material vegetal se incuba en cámaras con la luz y la temperatura controladas.

El cultivo *in vitro* se ha utilizado para la propagación vegetativa de plantas de tabaco, para la transformación, regeneración y propagación de plantas transgénicas y para los estudios de segregación de la F<sub>1</sub> de las plantas transformadas en medio selectivo.

El medio base utilizado es el MS (Murashige y Skoog, 1962). Los medios se esterilizan por autoclavado y los antibióticos (esterilizados mediante filtración), se adicionan al medio templado. Finalmente, el medio se dispensa en cajas Petri o en contenedores Magenta (Sigma).

**Medio MS;** 4.3 g/L de mezcla basal de MS (Sigma), 10 ml/L de mio-inositol 100 x, 1 ml/L de vitaminas 1000 x, 30 g/L sacarosa. El pH se ajusta a 5.7 con NaOH 1M. Para medios sólidos, se añade 6 g/L agar (Difco).

-Mioinositol 100 x: 10 mg/ml mio-inositol.

-Vitaminas 1000 x: 0.05 g/L nicotina, 0.005 g/L tiamina, 0.005 g/L piridoxina, 0.005 g/L ácido fólico, 0.0005 g/L biotina, 0.025 g/L glicina.

**MS Cocultivación:** Medio MS líquido sin vitaminas.

**MSS (regeneración de brotes):** Medio MS sólido; 50  $\mu$ l/L de ácido naftalenacético (NAA) (2 mg/ml en NaOH 1N), 500  $\mu$ l/L benzilaminopurina (BAP) (2 mg/ml en NaOH 1N), 100 mg/L kanamicina y 250 mg/L carbenicilina.

**MS enraizamiento:** Medio MS sólido, 100 mg/L kanamicina y 250 mg/L carbenicilina, (para la selección de los brotes transgénicos).

**MS germinación:** MS sólido, 300 mg/L kanamicina para seleccionar las semillas de las plantas transgénicas.

## 1.2. Bacterias

Se han utilizado las siguientes estirpes de *Escherichia coli* :

NM522 (Stratagene); *D(lac-proAB), thi, hsdD5, supE, [F'proAB,laclqZDM15]*

XL-1 Blue (Stratagene); *recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacIq, ZDM15, Tn10, (tetR)]*.

KW251 (Promega) F<sup>+</sup> *supE44, galK2, galT22, metB1, hsdR2, mcrB1, mcrA, [argAB1::Tn10], recD1014*.

Las bacterias se cultivaron en medio LB. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos se suplementaron con 100 mg/L de ampicilina o 100 mg/L de kanamicina.

**Medio LB:** 10 g/L bactotripton, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl.

Para la transformación de discos de hoja se utilizó la estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* (A.t.) LBA4404: plásmidos Cr (críptico), pLA 4404 y fondo cromosómico C58-C9, *strR, thi+* (Hoekema et al., 1983).

Para la selección de A.t. transformantes, se sembraron en medio LB ó YEB sólido suplementado con 100 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de estreptomycin. Posteriormente se crecían en medio líquido YEB (con extracto de carne, evita que las bacterias crezcan formando grumos) y suplementado con 100 mg/L kanamicina y 100 mg/L estreptomycin.

**Medio YEB:** 0.5% Extracto de ternera (Difco), 0.1% extracto de levadura, 0.5% pepton, 0.5% sacarosa, 2 mM MgSO<sub>4</sub>.

### 1.3. Vectores

El bacteriófago lambda EMBL3 (Promega) se usó para la construcción de la genoteca de tomate.

Los plásmidos pBluescript II SK (+) y (-) (Stratagene) se usaron para la clonación y secuenciación de los fragmentos seleccionados.

El vector binario pBin19 (Bevan, 1984) contiene el origen de replicación bacteriano RK2, el gen de la nopalina sintetasa, que confiere la resistencia a kanamicina tanto en bacterias como en plantas y las regiones Ti de movilización de ADN necesarias para la transformación de plantas de tabaco con A.t. En este vector se clonaron las construcciones transcripcionales del promotor Tsw12/Gus para la posterior transformación estable de plantas de tabaco.

El plásmido pBI101.1 es un derivado de pBin19 en el cuál se ha clonado el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa de *E.coli* completo (1.87 kb), correspondiente al locus *uidA* (Novel and Novel, 1973), y la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa. Permite la clonación de promotores que dirijan la expresión del gen Gus. Se ha utilizado para la realización de la fusión traduccional del promotor Tsw12/Gus.

El plásmido pBI221 contiene el cassette consistente en el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S), el gen Gus y el terminador nos clonados en el plásmido pUC19. Se ha



utilizado como control positivo en los experimentos de expresión transitoria. Las plantas transgénicas transformadas con esta construcción se han utilizado como control positivo en los experimentos de detección de actividad Gus en plantas transformadas.

El plásmido pBlueGus (equivalente al plásmido pBI221, pero sin promotor y con los sitios de clonación múltiple ampliados a ambos lados), se utilizó para la clonación transcripcional del promotor Tsw12. Para la transformación estable de plantas de tabaco, se subclonó el cassette completo (promotor/Gus/terminador nos) en el vector pBin19.

El plásmido -70CaMV 35S/Gus se diferencia del plásmido pBI221, en que el promotor 35S se ha deletado hasta el nucleótido -70.

## **2. PURIFICACION DE ADN**

### **2.1 Purificación de plásmidos bacterianos**

Se ha seguido básicamente el protocolo de lisis alcalina descrito por Sambrook et al., 1989. Este método se basa en la lisis de las células bacterianas y en la desnaturalización del ADN con álcali, la renaturalización del ADN plasmídico y su precipitación posterior con etanol. Para las minipreparaciones de ADN plasmídico se partía de 1.5 ml de cultivo crecido durante la noche (on), para las midipreparaciones de 15 ml y para las maxipreparaciones de 250 ml.

#### **Gradiente de CICs**

Este procedimiento permite obtener preparaciones de plásmidos de gran pureza.

1. Resuspender el sedimento obtenido de una maxipreparación de plásmidos en 4.4 ml de TE y centrifugar a 8000 rpm, 4 °C. Añadir 1 g/ml de CsCl al sobrenadante.

Disolver suavemente.

2. Añadir 0.4 ml de solución de bromuro de etidio (10 mg/ml en agua) y mezclar. Medir el índice de refracción, que debe estar en torno a 1.3860.

3. Transferir la solución a tubos de ultracentrifuga de 5 ml con pipetas Pasteur y sellar los tubos.

4. Centrifugar a 65000 rpm, 20 °C, durante 5 h en rotor vertical.

5. Recoger la banda correspondiente al plásmido iluminando con luz UV de onda larga.

6. Eliminar el bromuro de etidio del ADN con extracciones sucesivas con isopropanol saturado con CsCl, hasta obtener una solución transparente.

7. Precipitar el plásmido con 3 vol de etanol al 70%, secar levemente y resuspender en TE.

## **2.2. Purificación de ADN total de *Agrobacterium tumefaciens***

Se inocula una colonia de *A.t.* en 5 ml de medio YEB suplementado con antibiótico en un matraz de 50 ml y se crece a 28 °C durante 24 h con agitación vigorosa.

Se centrifugan mediante un "pulso" 2 x 1.5 ml de cultivo en un eppendorf y a continuación se procede al igual que en las minipreparaciones de plásmido de *E.coli*, con la única salvedad de que se incuban con una "punta de espátula" de lysozima durante 15-30 min a ta y con agitación, para la digestión de la pared celular.

## **2.3. Purificación de ADN de fagos**

### **2.3.1. Purificación de ADN de fagos a partir de medio sólido**

El fago, previamente purificado y titulado se sembró en placas de 120 mm de NZYCM con agarosa en lugar de agar, de forma que las calvas de lisis fueran confluentes. A continuación se siguió el protocolo descrito por la casa *Promega*:

1. Cubrir las placas con 5-10 ml de SM y rascar la capa superior con espátula. Al material obtenido se le añade una gota de cloroformo y se recoge en un tubo de centrifuga.
2. Mantener a ta durante 30 min con agitación leve.
3. Centrifugar a 8000-10000 xg, 10 min, y a 4 °C.
4. Traspasar el sobrenadante a nuevo tubo y añadir RNasa A y DNasa I al lisado, ambas a una concentración final de 1 µg/ml. Incubar 30 min a 37 °C.
5. Añadir 1 vol de solución de precipitación de fagos e incubar 1h en hielo.
6. Centrifugar a 10000 xg , 20 min a 4 °C.
7. Secar ligeramente el precipitado y añadir 1 ml de tampón de fagos por cada 10 ml de lisado inicial. Resuspender agitando suavemente.
8. Centrifugar a 8000 xg , durante 2 min a 4 °C, para eliminar restos celulares.
9. Extraer dos veces con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Agitar 1 min y centrifugar a 12000 xg, 5 min.
10. Transferir la fase superior (acuosa) a un tubo limpio y añadir 1 vol de isopropanol. Mezclar e incubar a -80 °C, 20 min Centrifugar a 12000 xg, 10 min a 4 °C.
11. Lavar el precipitado con 1 ml de EtOH 70%. Secar ligeramente al aire y resuspender en 50-100 µl de TE.

**SM:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01% gelatina.

**Solución de precipitación de fagos:** 20 % p/v PEG 8000, 2M NaCl.

**Tampón de fagos:** 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>.

**Medio NCYM:** 10 g/L NZ amina, 5 g/L NaCl, 5 g/L extracto de levadura, 1 g/L casaminoácidos y 2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Ajustar a pH 7.5.

### 2.3.2. Purificación de ADN de fagos a partir de medio líquido

1. Inocular una colonia bacteriana apropiada en medio NZCYM y crecer toda la noche (on). Transferir 1/1000 a 100 ml NZCYM y crecer hasta  $DO_{600}=1.0$ . Las células así preparadas se pueden usar hasta pasadas dos semanas si se guardan a 4 °C.
2. Transfectar 0.5 ml de células con  $5 \times 10^4$ - $10^5$  fagos e incubar a 37 °C durante 30 min. Transferir a un matraz de 250 ml con 37 ml de NZCYM. Incubar on a 37 °C. La lisis debe ser evidente.
3. Pasar el medio de cultivo a un tubo con 100 µl de cloroformo y mezclar bien. Añadir 370 µl de solución de nucleasa e incubar a 37°C, 30 min. Añadir 2.1 g de NaCl y disolver. Centrifugar 20 min a 7000 xg .
4. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y añadir poco a poco 3.7 g de PEG (6-8K) y disolver lentamente. Incubar en hielo 60 min.
5. Precipitar los fagos centrifugando a 7000 xg, 20 min a 4 °C. Resuspender suavemente el precipitado en 0.5 ml de SM conteniendo 50 µg/ml de RNasa A. Transferir a un tubo eppendorf e incubar a 37 °C, 10 min. Añadir 0.5 ml de cloroformo y mezclar. Centrifugar 5 min en la microcentrífuga.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo que contenga 35 µl de solución de proteinasa K e incubar a 65 °C, 30 min.
7. Extraer con fenol y después dos veces con cloroformo:isoamílico (24:1). Transferir el sobrenadante final a un tubo conteniendo 170 µl de acetato amónico 6 M. Añadir 0.7 ml de isopropanol e incubar 20 min a -80 °C. Centrifugar en la microcentrífuga a 14000 rpm 10 min Lavar con EtOH 70%, secar y resuspender en 200 µl de TE.

**Solución de nucleasa:** (para 10 ml), 5 ml glicerol, 100 µl acetato sódico, 50 mg DNasaI, 50 mg RNasa A y llevar hasta 10 ml con H<sub>2</sub>O.

### 2.3.3. Obtención de ADN de fagos purificados en gradiente de CICs

Los bacteriófagos concentrados por uno u otro método se centrifugan en gradiente continuo de CICs en un rotor vertical. El ADN obtenido mediante este método es de una calidad excelente, digiriéndose de forma óptima.

1. Añadir 0.75 g de CsCl por ml de solución de fagos y mezclar suavemente.
2. Pasar a tubo de ultracentrífuga y rellenar con solución TM a la que se ha adicionado la misma cantidad de CsCl.
3. Centrifugar en rotor vertical a 60000 rpm, 6 h a 15 °C.
4. Colocar el tubo en un soporte. Los fagos forman una banda opaca. Para la obtención de la banda pinchar primero la parte superior del tubo con una aguja y pinchar y succionar la banda con jeringa. Los fagos se guardan a 4 °C hasta su uso.

5. Añadir a 150 µl de fagos 1 vol de formamida e incubar a ta 30 min.
6. Diluir la mezcla con 150 µl de agua y precipitar añadiendo 900 µl de etanol.
7. Centrifugar a 10000 rpm. 10 min 4 °C.
8. Lavar el precipitado con etanol al 70%, secar levemente y resuspender en TE.

**Solución TM:** 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgSO<sub>4</sub>.

#### 2.4. Aislamiento de ADN total de plantas

Se siguió, con algunas modificaciones, el método descrito por Rogers y Bendich (1985), basado en el uso del detergente CTAB (cetil trietil amonio bromuro). En condiciones de alta sal, los ácidos nucleicos forman complejos solubles y estables con el CTAB; sin embargo, al bajar la concentración de sales (por debajo de 0.4 M NaCl), los ácidos nucleicos precipitan dejando la mayoría de los polisacáridos en solución. Posteriormente, el CTAB es fácilmente eliminado dada su solubilidad en etanol. El protocolo que se detalla está optimizado para la obtención de minipreparaciones de ADN genómico de plantas.

1. El material recolectado se congela inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se guarda a -80°C hasta su uso.
2. El material se tritura bajo N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. Ayuda mucho martillar la muestra previamente para fraccionarla . Partir de medio eppendorf de material.
3. Añadir 1 vol de tampón de extracción (1 µl/mg de material vegetal) y mezclar.
4. Incubar a 65 °C durante 15 min y centrifugar a 13000 rpm durante 10 min en la microcentrífuga a ta (todas las centrifugaciones se realizan en las mismas condiciones).
5. El sobrenadante se extrae 2 x con 1 vol de cloroformo:isoamílico (24:1).
6. Homogenizar con un vol de tampón de precipitación. Incubar al menos 30 min a temperatura ambiente; mientras, tiene lugar la precipitación del ADN genómico.
7. Los ácidos nucleicos se centrifugan y se resuspenden en 500 µl de CsCl 1 M, conteniendo 10 µg de RNasa A.
8. Precipitar con 1 ml de etanol absoluto durante 30 min a ta y centrifugar. El precipitado se lava con etanol al 70% y se resuspende en 50-200 µl de agua ó 0.1xTE. Guardar a -20 °C.

**Tampón de extracción:** 2% CTAB (p/v), 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% PVP (p/v): pH 8.

**Tampón de precipitación:** 1% CTAB (p/v), 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% 2-β-Mercaptoetanol: pH 8.

**0.1 x TE:** 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA: pH 8.

### 3. MANIPULACION DE ADN

#### 3.1. Cuantificación del ADN

La concentración del ADN en soluciones se estima tras la medida de la absorbancia de la muestra a 260 nm, asumiendo que  $1 \text{ DO}_{260} = 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ADN. Han de utilizarse para ello cubetas de cuarzo.

Para la realización de medidas más exactas se han utilizado métodos fluorimétricos. El fluorocromo comercial *Hoescht* 33258 se une al ADN, incrementándose la fluorescencia y cambiando la longitud de emisión y de excitación en este estado. La emisión se detecta en fluorímetro (TKO100 Minifluorimeter, Hoefler). Para la cuantificación de la muestra, se compara con el patrón obtenido al medir ADN comercial de timo de ternera.

#### 3.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN se ha llevado a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE, conteniendo  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  de bromuro de etidio, utilizándose este mismo tampón como electrolito. La concentración de agarosa usada varía entre 0.5-2%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. A las muestras se les añade un 1/10 del vol de tampón de carga x10. Como marcadores de peso molecular se ha utilizado ADN del bacteriófago lambda digerido con PstI, HindIII o HaeIII y del plásmido pSK digerido con Sau3A.

**Tampón TAE:** 40 mM Tris-acetato, pH 8, 2 mM EDTA, 5 mM acetato sódico.

**Tampón de carga x 10:** 25% ficoll, 0.25% azul de bromofenol, 10 mM EDTA.

#### 3.3. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Tras separar los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, se recortaron del mismo y se aislaron siguiendo el método de GeneClean®. Este método se basa en la solubilización de la agarosa en presencia de NaI 6M y la unión del ADN a una matriz de perlas de vidrio.

#### 3.4. Tratamientos enzimáticos del ADN

##### 3.4.1. Restricción

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas por las casas comerciales *Boehringer Mannheim* y *Pharmacia*. Las reacciones se realizaron siguiendo las condiciones recomendadas por los fabricantes. Las reacciones se llevan a cabo habitualmente en un volumen de 20-40  $\mu\text{l}$  con 1-5 U/ $\mu\text{g}$  ADN durante 1-4 h.

Para manipulaciones posteriores de los productos de digestión, la mezcla se fenoliza y el ADN se precipita de la fase acuosa por adición de acetato sódico hasta 0.3 M y 2.5 vol de etanol e incubación a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 min. Tras centrifugar durante 15 min en

microcentrífuga, el sedimento se lava con etanol al 70%, se seca levemente y se resuspende en TE.

En el caso de digestiones dobles, si no existía un tampón compatible para ambas enzimas, se realizó primero una de las restricciones, se precipitó y se realizó a continuación la segunda restricción. Otra opción consistió en realizar primero la digestión con la enzima que requería menor concentración de sales y una vez concluida, se ajustó la concentración salina para el tratamiento con la segunda enzima.

### **3.4.2. Desfosforilación**

Este método se ha utilizado para la eliminación de los grupos fosfatos de los extremos 5' de los plásmidos utilizados como vectores de clonación, con el objetivo de evitar su religamiento.

Una vez digerido el vector con la enzima de restricción apropiada, se inactivó la enzima calentando 15 min a 70 °C. La mezcla de reacción se lleva a un volumen mayor y se ajusta a pH 8.5 por adición de 0.1 vol de tampón x 10 de fosfatasa alcalina. A continuación, se añade 1-2 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera y se incuba a 37 °C durante 30-60 min. Tras la reacción, el plásmido se purificó por gel de agarosa.

**Tampón de fosfatasa alcalina 10 x:** 0.5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.5.

### **3.4.3. Generación de extremos romos**

#### **3.4.3.1. Relleno de extremos 5' prominentes.**

Los fragmentos previamente digeridos se tratan con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E.coli*. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl que contenían ADN (en TE), 2 µl de tampón de reacción, 2 µl de una mezcla de los cuatro deoxinucleótidos a una concentración de 0.5 mM cada uno y 1-2 U de enzima. La mezcla se incubó 15 min a 30 °C. Posteriormente, se inactivó la enzima calentando 10 min a 70 °C y el ADN se purificó por gel de agarosa.

**Tampón de reacción:** 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA.

#### **3.4.3.2. Relleno de extremos 3' prominentes**

Los fragmentos digeridos y purificados se tratan con la enzima T<sub>4</sub> ADN polimerasa. En un volumen final de 20 µl conteniendo ADN (en TE), 6 µl de una mezcla de los cuatro deoxinucleótidos a una concentración de 0.5 mM cada uno y 1 U de enzima. La incubación tuvo lugar a 30 °C durante 15 min.

**Tampón de T4 ADN polimerasa:** 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM 2-B-mercaptoetanol, 0.1 mM EDTA; pH 7.5.

#### 3.4.4. Ligación

La ligación de un fragmento de ADN al vector correspondiente se realizó mezclándolos (en una relación molar aproximada 2:1) en presencia de la ADN ligasa de T4 en el tampón suministrado por el fabricante (*Boehringer Mannheim*). Si los extremos a ligar eran cohesivos, la incubación se realizaba a 15 °C on; si eran romos se realizaba durante 1 hora a ta y a 15 °C on.

En el caso en el que el fragmento a ligar procediera de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, la ligación se realizó directamente.

#### 3.4.5. Obtención de fragmentos delecionados de ADN

En este trabajo se han realizado deleciones de fragmentos del gen Tsw12 clonados en el plásmido pSK con tres finalidades distintas: para la obtención de fragmentos delecionados y solapantes para la secuenciación del clon genómico, de versiones delecionadas del promotor Tsw12 para la detección de regiones en *cis*, y finalmente, para la realización de la construcción transcripcional del promotor Tsw12 y el gen informador Gus.

Las deleciones se han realizado mediante el kit de *Pharmacia*. Básicamente, el proceso se basa en la capacidad de la exonucleasa III (ExoIII) de *E.coli* de digerir 5' mononucleótidos del extremo 3'-OH de ADN de cadena doble. El plásmido que contiene el fragmento de ADN a deleccionar se lineariza primero con una enzima que deje extremos 3' prominentes, (no reconocidos por la ExoIII). A continuación se corta con una enzima que deje extremos 5' prominentes, siendo la cadena 3'-OH el sustrato inicial de la ExoIII. Es sumamente importante que la digestión con la primera enzima sea total para proteger la integridad del plásmido. La velocidad de actuación de la ExoIII se puede modular modificando los parámetros de temperatura y concentración de NaCl durante la incubación (condiciones especificadas en el kit).

#### 3.4.6. Marcaje radiactivo de sondas de ADN

Se marcaron 50-100 ng de sonda utilizando los kits de *Boehringer* y *Pharmacia* siguiendo las instrucciones del fabricante. Este procedimiento se basa en el alineamiento de la sonda desnaturalizada con cebadores aleatorios (*random primer*); éstos actúan como iniciadores de la síntesis de la cadena complementaria llevada a cabo por el fragmento Klenow en presencia de dATP, dTTP, dGTP y 30-50 µCi de α<sup>32</sup>-dCTP. Los nucleótidos libres, no incorporados se separan en columnas de Sephadex G-50.

## 4. TRANSFORMACION DE *ESCHERICHIA COLI*

#### 4.1. Preparación de *E.coli* competente

Se siguió el método descrito por Hanahan (1983).

1. Se inocula una colonia de la estirpe apropiada refrescada previamente en 5 ml de medio Y y se crece a 37 °C con agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.3.
2. Con este precultivo se inoculan 100 ml de medio Y, precalentado a 37 °C y se incuba con agitación vigorosa (300 rpm) hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.5.
3. El cultivo se enfría en hielo y las células se recogen por centrifugación (2500 rpm, 10 min, 4 °C).
4. El sedimento se resuspende en 30 ml de solución TFB1 fría y se centrifuga en las mismas condiciones.
5. Finalmente, las células se resuspenden en solución TFB2 fría, se distribuyen en alícuotas de 100-200 µl y se congelan inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se almacenan a -80 °C hasta su uso.

**Solución TFB1:** 100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM acetato potásico, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol. Ajustar a pH 5.8 con acético 0.2 M. Esterilizar por filtración y conservar a 4 °C.

**Solución TFB2:** 10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol. Se esteriliza por filtración y se conserva a 4°C.

**Medio Y:** 2% bactotripton, 0.5% extracto de levadura, 0.4% MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl. Se ajusta el pH a 7.6 con KOH

#### 4.2. Transformación

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook et al., 1989.

1. Las células competentes se descongelan en hielo. El ADN se mezcla con suavidad, (< 100 ng) en un vol < 20 µl y se incuban en hielo durante 20 min.
2. Incubar a 42 °C durante 90 s. ó a 37 °C 5 min y pasar a hielo inmediatamente. Incubar en hielo 15 min.
3. Añadir 800 µl de medio LB e incubar 30-60 min a 37 °C con agitación.
4. Finalmente, extender una alícuota en cajas Petri con el medio de selección apropiado.

Para seleccionar por  $\alpha$ -complementación, se preparan las cajas de LB suplementadas con X-gal e IPTG (Sambrook et al., 1989). Este método permite seleccionar los transformantes positivos (blancos) con respecto a los que no han integrado el fragmento (azules), ya que el sitio de clonación múltiple de los plásmidos pSk y pUC se encuentra dentro de la zona codificante de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*).



**Stock X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside):** 20 mg/ml en dimetilformamida. Guardar a -20 °C resguardado de la luz. Añadir 800  $\mu$ l/500 ml de medio.

**Stock IPTG (isopropylthio- $\beta$ D-galactoside):** 120 mg/ml en agua. Guardar a -20 °C. Añadir 300  $\mu$ l/500 ml de medio.

## 5. ANALISIS SOUTHERN

Mediante esta técnica (descrita por Southern, 1975) se pueden detectar fragmentos específicos de ADN separados por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos resueltos se desnaturalizan *in situ* en el gel y se transfieren a una membrana de nylon o nitrocelulosa por capilaridad y se fijan posteriormente. En este trabajo se han utilizado mayoritariamente membranas de nylon. Posteriormente, el filtro se prehibrida y se hibrida con la sonda específica marcada radiactivamente. Este procedimiento se ha utilizado para el análisis del fago Tsw12-1, para la comprobación de los subclonajes de determinados fragmentos en plásmidos y para la detección del número de copias de transgenes integradas en plantas de tabaco.

### 5.1. Digestión de ADN genómico y electroforesis

Se digieren 15  $\mu$ g de ADN genómico de plantas con la enzima correspondiente (1 U/ $\mu$ g de ADN total) durante tres horas. Se repite la carga de enzima 1 ó dos veces incubándose durante el mismo período de tiempo.

A continuación, los fragmentos originados se separan por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% + BrEt, durante toda la noche a bajo voltaje (1V/cm). Conviene, una vez cargadas las muestras aplicar 100 V para evitar que el ADN de alto peso molecular se quede retenido en los pocillos.

Una vez finalizada la electroforesis, el ADN del gel se visualiza con luz UV y se marca la posición de los marcadores de peso molecular pinchando el gel con una aguja impregnada en tinta china.

El gel, a continuación, se baña en las siguientes soluciones:

HCl 25 mM (hidroliza fragmentos de alto peso molecular)

Southern I (solución desnaturalizante)

Southern II (solución neutralizante)

SSC x 20 (tampón de transferencia)

Todos los tratamientos se llevan a cabo a temperatura ambiente y durante 15 min.

#### Southern I

0.5 M NaOH

1.5 M NaCl

#### Southern II

1 M Tris-HCl pH 7.5

1.5 M NaCl

#### SSC x 20

3 M NaCl

0.3 M Na<sub>3</sub>Citrato·2H<sub>2</sub>O

ajustar a pH 7 con HCl 1M

### 5.2. Transferencia del ADN a membrana

Para la transferencia del ADN a membrana, el gel se coloca sobre un puente de papel de filtro *Whatman* 3MM, cuyos extremos están en contacto con el tampón de transferencia, SSC x 20. Sobre el gel se coloca una membrana de nylon, tres papeles *Whatman* 3MM (todo del tamaño del gel) y sobre éstos una pila de papel absorbente. Sobre el conjunto, se coloca un vidrio y sobre éste un peso. La transferencia capilar se lleva a cabo durante la noche (o al menos 6-8 horas). Tras la transferencia, el filtro se seca a ta durante 30 min.

El ADN se fijó al filtro covalentemente por iluminación con luz ultravioleta en un *cross-linker UVP CL-1000*, según las indicaciones del fabricante.

### 5.3. Hibridación ADN/ADN

Los sitios de unión inespecífica presentes en la membrana se bloquean en primer lugar, incubando la membrana en solución de hibridación, durante al menos 30 min a 42 °C. A continuación, se añade el fragmento de ADN marcado radiactivamente previamente desnaturalizado y se incuba a la misma temperatura durante 12-18 horas en un horno de hibridación *Hybaid™ micro-4*. Tras la hibridación, se retira la sonda y se lava la membrana con las soluciones de lavado a 65 °C. La membrana hibridada se expuso a películas *Agfa Curix* con pantallas intensificadoras a -80°C.

Las hibridaciones llevadas a cabo en este trabajo se han realizado a alta estringencia.

**Nota:** Para la desnaturalización de la sonda, ésta se hierve durante 10 min y se incuba inmediatamente en hielo durante 5 min.

**Solución de hibridación:** SSPE x 5, 0.2% Ficoll 400, 0.2% polivinilpirrolidona 350, 0.1% SDS, 50% formamida.

**Solución de lavado 1:** 2 x SSPE, 1% SDS

**Solución de lavado 2:** 0.2 x SSPE, 1% SDS

SSPE x 20; 175 g NaCl, 27.6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 7.4 g EDTA; pH7.4 (para 1L).

## 6. ANALISIS NORTHERN

### 6.1. Obtención de ARN total de plantas

El ARN total se obtuvo según el protocolo descrito por Wadsworth et al., (1988), con algunas modificaciones aportadas por nuestro laboratorio. Este protocolo ha sido útil para la obtención de ARN tanto a pequeña como a gran escala. Las condiciones que se detallan en el protocolo descrito están optimizadas para minipreparaciones de ARN.

1. Recoger las muestras vegetales de la cámara de cultivo, envolverlas en una capa doble de papel de aluminio y congelarlas inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido. Las muestras se guardan a -80 °C hasta su uso.
2. Triturar la muestra. Ayuda mucho martillear previamente la muestra, sobre todo si se trata de muestras de tallo. Si se va a obtener ARN de grandes cantidades de tejido, resulta más práctico pasar la muestra por un molinillo. La muestra se acaba de triturar en mortero, hasta obtener un polvo fino. Es importante que la muestra no se descongele, por tanto, hay que añadir N<sub>2</sub> líquido de vez en cuando. Partir de 3/4 eppendorf de material por muestra.
3. Homogeneizar con 1 vol de tampón de extracción en un homogenizador.
4. Pasar a tubo eppendorf de 2 ml y centrifugar a 4 °C, 14000 rpm, 10 min.
5. Pasar 1 ml del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 2 ml y añadir 1 vol de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Mezclar vigorosamente.
6. Centrifugar a 14000 rpm, 4 °C, 10 min. Recoger el sobrenadante.
7. Repetir la fenolización dos veces más.
8. Añadir 1 vol de cloroformo, mezclar vigorosamente y centrifugar en las condiciones descritas.
9. Recoger el sobrenadante cuidadosamente y pasarlo a un nuevo tubo. Añadir 1 vol de LiCl 6M.
10. Dejar precipitando a 4 °C, al menos 1 h.
11. Centrifugar a 14000 rpm, 4 °C durante 20 min.
12. Resuspender el precipitado en 1 vol de LiCl 3M y centrifugar igual que en la etapa 11.
13. Resuspender el precipitado en 400 µl de AcNa 0.3 M pH 5.8, calentando a 55 °C , 10 min.
14. Precipitar directamente añadiendo 1 vol de etanol absoluto frío. Incubar a -80°C, 15 min.
15. Centrifugar 15 min a 14000 rpm, 4 °C en microcentrífuga.
16. Desechar el sobrenadante y dar un pulso en la microcentrífuga para eliminar los restos de etanol. Secar ligeramente.
17. Resuspender en 40 µl de agua milliQ autoclavada.
18. Cuantificar la concentración de ARN en el espectrofotómetro, asumiendo que 1 DO<sub>260</sub> =40 µg/ml ARN. Visualizar una alícuota (2 µl) en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.
18. Guardar el ARN a -80°C.

**Tampón de extracción**  
25 mM NaCitrato, pH 7.0

4 M isotiocianato de guanidinio  
 1.5% (p/v) Na-lauril-sarcosina  
 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol (7  $\mu$ l/ml de solución comercial 14M antes de usar)  
 Esterilizar por filtración y guardar a 4 °C.

**Nota:** Todas las soluciones (excepto el tampón de extracción) se trataron con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1%, y posteriormente se autoclavaron. Es necesario el uso de guantes y material estéril durante todo el proceso.

## 6.2. Electroforesis desnaturalizante de ARN y transferencia a filtro

El ARN total de plantas se analizó en geles de agarosa en presencia de formaldehído.

1. Las muestras de ARN se preparan de la siguiente forma:

4.5  $\mu$ l ARN  
 2  $\mu$ l de tampón Northern x 10  
 3.5  $\mu$ l de formaldehído  
 10  $\mu$ l de formamida

2. Calentar a 65 °C, 15 min.

3. Añadir 3  $\mu$ l de tampón de carga.

### Tampón Northern x 10 (1 L)

MOPS 41.86 g  
 AcNa 6.8 g  
 EDTA 0.5 M 2ml  
 Ajustar a pH 7 con NaOH

### Tampón de carga x 10

glicerol 50%  
 EDTA (pH 8) 1 mM  
 azul de bromofenol 0.25%

Los geles de agarosa (1.2%) se prepararon según la siguiente receta (para 100 ml);

Agarosa 1.2 g  
 Agua 70.2 ml

Fundir en microondas y enfriar hasta 65 °C; añadir a continuación,

Northern x 10 10 ml  
 Formaldehído 19.8 ml

Se deja gelificar en la campana de extracción y se lleva a cabo la electroforesis a 90 V.

Tras la electroforesis, se lava el gel en agua destilada (10 min) para eliminar parte del formaldehído. El gel se transfiere por capilaridad a un filtro de nylon usando como tampón de transferencia SSC x20. Tras la transferencia, (al menos 8 horas) el filtro se marca, se seca y a continuación se fija con luz ultravioleta. Se utilizó un *cross-linker UVP CL-100*, según las instrucciones del fabricante.

El ARN transferido a la membrana de nylon y fijado puede ser visualizado por tinción reversible. Esto permite verificar la calidad de la transferencia y comparar la cantidad de

ARN existente en cada carril. La membrana se incuba en una solución de azul de metileno al 0.02% en acetato sódico 0.3 M (pH 5.5) hasta que las bandas de ARN ribosómico se hacen visibles (menos de 3 minutos). El exceso de tinción se lava con agua destilada hasta que las bandas se dibujan nítidamente sobre un fondo claro. La tinción se retira lavando la membrana con SSPE x 0.2, 1% SDS durante 15 min a temperatura ambiente.

La hibridación de la membrana se realiza en las mismas condiciones descritas en el apartado 5.3.

## 7. AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN POR PCR

### 7.1. PCR a partir de bacterias

Este método es muy útil y rápido, pues permite analizar gran cantidad de colonias sin necesidad de tener que crecer las bacterias en medio líquido, ni purificar el plásmido ni digerirlo. Para la detección de la presencia de un inserto subclonado, se utilizaban los oligonucleótidos M13 que flanquean el sitio de clonación múltiple del plásmido pSK. Para la detección del tamaño de los fragmentos del promotor delecionados de la construcción transcripcional, se utilizó el oligonucleótido M13 (inverso) y el oligonucleótido que comprende las secuencias XXXXXXXXXXXX. A continuación se detalla el protocolo básico para la detección de fragmentos subclonados en pSK.

1. En un tubo eppendorf de 500  $\mu$ l, mezclar:

1  $\mu$ l (0.1  $\mu$ M) de oligo M13 directo (*Promega*)

1  $\mu$ l (0.1  $\mu$ M) de oligo M13 inverso (*Promega*)

1  $\mu$ l de tampón PCR x10

5  $\mu$ l de agua destilada

Inocular con un palillo estéril una mínima cantidad de biomasa de la colonia a analizar. Realizar una réplica en una caja de LB + antibiótico y numerar las colonias igual que los tubos.

2. Calentar a 95 °C durante 15 min.

3. Añadir a los tubos:

1  $\mu$ l dNTPs 2 mM

1  $\mu$ l Taq polimerasa (1 U/ $\mu$ l, Pharmacia)

45  $\mu$ l aceite mineral (Sigma)

4. Utilizar las siguientes condiciones de amplificación;

95 °C, 30 s (desnaturalización)

57 °C, 1 min (apareamiento)

72 °C, 1 min (polimerización)

Repetir 25 ciclos

72 °C, 5 min

Mantener a 4 °C hasta su análisis.

5. Añadir 15 µl de TAE x1 con tampón de carga, dar un pulso en microcentrifuga, recoger la fase acuosa y cargarla en un gel de agarosa al porcentaje adecuado.

**Tampón PCR x10:** 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% gelatina.

## 8. HIBRIDACION DE COLONIAS

El método de Grunstein & Hogness (Sambrook et al., 1989) se ha revelado especialmente útil en el análisis de los transformantes de suclonajes "realcitrantes". Permite analizar múltiples colonias por hibridación con la sonda correspondiente *in situ*.

1. Colocar los filtros de nitrocelulosa sobre cajas con LB. Marcar los filtros (pinchando con una aguja y rotulando en ese punto la caja). Numerar filtros y cajas.
2. Inocular ordenadamente las colonias sobre el filtro y hacer una réplica equivalente sobre una caja sin filtro. Incubar boca abajo a 37 °C on.
3. Los filtros se incuban (con las colonias hacia arriba) sobre papel 3MM empapados con las siguientes soluciones:

SDS 10%	10 min
Southern I	5 min
Southern II	5 min
SSC x2	5 min

3. Secar el filtro a ta.
4. Fijar el filtro a 80 °C, con vacío 1 h ó con UV (según el tipo de membrana).

El marcaje de la sonda, hibridación y lavados se llevó a cabo según se ha descrito en los apartados 3.4.6., y 5.3.

## 9. HIBRIDACION *IN SITU*

### 9.1. Marcaje de ARN

Las hibridaciones *in situ* se realizan con sondas de ARN o ribosondas, las cuales se generan por transcripción *in vitro* a partir de ragmentos de ADN clonados en vectores adecuados. Los transcritos pueden marcarse con digoxigenina-dUTP o radiactivamente (con S<sup>35</sup> o con P<sup>33</sup>), según Langdale (1993). En este caso se ha utilizado el método no radiactivo.

### 9.1.1. Preparación de los fragmentos a marcar

Las sondas específicas a marcar deben estar clonadas en vectores que contengan los promotores T7 y T3 de la ARN polimerasa. La sonda tsw12 estaba clonada en el sitio EcoRI del plásmido pSK+, que contiene ambos promotores a ambos lados del sitio de clonación múltiple. El plásmido se linearizó con las enzimas adecuadas para la síntesis de los transcritos sentido y antisentido, utilizándose los primeros como control, mientras que los segundos se utilizaron como las sondas informativas en la hibridación *in situ*. Tras la digestión del plásmido, se realizaron dos extracciones con fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1). A continuación, se precipitó el ADN añadiendo NaCl hasta una concentración de 0.2 M y 2.5 vol de etanol. Tras la centrifugación, el ADN se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H<sub>2</sub>O libre de RNasas a una concentración aproximada de 1 µg/µl. Es importante comprobar la total linearización del plásmido para evitar transcripciones anómalas.

### 9.1.2. Marcaje con digoxigenina

Se utilizó UTP marcado con digoxigenina (3.5 mmol/L). Se procedió según las recomendaciones de la casa comercial (RNA colour kit for *in situ* hybridization, Amersham).

#### 1. Realizar la siguiente mezcla de reacción:

- 1 µg de ADN linearizado
- 2 µl de DIG NTP labelling mixture x10
- 2 µl de transcription buffer x10
- 2 µl de T3 ó T7 polimerasa
- 1 µl de inhibidor de RNasa (*Rnasin*, *Promega*)
- llevar hasta 20 µl con agua libre de RNasas

#### 2. Incubar 2 h a 37 °C.

#### 3. Añadir:

- 2 µl de inhibidor de RNasas
- 5 µl de tampón DNasa x10
- 23 µl de H<sub>2</sub>O

#### 4. Incubar 15 min a 37 °C.

#### 5. Añadir

- 25 µl de NH<sub>4</sub>OAc 7.5 M
- 1 µl de tRNA a 50 mg/ml
- 188 µl de etanol absoluto

#### 6. Precipitar durante 10 min en hielo y centrifugar 10 min en microcentrífuga.

#### 7. Resuspender en 50 µl de 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 10.2), 10 mM de DTT.

#### 8. Incubar a 60 °C para hidrolizar el ARN. Es conveniente obtener un tamaño de

fragmentos en torno a unas 150 pares de bases.

9. Añadir 1/10 del volumen de ácido acético al 5% (v/v).

10. Precipitar añadiendo 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M (pH 4.5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.

11. Resuspender en 200  $\mu$ l de 50% de formamida desionizada, 10 mM de DTT. Guardar hasta su uso a -70 °C.

Para controlar la síntesis, cargar 1  $\mu$ l de la reacción en un gel de agarosa al 2%, libre de ARNasas.

## 9.2. Preparación de secciones de tejidos.

### 9.2.1. Preparación de porta-objetos tratados con poli-D-lisina

Este tratamiento es necesario para asegurar la fijación de las secciones de parafina durante los tratamientos. Es conveniente utilizar porta-objetos nuevos, de lo contrario, deben sumergirse una noche en una solución de lavado con ácido crómico, lavar en agua abundante durante 2 h, aclarar cada porta individualmente y secarlos durante una noche al horno a 80 °C.

1. Preparar la solución de poly-D-lisina: 50  $\mu$ g/ml de *poly-D-lysine hydrobromide* en 10 mM de Tris-HCl (pH 8.0). Esta solución puede reutilizarse hasta 10-15 veces.
2. Colocar los portas en rejillas metálicas y sumergirlos en la solución de poly-D-lisina durante 30 min a temperatura ambiente.
3. Secarlos envueltos en papel, en lugar libre de polvo. Una vez secos, los portas pueden guardarse durante varios meses, envueltos en papel.

### 9.2.2. Fijación de tejidos vegetales e inclusión en parafina

Las plántulas de tomate se tiñeron previamente con *Fast Green*, para lo cuál se añaden 10  $\mu$ l de solución al 5% de *Fast Green* preparada en etanol 90% en cualquiera de los pasos de fijación con etanol.

1. Cortar con bisturí secciones de 2-3 mm de tejido de plantas frescas.
2. Fijar en 3:1 etanol/acético durante 30 min a temperatura ambiente, en un vial de varios ml de vol.
3. Eliminar el fijador y añadir 2 ml de etanol al 70 %. En este paso, las secciones pueden guardarse indefinidamente a 4 °C.
4. Transferir las secciones en las siguientes soluciones de etanol/tert-butil-alcohol, descartando la solución y añadiendo la siguiente en el mismo vial. (El TBA es tóxico por contacto e inhalación y debe ser manipulado con precaución).

30 min en 80% EtOH



30 min en 90% EtOH  
2x30 min en 100% EtOH  
30 min en 25% TBA  
2x30 min en 100% TBA

5. Transferir las secciones a un recipiente (caja Petri) con parafina (*Paraplast plus*) e incubarlas a 60 °C on. Repetir el proceso.
6. Transferir las secciones al recipiente definitivo. Incubar durante 2 h a 60 °C.
7. Solidificar el molde. Conviene distribuir previamente las secciones de forma adecuada utilizando una espátula calentada y atemperada a 60 °C en un recipiente de parafina fundida. Posteriormente se sumerge el molde en agua fría y se deja secar al aire. Las secciones de tejidos solidificadas pueden conservarse indefinidamente a 4 °C.

### 9.3. Seccionamiento de los tejidos

Se retira el molde de plástico y se recorta el bloque de parafina alrededor de los tejidos de forma que la cara a seccionar sea plana. Conviene utilizar para ello un bisturí caliente. También se puede recortar el tejido en un pequeño cubo que puede fijarse sobre un soporte u otro cubo mayor de parafina fundiendo para ello la parafina con un bisturí precalentado. Antes de proceder al corte, es absolutamente necesario que la parafina se haya solidificado. Se pueden dejar los bloques unos min a 4 °C.

1. Montar el bloque en el microtomo. Es importante asegurarse de que el bloque y la cuchilla están firmemente sujetos.
2. Cortar secciones de 7-8  $\mu\text{m}$ . Recoger las secciones sobre un soporte limpio con ayuda de un palillo humedecido.
3. Colocar los porta-objetos tratados con poli-D-lisina sobre una placa calefactora a 42 °C. Cubrirlos con un poco de agua desgasificada.
4. Colocar sobre el agua tiras de 4-5 secciones con la cara mate hacia arriba. Dejar expandirse las secciones de parafina durante unos 10 min.
5. Eliminar el agua con ayuda de papel de celulosa y dejar secar las secciones sobre los portas, un mínimo de 8 h a 42 °C.

Las secciones fijadas sobre los porta-objetos deben guardarse en desecador a 4 °C y pueden mantenerse así durante varias semanas, pero con el tiempo, tienden a desprenderse de los portas en las sucesivas manipulaciones.

### 9.4. Pretratamiento de las secciones

Los tratamientos previos tienen como objeto preparar los tejidos para hacer los ARNm accesibles a la ribosonda. Los portas con las secciones se colocan en gradillas (con capacidad para 25-30 portas). En cada uno de los pasos, se sumergen dos gradillas en cajas de plástico

con 750-800 ml de cada solución. Todos los pasos se realizan a temperatura ambiente, excepto la desproteínización con proteinasa K, que se realiza a 37 °C.

1. Eliminar la parafina incubando 2 x 10 min en xilol.
2. Rehidratar sucesivamente en series de etanol; 2 x 100%, 90%, 70%, 50%, 30%, 2x H<sub>2</sub>O, 2 minutos cada una de ellas.
3. Incubar en 0.2 M HCl durante 20 min para desnaturalizar el ARN.
4. Lavar 5 minutos en H<sub>2</sub>O y posteriormente incubar 10 min en 2 x SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M citrato sódico pH 7.6) para neutralizar.
5. Lavar 5 min en H<sub>2</sub>O.
6. Incubar en proteinasa K (1µg/µl en 100 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM EDTA). El tiempo de digestión con proteinasa K debe ser optimizado para cada tipo de muestra para obtener una buena hibridación sin perder la morfología de los tejidos.
7. Lavar brevemente en PBS (10 mM Fosfato sódico pH 7.5, 150 mM NaCl), y bloquear la proteasa incubando en una solución de glicina 2 mg/ml en PBS durante 2 min.
8. Lavar en PBS 2 x 30 s.
9. Fijar incubando en 4% (p/v) paraformaldehído en PBS durante 20 min en una campana de gases (30 g de paraformaldehído/750 ml PBS; disolver calentando).
10. Lavar 2 x 30 s en PBS.
11. Incubar 10 min en una solución de trietanolamina (13 ml de trietanolamina y 4 ml de HCl concentrado en un litro de H<sub>2</sub>O; añadir 1 ml de ácido acético glacial antes de introducir las gradillas).
12. Lavar 2 x 30 s en PBS y deshidratar en series de etanol.
13. Dejar secar al aire en un lugar preservado del polvo.

### 9.5. Hibridación

Las condiciones de hibridación con sondas marcadas con digoxigenina son idénticas a las utilizadas con sondas marcadas con <sup>35</sup>S, sólo que en este último caso, todas las soluciones van suplementadas con 10 mM de DTT.

1. Calentar la sonda a 80 °C durante 30 s.
2. Dar un pulso en la microcentrífuga y diluir 1:4 con SPB.
3. Aplicar la sonda a las secciones (30-50 µl a cada porta-objetos). Cubrir con cubre-objetos tratados con *Sigmacote*.
4. Incubar toda la noche a 50 °C, en una cámara húmeda (dentro de cajas cerradas, sobre una base de papel de celulosa mojada).

5. Retirar los cubre-objetos, sumergiendo los portas en una solución de tampón de lavado a 50 °C, agitando suavemente para que no se despeguen las secciones. Colocar las secciones en una rejilla para portas, sumergida en tampón de lavado a 50 °C.
6. Transferir la rejilla con los portas a tampón de lavado fresco e incubar 4-5 h a 50 °C.
7. Incubar a 37 °C durante 30 min en una solución de ARNasa A 20 µg/µl en NTE (1.5 ml de una solución de ARNasa A a 10 mg/ml, en 750 ml de NTE). La ARNasa digiere solo ARN de cadena simple, respetando los híbridos ARN-ARN, por tanto en este paso se logra disminuir la señal de fondo.
8. Lavar cinco veces en NTE, a 37 °C, durante 1 h en total.
9. Transferir los portas a solución de lavado fresco e incubar 1 h a 50 °C.
10. Transferir a PBS y guardar a 4 °C toda la noche.

#### Soluciones:

##### 10 x sales

NaCl	3 M
Tris HCl (pH 6.8)	10 mM
Fosfato de sodio (pH 6.8)	100 mM
EDTA	50 mM

##### SPB (800 µl)

10 x sales	100 µl
formamida desionizada	400 µl
50 % sulfato de dextrano	200 µl
50 mg/ml tRNA	20 µl
10 mg/ml de ácido poliadenílico	50 µl
H <sub>2</sub> O	30 µl

##### Solución de lavado

1 x sales  
50% formamida

##### NTE

50 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl (pH 8.0)  
1 mM EDTA

##### PBS

10 mM fosfato de sodio (pH 7.5)  
150 mM NaCl

#### 9.6. Detección de los híbridos y análisis de los resultados

Los híbridos marcados con digoxigenina se detectan mediante inmunorreacción con anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (Langdale, 1993). Todos los pasos se realizan a temperatura ambiente, según las recomendaciones de las casas comerciales (*Boehringer, Amersham*).

1. Incubar los portas de 30-60 min en una solución con 1% de agente de bloqueo en PBS x 1 con 0.3 % de Tritón X-100.
2. Transferirlos a BSA/tritón/PBS (0.5% BSA, 0.3% tritón X-100, en PBS), e incubar de 30-60 min.
3. Eliminar el exceso de líquido y secar la parte inferior de los portas. Añadir 100 µl de una dilución 1/2000 del anticuerpo anti-DIG en BSA/Tritón/PBS sobre cada porta y cubrirlos con cubre-objetos tratados con *Sigmacote*. Incubarlos en una cámara húmeda de 1-5 h.

4. Lavar 3 x 10 min en una solución BSA/Tritón/PBS.
5. Incubar 5 min en tampón AP (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>).
6. Escurrir los portas y añadir 100 µl de la solución sustrato a cada uno de ellos. Cubrir con un cubre-objetos e incubar en una cámara húmeda y en oscuridad toda la noche (o hasta detectar el color; a veces es necesario incubar más tiempo, hasta un máximo de tres días).
7. Cuando la señal es claramente visible, deshidratar con soluciones gradualmente más concentradas de etanol hasta llegar a etanol 90%.
8. Contrastar con 0.5% de colorante *Fast Green* FCF, preparado en etanol al 90%, durante 30 s.
9. Lavar en etanol 100%.
10. Sumergir en xilol 2 x 5 min.
11. Montar en *Permount* o *Histovitrex*, sin dejar que los portas se sequen.

**Solución sustrato:** se prepara fresca disolviendo 0.34 mg/ml de NTB y 0.175 mg/ml de BCIP en tampón AP.

Los resultados de la hibridación con sondas marcadas con DIG-UTP se deben observar usando un microscopio de campo claro. Para la realización de las fotografías, es recomendable utilizar películas *Ektachrome* 160.

## 10. CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA DE *L. esculentum*

El ADN genómico de hojas de tomate se extrajo según el protocolo descrito en el apartado 2.4. Para la construcción de la genoteca, se eligió como vector el bacteriófago lambda EMBL3. Los vectores derivados de lambda son genomios lineales de bacteriófagos modificados por ingeniería genética que permiten la sustitución de genes internos no esenciales por fragmentos de 15-20 Kb de ADN foráneo, en este caso ADN de tomate. El ADN total de alto peso molecular obtenido se fraccionó hasta un tamaño adecuado (17-20 Kb) para la inserción en el vector λEMBL 3.

### 10.1. Digestión parcial del ADN genómico

Se llevaron a cabo pruebas preliminares para la optimización de las condiciones de la digestión parcial del ADN total. Cantidades fijas de ADN total (5 µg) se digería con diluciones crecientes de enzima Sau3A, desde 4 U hasta 0.0315 U. Las digestiones se incubaron durante 1 h a 37 °C. Los fragmentos producidos se separaron por tamaño en un gel de agarosa al 0.5%

durante la noche a 20 °C. Las alícuotas digeridas con 0.0625 y 0.0315 U contenían mayoritariamente fragmentos del tamaño requerido.

Por tanto, para la digestión preparativa se escalaron estas condiciones:

500 µg de ADN

4.7 U de Sau3A

540 µl de tampón x 10 Sau3A

llevar hasta 5.4 ml con agua

La mezcla se incubó en un tubo *Corex* a 37 °C durante 1 h, se paró la reacción con EDTA (20 mM) y se precipitó con 2 vol de etanol absoluto y 0.1 vol de AcNa 3M. Tras incubar a -80 °C durante 30 min, se centrifugó a 15000 rpm, 5 min y se lavó con etanol al 70% y se secó el ADN levemente. A continuación el ADN se resuspendió en 500 µl tampón de centrifugación sin adicionarle sacarosa.

### 10.2. Gradiente de sacarosa

Los fragmentos de ADN generados se separaron por centrifugación en gradiente de sacarosa al 10-40%, que se realizó mediante una bomba peristáltica. Una vez formado el gradiente, el ADN se depositó con cuidado sobre la superficie y el tubo se centrifugó a 26000 rpm durante 24 h, a 25 °C en rotor basculante (TST3828, Kontron). La centrifuga se paró sin freno.

Se recogieron fracciones de 500 µl con ayuda de una bomba peristáltica. Para ello, la aguja se introducía con cuidado hasta el fondo del tubo y se aspiraba el contenido accionando el modo reverso y al 75 % de su velocidad máxima. Se obtuvieron un total de 56 fracciones. 10 µl de una de cada tres alícuotas consecutivas se analizaron en gel de agarosa al 0.5%. Como marcador de peso molecular, se utilizó ADN del bacteriófago lambda cortado con HindIII diluido 1:1 en una solución de sacarosa al 12.5%. Se escogieron desde las fracciones 10 hasta 22 (ambas inclusive), se mezclaron y se dializaron frente a 3 l TE durante toda la noche, a 4 °C con agitación suave. A las 12 h se reemplazó el tampón TE. Tras la diálisis, el volumen se redujo con 1-butanol hasta 500 µl, volumen adecuado para precipitar el ADN en tubos eppendorf con 2 vol de etanol y 0.3 M AcNa. El ADN se dejó precipitando toda la noche a ta, y a continuación, se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min. Se resuspendió en 200 µl de TE. El ADN se visualizó en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se estimó la concentración espectrofotométricamente y por comparación con moléculas cuantificadas de ADN en el mismo gel, obteniéndose una concentración de 0.57 µg/µl.

### 10.3. Ligación

En un tubo eppendorf, en hielo, se realizó la siguiente mezcla;

2 µl (1 µg) de brazos EMBL3 cortados con BamHI (Promega)

1  $\mu$ l (0.57  $\mu$ g) de ADN genómico (17-20 Kb) de extremos Sau3A  
0.5  $\mu$ l tampón ligasa x 10  
0.5  $\mu$ l BSA  
1  $\mu$ l ligasa T<sub>4</sub> (1 U)

La mezcla de ligación se mantuvo durante 45 min a ta y se incubó a 15 °C toda la noche.

#### 10.4. Empaquetamiento *in vitro*

Para empaquetar el producto de la ligación anterior, se utilizaron extractos de empaquetamiento comerciales *Giga Pack Plus* y se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante (*Stratagene*). Se utilizaron los 5  $\mu$ l de la ligación. Tras realizar la mezcla con los dos extractos, se incubó durante 2 horas a ta, tras las cuales, se añadió 500  $\mu$ l de SM, 20  $\mu$ l de cloroformo y se guardó a 4 °C.

#### 10.5. Titulación de la genoteca

La genoteca se tituló en la estirpe hospedadora *E. coli* KW251. Se inoculó una colonia refrescada el día anterior en LB suplementado con maltosa 0.2%. Cuando el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub>=1, se centrifugó, y se diluyeron las bacterias en SO<sub>4</sub>Mg 10 mM hasta una D.O<sub>600</sub>=0.5. Se mezclaron 300  $\mu$ l de bacterias con diluciones crecientes de la genoteca, se incubaron durante 15 min a ta y se plaquearon con agar de cobertera sobre cajas de LB suplementado con SO<sub>4</sub>Mg 10 mM, pH 7.2. Las cajas se incubaron toda la noche a 37 °C.

El título de la genoteca fue de aproximadamente 1600 u.f.c. (unidades formadoras de calvas ó fagos viables)/ $\mu$ l.

#### 10.6. Escrutinio de la genoteca

Este procedimiento consistió en la identificación fago que contenía el gen correspondiente al clon de cDNA tsw12 previamente caracterizado.

1. Sembrar 15000 fagos recombinantes por caja (135 mm) e incubar a 37 °C.
2. Transferir a filtros de nitrocelulosa (Schleicher&Schuell) por duplicado. Colocar el filtro sobre el césped bacteriano durante 3 min. Repetir el proceso con el segundo filtro, ampliando el tiempo de incubación a 5 min. Numerar las cajas y los filtros y marcar los filtros perforándolas con una aguja. Rotular la caja por debajo, y marcar los orificios.
3. Tratar los filtros colocandolos sobre papeles *Whatmann* 3 MM empapados en las siguientes soluciones:

Southern I    10 min  
Southern II    10 min

SSPE x2            10 min

Secar al aire 30 min a ta.

4. Fijar 2 h a 80 °C con vacío.

5. La prehibridación, hibridación y lavado se lleva a cabo como se describe en el apartado 5.3 con la única salvedad de que la prehibridación se realiza en un vol grande, para eliminar restos celulares. La sonda tsw12 se marcó radiactivamente (ver apartado 3.4.6.).

6. Tras la exposición y revelado, se aislan como posibles positivos aquellos que presentan señal en ambos filtros.

## 11. SECUENCIACION

El ADN se ha secuenciado siguiendo el método de Sanger (Sanger et al, 1977). La síntesis se iniciaba a partir de un oligonucleótido complementario a una secuencia del M13 en presencia de la ADN polimerasa y de los cuatro nucleótidos, uno de los cuales estaba marcado radiactivamente. Esta reacción se lleva a cabo en cuatro alícuotas por separado, cada una de las cuales contienen una proporción de uno de los cuatro dideoxinucleótidos, que bloquean la síntesis. El análisis en paralelo de las cuatro reacciones en un gel de poliacrilamida determina una serie de interrupciones representadas por bandas en la autorradiografía, que indican la presencia del dideoxinucleótido. En este trabajo, se ha utilizado el kit *Sequenase® Version 2.0* de *USB* y se ha procedido según las indicaciones recomendadas por el fabricante, excepto en la desnaturalización de la muestra, que se detallará a continuación. El ADN a secuenciar, se encontraba subclonado en el vector pSK, utilizándose como iniciadores los oligonucleótidos T3 ó T7 ó bien M13 ó M13 reverso, según la cadena a leer. Los oligonucleótidos se marcaron con ( $\alpha$ -<sup>35</sup>S)dATP (Amersham). Se ha secuenciado ADN de doble cadena.

### 11.1. Desnaturalización de la muestra

1. En un tubo eppendorf, mezclar:

8 µl de ADN (que contenga 1.5-3 µg)

2 µl de NaOH 2 M

2. Agitar suavemente, dar un pulso en microcentrífuga e incubar 10 min a ta.

3. Añadir 3 µl de AcNa 3 M (pH 4.8) y 7 µl de agua destilada.

4. Añadir 60 µl de etanol absoluto, mezclar e incubar a -80 °C durante 15 min.

5. Centrifugar 10 min a velocidad máxima, y lavar el sedimento en etanol al 70%.

Volver a centrifugar. Eliminar los restos de etanol de las paredes mediante un pulso en la microcentrífuga y secar muy brevemente.

6. Resuspender en 7 µl de agua destilada (*milliQ*).

Proceder para la realización de las reacciones de secuenciación según el protocolo detallado en el kit *Sequenase® Version 2.0*.

### 11.2. Geles de secuencia

Los productos de las reacciones se resolvieron en geles de poliacrilamida de secuencia (Urea 1 M, 1 x TBE) de 0.2 y 0.5 mm de grosor. Los pocillos se formaron con peines de dientes de tiburón del mismo grosor (*Pharmacia*). Los geles se prepararon siguiendo la siguiente receta:

	Gel al;	
	4%	6%
Urea	20 g	20 g
TBE x 5	8 ml	8 ml
Acrilamida/bisacrilamida (38%/2%)	4 ml	6 ml
H <sub>2</sub> O	12 ml	10 ml
persulfato amónico 10%	0.2 ml	0.2 ml

Disolver a 45 °C y completar hasta 40 ml con agua. Filtrar con filtro Millipore (0.45 µm) y desgasificar. A continuación, añadir 20 µl de TEMED (*LKB*) inmediatamente antes de llenar las placas y dejar polimerizar 30-40 min. Las placas de vidrio, una vez limpias, se trataban con etanol y acetona y la placa con "orejas" se silanizaba. A continuación, se montaban las placas con los separadores y tras el llenado con la mezcla del gel se colocaba el peine. Tras la corrida del gel, utilizando como tampón de cubeta TBE x 1, el gel se adsorbía a una hoja de papel *Whatman* 3 MM y se fijaba en una mezcla de acético/metanol/agua (10:10:80), (este paso es obvio). Posteriormente, el gel se secaba en un secador de vacío (*Bio-Rad*) durante 1 h a 80 °C y se exponía a películas *Agfa-Curix* durante 12-24 h a ta.

#### TBE x 5

Tris base	54	g/L
Acido bórico	27.5	g/L
EDTA 0.5 M, pH 8.0	20	ml/L

Para controlar la migración de los fragmentos generados en la reacción de secuenciación, se adicionan colorantes que migran a la vez que fragmentos de un tamaño determinado. El tamaño aproximado de estos fragmentos se indica en la tabla siguiente (en nucleótidos);

<u>% acrilamida</u>	<u>azul de bromofenol</u>	<u>xilencianol</u>
4	45	170
6	26	106

## 12. EXTENSION DE CEBADOR (PRIMER EXTENSION)



Se ha seguido básicamente el método descrito por Ausubel et al., (1989) con algunas modificaciones. El objetivo de esta técnica consiste en la localización del inicio de transcripción o la determinación del primer nucleótido del mensajero que se transcribe en determinadas circunstancias.

### 12.1. Marcaje del oligonucleótido

1. En un tubo eppendorf, se llevó a cabo la siguiente reacción;

100 ng oligonucleótido

2.5  $\mu$ l de tampón x 10 de polinucleótido kinasa (PK)

100  $\mu$ Ci de ( $\gamma^{32}$ P)ATP

4 U de T<sub>4</sub> PK

llevar hasta 25  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O

2. Incubar 45 min a 37 °C, 10 min a 68 °C.

3. Parar la reacción calentando a 65 °C durante 5 min.

4. Precipitar el oligo añadiendo primero 25  $\mu$ l de Ac(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 4 M, 1  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> y 250  $\mu$ l de etanol absoluto frío. (El isótopo no incorporado permanece en el sobrenadante).

5. Incubar 30 min a -20 °C.

6. Centrifugar 20 min en microcentrífuga a 14000 rpm a 4 °C.

7. Lavar con etanol al 80% dos veces.

8. Resuspender en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

10. Medir 1  $\mu$ l en contador de centelleo. Se obtuvieron 4 x 10<sup>7</sup> c.p.m. Se diluyó el oligo marcado al 50%.

### 12.2. Hibridación del ARN con el cebador

1. Mezclar en un tubo eppendorf;

50  $\mu$ g de ARN total de plántulas de tomate de 4 días de edad

1  $\mu$ l cebador marcado (alrededor de 1 x 10<sup>6</sup> c.p.m.)

3  $\mu$ l de tampón e hibridación x 5

2. Incubar 10 min a 90 °C.

3. Añadir 0.5  $\mu$ l de inhibidor de ARNasa (*Pharmacia*) y aumentar el volumen hasta 25  $\mu$ l con tampón de hibridación x 1.

4. Incubar durante 4 h a 56 °C.

5. Precipitar añadiendo 2.5  $\mu$ l de NaAc 3M y 75  $\mu$ l de etanol absoluto.

6. Centrifugar 20 min a 14000 rpm.

7. Resuspender en 15.5  $\mu$ l de agua.

### **12.3. Reacción de la transcriptasa reversa**

1. Añadir a la mezcla ARN/cebador resuspendida en 15.5  $\mu$ l de agua (etapa 7):
  - 3  $\mu$ l de dNTPs (10 mM)
  - 6  $\mu$ l de tampón de transcriptasa reversa x 5 (BRL)
  - 5  $\mu$ l de transcriptasa reversa (BRL)
  - 0.5  $\mu$ l de RNAsina
2. Incubar a 42 °C durante 25 min y parar la reacción con 1  $\mu$ l de EDTA 0.5 M.

### **12.4. Hidrólisis y precipitación del cDNA;**

1. Añadir 4  $\mu$ l de NaOH 1N.
2. Incubar a 95 °C, 5 min.
3. Añadir 4  $\mu$ l de HCl 1 N.
4. Precipitar a -20 °C toda la noche tras adicionar;
  - 7  $\mu$ l de NaAc 3 M
  - 138  $\mu$ l etanol absoluto
5. Centrifugar 20 min a 14000 rpm y resuspender 4  $\mu$ l de agua y 5  $\mu$ l de solución STOP del kit de Sequenase®.

### **12.5. Resolución en gel de secuenciación**

1. Previamente, se realizan las reacciones de secuenciación con el oligo marcado utilizando un fragmento de ADN genómico Tsw12 que comprenda el posible inicio de transcripción.
2. Cargar 3 y 6  $\mu$ l del cDNA obtenido en un gel de secuenciación al 6% junto a la reacción de secuenciación.

**Nota:**Todas las soluciones se tratan con DEPC al 0.2% y se mantienen en esterilidad.

**Tampón PK x 10:** 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA

**Tampón de hibridación x 10:** 1.5 M KCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8.3, 10 mM EDTA

## **13. ANALISIS DE PROTEINAS**

### **13.1. Método de extracción general**

1. Triturar el material en presencia de N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino.
2. Añadir 1 vol de tampón de extracción Laemmli x2 y homogeneizar.
3. Calentar la muestra a 95 °C, 10 min.

4. Centrifugar 15 min a 13000 rpm para retirar el material insoluble.
5. Para muestras con pigmentos, precipitar con al menos 3 vol de TCA 10%, 0.07% 2-β-mercaptoetanol, en acetona fría. Incubar 45 min a -20 °C y centrifugar igual que en el paso 4.
6. Lavar el sedimento varias veces con 0.07% β-mercaptoetanol en acetona fría. Incubar y centrifugar en las condiciones descritas anteriormente.
7. Secar el sedimento y resuspender en tampón Laemmli x1.
8. Hervir 5 min y centrifugar para eliminar la fracción no soluble.

**Tampón Laemmli:** 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% 2-β-mercaptoetanol 0.05% (p/v) azul de bromofenol.

## 13.2. Cuantificación de proteínas.

### 13.2.1. Método de Bradford

El método Bradford (1976), es muy rápido y sencillo pero no es aplicable a muestras proteicas disueltas en tampones que contengan detergentes (SDS, Tritón X-100 ó NP-40) a concentraciones superiores al 0.2 %. En este trabajo, se ha utilizado este método para la cuantificación de las muestras proteicas del ensayo Gus y de las muestras muy concentradas de proteínas en tampón Laemmli, de forma que la alícuota a medir era de 1-2 µl.

A 1.5 ml de solución Bradford x 1 se añaden 5-10 µl de muestra, se incuba de 5-30 min y se mide la absorbancia a 595 nm. Se construye paralelamente una recta patrón con 0, 1, 5, 10 y 15 µg de BSA. Los valores de absorbancia de las muestras obtenidos se extrapolan a concentración de proteínas en la recta patrón.

**Solución Bradford x1:** diluir la solución Bradford x5 (*Bio-Rad*) en agua destilada 1:4.

### 13.2.2. Método de Lowry

Este método permite estimar la concentración de proteínas en soluciones en presencia de detergentes. El método, inicialmente descrito por Lowry (1951), fue posteriormente modificado por Bensadoun and Weinstein (1976).

1. A 600 µl de agua, adicionar 5-10 µl de muestra. Llevar en paralelo una recta patrón con concentraciones de 0 a 50 µg de BSA en tampón de extracción.
2. Añadir 5 µl de deoxicolato sódico 2%, agitar e incubar 15 min a ta.
3. Precipitar las proteínas con 200 µl de TCA 24%. Agitar y centrifugar a 6500 rpm, 30 min a ta.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 1.4 ml de reactivo D.
5. Incorporar 100 µl de *Folin-Ciocalteus* (*Merck*) diluído 1:1 en agua.

6. Incubar 45 min en oscuridad, (tiene lugar la reacción colorimétrica).
7. Medir la absorbancia a  $DO_{600}$  y extrapolar la concentración de proteína con la recta patrón obtenida.

**Reactivo C:** 20 g  $CO_3Na$ , 10 ml de Tartrato NaK 2%, 6.2 ml NaOH 16 N. Disolver primero el  $CO_3Na$  en 900 ml de agua. Añadir el resto de los componentes y completar hasta 1L.

**Reactivo D:** añadir 0.5 ml de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  al 1.4% por cada 50 ml de reactivo C. Preparar inmediatamente antes de su uso.

### 13.3. Electroforesis monodimensional

Se realiza en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, según el método descrito por Laemmli (1970). La separación de proteínas se lleva a cabo en un sistema discontinuo consistente en un gel de apilamiento (stacking) y en un gel de separación. Las muestras se resuelven bien a bajo amperaje o a voltaje constante hasta que el azul de bromofenol alcanza el borde inferior del gel.

**Gel de apilamiento:** 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, A/B (3.8% acrilamida, 0.2% bisacrilamida), 0.05% APS, 0.1% TEMED.

**Gel de separación:** 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, A/B (29.2% acrilamida, 0.8% bisacrilamida) hasta el porcentaje adecuado, 0.05% APS, 0.05% TEMED.

**Tampón de cubeta:** 25 mM Tris, 194 mM glicina, 0.1% SDS.

## 14. ANALISIS WESTERN

Este método, descrito inicialmente por Towbin (1979), permite la detección de proteínas específicas mediante anticuerpos desarrollados frente a éstas. Esta especificidad antígeno-anticuerpo permite determinar la presencia y cantidad relativa de los antígenos en mezclas complejas.

Los extractos proteicos se resuelven por electroforesis y se transfieren a filtros de nitrocelulosa o de difluoruro de polivinilideno (PVDF ó Inmobilon). La membrana se incuba con los anticuerpos y aquellos unidos a su antígeno se detectan sobre el filtro. En este trabajo se han utilizado anticuerpos anti-IgG conjugados a fosfatasa alcalina.

### 14.1. Transferencia de proteínas a membranas

Se ha utilizado un aparato de transferencia semi-seca (*LKB, Pharmacia*).

1. Tras la electroforesis, equilibrar el gel en el tampón de transferencia 15 min a ta.
2. Colocar el gel en contacto con la membrana de PVDF, de forma que la membrana esté en la cara del gel mirando hacia el cátodo. Colocar 6 papeles Whatman 3MM del tamaño del gel empapados en tampón de transferencia por encima y por debajo del gel.
3. Aplicar un amperaje de  $0.8V/cm^2$  del gel durante 90 min.

4. Visualizar las proteínas transferidas al filtro por tinción con Ponceau S (3 min) y destiñendo posteriormente con TBS o PBS.

**Tampón de transferencia:** 39 mM glicina, 48 mM Tris-base, 0.037% SDS, 20% metanol.

**Solución de Ponceau S:** 0.5% ponceau S en 1% de ácido acético.

**TBS x5 (Tris buffered saline):** 40 g/L NaCl, 1 g/L KCl, 15 g/L Tris-base. Ajustar a pH 8 con HCl.

**PBS x10 (Phosphate buffered saline):** 80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 14.4 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Ajustar a pH 7.2.

#### 14.2. Inmunodetección con anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina

1. Tratar la membrana con solución de bloqueo durante un tiempo que puede oscilar desde 30 min hasta toda la noche (a 4 °C).
2. Incubar con el anticuerpo específico a la dilución apropiada en solución de bloqueo. Esta dilución se determina previamente titulando el anticuerpo. En nuestro caso, se utilizó anticuerpo anti-Gus (*Clontech*) a la dilución recomendada por el fabricante.
3. Lavar el filtro 4 x 5 min con solución de bloqueo.
4. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario (anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a fosfatasa alcalina) diluído en solución de bloqueo (según fabricante), durante 1 h a ta.
5. Lavar como se describe en la etapa 3.
6. Lavar en 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5 min a ta.
7. Equilibrar la membrana en tampón de fosfatasa alcalina, 5 min a ta.
8. Añadir la solución cromogénica hasta que las bandas se hagan evidentes. Parar la reacción con agua destilada.
9. Fotografíar la membrana o guardarla en oscuridad.

**Solución de bloqueo:** 5% p/v de leche desnatada en polvo (*Molico Sveltesse, Nestle*), 0.2% Tween-20 en TBS.

**Solución cromogénica:** se prepara inmediatamente antes de su uso añadiendo 66 µl de NBT y 33 µl de BCIP a 10 ml de tampón de fosfatasa alcalina.

**Solución NBT:** disolver 50 mg de NBT (Nitro-blue tetrazolium, *Sigma*) en 1 ml de dimetilformamida al 70%. Guardar a -20 °C protegido de la luz.

**Solución BCIP:** disolver 50 mg de BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, *Sigma*) en 1 ml de N,N-dimetilformamida. Guardar a -20 °C.

**Tampón de fosfatasa alcalina:** 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

### 15. INMUNOLocalización AL MICROSCOPIO ELECTRONICO

#### 15.1. Preparación de las ultrasecciones

El material vegetal recolectado se corta a mano con cuchilla en secciones de unos 2-3 mm de grosor y se sumergen en solución de fijación a 4 °C durante 1 h. Lavar con tampón

Cacodilato a 25 °C durante 4 h para bloquear los grupos aldehídos libres. Las muestras se incluyen en la resina hidrofílica Lowicryl K4M (*Chemische Werke Lowi, Wadkraig, FRG*), según el método descrito por Roth (1983), con las siguientes modificaciones; las muestras se deshidratan por tratamientos sucesivos con soluciones de concentraciones gradualmente crecientes de metanol y a temperaturas progresivamente más bajas. La polimerización se lleva a cabo por irradiación con luz UV de 360 nm de longitud de onda, durante 24 h

La muestra incluida se monta en el ultramicrotomo (*Reicher-Jung Ultracut E*) y se cortan con cuchilla de diamante. Las ultrasecciones obtenidas (50-250 nm) se montan en rejillas de níquel para mayor facilidad en el procesamiento posterior.

**Solución de fijación:** 4% paraformaldehído, 0.1% glutaraldehído en 0.1M tampón cacodilato pH 7.2. Preparar la solución de glutaraldehído al 8% y mezclar con el tampón cacodilato. Añadir 0.1% glutaraldehído.

**Tampón cacodilato:** 0.2 M cacodilato sódico pH 7.2.

### **15.2. Inmunodetección con proteína A unida a partículas de oro**

Las rejillas que contienen las secciones se incuban con una gota de PBTT, durante 5 min a 25 °C. Tras retirar la solución, se incuban las secciones con el anticuerpo anti-Gus a la dilución recomendada por el fabricante en tampón PBTT, durante toda la noche a 25 °C. Lavar a continuación con PBS e incubar las secciones con proteína A unida a partículas de oro (según Bendayan et al., 1980). Las muestras se lavan en agua destilada y se contrastan con acetato de uranilo 2%.

**Tampón PBTT:** 0.05% BSA, 0.05% Tritón X-100, 0.05% Tween 20 en 0.1 M PBS.

### **15.3. Análisis morfométricos y estereológicos de las secciones**

Las secciones se visualizan en un microscopio de transmisión de electrones (Phillips CM-10; Servicio de Microscopía Electrónica, Universidad de Sevilla) y se fotografían.

Los estudios morfométricos y cuantitativos se realizan eligiendo al azar 30 imágenes de los compartimentos celulares a analizar. Las imágenes se procesan con un programa automático de análisis de imagen IMAGO, tomando como parámetro el número de partículas de oro por unidad de superficie ( $1\text{mm}^2$ ). Posteriormente, los datos se analizan estadísticamente mediante el análisis de la varianza, test-Student, test de Kolmogorov-Smirnoff y test U. Cuando  $P < 0.001$  se considera una diferencia estadística.

## **16. TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS DE MESOFILO DE HOJA DE TABACO**

Los protocolos utilizados se basan en los inicialmente descritos por Negrutiu et al., (1987), y Shillito and Potrykus, (1986) modificados y perfeccionados (I. Díaz y B. Damm, comunicaciones personales).

### 16.1. Aislamiento de protoplastos de tabaco

Este protocolo permite obtener un rendimiento de  $2-3 \times 10^6$  protoplastos/g de hoja de tabaco. Es fundamental utilizar el tejido en óptimas condiciones. Las plantas no deben subcultivarse más de 10 veces ya que el rendimiento se ve afectado negativamente. El ápice de cada planta utilizada, conteniendo el meristemo vegetativo, se subcultiva vegetativamente en jarras con MS.

1. Partir de 2-3 g de hojas de tabaco crecidas *in vitro* en condiciones de esterilidad. Es conveniente no recolectar todas las hojas de una vez, ya que se secan muy fácilmente (se pueden mantener en una solución 0.5 M manitol). Se elimina el nervio central de las hojas y se cortan en tiras de unos 0.5 cm de ancho. Las tiras se van colocando en una caja Petri con solución CPW13M para que se produzca la preplasmolisis y se separen las paredes celulares de las membranas plasmáticas.
2. Se retira la solución CPW13M y se añaden 9-12 ml de solución de enzima por caja. Las cajas se sellan con parafilm y se incuban en oscuridad y sin agitación durante 16-20 h (on) a 25°C.
3. Las cajas se agitan muy suavemente durante 30-60 min para completar la digestión. A continuación, se separan los protoplastos del tejido sin digerir por filtración mediante filtros con un diámetro de poro de 65  $\mu\text{m}$ .
4. Se distribuye el filtrado en tubos de vidrio y se centrifugan en un rotor basculante durante 5 min a 1000 rpm.
6. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en CPW13M. Se vuelve a centrifugar.
7. El sedimento se resuspende en CPW21S y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 min para purificar los protoplastos. Los protoplastos vivos se separan en una banda superior, que se recoge con una pipeta Pasteur. Los protoplastos recogidos se resuspenden en medio MSP9M y se centrifugan (5 min a 1000 rpm).
8. El sedimento se lava con el mismo medio para eliminar los restos de sacarosa.
9. El sedimento lo constituyen los protoplastos viables. A continuación, se resuspenden en medio de cultivo y se cuenta una alícuota al microscopio óptico en una cámara de conteo Fuchs-Rosenthal.

**Nota:** Depositar las soluciones en las paredes de los tubos y evitar burbujear los protoplastos, ya que se rompen fácilmente. Es conveniente utilizar tubos de vidrio, ya que los protoplastos se adhieren a las paredes de los tubos de polipropileno.

**Solución de enzima:** 1.5% Celulasa Onozuka R-10 (*Yakult*), 0.35% Macerozyme R-10 (*Yakult*) en CPW13M. Esterilizar por filtración y guardar en alícuotas de 12 ml a -20 °C.

**Medio CPW13M:** 13% manitol, 27.2 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 101 mg/L  $\text{KNO}_3$ , 1.48 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 246 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.16 mg/L KI, 0.025 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ; pH 5.6-5.8

**Medio CPW21S:** 21% de sacarosa en CPW13.

**Medio MSP9M ó medio de cultivo:** MS con 30 g/L sacarosa, 9% manitol, 2 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP.

## 16.2. Transfección de protoplastos de tabaco

Se han utilizado los dos métodos descritos a continuación. Ambos dan buenos resultados pero, aunque la electroporación es el método más rápido y parece ser más repetitivo, hay que utilizar más protoplastos en cada evento de transformación.

### 16.2.1. Transfección de protoplastos mediante Polietilenglicol (PEG)

1. Los protoplastos aislados viables se resuspenden a una densidad aproximada de  $1.0 \times 10^6$  protoplastos/ml en MSP9M.
2. A continuación se añaden 50-75  $\mu\text{g}$  de ADN de esperma de salmón como carrier (o pSK) y 30  $\mu\text{g}$  del plásmido a transformar (a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en agua estéril).
3. Añadir 500  $\mu\text{l}$  de PEG poco a poco (por las paredes del tubo) e ir mezclando con cuidado.
4. Incubar durante 30 min a ta.
5. Añadir, a cada tubo, 2 ml de solución F cada 2 min, hasta llenar el tubo.
6. Centrifugar en rotor basculante a 100 g durante 5 min.
7. Resuspender el sedimento en medio de cultivo MSP9M y volver a centrifugar.
8. Resuspender los protoplastos 1 ml de MSP9M y pasar los protoplastos a cajas Petri estériles de 2.5 cm de diámetro.
9. Incubar durante 24-30 horas en oscuridad a 25 °C.
10. Cuantificar la actividad GUS y la concentración de proteína por Bradford (ver apartados 17.1.1. y 10.2.1.).

**Solución PEG:** 40 % de PEG 3350, 0.4 M manitol, 0.1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , ajustar a pH 8.0. Filtrar para esterilizar.

**Solución F:** Para 1 litro, 8.12 g NaCl, 0.27 g KCl, 0.11 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 g glucosa, 18.36 g de  $\text{CaCl}_2$ . Ajustar a pH 7.0 y filtrar para esterilizar.





### **16.2.2. Transfección de protoplastos mediante electroporación**

1. Los protoplastos viables se lavan en una solución de 0.65 M manitol y posteriormente, se resuspenden en este medio a una densidad de  $3.0 \times 10^6$  protoplastos/ml.
2. Previamente, las cubetas se esterilizan con etanol y se dejan secar en la cabina de flujo laminar. Una vez secas, se colocan en hielo. Se utilizaron cubetas con electrodos separados 0.2 cm.
3. Añadir 400  $\mu$ l de protoplastos por cubeta y añadir 30  $\mu$ g de esperma de salmón y 15  $\mu$ g de plásmido a transformar.
4. Electroporar la muestra en las siguientes condiciones;

48 ohmios

500  $\mu$ F

375 V/cm

Corroborar que cada pulso sea de 20-30 ms. Estas condiciones se han utilizado satisfactoriamente en el electroporador de la casa BTX, modelo "*Electrocell manipulator 600*".

5. Pasar las muestras rápidamente a tubos con medio de cultivo MSP9M.
6. Centrifugar y seguir el proceso descrito en los pasos 8, 9, y 10 en el protocolo de transfección mediante PEG.

## **17. TRANSFORMACION DE TOMATE MEDIANTE BOMBARDEO**

El protocolo utilizado se basa en el descrito por Klein et al., (1988a,b) y posteriormente modificado por Menossi, (comunicación personal).

### **17.1. Preparación del material**

### **17.2. Preparación de las partículas**

1. En un tubo eppendorf (Treff Lab, Suiza), se pesan 60 mg de partículas de oro de 1  $\mu$ m de diámetro y se añade 1 ml de etanol absoluto (grado HPLC). Agitar en vórtex durante 10 min y centrifugar durante 1 min a 10000 rpm (6 10 s a 14000 rpm).
2. Descartar el sobrenadante, añadir 1 ml de glicerol al 50% estéril y agitar en vortex durante 30 s. Centrifugar a 10000 rpm, 1 min. Repetir el lavado dos veces más.
3. Resuspender el precipitado de partículas en 1 ml de glicerol al 50%, agitando en vórtex durante 1 min. Almacenar a 4 °C.

### **17.3. Precipitación del ADN**

1. Añadir secuencialmente en tubo de 2 ml (Sarstedt, Alemania);

- 10  $\mu$ l de ADN (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)
- 100  $\mu$ l de agua
- 38  $\mu$ l de partículas de oro, (preparadas según el apartado anterior)
- 150  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub>/espermidina

Las partículas de oro se añaden tras agitarlas vigorosamente. La solución CaCl<sub>2</sub>/espermidina se añade bajo agitación continua y máxima de vórtex.

2. Agitar durante 3-5 min y mantener posteriormente en hielo en posición vertical durante 10-15 min para sedimentar las partículas.
3. Descartar el sobrenadante con pipeta y añadir 500  $\mu$ l de etanol absoluto (HPLC). Agitar en vórtex (10-20 s), y mantener en hielo en posición vertical para sedimentar las partículas.
4. Repetir la etapa anterior y colocar las muestras en hielo. Con cada preparación pueden realizarse 5 disparos.

**Solución espermidina 0.1 M;** descongelar la espermidina (free base) calentando a 65 °C y distribuir en alícuotas de 14  $\mu$ l y almacenar a -20°C. Para su uso, descongelar a ta y añadir 986  $\mu$ l de agua y agitar en vórtex. Se recomienda utilizar una alícuota recién descongelada por cada experimento.

**Solución CaCl<sub>2</sub>/espermidina;** se prepara inmediatamente antes mezclando 125  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M y 25  $\mu$ l de espermidina 0.1 M.

**Notas:** Las muestras se pueden centrifugar, aunque ésto parece que propensa la formación de agregados. El ADN a utilizar debe ser de gran pureza, con una relación de densidad óptica 260/280 nm entre 1.8 y 2.0. El ADN debe mantenerse a 4 ° C o bien alicuotearse y guardarse a -20 °C para evitar ciclos de congelación-descongelación. Es importante que el etanol HPLC no se hidrate, para ello se hace necesario tomar alícuotas de la botella en tubos *Falcon* para evitar abrirla innecesariamente.

#### 17.4. Bombardeo con microproyectiles

Se ha llevado a cabo utilizando el aparato PDS 1000/He de la casa Bio-Rad. Básicamente, el funcionamiento de este aparato consiste en la descarga de los proyectiles (que llevan el DNA precipitado en su superficie) sobre los tejidos por descargas de aire comprimido, en este caso, gas helio.

1. En una cabina de flujo laminar, se esterilizan las membranas portadoras y las rejillas de parada en etanol absoluto (HPLC) y se ponen a secar. Es necesario que todo esté bien seco antes de su uso.
2. Conectar la bomba de vacío, abrir la llave de la bombona de helio y ajustar la presión de forma que sea 200 psi mayor que la resistencia nominal de los discos de ruptura a utilizar.

3. Colocar la membrana portadora en el soporte de la membrana sobre una superficie horizontal.
4. Justo antes del bombardeo, descartar el sobrenadante de la preparación y resuspender en 48  $\mu$ l de etanol y agitar en el vórtex. Sonicar secuencialmente cada muestra 3 veces durante 3-5 s cada vez. Agitar en vórtex y añadir 8  $\mu$ l a cada membrana portadora y esperar a que el etanol se evapore completamente.
5. Poner una rejilla de parada en el soporte disparador y a continuación el soporte con la membrana, de manera que la cara con las partículas quede mirando a la rejilla. Cerrar con el tapón del disparador. La distancia entre la membrana portadora y la rejilla es de 6 mm y habitualmente no se modifica.
6. Sumergir brevemente el disco de ruptura en isopropanol y colocarlo en su soporte. Enroscar el soporte en la extremidad del cilindro de gas hasta que quede fijo.
7. Poner el soporte disparador en el nivel 5. Ajustar la distancia entre éste y el soporte de forma que sea 8 mm.
8. Poner la placa con el material a bombardear en el nivel adecuado y cerrar la cámara.
9. Accionar la bomba de vacío hasta que el manómetro llegue a 27 (0.1 atm) y el botón de disparo hasta que se rompa la membrana. Abrir el vacío inmediatamente.
10. Cuando la presión haya llegado al nivel normal, abrir la cámara y sacar la muestra.

**Notas:** El tiempo de sonicación del ADN no debe exceder de 3-5s para evitar que se dañe.

## **18. TRANSFORMACION ESTABLE DE PLANTAS DE TABACO**

### **18.1. Transformación de *A.tumefaciens***

Se ha utilizado el método de congelación descongelación descrito por Holsters et al., (1987) y posteriormente modificado por Höfgen and Willmitzer, (1988).

#### **18.1.1. Preparación de *A.tumefaciens* competente**

Se inoculan 200 ml de medio YEB en un matraz de 2 l con una colonia de *A.t.* previamente refrescada y se crecen a 28 °C durante 36 horas con agitación vigorosa. El cultivo se pasa a tubos de centrifuga previamente enfriados y se centrifugan a 3000 rpm durante 20 min a 4 °C. Las células sedimentadas se lavan con 10 ml de TE frío, y finalmente se resuspenden en 20 ml de medio YEB frío. Las células se alicuotean y se congelan inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido, para almacenarlas a -80 °C hasta su uso.

#### **18.1.2. Transformación de *A.tumefaciens***

Las células competentes de *A. tumefaciens* se descongelan en hielo, se ponen en contacto con 0.5-1 µg de ADN plasmídico y se incuban 5 min en hielo. La mezcla se congela durante 5 min en N<sub>2</sub> líquido y se descongelan en un baño a 37 °C durante 5-10 min. Se añade 1 ml de medio YEB y se incuban a 28 °C ó a ta durante 2-4 horas. A continuación se extienden sobre medio sólido (LB ó YEB) suplementado con kanamicina y estreptomina y se incuban durante 48 horas a 28 °C.

## **18.2. Transformación de plantas de tabaco vía *A. tumefaciens***

### **18.2.1. Preparación de las células de *A. tumefaciens***

Se inocula una colonia de *A.tumefaciens* (transformada con el plásmido que contenga la construcción a introducir en plantas) en 10 ml de medio YEB sin antibiótico (en un matraz de 250 ml) y se incuba a 28 °C durante 24 horas con agitación vigorosa. Las células se centrifugan a 4 °C a 3500 rpm durante 20 min y se resuspenden en 10 ml de medio YEB sin antibiótico y en condiciones de máxima esterilidad. Las células ya están preparadas para la transformación.

### **18.2.2. Transformación de discos de hoja de tabaco**

Se requieren plantas silvestres de tabaco crecidas *in vitro* en condiciones de esterilidad. Las hojas de plantas jóvenes (3-4 semanas) se cortan en trozos de 1cm<sup>2</sup> aproximadamente eliminando el nervio central y se colocan con el envés hacia arriba y sin sumergir en cajas Petri con 20 ml de MS de cocultivación, en el que se inoculan previamente 100-200 µl de *A.tumefaciens* preparadas según el apartado anterior. Por cada transformación se cocultivan 100 discos de hojas (10-15 discos/placa) a 25°C y en oscuridad durante 2 días.

### **18.2.3. Aislamiento y regeneración de plantas de tabaco transformadas**

Tras la cocultivación, las secciones de hoja se lavan en agua destilada para eliminar el exceso de bacterias y se secan ligeramente sobre papel de filtro estéril. Los discos de hojas se colocan sobre medio MSS (con el haz en contacto con el medio) y se incuban en una cámara de cultivo iluminada hasta la formación de callos y posteriormente de brotes de plantas.

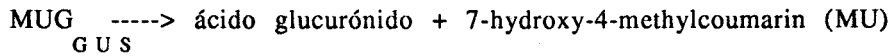
Los brotes de plantas bien formados y verdes se cortan y se traspasan a contenedores Magenta con medio MS de enraizamiento. Se consideran falsos transformantes aquellos que son incapaces de enraizar en medio selectivo.

Las plantas se crecen en la cámara de cultivo *in vitro* hasta que alcanzan unos 10-15 cm de altura, momento en el que se traspasan a macetas con tierra. Las plantas se recubren inicialmente con bolsas de plástico transparente para protegerlas frente al cambio de humedad.

## 19. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GLUCURONIDASA.

### 19.1. Cuantificación de la actividad Gus por fluorimetría

Este procedimiento se basa en la hidrólisis del substrato 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronido (MUG) por la  $\beta$ -Glucuronidasa (Gus). Tiene lugar la siguiente reacción:



El producto MU es fluorescente, y alcanza su máxima fluorescencia cuando el grupo hidroxilo está ionizado, por esta razón, las reacciones se paran en presencia de  $\text{NaCO}_3$ .

#### 19.1.1. Ensayo fluorimétrico Gus en protoplastos de tabaco.

1. Tras la incubación, se recogen los protoplastos con pipetas Pasteur largas en tubos eppendorf.
2. Dar un pulso muy corto (subir y bajar) en la microcentrifuga y desechar el sobrenadante, dejando unos 20-30  $\mu\text{l}$ , para evitar pérdida de material.
3. Añadir 100  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción y centrifugar 2 min a 14000 rpm a ta.
4. Recuperar el sobrenadante y emplear 15  $\mu\text{l}$  para medir la concentración de proteína por el método de Bradford, (guardar a  $-80^\circ\text{C}$  hasta la realización) y 105  $\mu\text{l}$  para la realización del ensayo fluorimétrico.
5. Añadir 105  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción MUG, mezclar e inmediatamente tomar 100  $\mu\text{l}$  y pasarlos a un eppendorf con 900  $\mu\text{l}$  de tampón de parada (constituye el punto correspondiente a tiempo 0).
6. Incubar la muestra restante a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora.
7. Añadir 900  $\mu\text{l}$  de tampón de parada y cuantificar la actividad en fluorímetro (llevar a 2 ml de volumen con tampón de parada).

**Tampón de extracción:** 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.1% Tritón X-100, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Tampón de reacción:** 2mM MUG en tampón de extracción.

**Tampón de parada:** 0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

#### 19.1.2. Ensayo fluorimétrico Gus en plantas transgénicas de tabaco

Basado en el protocolo descrito por Jefferson, (1987).

1. El material, una vez recolectado y envuelto en láminas de aluminio se congela en  $\text{N}_2$  líquido .
2. La muestra se tritura y 200 mg de tejido (aproximadamente) se extraen con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción con ayuda de un homogeinizador.

3. Centrifugar 10 min a 4 °C a 14000 rpm.
4. Pasar 200 µl de sobrenadante a nuevo eppendorf.
5. Medir la concentración de proteínas por Bradford (1976), (ver apartado 10.2.2.).
6. En un tubo eppendorf, llevar 21 µg de proteína de cada muestra hasta un vol de 100 µl con tampón de extracción.
7. Añadir 530 µl de tampón de reacción, mezclar.
8. Inmediatamente tomar 200 µl y mezclarlos con 1.3 ml de tampón de parada. Representa el punto correspondiente a tiempo 0.
9. Incubar los 400 µl restantes a 37 °C y repetir el proceso descrito en 8. a los 15 min y a los 45 min.
10. Aumentar el volumen hasta 2 ml con tampón de parada y medir en el fluorímetro (previamente calibrado) a 365 nm de excitación y a 455 nm de emisión.

**Tampón de reacción:** se utiliza el mismo descrito en 17.1.1. sólo que la concentración de MUG es de 1 mM.

#### 19.1.3. Calibrado del fluorímetro TKO 100 (*Hoefler, Scientific Instruments*)

1. Conectar el fluorímetro 15 min antes de su uso.
2. Llenar una cubeta de vidrio con 1.9 ml de tampón de parada (blanco) e introducirla en el adaptador de la muestra del fluorímetro y cerrar la tapa.
3. Llevar el botón *scale* a tope en sentido de las agujas del reloj y llevar el contador a cero ajustando con el botón *Zero* del TKO 100.
4. Añadir al blanco 100 µl de la solución 1 µM MU para obtener una concentración de 50 nM MU e introducirla en el adaptador de la muestra.
5. Ajustar el botón *scale* hasta 500. Por tanto, en una solución 50 nM de MU, el aparato mide 500, o sea 10 unidades/ nM MU.

**Solución concentrada de calibrado:** disolver 19.8 mg de MU (*Sigma*) en 100 ml de agua destilada, para obtener una solución 1 mM. Diluir 10 µl de esta solución en 1.9 ml de tampón de parada obteniéndose una solución 1 µM.

**Nota:** El calibrado del fluorímetro ha de realizarse cada vez que se vayan a medir muestras. La solución 50 nM MU hay que prepararla fresca en cada ocasión. La solución stock de calibrado 50 nM MU puede guardarse durante varios días a 4 °C protegida de la luz. No obstante, antes de ajustar el fluorímetro a 500 una vez diluída conviene anotar la medida obtenida y compararla con otras medidas previas.

#### 19.1.4. Cálculo de la actividad Gus

La actividad enzimática se ha calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

Actividad Gus (pmol 4-MU/ mg proteína/ min)= 10(ULt1-ULt0)/min x mg proteína.

ULt0: unidades de lectura del fluorímetro a tiempo 0.

ULt1: unidades de lectura del fluorímetro a tiempo 1.

Normalmente el valor de ULt0 en las condiciones ensayadas era despreciable. Para el cálculo de las muestras transformadas con el promotor Tsw12, Lt1 representa la media de los valores obtenidos a los 15 y a los 45 minutos, (ya que la actividad era lineal en el tiempo).

**Nota:** La duración de la incubación depende de la actividad de cada promotor en el sistema transgénico en cuestión y hay que determinarla en cada caso.

### 19.2. Detección histoquímica de la actividad Gus por tinción con X-Gluc.

El sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucoronido (X-Gluc) es incoloro, pero tras la acción de la β-glucuronidasa, da lugar a un compuesto intermedio que se dimeriza hasta dichloro-dibromoindigo (ClBr-índigo), de color azul intenso e insoluble. Este compuesto final precipita inmediatamente tras su formación, constituyendo un sustrato ideal para la localización histoquímica. El protocolo que se detalla a continuación se basa en el descrito inicialmente por Jefferson (1987).

1. Recolectar cada muestra independientemente y a continuación realizar las secciones (a mano con una cuchilla de afeitar o con microtomo manual).
2. Fijar la muestra con tampón de fijación 1 durante 5 min a ta. Este paso es opcional, depende del patrón de inducción de cada muestra. El tiempo y la temperatura de incubación con el tampón de fijación hay que ajustarlo para cada muestra.
3. Lavar el material en 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.
4. Sumergir el material en 1 mM X-Gluc en tampón de extracción. Infiltrar con vacío.
5. Incubar a 37 °C hasta detectar el color azul.
6. Fijar en tampón de fijación 2 durante 10 min a ta.
7. Decolorar los tejidos verdes por lavados sucesivos con:
  - 50% etanol (5 min)
  - 100% etanol (desde 30 min a on )
8. Hidratar en 1 ml de agua destilada. Las muestras se pueden mantener en agua o pasar a 50% glicerol. Se mantienen sin cambios apreciables durante meses.

**Solución 1 mM X-Gluc:** para 10 ml, disolver 50 mg en 50 μl de N,N'dimetilformamida y añadir 10 ml de tampón de extracción. Se puede guardar a 4 °C, si se va a utilizar en pocos días o alicuotarse y mantener a -20 °C. Para muestras de polen y flores, se incluyó 20% metanol (Kosugi et al., 1991), que inhibe la actividad β-glucuronidasa endógena.

**Tampón de fijación 1:** 2% paraformaldehído en tampón de extracción.

**Tampón de fijación 2:** 10% formaldehído, 20% etanol, 5% acético.

**Nota:** se puede incluir en la solución X-Gluc ferro y ferricianuro de potasio (0.5 mM), que catalizan la oxidación y formación del dímero ClBr-índigo y por tanto, favorecen una localización más nítida. Esta modificación se utilizó en los experimentos de bombardeo de microproyectiles sobre hojas adultas y plántulas de tomate, aunque no se detectaron diferencias significativas cuando las muestras se incubaban en ausencia de ambos compuestos. El tiempo y condiciones de fijación hay que adaptarlos para cada muestra. En este trabajo se han detectado anomalías en la detección histoquímica en algunas muestras fijadas antes de la tinción.



## RESULTADOS

# 1. EXPRESION DEL GEN Tsw12

## 1.1. Análisis *northern*

### 1.1.1. Acumulación del mensajero tsw12 en flores de tomate

La presencia del mensajero tsw12 se ha estudiado en tejidos de flores de tomate mediante análisis *northern* en dos estadios distintos de desarrollo, durante la antesis (estadio X, según Koltunow) y en el estadio de botón floral (estadio Y). En el primer caso, se extrajo ARN de distintas partes de la flor; estilo y estigma, ovario, pétalos, sépalos, y anteras, mientras que en el otro caso, se extrajo ARN total del botón floral completo. 15 µg de cada una de las muestras se resolvieron por tamaño en gel de agarosa y se transfirieron a una membrana de nylon para ser hibridados con la sonda tsw12. El filtro se volvió a hibridar con la sonda correspondiente al gen ribosómico 18 S de rábano para corregir los errores de cuantificación.

La Figura 1 muestra la presencia del mensajero tsw12 en todas las muestras ensayadas. La señal correspondiente al transcrito tsw12 es más abundante en la flor madura que en la flor inmadura. La señal detectada en tejidos procedentes de la flor madura es especialmente intensa en el gineceo, tanto en el estilo y en el estigma (carril 6), como en el ovario (carril 5), donde la señal es especialmente intensa. La presencia del mensajero tsw12 en el androceo (carril 4) es menor que en el resto de los tejidos de la flor madura. El mensajero del gen Tsw12 es también bastante abundante en los tejidos no reproductores de la flor, en los pétalos (carril 2) y en los sépalos (carril 3). En botón floral, se detecta ARN mensajero tsw12, aunque el nivel es inferior al determinado en la flor madura (carril 1).

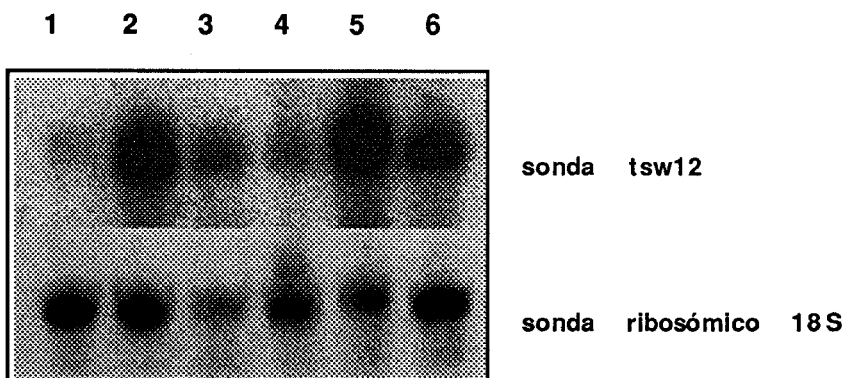


Figura 1. Hibridación de la sonda tsw12 con ARN total de flores inmaduras de tomate (estadio X) (1), y con ARN total de sépalos (2), pétalos (3), anteras (4), ovarios (5) y pistilos (6) de flores maduras de tomate (estadio Y). El mismo filtro se hibridó con la sonda del cDNA correspondiente al gen ribosómico 18S de rábano.

El análisis *Southern* realizado con ADN genómico de tomate hibridando con el cDNA tsw12 a alta estringencia, detectaba una sola banda con todas las enzimas de restricción probadas. Este resultado sugería que existe una sola copia por genomio haploide, aunque no se pudo descartar la existencia de varias copias en los fragmentos que hibridaban. En condiciones de baja estringencia se observaban bandas adicionales de menor intensidad correspondientes a genes que presentan homología con el gen Tsw12 (Torres-Schumann et al., 1992).

Las hibridaciones *northern* se han realizado en condiciones de alta estringencia de hibridación por tanto, los transcritos detectados tienen una homología superior al 95% con la sonda tsw12. Por otra parte, se ha determinado la expresión de la  $\beta$ -glucuronidasa dirigida por el promotor del gen Tsw12 en flores de plantas transgénicas de tabaco. El patrón de expresión dictado por el promotor se detalla en la sección 3.3.5.4. y se correlaciona con los resultados obtenidos por *northern*.

Por ambas razones, la posibilidad de que la señal obtenida corresponda a un transcrito cuya secuencia tenga homología con el gen Tsw12 e hibride con la sonda se ha descartado

### 1.1.2. Acumulación del mensajero Tsw12 en plantas de tomate tratadas con ácido jasmónico y ácido salicílico

Dada la implicación de las PLTPs en funciones de defensa frente a patógenos (Terras et al., 1992; Molina et al., 1993), se trataron plantas de tomate en distintos estadios de desarrollo con ácido jasmónico (JA) y con ácido salicílico (SA) para valorar sus efectos sobre la expresión del gen Tsw12. Ambos compuestos son conocidos inductores de genes que se expresan por herida y/o en la respuesta defensiva frente a patógenos (Yalpani et al., 1991; Creelman et al., 1992).

En la Figura 2, ARN total correspondiente a hipocótilos y radículas de plántulas control (carriles 1 y 2) y tratadas con 20  $\mu$ M de JA (carriles 3 y 4), se hibridaron junto con ARN total de tallos y raíces de planta adulta control (carriles 5 y 6) y tratadas (carriles 7 y 8) con la misma cantidad de JA. En todos los casos, el tratamiento tuvo una duración de 24 h

En ningún caso se obtiene señal debida a la hibridación de la sonda con muestras correspondientes a raíces ni a radículas control o tratadas (carriles 2, 4, 6 y 8). La señal presente en tejido de tallo control (5) es muy débil. El tratamiento de este tejido con JA (7) induce ligeramente la transcripción del gen Tsw12 ya que la señal obtenida es muy débil, (comparando con la intensidad que se obtiene en muestras de este tejido tratado con sal o con ABA).

En las muestras de hipocótilos control (1) se detecta señal debida a la presencia del mensajero tsw12 durante la germinación. En este tejido, el nivel de mensajero tsw12 aumenta notablemente tras el tratamiento con JA (3).

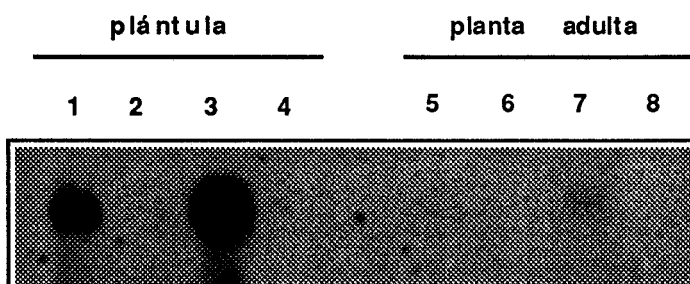
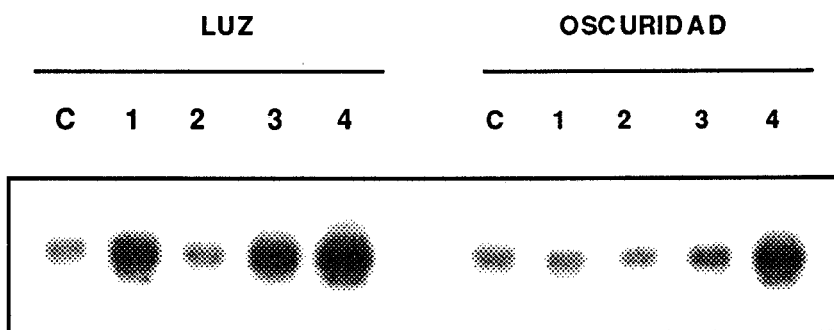


Figura 2. Hibridación de la sonda tsw12 con muestras de ARN total de hipocótilos (1) y radículas de tomate control (2) y tratadas con 20  $\mu$ M de ácido jasmónico (carriles 3 y 4 respectivamente), de tallos y raíces control (carriles 5 y 6) y tratados con la misma cantidad de ácido jasmónico, (carriles 7 y 8).

Las plántulas son más sensibles al tratamiento con JA cuando están expuestas a la luz que en oscuridad (Peña-Cortés et al.). Este hecho se confirma para la expresión del gen *Tsw12*. La Figura 3 muestra la acumulación del transcrito *tsw12* en plántulas de tomate tratadas con concentraciones crecientes de JA; 0, 50 nM, 500 nM, 5  $\mu$ M y 50  $\mu$ M (carriles C, 1, 2, 3, 4, respectivamente). Estos tratamientos se llevaron a cabo paralelamente en condiciones de luz y de oscuridad. En condiciones de iluminación, concentraciones de 50 nM (2) aumentan notablemente los niveles de mensajero *tsw12* respecto al control. En cambio, en oscuridad, la tasa de transcripción de este gen permanece casi inalterable con concentraciones por debajo de 50  $\mu$ M de JA. No obstante, hay que destacar que existe un punto de inflexión en esta tendencia. Tanto en condiciones de luz como de oscuridad, la señal detectada tras el tratamiento con concentraciones de JA 500 nM (carril 2) suponen un descenso en la acumulación del mensajero con respecto al punto anterior de 50 nM.

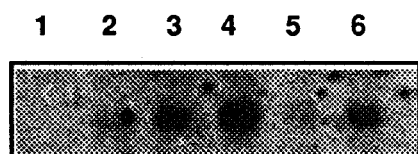


**Figura 3.** Hibridación de la sonda *tsw12* con ARN total de plántulas de tomate control (C) y tratadas con ácido jasmónico 50 nM (1), 500 nM (2), 5  $\mu$ M (3), 50  $\mu$ M (4) en condiciones de luz y de oscuridad.

Los resultados obtenidos indican que el JA aplicado exógenamente no induce por sí mismo la transcripción del mensajero *tsw12*, aunque en condiciones en las que la transcripción de este gen es activa, aumenta la acumulación del mensajero tras el tratamiento con JA.

Para verificar el resultado anterior se llevó a cabo otro experimento en el cuál se analizó la población de ARN mensajero *tsw12* presente en folíolos de tomate tratados con JA 50  $\mu$ M, ABA 100  $\mu$ M, JA 50  $\mu$ M + ABA 100  $\mu$ M. En este experimento se incluyeron además muestras de folíolos de tomate heridos con bisturí y tratados con ácido salicílico 1 mM. Para eliminar los el estrés hídrico asociado a la herida mecánica, el experimento se

llevó a cabo en cajas Petri selladas, incubando el material en medio Hoagland. Los tratamientos tuvieron una duración de 24 horas y se llevaron a cabo en condiciones de iluminación. En la Figura 4 se muestra la autorradiografía resultante del experimento. Tanto en condiciones control (carril 1) como en el tratamiento con SA (carril 5) sólo se detecta la presencia del mensajero tsw12 cuando se sobreexpone la película; el JA (carril 2) induce levemente la expresión del gen Tsw12. En el tratamiento con ABA se produce una acumulación notable del mensajero (carril 3), que se incrementa en el caso del tratamiento doble (carril 4). La herida mecánica también induce la acumulación del mensajero (carril 6).



**Figura 4.** ARN total de hojas de tomate control (1), tratadas con ácido jasmónico 50  $\mu$ M (2), ABA 100  $\mu$ M (3), ácido jasmónico 50  $\mu$ M + ABA 100  $\mu$ M (4) ácido salicílico 1 mM (5) y heridas con bisturí (6), hibridados con la sonda tsw12.

Los resultados obtenidos en este último experimento descartan al JA como inductor de la expresión del gen Tsw12. El tratamiento conjunto de ABA y JA incrementa la representación del mensajero tsw12 con respecto a los tratamientos simples, observándose niveles mayores que los meramente aditivos. No obstante, existe una inducción clara y fuerte en las muestras procedentes de folíolos heridos. El JA se ha asociado a la señalización local y sistémica de la herida mecánica y por infección de insectos masticadores. En el caso del gen Tsw12, la implicación del JA en la inducción de su expresión en estos casos queda descartada.

La aplicación exógena de ácido salicílico a las concentraciones ensayadas apenas afecta al nivel de acumulación del mensajero. La respuesta génica mediada por el SA está restringida a aquellos genes que participan en la respuesta hipersensible (HR). La ausencia de inducción de la expresión del gen Tsw12 parecen indicar que este gen no participa en la HR.

### 1.1.3. Análisis de la expresión del gen Tsw12 en respuesta a tratamientos con ABA, NaCl y manitol en mutantes *flacca*

Las plantas mutantes *flacca*, son deficientes en la síntesis de ABA, conteniendo sólo un 15% del ABA presente en la especie isogénica *Rheinlands Rhum (RR)*, de la que procede. Además, el contenido de ABA en estos mutantes no se altera en condiciones de estrés hídrico, constituyendo un sistema ideal para determinar el papel del ABA en la inducción transcripcional del gen Tsw12 en situaciones de estrés hídrico-salino.

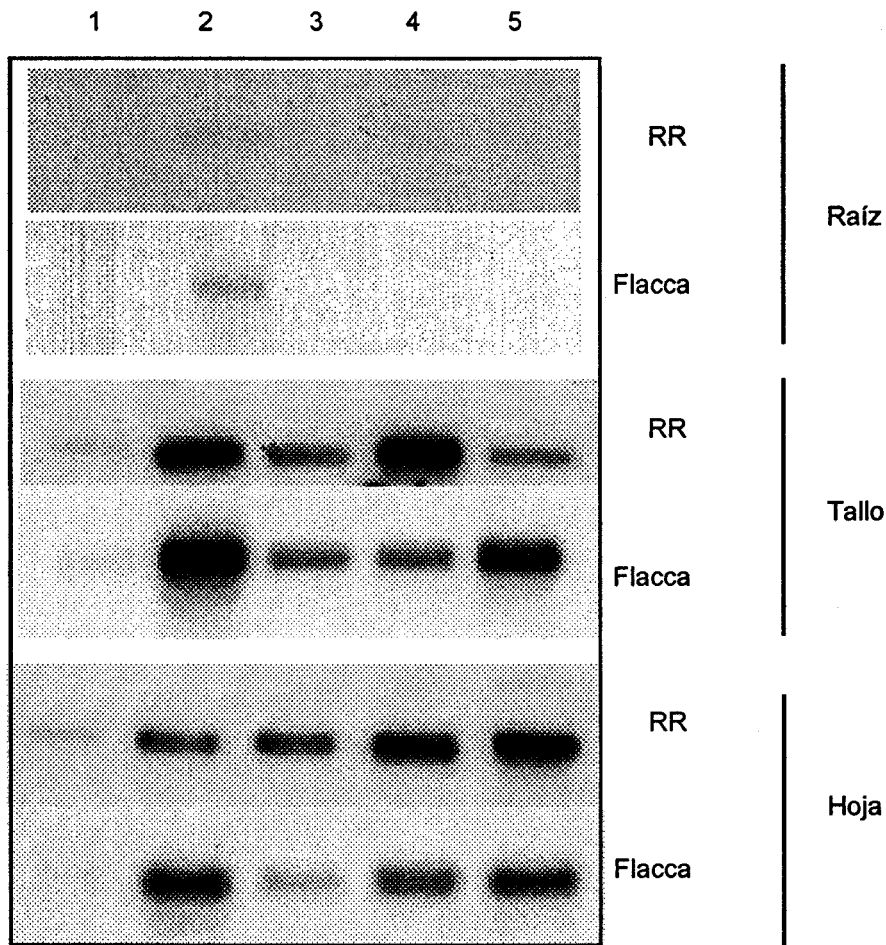
Se germinaron semillas de ambas plantas y las plántulas resultantes se crecieron en cultivo hidropónico. Cuando las plantas desarrollaron cinco hojas verdaderas, se trataron durante 24 h con 100  $\mu$ M ABA, 10 g/l NaCl, 100  $\mu$ M ABA + 10 g/l NaCl y 300 mM manitol, y se mantuvieron plantas sin tratar, representando los controles. El material se recolectó separando raíz, tallo y hojas, se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se extrajo el ARN total para hibridarlo en filtro con la sonda tsw12. Posteriormente, los filtros se hibridaron con la sonda correspondiente al gen ribosómico 18 S para determinar los posibles errores de cuantificación del ARN.

En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos. Las muestras correspondientes a plantas control, tratadas con 100  $\mu$ M ABA, 15 g/l NaCl, 100  $\mu$ M ABA +10 g/l NaCl y 300 mM manitol se localizan en los carriles 1, 2, 3, 4, y 5 respectivamente.

En las plantas no tratadas (1) sólo se detecta una señal tenue en tallos de ambos tipos de plantas y en hojas de plantas *RR*.

En las muestras procedentes de tejidos de raíces de ambos tipos de plantas no se detecta hibridación con la sonda tsw12 exceptuando una leve señal existente en las muestras tratadas con ABA. En este experimento se han utilizado concentraciones de ABA 100  $\mu$ M, superiores en un orden de magnitud a las utilizadas previamente en nuestro laboratorio (Torres-Schumann et al., 1992). El tratamiento con ABA 10  $\mu$ M no producía acumulación del mensajero tsw12 a niveles detectables en este tejido.

Con respecto al patrón de expresión del mensajero tsw12 en tejidos verdes de plantas *RR* y *flacca*, en ambos se mantiene el mismo patrón de expresión cualitativo, aunque existen diferencias cuantitativas dignas de reseñar. La presencia del transcrito tsw12 en muestras de tallos y hojas de plantas *flacca* sometidas a estrés hídrico y salino revelan la existencia de mecanismos transcripcionales que actúan independientemente del ABA en estas condiciones.



**Figura 5.** Hibridación de la sonda *tsw12* con ARN total de raíces, tallos y hojas de plantas de tomate de la variedad *RR* y de los mutantes isogénicos *flacca* en condiciones control (1) y tratadas con 100  $\mu$ M ABA (2), 10 g/l NaCl (3), 10g/l NaCl + 100  $\mu$ M ABA (4) y 300mM manitol (5).

En el tratamiento con ABA (2), se produce acumulación de mensajero *tsw12* en tejidos de tallo y hojas mutantes, que es superior a la detectada en las muestras de plantas silvestres.

El tratamiento salino (3) produce acumulación del mensajero en ambos tipos de plantas tanto en hojas como en tallos. Los niveles de acumulación del mensajero en tallos son parecidos en ambas plantas, sin embargo, en hojas, la representación del mensajero *tsw12* es mayor en la muestra procedente de plantas silvestres que de mutantes.

Con respecto al tratamiento doble ABA/NaCl (4), existen diferencias significativas entre el comportamiento del mutante y el silvestre. Los tallos de plantas *RR*, acumulan mayor cantidad de mensajero *tsw12* en el tratamiento simultáneo ABA/NaCl que en cada tratamiento por separado, siguiendo un patrón aparentemente aditivo. En el mutante, no se da este efecto; los niveles de acumulación del mensajero *tsw12* en tejidos de tallos



sometidos al tratamiento doble son inferiores a los existentes en el tratamiento con ABA y similares a los del tratamiento con sal.

En las muestras procedentes de hojas silvestres se repite este comportamiento aunque la representación del mensajero es menor que en tallos. En las muestras correspondientes hojas de plantas *flacca*, la acumulación durante el tratamiento doble es superior a la existente en plantas tratadas sólo con sal, aunque no se superan los niveles de acumulación existentes en las muestras tratadas con ABA.

Las plantas tratadas con manitol (5), sufren estrés osmótico y acumulan el mensajero tsw12 en ambos tipos de plantas, aunque la modulación cuantitativa a nivel de tejido parece ser distinta. En los tallos de plantas *RR*, la intensidad de la señal obtenida es similar a la existente en muestras de este mismo tejido tratadas con sal, mientras que en hojas este tratamiento produce elevados niveles de inducción, de un orden similar al detectado tras el tratamiento doble ABA/sal. Con respecto al comportamiento del mutante, la acumulación del mensajero tsw12 en las muestras de tallos es notable, superando a la determinada en el tratamiento con sal y al tratamiento conjunto ABA/sal. Esta acumulación supera incluso a la detectada en el silvestre.

En la autorradiografía procedente de las muestras de hojas silvestres, se detectan elevados niveles de acumulación del mensajero bajo este tratamiento, equiparables a los existentes durante el tratamiento doble ABA/ sal, revelándose el manitol como el máximo inductor de la expresión de este gen. En el mutante, se repite este patrón de acumulación aunque los niveles de acumulación son menores que con respecto al silvestre.

Los resultados obtenidos indican que:

- existe una respuesta al estrés osmótico-salino independiente del ABA.
- el gen Tsw 12 responde transcripcionalmente a aplicaciones exógenas de ABA pero no depende de la presencia de éste para su transcripción en condiciones de estrés osmótico.
- el ABA parece ser importante para la obtención de los niveles finales de transcrito, participando en la modulación cuantitativa de la transcripción. Por otra parte, otra interpretación posible es que existan al menos dos vías de inducción, una dependiente de ABA y otra independiente de ABA que opere en condiciones de estrés osmótico-salino.
- el ABA adicionado al medio induce la transcripción del gen Tsw12 en tejidos de hojas y tallos, por tanto, este compuesto (o la señal por él inducida) se transporta hasta estos tejidos desde las raíces. No obstante, la adición de ABA exógenamente no parece ser equivalente al incremento endógeno de la hormona en condiciones de estrés salino, como puede concluirse del efecto del tratamiento combinado ABA /NaCl en las plantas *flacca* y en plantas *RR*.

## 1.2. Hibridación *in situ* en plántulas de tomate

La hibridación *in situ* de secciones de tejidos y preparaciones celulares se ha convertido en uno de las estrategias más utilizadas para la localización de poblaciones de ARNs celulares (Langdale, 1993).

La detección del mensajero tsw12 se realizó sobre secciones de radículas, hipocótilos y cotiledones de plántulas de tomate de cinco días de edad incluidas en parafina. Se escogió este estadio porque el material es muy fácil de obtener e incluir y además, el mensajero tsw12 es muy abundante. Los cortes de 8  $\mu\text{m}$  se hibridaron con la cadena antisentido del cDNA tsw12 sintetizada mediante la enzima ARN polimerasa y marcada con digoxigenina. Como control, algunos cortes se hibridaron con la cadena codificante marcada del mismo modo.

Los resultados se muestran en la Figura 6. La señal obtenida se localiza principalmente en las células epidérmicas del hipocótilo y de los cotiledones. En experimentos de *tissue printing* (S. Torres, tesis doctoral), la proteína TSW12 se localizó en el tejido epidérmico y vascular de tallos y peciolo de planta adulta de tomate tratada con sal, no detectándose la proteína en las impresiones realizadas con secciones de plantas no tratadas. Es de notar la ausencia del mensajero tsw12 en el tejido vascular de plántulas de tomate. En las secciones correspondientes a radículas tampoco se detectó hibridación con la sonda antisentido (foto no mostrada).

**Figura 6.** Hibridación *in situ* realizada sobre cortes de 8  $\mu\text{m}$  de cotiledones (A) e hipocótilos (B) de plántulas de tomate utilizando como sonda la cadena antisentido del clon de cDNA del gen Tsw12 marcada con digoxigenina.

## 2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN Tsw12

El análisis de la expresión del mensajero tsw12 desveló un patrón complejo para este gen. Para realizar un estudio más detallado de la regulación de su expresión, se aisló el clon genómico correspondiente para así analizar y manipular aquellas regiones flanqueantes responsables de su patrón de expresión.

### 2.1. Aislamiento del gen Tsw12

El primer paso para la obtención de un clon genómico concreto consiste en la construcción de una genoteca en la que estén representadas todas las secuencias del genoma del organismo organizadas en fracciones discretas al azar.

Para la construcción de la genoteca, se eligió el bacteriófago lambda EMBL3 como vector que permite la sustitución de genes internos no esenciales por fragmentos de 15-20 Kb de ADN foráneo, en este caso, ADN de tomate.

El ADN de alto peso molecular extraído (> 200 Kb), se digirió parcialmente con la enzima de restricción Sau3A para obtener mayoritariamente fragmentos de 17-20 Kb e insertarlos en el vector. Se escogió esta enzima de restricción porque deja extremos compatibles con BamHI, (que corta en el sitio de clonaje del fago lambda EMBL3) y por su alta frecuencia de corte, ya que su diana de reconocimiento es de sólo cuatro nucleótidos.

Las alícuotas conteniendo el ADN digerido y fraccionado por tamaño en gradiente de sacarosa (según se detalla en el apartado 10. de Materiales y Métodos) se analizaron por gel de agarosa. Se eligieron las fracciones enriquecidas en fragmentos de 17-20 Kb y el ADN purificado de éstas se ligó con ADN de brazos del vector lambda EMBL3 cortados con BamHI (*Promega*). El producto de la ligación se empaquetó con extractos de empaquetamiento comerciales (*Gigapack Gold Stratagene*). Para la titulación de la genoteca, los recombinantes se crecieron en la cepa hospedadora permisiva KW12 (*Promega*). Se obtuvieron un total de 900.000 fagos recombinantes.

Se sembraron en placa 200.000 fagos y se transfirieron por duplicado a filtros de nitrocelulosa para ser hibridados con 1 µg de inserto tsw12 marcado radiactivamente. Cuatro halos de lisis hibridaron claramente con la sonda tsw12 y se purificaron hasta homogeneidad del resto por plaques e hibridaciones sucesivas. De los cuatro fagos purificados, uno de ellos resultó ser un artefacto; de los tres restantes, se eligió aquél cuya señal era más intensa para proseguir con su análisis. Este fago se denominó Tsw12-1.

## 2.2. Mapa de restricción del fago Tsw12-1

Para la caracterización del gen, es necesario delimitar el clon genómico dentro del fago hasta un tamaño manejable.

Uno de los inconvenientes de los fagos de la serie EMBL es la limitación del sitio de clonaje múltiple, con sólo tres dianas: EcoRI, BamHI y Sall (en este orden), lo cuál complica el análisis de los productos de restricción si se usan enzimas distintas.

En un análisis previo, se digirió ADN del fago Tsw12-1 con las enzimas BamHI, EcoRI, HindIII, PstI y Sall. Los fragmentos resultantes se analizaron por Southern utilizando la sonda tsw12. El resultado de esta hibridación se muestra en la Figura 7 y aporta la siguiente información:

- el gen Tsw12 está relativamente centrado dentro del fragmento de ADN clonado.

- Sall libera el inserto, que tiene un tamaño de aproximadamente 15 Kb.

- existe sólo una diana BamHI dentro del clon genómico que origina dos bandas por hibridación que tienen distinta intensidad. El cDNA tsw12 contiene una diana BamHI en el extremo 3'. Este dato sugiere que se trata probablemente del clon genómico correspondiente al cDNA previamente descrito y no a otro relacionado, también nos permite orientar el clon (5'->3').

La comprobación definitiva de que se trata del clon correspondiente al cDNA tsw12 se confirmará por la secuenciación de éste.

La digestión con la enzima de restricción EcoRI da lugar a una banda de 6.4 Kb que hibrida con la sonda tsw12, sin apreciarse ninguna otra banda adicional. Se aisló esta banda y se subclonó en el plásmido pBluescriptSK+ (pSK+) previamente digerido con EcoRI y desfosforilado.

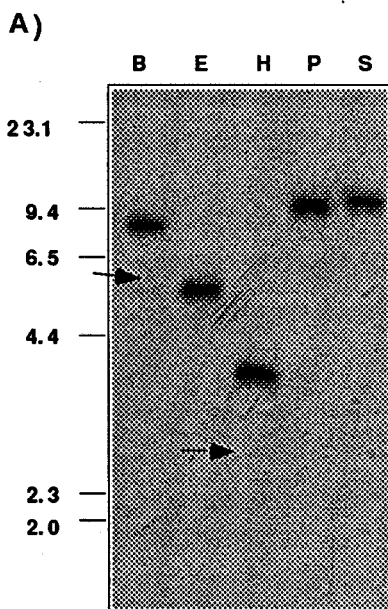
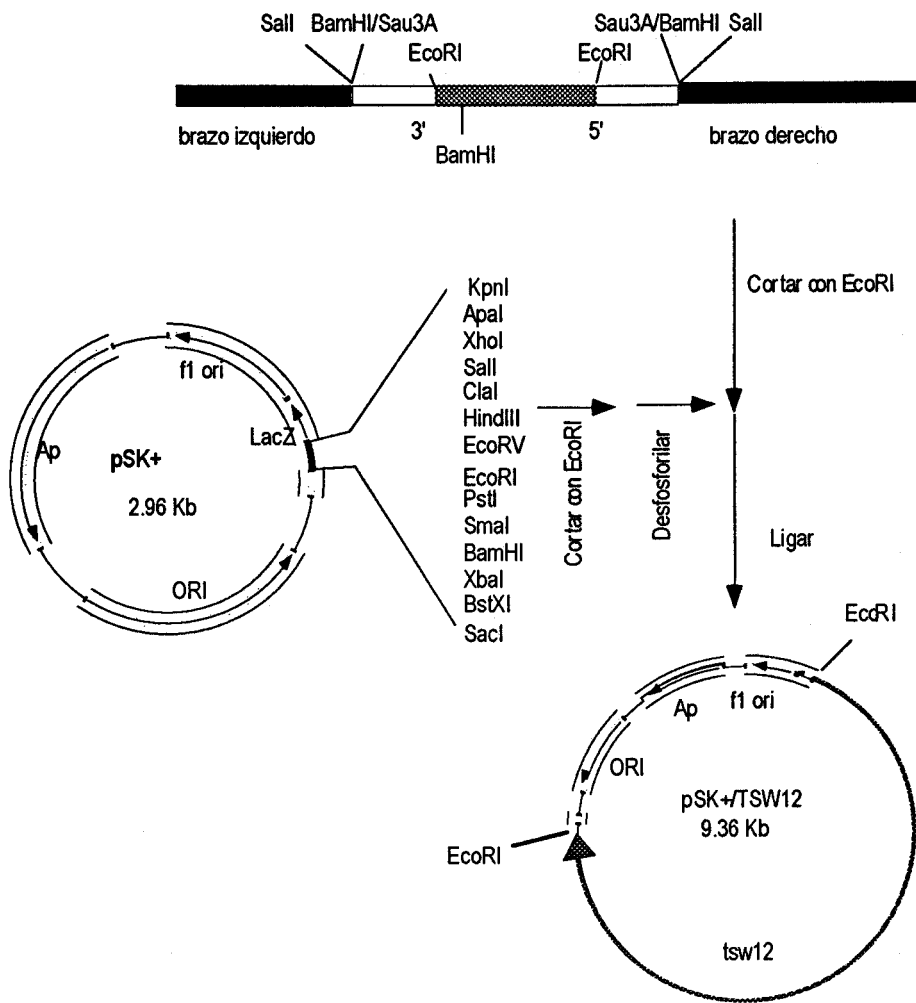


Figura 7. A) Análisis *Southern* del ADN del fago Tsw12-1 digerido con las enzimas de restricción BamHI (B), EcoRI (E), HindIII (H), PstI (P), y Sall (S), utilizando como sonda el inserto tsw12. Las flechas señalan fragmentos que hibridan débilmente que sólo son apreciables en la autorradiografía. En la parte izquierda de la figura se indican los marcadores de tamaño que corresponden a ADN del fago lambda digerido con HindIII +.



**Figura 7B** Organización del fago Tsw12-1 deducida del análisis Southern previo y clonación del fragmento EcoRI/EcoRI en el vector pSK

Para la obtención del mapa de restricción del fragmento de 6.4 Kb, el plásmido se digirió con las enzimas de restricción disponibles presentes en el sitio de clonación múltiple del plásmido; así mismo, el inserto purificado se digirió con otras enzimas diferentes. Los fragmentos resultantes se analizaron por Southern utilizando la sonda tsw12. Se subclonaron múltiples fragmentos, entre éstos, tres de los fragmentos originados por la digestión con XhoI de aproximadamente 3, 0.8 y 1.7 Kb, que hibridaban con la sonda. El fragmento de 0.8 Kb contenía la mayor parte de la secuencia codificante y los fragmentos de 3 y 1.7 Kb comprendían parte de la secuencia no codificante del cDNA junto con el promotor y la región genómica 3' respectivamente. El fragmento de 3 Kb (correspondiente en su mayor parte al promotor) contenía una diana EcoRV que originaba dos fragmentos de 1.7 y 1.3 Kb. El fragmento de 1.3 Kb del promotor originado por la digestión con EcoRV se utilizó para delimitar el extremo 5' del promotor Tsw12. La digestión del inserto de 6.4 kb

con EcoRV y con BamHI daba lugar a un fragmento de XX Kb que acotaba 1.2 Kb aproximadamente de la región promotora junto con la mayor parte de la región codificante. Este fragmento se subclonó en pSK digerido con SmaI y BamHI. Con la información obtenida, se pudo confeccionar un mapa de restricción bastante detallado del fragmento de 6.4 Kb. Algunos de los fragmentos subclonados se utilizaron para la obtención de la secuencia del clon.

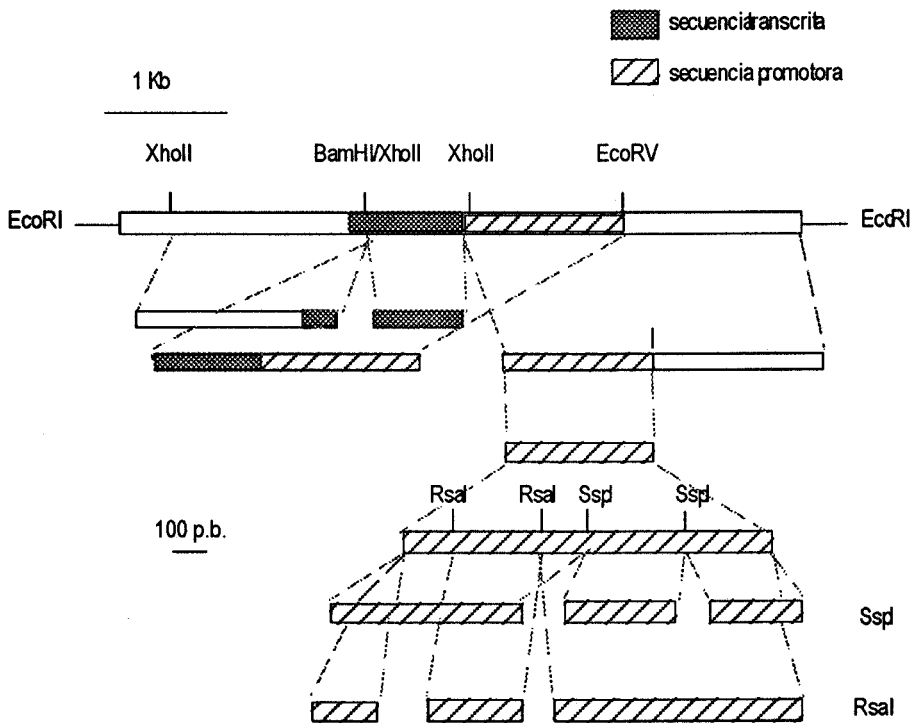


Figura 8 Mapa de restricción simplificado del inserto de 6.4 Kb y esquema de los subclonajes realizados.

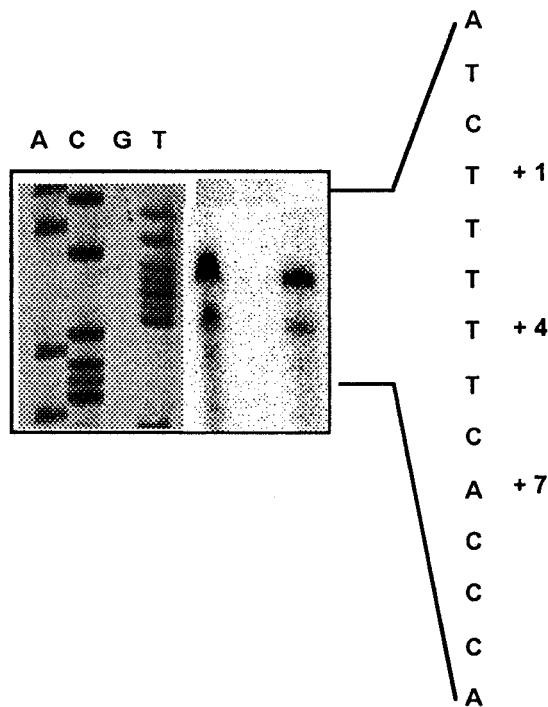
### 2.3. Secuencia de nucleótidos; determinación del inicio de transcripción y descripción de elementos reguladores del gen Tsw12

Para la obtención de la secuencia de nucleótidos, el proceso más rápido es la obtención de una serie de deleciones dirigidas y solapantes en ambos sentidos. En un principio, por problemas técnicos, este abordaje resultó infructuoso, por lo que se procedió a secuenciar distintos fragmentos subclonados. Posteriormente, se generaron deleciones y se secuenció la región promotora. La secuencia ha sido leída en ambas cadenas y la secuencia de las zonas de unión entre los distintos fragmentos se ha determinado, en algunos casos utilizando cebadores internos. En la Figura 9 se detalla la secuencia del clon Tsw12.

**Figura 9.** Secuencia del gen Tsw12.

Se han secuenciado 2.3 Kb. De éstas un 71.4% son A+T, mientras que el contenido de la región promotora asciende hasta un 76%. La región del intrón tiene casi el mismo contenido en A+T que la región codificante, 62.3% frente al 63%. Estos datos indican que el clon es rico en A+T. La distribución de estas bases dentro del promotor se organiza frecuentemente en trectos homogéneos de T y A.

Una vez secuenciado el clon, se determinó el inicio de transcripción. Dado que se conocía la secuencia del cDNA tsw12, se podía prever la región en la cuál se encontraría el inicio de transcripción. Se sintetizó un oligonucleótido de 25 bases de longitud cuya secuencia era 5' GCTAACCATTTCATATTGTTAATG 3' de la cadena no codificante; comprendía 9 bases de la secuencia traducida, el resto, correspondía a la región 5' no codificante del mensajero tsw12. Se marcaron radiactivamente 100 ng del oligonucleótido mediante la enzima T<sub>4</sub> polinucleótido kinasa y 5x10<sup>4</sup> c.p.m. se hibridaron con 40 µg de ARN total de plántulas de tomate, tejido en el que el mensajero del gen Tsw12 es muy abundante. Por medio de la enzima retrotranscriptasa se obtiene un híbrido cDNA-RNA cuya longitud se remonta hasta el inicio de transcripción o lo que es lo mismo, hasta la primera base del mensajero. El producto de la extensión se resolvió en un gel desnaturalizante de poliácridamida al 6% y se comparó con la secuencia del clon genómico obtenida utilizando el mismo *primer* o cebador.



**Figura 10.** Determinación, por *primer extension*, del origen de transcripción del gen Tsw12.

Se obtuvieron tres bandas que coincidían con los nucleótidos 1195, 1198 y 1201, de intensidad decreciente. El nucleótido 1195 se renumeró con la posición +1 ó primer



nucleótido que se transcribe. Es, por lo tanto el sitio donde comienza mayoritariamente la transcripción en las condiciones ensayadas. Se define como región promotora a la región que queda a la izquierda (a partir de ahora con numeración negativa).

En un estudio realizado con 79 genes de plantas con orígenes de transcripción conocidos, la transcripción se inicia en un residuo de Adenina que se halla dentro de la secuencia CTCATCA en el 85% de los casos, (Joshi, 1987).

CTC <u>A</u> TCA	consenso
TCC <u>A</u> TCA	LTP1 (Thoma et al.)
ATC <u>T</u> TT <u>T</u> TC <u>A</u> CCCA	TSW12

En este caso, la transcripción se inicia en dos residuos de Timina, la originada a partir de la Adenina es meramente residual. Las zonas flanqueantes a esta región rica en T presentan semejanza con las del consenso.

Para que la ARN polimerasa II pueda ocupar una posición correcta, los genes eucarióticos contienen una secuencia consenso bastante conservada en la posición -30 a la que se le ha dado el nombre de TATA box o caja TATA. En general, el segmento comprendido entre -110 hasta -40 contiene dos elementos llamados *primero* y *segundo* que son necesarios para la transcripción *in vivo* aunque el grado de conservación no sea tan estricto como en el caso de la TATA box. En muchos genes, una región rica en GC acompañando a la secuencia CAAT puede servir como uno de estos elementos.

En el gen Tsw12, la caja TATA comienza en el nucleótido -26. En la posición -40, se encuentra la secuencia CAAAT, que tiene bastante similitud con la caja CAAT, aunque el entorno no sea especialmente rico en GC. Una zona rica en GC en la posición -108 cuya secuencia es GTGCGGC, actuaría como *segundo* elemento. El inicio de traducción putativo, se encuentra en la posición +92.

Dentro del promotor existe una repetición perfecta de 18 pares de bases que comienza en los nucleótidos -402 y -368, cuya secuencia es CTCTATTTAAAAAAGAAT. Admitiendo un par de sustituciones, el número de nucleótidos que componen la secuencia repetida se ampliaría hasta 25 (con una similitud del 92%). Además, entre y detrás de estas repeticiones se encuentran las secuencias TTTCTTTTT y CTTTTCTTTTTTTT. Existen otras secuencias repetidas que se detallan a continuación;

-318 CCACATGA	-312	149 TGTCCAT	-142	-30 TCCTCT	-25
-299 CCACAAGA	292	-53 TGTCCAT	-46	-22 TCCTCT	-17
-76 ACCCCAA	-70	-80 TTTACCC	-73		
-19 ACCCCAA	-13	+3 TTTACCC	+10		

Comparando la secuencia del clon genómico del gen Tsw12 con la del cDNA previamente descrito, se comprobó que realmente se trataba del gen buscado, ya que la homología con la región codificante es del 100%. Esta homología sólo es interrumpida por un intrón de 266 pb de longitud que comienza en el nucleótido +428 y finaliza en el +694. El intrón está demarcado por los nucleótidos conservados 5' AG TG 3' que funcionan como sitio aceptor y donador respectivamente durante el proceso de maduración del ARNm. La disposición del intrón es similar a la de otros genes de PLTPs, generando un segundo exón que codifica para los dos aminoácidos terminales del extremo carboxilo de la proteína. La comparación de la región 3' no codificante del cDNA con la del clon genómico, sitúa el lugar de la poliadenilación del mensajero en el nucleótido +933. Sin embargo, la señal consenso de poliadenilación, AAUAAA, situada normalmente a unas 20 bases a la izquierda (upstream) de este sitio no se encuentra. Se ha descrito otra señal consenso en plantas para la poliadenilación TT(G/A)NNNTTTTTT, (Renan, 1987). Se buscó alguna secuencia que presentara algún grado de homología con los consensos descritos situada a una distancia adecuada del sitio de poliadenilación.

TTGATAATTTTT	a 21 pb del polyA
TTGTTTCTTTTTT	a 100 pb " "
AATCCAAT	a 34 pb " "

En función de la distancia y la homología, la secuencia situada a 21 pb es la que tiene mayor probabilidad de actuar como señal para la poliadenilación.

#### **2.4. Presencia de elementos reguladores descritos en otros promotores de genes regulados por estrés**

Se han descrito consensos de secuencias en promotores de genes de plantas que se expresan en condiciones de estrés que son reconocidas por factores de transcripción. Se ha buscado dentro del promotor del gen Tsw12 la presencia de secuencias homólogas a estas cajas, lo cuál no significa que estén necesariamente implicadas en la regulación de la transcripción en este caso concreto.

La transcripción del gen Tsw12 se activa por tratamientos exógenos con ABA. Por tanto, lo primero que se buscó una vez obtenida la secuencia del clon, fue la secuencia de posibles ABREs previamente descritas. No se ha encontrado ninguna secuencia homóloga a las ABREs Em1A, GGACACGTGGC (Marcotte et al., 1989), motivo I, CCGTACGTGGCGC (Mundy et al., 1990), hex-3, GGACGCGTGGC (Lam and Chua, 1991), SphI, TCCATGCATGCAC (Hattori et al., 1992) o la correspondiente al gen CDeT27-45, AAGCCCAAATTTACACAGCCCGATAACCG (Nelson et al., 1994).

Dentro de la secuencia promotora del gen Tsw12 se han encontrado secuencias que coinciden con el consenso de las cajas G (Ref.). Las cajas G se han localizado en promotores de genes que se expresan en distintas condiciones de estrés, (Referencias).

consenso la caja G		CACGTG
en el promotor TSW12	-673	CCTACGTGAA
	-612	ATGACGTTAG *
	-213	ATTACGTACT
	-89	TTTACGTAAT *
en el intrón	+412	TCCACGTATG
	+524	GATACGTTTA *
en la región 3' no transcrita	+105	ACAACGTGTA *

Las secuencias señaladas con un asterisco (\*) se en la cadena no codificante del clon Tsw12

El promotor de la  $\alpha$ -amilasa responde tanto al ABA como al ácido giberélico. Se ha descrito la posible participación de la secuencia TAACAA en la respuesta al ABA (Gubler and Jacobsen, 1992). Dentro del promotor Tsw12 de han encontrado secuencias similares a la secuencia TAACAA en las posiciones -1071, -1038, -588, -328, +92, +1064.

Otras secuencias implicadas en la interacción con factores de transcripción que modulan la actividad de promotores durante períodos de estrés osmótico o salino son las cajas DRE, Myb y las que operan en condiciones de bajas temperaturas. No se han encontrado secuencias homólogas o similares a la caja DRE TACCGACAT, (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994) ni al motivo TGCCGACA, presente en varios genes inducidos por ABA y por frío (Stokes et al., 1994; ref cor78).

El gen *Atmyb2* de *A. thaliana*, homólogo de la familia MYB, se regula por estrés hídrico, salino y por tratamiento con ABA, (Urao et al., 1993) y la proteína muestra especificidad de unión a la secuencia consenso myb. La relación de secuencias dentro del promotor Tsw12 que muestran similitud con este consenso es la siguiente;

consenso myb	C/T AAC G/T G
	-756 TAACTG
	-646 CTA CTG
	-616 TTACTG
	410 AA ACTG
	-286 GGCAAT
	-199 AA ACTG

Los consensos myc y myb fueron previamente identificados en el promotor del gen Bz1 de maíz (Roth et al., 1991). La disposición relativa entre las secuencias myb y myc es importante para que se pueda establecer una interacción entre los factores que las

reconocen. En la secuencia del promotor Tsw12 se encuentran así mismo secuencias homólogas al sitio de reconocimiento por factores de transcripción pertenecientes a la familia myc.

consenso myc  
en el promotor TSW12

NCANNTGN

-1053 ACAATTGA \*  
-813 ACATGTGT \*  
-880 ACAAATGT  
-505 ACATTTGT  
-318 CCACATGT

La secuencia TACP<sub>y</sub>AT está repetida en el promotor de la chalcona sintasa de *Petunia hybrida* dentro de la secuencia comprendida entre -67 y -53 (van der Meer et al., 1992). Esta secuencia controla la especificidad de expresión en los tejidos actuando como un módulo dominante negativo. En el gen Tsw12 se encuentra esta secuencia, TACTAT, en la región 5' no codificante en las posiciones +39 y +51. Solapando una base con la primera secuencia se encuentra la secuencia TACTCT, que muestra de similitud con el consenso.

estructura de la región:

TACTATTACTCTTTACTAT

## 2.5. Comparación con la secuencia de otras LTPs

El gen Le16 de tomate codifica una PLTP que tiene un patrón de expresión espacial muy similar al del gen Tsw12. Se induce también por desecación y responde al tratamiento exógeno con ABA, (Plant et al., 1991). La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de ambos clones de cDNA mostraba que la homología entre ambas proteínas desaparecía a partir del aminoácido 60 de la proteína madura, (concretamente pasaba de un 91% a un 8%). Por inserción de un nucleótido en esa posición, el grado de homología se restablecía hasta un 75%. Recientemente, los autores han corregido la secuencia del clon en la que efectivamente, faltaba un nucleótido (referencia libro verde). La comparación de las secuencias de los clones genómicos Le16 y Tsw12, confirmó que se trata de genes distintos pertenecientes a la misma familia multigénica. Las regiones que tienen mayor homología se reducen al transcrito, tanto en las regiones codificantes como en las no codificantes. La homología entre los promotores e intrones de ambos genes no es llamativa, aunque existen algunas regiones conservadas. La relación de estas secuencias se detalla más abajo. El alineamiento de secuencias se llevó a cabo mediante el método Martinez/Needleman-Wunsch. Es interesante destacar que las secuencias

homólogas se encuentran localizadas en posiciones similares a partir de la posición -550 en ambos genes.

Tsw12	-911	AC-CGTTAAACTCATTTTTAA
Le16	-628	ACACCTTAAACTCATTTTTAA
Tsw12	-721	TCCAATTT
Le16	-557	TCCAATTT
Tsw12	-497	CATTTGTTT
Le16	-530	CATTTGTTT
Tsw12	-393	TGACTT
Le16	-421	TGACTT
Tsw12	-371	TTACTCTACTTTA- - - AATAACC
Le16	-387	TTACTCTT-TTTA- - - - - AATAACC
Tsw12	-193	TTTGTGAAGCGAAGG
Le16	-177	TTTGTGGATTG--GG
Tsw12	-128	TGACTTTATAAC-C
Le16	-108	TGACTTTATA-CTC
Tsw12	-93	CACCCCAAC
Le16	-75	C-TCCCAAC
Tsw12	+64	TCCTCTCTAT
Le16	-40	TCCTCTCTAT
Tsw12	-8	CTCACTATCTTTTTACACC
Le16	-25	CTCACTAGCTTTTACACC

La secuencia descrita en el promotor de la chalcona sintetasa que controla la especificidad de tejido, TACPyAT (van der Meer et al., 1992) mencionada en el apartado anterior, se encuentra también en el promotor Le16 en las posiciones -506, -313 y +21.

La posición del intrón en ambos genes es idéntica, aunque tienen distintos tamaños. En ambos casos ocupan una posición 3' terminal definiendo dos exones de 112 y 2 aminoácidos. El intrón del gen Tsw12 consta de 266 pares de bases, mientras que el del gen Le16 tiene sólo 157. La diferencia de tamaño entre ambos es de 109 pares de bases.

El promotor del gen Ltp1 de *Arabidopsis* presenta cierta homología en pequeñas secuencias conservadas en los promotores de los genes implicados en la ruta de los fenilpropanoides denominadas cajas I, II y III (Thoma et al., 1994). En el promotor Tsw12 se

han encontrado secuencias similares a dos de estas cajas. No se han encontrado estas cajas en el promotor Le16.

Consenso caja I	A/TCTCACCTACCA/C
secuencias presentes en Ltp1	-314 ACACACCTATAA
	-58 ACGTACCTACTC
en Tsw12	-67 TC_CACCTAACTC

Consenso caja II	C/T CAAC A/C AACC A/C A
secuencia presente en Ltp1	-110 CCAACCACCAAC
secuencia presente en Tsw12	-848 TCAACACAAACG
	-326 ACAACTTCCCAC
	-72 CCAACATCCACC

Recientemente se han aislado cuatro clones genómicos homólogos denominados Wax9(A, B C y D respectivamente) correspondientes a LTPs en bróccoli (Pyee and Kolattukudy, 1995). Tras comparar las regiones promotoras, se identificaron segmentos homólogos conservados situados en las 200 pares de bases contiguas al inicio de transcripción. Estas cajas conservadas no se mantienen en la secuencia promotora del gen Tsw12.

También se han encontrado secuencias homólogas a los consensos de reconocimiento de los factores de transcripción myb y myc en dos promotores de PLTPs de cebada (Linnestad et al., 1991; Kalla et al., 1994). Como se describió previamente, la distancia entre ambas secuencias es crucial para la interacción entre estos factores. En el caso del gen Bz1, la distancia es de 7 nucleótidos, en el de Ltp1 y Ltp2 es de 39 y 16 respectivamente. La separación entre estas secuencias en el promotor del gen Tsw12 es mayor que la descrita en estos promotores, por tanto, parece improbable que estos factores pudieran actuar de forma cooperativa (en el caso de que participaran en la regulación de este gen).

### 3. ESTUDIO DE LA REGULACION TRANSCRIPCIONAL DEL GEN Tsw12

La especificidad de la expresión génica está determinada por las regiones reguladoras. Generalmente, las regiones que modulan la actividad del complejo transcripcional se encuentran en la región del promotor, aunque se han descrito genes que contienen secuencias reguladoras en intrones (Ref), en las regiones 3' no codificantes (Ref) e incluso en la región 5' no codificante (Ref), aunque en este último caso, las zonas reguladoras están implicadas principalmente en procesos post-

transcripcionales, procurando una mayor estabilidad del mensajero, o una traducción más efectiva de éste.

En organismos complejos, la estrategia óptima para determinar qué elementos en *cis* son importantes para regulación de la expresión de un gen son los análisis mutacionales. Consiste en aislar el gen, mutarlo *in vitro* y transferirlo posteriormente al organismo del que procede, en este caso, la planta. La mutagénesis realizada en este trabajo ha consistido en la construcción de genes quiméricos que contienen la región promotora del gen Tsw12 fusionada al gen informador de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) (Jefferson et al., 1986). Se han realizado fusiones traduccionales y transcripcionales del promotor Tsw12 con el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa. Se han transfectado protoplastos de tabaco, bombardeado plantas de tomate y transformado plantas de tabaco de forma estable con las construcciones quiméricas.

### 3.1. Construcción de genes quiméricos: promotor Tsw12/ $\beta$ -glucuronidasa

#### 3.1.1. Fusión traduccional

Todas las PLTPs descritas contienen un péptido señal constituido por residuos mayoritariamente hidrofóbicos (von Heijne, 1983) mediante el cuál se traslocan al retículo endoplásmico cotraduccionalmente (S. Madrid, 1991; Bernhard et al., 1991). La inclusión del péptido señal en la construcción del gen quimérico permitiría determinar el compartimento celular al que se secretaría la proteína híbrida mediante la detección de la actividad GUS. La actividad GUS puede ser detectada en tejidos y en células por observación directa o bien en cortes finos al microscopio óptico; la detección en estructuras u orgánulos subcelulares requiere la obtención de cortes ultrafinos (50-250 nm) y la observación al microscopio electrónico.

El fragmento -1194/+197 del clon genómico Tsw12, de extremos HindIII/NlaIV que contenía el promotor, los 23 aminoácidos que forman parte del péptido señal y 11 aminoácidos de la proteína madura TSW12, se subclonó en el vector pBI101.1 digerido con HindIII y SmaI y desfosforilado.

En la figura 11 se esquematiza la clonación realizada. Los plásmidos de la serie pBI101, derivados del vector binario pBIN19, contienen la región codificante del gen GUS, el terminador de la nopalina sintetasa y un sitio de clonación múltiple a la izquierda del inicio de traducción del gen GUS. Las tres versiones del plásmido incorporan cada diana en una fase distinta de lectura, lo cuál permite la clonación de promotores que aporten su propio inicio de traducción.

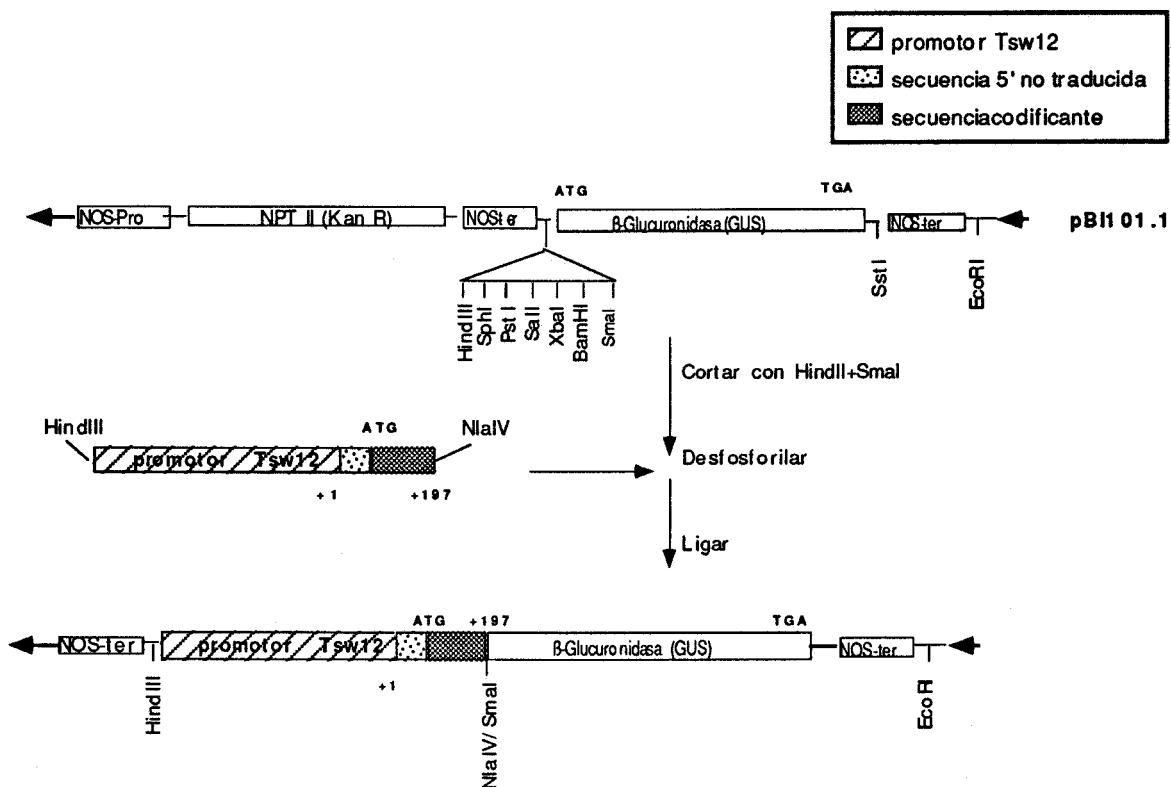


Figura 11. Clonación traduccional del promotor Tsw12 (-1194/+197) en el vector pBI101.1.

De las múltiples colonias transformantes analizadas, sólo una de ellas contenía el inserto de aproximadamente 3.6 Kb liberado por la digestión con EcoRI y HindIII. Mediante secuenciación, utilizando como cebador el oligonucleótido GUS, se corroboró la identidad del transformante y que la fase de lectura de la proteína híbrida TSW12::GUS era correcta. La secuencia del oligonucleótido era 5' XXXXX3' y correspondía a los nucleótidos (x) e (y) de la cadena no codificante del gen GUS. Esta construcción se utilizó para la transformación estable de plantas de tabaco.

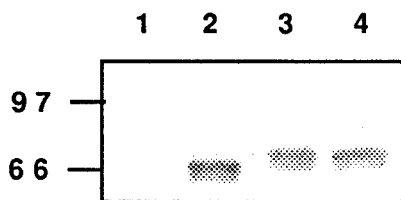
El vector binario portador de la fusión traduccional se transformó en *A. tumefaciens* siguiendo el método de congelación-descongelación (Höfgen and Willmitzer, 1988). La presencia del plásmido y del fragmento clonado se verificó por digestión con HindIII y EcoRI del ADN purificado y se confirmó por Southern utilizando la sonda GUS. Se escogió uno de los transformantes para la transformación de los discos de hoja de tabaco. Se traspasaron a medio de enraizamiento unos 30 explantes verdes y bien formados. El número de loci Tsw12:GUS integrados por genoma de planta se detectó por Southern en 12 de las plantas que enraizaron en presencia de kanamicina.



Se realizó un ensayo preliminar para determinar la actividad GUS dirigida por el promotor Tsw12. El ensayo consistía en poner en contacto las hojas a través de los peciolo con una solución Hoagland a la que se había adicionado 15 g/l de NaCl. En ninguno de los extractos proteicos de las hojas y los peciolo incubados con el sustrato MUG se detectó actividad fluorimétrica debida a la actividad enzimática de la proteína GUS.

Cabía la posibilidad de que el gen estuviera integrado pero que no se expresara; para determinarlo, se resolvieron 30 µg de extracto proteico de hojas y peciolo tratadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 8% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Como control positivo, se resolvieron en el mismo gel extractos de proteínas de hojas de plantas transformadas con el promotor del virus del mosaico de la coliflor fusionado al gen GUS (CaMV35S:GUS), y como control negativo, extractos de plantas sin transformar. La membrana se incubó con suero de conejo que contenía anticuerpos frente a la proteína GUS (*Clontech, Inc., Palo Alto, Calif.*) y se reveló con anticuerpos anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina. El resultado se muestra en la Figura 12. El anticuerpo antiGUS reacciona específicamente con una proteína presente en todos los extractos excepto en el procedente de plantas no transformadas. La movilidad de la proteína de fusión TSW12:GUS está retardada con respecto a la proteína GUS. La proteína de fusión madura difiere de la proteína GUS en 17 aminoácidos, 11 de ellos procedentes de la proteína TSW12 y los 6 restantes de la traducción en fase del sitio de clonaje múltiple. El incremento en el peso molecular de la proteína es de 1.7 kDa, lo cuál parece insuficiente para justificar esta diferencia en la movilidad.

El péptido señal de la proteína TSW12 transloca la proteína híbrida TSW12::GUS al sistema de endomembranas, dónde se N-glicosila. Esta modificación supone un incremento en la masa molecular de aproximadamente 2 kDa con respecto a la proteína GUS citoplásmica, es decir sin péptido señal (Farrel and Beachy, 1990). Por otra parte, la pérdida de actividad enzimática observada también es atribuible a la N- glicosilación de la proteína GUS (Iturriaga et al., 1989).



**Figura 12.** Análisis de los extractos proteicos procedentes de plantas de tabaco control (1), transformadas con el control positivo, 35CaMV:GUS (2), y transformadas con la fusión traduccional Tsw12/GUS (3) y (4) transferidos a filtro e incubados con anticuerpos específicos antiGUS.

Para la determinación del compartimento subcelular al que se secretaba la proteína híbrida, se inmunolocalizó ésta mediante técnicas de microscopía electrónica en cortes ultrafinos de tallos de plantas de tabaco transformadas con la fusión traduccional. Previamente, se determinó mediante impresiones de tallos y peciolo sobre membranas de nitrocelulosa (tissue printing) en qué tejidos se expresaba el gen quimérico Tsw12:Gus. Esta técnica se basa en la adsorción de proteínas al filtro de nitrocelulosa por presión de secciones de tejidos sobre ésta, obteniéndose una imagen estable y fiel de la superficie del corte (Cassab y Varner, 1987). Las plantas transgénicas de tabaco, crecidas en medio Hoagland, se trataron durante 24 h con 15 g/l de NaCl. Las secciones se incubaron y se revelaron con el mismo anticuerpo primario y secundario que se utilizaron en el western anterior.

La señal aparecía en la epidermis y en el tejido vascular, como se puede apreciar en la Figura 13 aunque se detectaba fondo inespecífico, debido a la presencia de pigmentos que adquirieron una tonalidad similar a las del producto de reacción de la fosfatasa alcalina durante las sucesivas incubaciones.

Mediante esta técnica se obtuvo la primera evidencia de la actividad el promotor Tsw12 en plantas de tabaco y de la especificidad de la expresión en tejidos de tallos, concretamente en células de tejido vascular y epidérmico.

**Figura 13.** Impresiones sobre nitrocelulosa de tallos de plantas de tabaco silvestres (1) y transformadas con el promotor Tsw12/GUS (2), procesadas con anticuerpos específicos antiGUS.

Para la localización subcelular se realizaron cortes ultrafinos sobre tejidos de tallos de plantas tratadas con 15 g/l de NaCl y plantas no tratadas. La Figura 14 muestra los resultados obtenidos. La proteína híbrida se localiza mayoritariamente en la pared celular de las células de los vasos del floema. Esto implica que el péptido señal y los 11 primeros aminoácidos de la proteína madura TSW12 son suficientes para dirigir el tráfico de la proteína híbrida TSW12::GUS hacia la pared celular. En los cortes de plantas tratadas se encuentra una mayor densidad de partículas de oro por unidad de superficie frente a los de plantas no tratadas, por tanto, el promotor tiene capacidad de respuesta al tratamiento salino.

**Figura 14.** Micrografía electrónica de células de los vasos del floema de plantas de tabaco transformadas con el promotor Tsw12/GUS en condiciones control (C) o tratadas con 15 g/l NaCl (S).

### 3.1.2. Fusión transcripcional

La fusión transcripcional se planteó como alternativa a la fusión traduccional dada la inactividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa. En este caso se clonó la secuencia codificante del gen GUS frente a la región promotora y parte de la región 5' no codificante del gen Tsw 12. La traducción, por tanto, se inicia a partir del ATG del gen Gus.

Como se ha mencionado previamente, se ha descrito la presencia de elementos reguladores en la región 5' no codificante de varios genes (Ref). En esta construcción se ha intentado mantener la región comprendida entre el inicio de transcripción y traducción de forma que los niveles de proteína, si estuvieran condicionados por esta región, fueran lo más aproximado cuantitativamente a los del gen Tsw12 intacto. Gracias al experimento por *primer extension* se conocía el punto de inicio de la transcripción, y por lo tanto el tamaño y el mapa de restricción de la región 5' no codificante del mensajero. Como todas las enzimas que cortan en esta región, lo hacen al menos una vez más en el promotor, no se podían utilizar.

Entre las alternativas posibles, se escogió la obtención de una deleción de aproximadamente 150 pb del fragmento HindIII/ NlaIV (-1194/+197) desde el extremo 3' mediante la enzima ExoIII, (este fragmento, subclonado en pSK se utilizó para la realización de la fusión traduccional, como se detalla en la Figura 11). 10  $\mu$ g de plásmido se cortaron primero con la enzima BstXI (que deja extremos 3' prominentes), después con EcoRI (que deja extremos 5' prominentes), quedando en el extremo 3' la diana SacI para liberar posteriormente los fragmentos delecionados. La velocidad teórica de corte de la Exo III llevando a cabo la reacción a 25 °C y 75 mM de NaCl es de 40 pb/min. Se tomaron alícuotas de la reacción en estas condiciones a distintos tiempos de incubación y parte de éstas se resolvieron en gel de agarosa para determinar el tamaño de los fragmentos originados. Los productos delecionados se ligaron y con ellos se transformaron bacterias XL1-Blue.

Se hicieron midipreparaciones de ADN de dos colonias de cada uno de los cuatro primeros tiempos de incubación para determinar, por secuenciación utilizando el oligo M13 reverse (*Promega*), en qué nucleótido comenzaba cada deleción. La velocidad media de corte de la ExoIII resultó ser de 33 nucleótidos por min. La única deleción válida obtenida fue una de las correspondientes a la alícuota tomada después de cuatro minutos de incubación con la ExoIII; esta deleción empezaba en el nucleótido +64. Sin embargo, esta deleción resultó inservible, ya que se formó un nuevo ATG en el cuál la A y la T eran aportadas por el extremo de la deleción y la G era el resto de la diana de restricción BstXI tras el tratamiento con la nucleasa S<sub>1</sub>.

Se sembraron más colonias de los tiempos correspondientes a 4 y 5 min. Se analizaron por secuenciación 25 colonias, de las cuales 18 resultaron ser distintas. Sólo en dos de ellas comenzaba la deleción dentro de la región del transcrito 5' no codificante. Se escogió la que empezaba en el nucleótido +76, (la otra empezaba en el +78). La deleción obtenida se cortó en el extremo 3' con SacI, que deja extremos 3' prominentes, se trató con la polimerasa del fago T<sub>4</sub> para dejar los extremos romos y se liberó el fragmento

cortando en el extremo 5' con HindIII. Este fragmento se subclonó en el vector pBlueGus digerido previamente con las enzimas SmaI y HindIII y desfosforilado. Este vector es una modificación del plásmido pSK- que contiene el gen de la β-glucuronidasa y el terminador de la octopina sintetasa subclonados en el sitio SmaI (cedido por T. Martín). El proceso se esquematiza en la Figura 15.

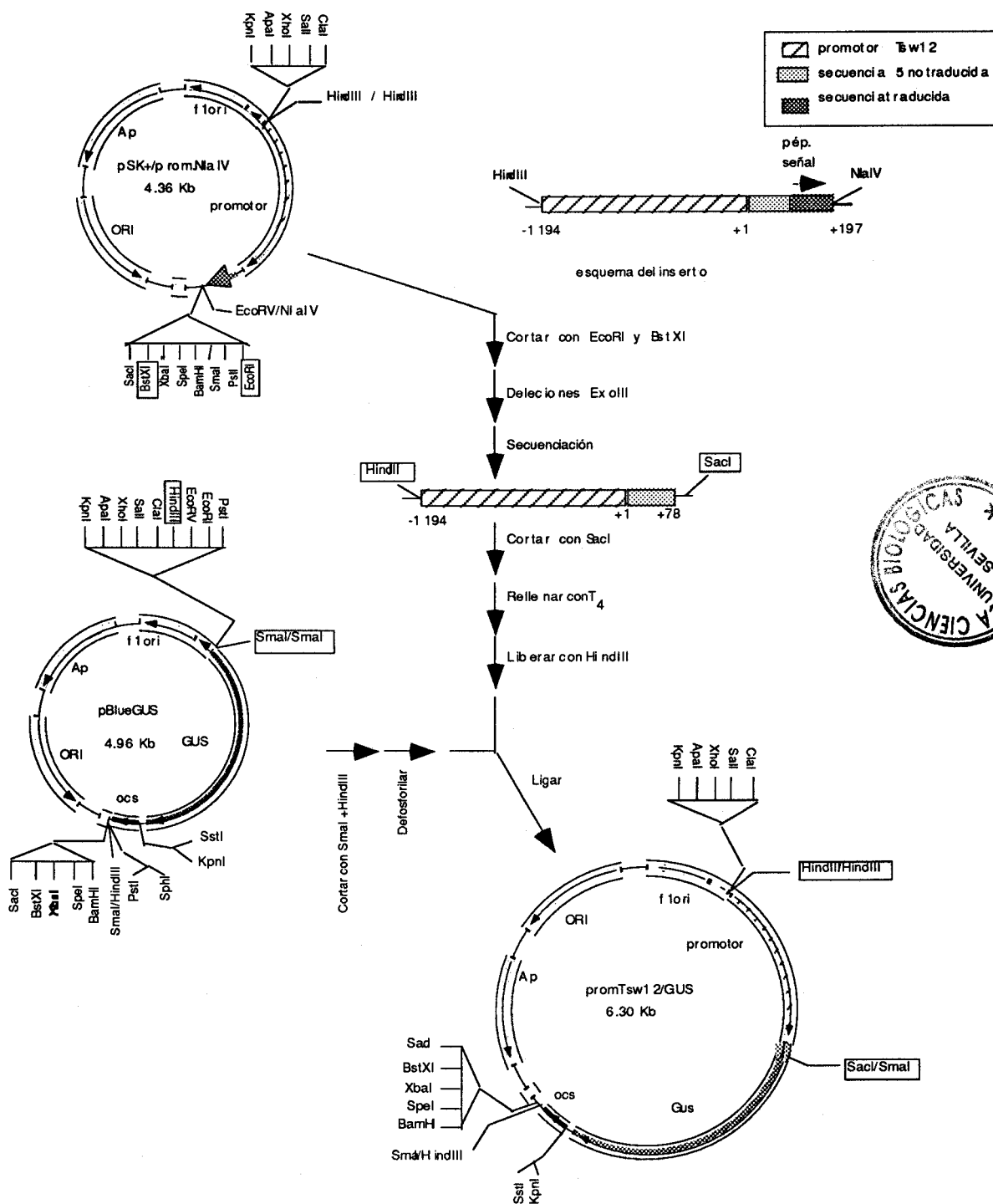


Figura 15. Obtención del fragmento -1194/+76 del promotor Tsw12 y clonación en el vector pBlueGus

Esta construcción intermedia era necesaria porque se requería la existencia de un juego de dianas de restricción apropiado para realizar posteriormente deleciones desde el extremo 5' del promotor; una vez realizadas éstas, se utilizarían directamente estas construcciones para los experimentos de expresión transitoria.

Se secuenciaron los plásmidos procedentes de tres colonias utilizando un oligonucleótido interno de la  $\beta$ -glucuronidasa y todas las construcciones resultaron ser correctas.

La fusión transcripcional realizada tenía una región 5' no codificante de 97 nucleótidos, sólo 3 nucleótidos más que la secuencia original del gen Tsw12. De los 97, 76 correspondían al gen Tsw12, 4 eran restos de los sitios de restricción y el resto correspondían a la región 5' no codificante del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa.

### 3.1.3. Obtención de versiones delecionadas del promotor Tsw12

A continuación se realizaron deleciones desde el extremo 5' del promotor para llevar a cabo los estudios funcionales del promotor. El plásmido pBlueGus conteniendo la fusión transcripcional se preparó con las enzimas *Apal* y *XhoI* para tratarlo con *ExoIII*. Para obtener fragmentos que difirieran entre sí aproximadamente 200 pb, se mantuvieron las condiciones de sal y temperatura empleadas en el experimento anterior y se prolongó el tiempo de incubación. Además se llevaron dos series de deleciones en paralelo empleando en cada una distinto número de unidades de *ExoIII*.

La determinación de la longitud de las deleciones se realizó mediante ensayos de PCR, (ver materiales y métodos, sección 7.1.), empleando los oligos M13 y GUS. La resolución en gel de agarosa de los tamaños de los fragmentos de las deleciones amplificados por PCR se muestra en la Figura 16.

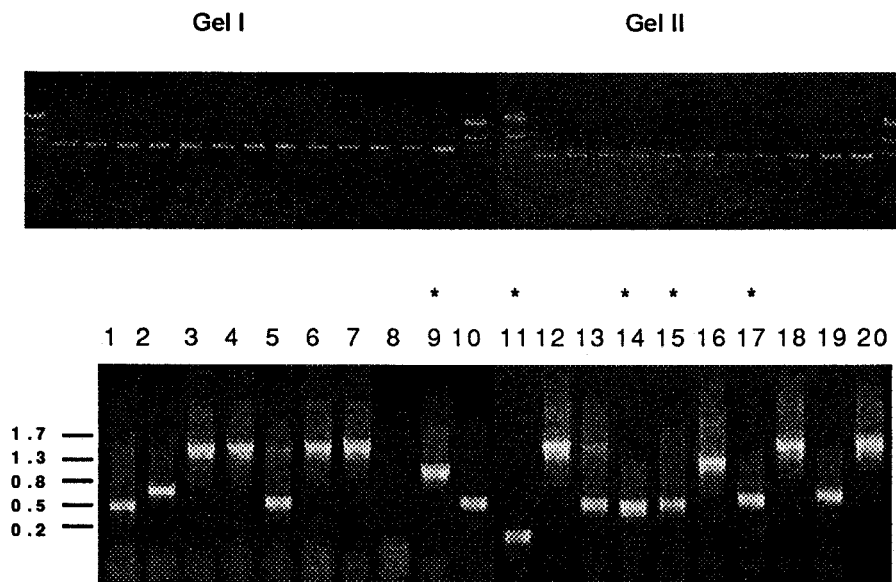
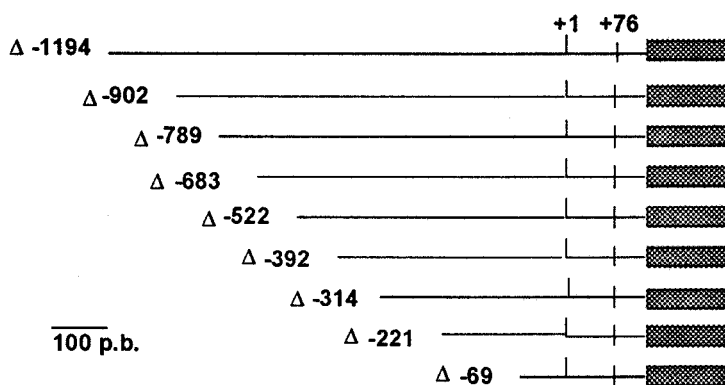


Figura 16. A) Gel de agarosa en el que se han resuelto las deleciones originadas por la enzima *ExoIII* desde el extremo 5' de la construcción transcripcional  $\Delta$ -1194, B) Detección del tamaño de las deleciones mediante PCR.

Se secuenciaron los plásmidos procedentes de las colonias 5, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18 y 20 utilizando el oligo M13. Se escogieron las colonias 9, 10, 11, 14 y 17 en las cuáles las deleciones comenzaban en los nucleótidos -902, -392, -69, -314 y -522 respectivamente. En una segunda ronda se escogieron otras deleciones que empezaban en los nucleótidos -221, -789 y -683. Se contaba también con la construcción original -1194 no delecionada. Estas construcciones estaban ya preparadas para los ensayos de expresión transitoria. A partir de ahora, nos referiremos a estas construcciones como  $\Delta$ -1194,  $\Delta$ -902,  $\Delta$ -789,  $\Delta$ -683,  $\Delta$ -522,  $\Delta$ -392,  $\Delta$ -314,  $\Delta$ -221,  $\Delta$ -69.



**Figura 17.** Esquema de las deleciones del promotor  $\Delta$ -1194 seleccionadas para realizar los experimentos de expresión transitoria.

## 3.2. Expresión transitoria

### 3.2.1. Expresión transitoria en protoplastos de mesófilo de hoja de tabaco

La transformación de protoplastos es la forma más rápida de detectar la actividad de un promotor, aunque este sistema tiene bastantes limitaciones; es semicuantitativo y no puede detectar la especificidad de tejido. En el caso concreto del gen Tsw12, la información a obtener estaba limitada *a priori* por la imposibilidad de inducir los protoplastos con NaCl, agente inductor de la expresión del mensajero tsw 12 (Torres-Schumann et al., 1992). Los objetivos de este experimento se centraron en determinar si la fusión transcripcional era activa e intentar dilucidar el papel del ABA en la expresión del promotor.

La transfección de protoplastos de mesófilo de hoja de tabaco se ha realizado siguiendo dos métodos distintos, mediante PEG y por electroporación (proceso descrito en materiales y métodos, sección 16.). En cada evento de transformación se incluyeron como control positivo el plásmido 35SCaMV:Gus y como control negativo, el plásmido pSK; así mismo, como control de la preparación de protoplastos y de la reacción fluorimétrica, se incluyeron un par de muestras sin transformar.

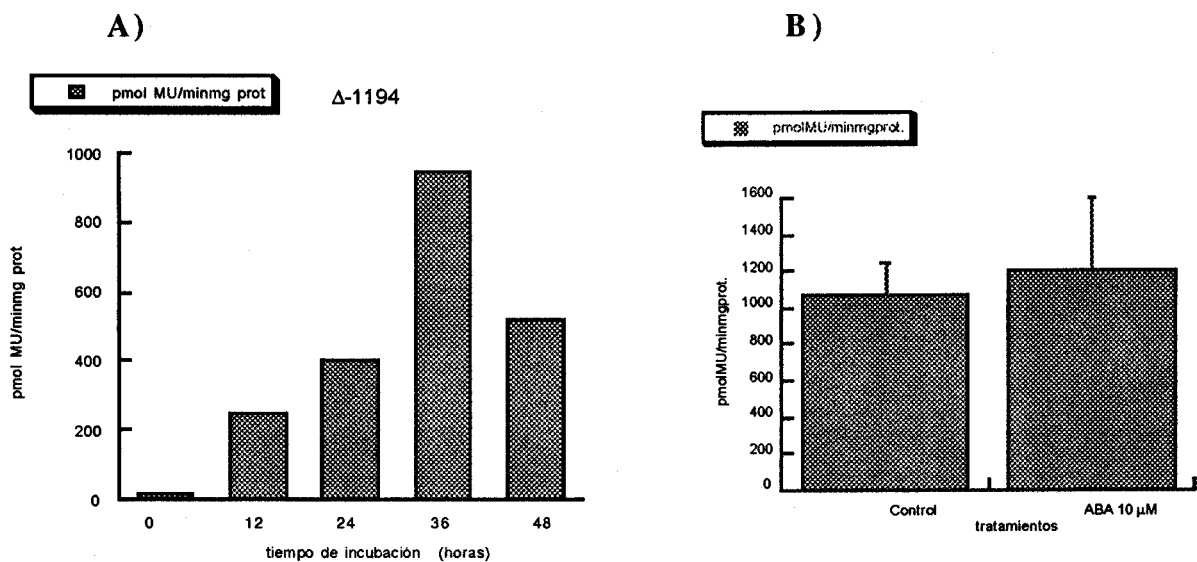
La construcción traduccional descrita en la Figura 11 se liberó del plásmido pBI101.1 por digestión con las enzimas HindIII y EcoRI y se subclonó en pSK para realizar los experimentos de expresión transitoria. La actividad fluorimétrica detectada en los ensayos realizados con extractos de protoplastos transformados con la construcción traduccional fue similar a la registrada en el control sin transformar. Las causas de la inactividad de esta construcción se discutieron previamente.

Se utilizó la construcción  $\Delta$ -1194 para determinar la actividad de la fusión transcripcional. Los ensayos de actividad fluorimétrica registraron medidas positivas de fluorescencia con respecto al control sin transformar, por tanto, la fusión transcripcional era activa en condiciones control. Para optimizar el tiempo de incubación de las muestras, se determinó la cinética de expresión del gen transformado y se recogieron las muestras transformadas a las 12, 24, 36 y 48 h de incubación. La actividad máxima se detectó a las 36 h y decrecía a partir de este tiempo, como se observa en la Figura 18-A. Este experimento se repitió dos veces y en todas las ocasiones se llevó cada muestra por duplicado.

Una vez optimizadas las condiciones de expresión, se incubaron los protoplastos transformados con la construcción  $\Delta$ -1194 en ausencia y en presencia de ABA 10  $\mu$ M. La media de las actividades GUS obtenidas en cinco experimentos independientes en los cuales cada muestra estaba representada por duplicado o triplicado se detalla en la Figura 18-B. No existe o no se ha podido apreciar en las muestras tratadas con ABA un incremento adicional significativo y repetitivo en la actividad GUS cuantificada.

La ausencia de inducción adicional en las muestras tratadas con ABA puede deberse a que las concentraciones utilizadas (10  $\mu$ M) fueran insuficientes para la inducción de la expresión o, que dado que las condiciones osmóticas de experimentación representan de por sí estrés, lo que se mide en realidad son los niveles máximos de inducción en estas condiciones.





**Figura 18.** Actividad GUS registrada en extractos proteicos de protoplastos de tabaco transformados con la construcción  $\Delta$ -1194. **A)** Actividad GUS en protoplastos Control y a distintos tiempos de incubación **B)** suplementados con ABA.

### 3.2.2. Experimentos de bombardeo de partículas

La ventaja que tiene este sistema con respecto al anterior es que permite determinar la expresión de las construcciones en tejidos diferenciados de la misma especie. Los resultados obtenidos son cualitativos y permiten establecer *de visu* qué construcciones son más o menos activas. El sistema de cuantificación utilizado, aunque aproximado fue el conteo del número de impactos por muestra que no tiene en cuenta la intensidad de éstos. Lo óptimo es la cotransformación de cada muestra con cantidades fijas de ADN de otra construcción que contenga un gen fácilmente cuantificable, como la luciferasa, para determinar la eficiencia de cada disparo. Cuando se llevaron a cabo estos experimentos, se carecía de la infraestructura necesaria para la realización de estos controles, por esta razón no se incluyeron.

#### 3.2.2.1. Bombardeo sobre plántulas de tomate. Señales implicadas en la germinación

Se utilizaron plántulas de tomate de cinco días de edad. Unas cincuenta plántulas por muestra se colocaron sobre un disco de papel *Whatmann* de 5 cm de diámetro empapado en agua en el centro de una caja Petri. Las variables a controlar en el disparo, presión y dispersión de las partículas fueron previamente puestas a punto para estas muestras. El nivel 3 de distancia de la muestra al foco del disparo daba una dispersión óptima en

combinación con la membrana de 100 Pps de resistencia. Cada muestra se bombardeó dos veces. A continuación, las plántulas se incubaban a 25 °C en oscuridad durante 36 h sobre papel de filtro empapado en agua. Para la detección cromogénica, se cortaban primero las radículas de las plántulas y se incubaban en tampón X-Gluc durante una noche a 37 °C con agitación leve.

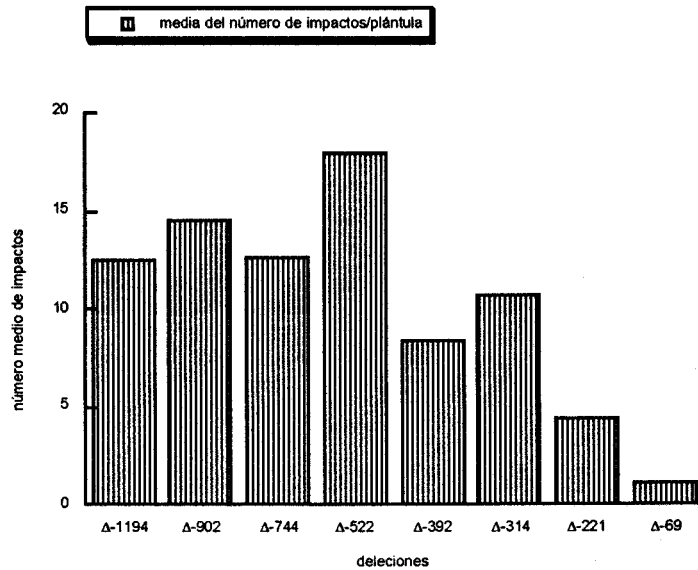
Se analizaron las construcciones  $\Delta$ -1194,  $\Delta$ -902,  $\Delta$ -744,  $\Delta$ -522,  $\Delta$ -392,  $\Delta$ -314,  $\Delta$ -221, y  $\Delta$ -69. Como control positivo y negativo se utilizaron los plásmidos 35SCaMV:Gus y pSK+ respectivamente.

En la Figura 19, se puede observar el aspecto de una plántula bombardeada con la construcción  $\Delta$ -1194. La actividad GUS más intensa se encuentra en el tercio superior de la plántula; en cuanto al número de impactos que registran actividad, el número es aproximadamente el mismo tanto en cotiledones como en el gancho o *hook* de la parte superior de hipocótilo, si bien la intensidad y tamaño de cada impacto son mayores en este último tejido. En los dos tercios restantes del hipocótilo, los impactos registrados son ocasionales y de menor intensidad. En ninguna de las radículas examinadas se encontró rastro alguno de actividad GUS.

**Figura 19.** A) Actividad del promotor Tsw12 en plántulas de tomate bombardeadas con la construcción  $\Delta$ -1194 ; esquema de una plántula señalando las regiones con actividad GUS más intensa. B) Vista en conjunto de las plántulas bombardeadas con las distintas delecciones, C) Actividad de las delecciones  $\Delta$ -314,  $\Delta$ -221 y  $\Delta$ -69 en plántulas de tomate.

El objeto de utilizar las delecciones de la construcción transcripcional era determinar qué regiones del promotor eran importantes para conferir el patrón característico durante la germinación. En todas las construcciones bombardeadas se ha observado el mismo patrón cualitativo, excepto en la delección  $\Delta$ -69, en la que el número de impactos que presentaban actividad GUS era muy pequeño y la intensidad del color muy débil, equiparable a la muestra bombardeada con el promotor mínimo del -70 35SCaMV:Gus.

Se han detectado diferencias cuantitativas entre el resto de las delecciones, debidas seguramente a la existencia de elementos potenciadores de la expresión. En la Figura 20 se representa la media del número de impactos por muestra.



**Figura 20.** Número medio de impactos que presentaban actividad GUS en plántulas de tomate bombardeadas con las distintas delecciones del promotor Tsw12.

### 3.2.2.2. Bombardeo sobre hoja adulta de tomate. Respuesta a la sal

Este experimento se realizó utilizando las condiciones descritas en el apartado anterior. Las hojas jóvenes de tomate se recolectaban inmediatamente antes de la sesión de disparos y se disponían de forma que la superficie a bombardear fuera el envés, ya que en esta cara la cutícula es menos gruesa. Una vez disparadas las muestras, se incubaban en cajas Petri tapizadas con papel de filtro embebido en agua y en 10 g/l de sal. Las hojas se colocaban cuidadosamente con el haz hacia arriba y con el peciolo en contacto con el papel de filtro.

Se utilizaron las mismas construcciones que en los bombardeos realizados sobre plántulas. Como se puede observar en la Figura 21, la construcción Δ-1194 presenta un comportamiento análogo al del mensajero tsw12 (Torres-Schumann et al., 1992). En las hojas incubadas en condiciones control no existe expresión o ésta es muy débil, mientras que las incubadas con sal presentan actividad GUS. Este patrón se mantiene en las delecciones Δ-902 y Δ-744. A partir de la delección Δ-522, existe actividad GUS en la hoja

control aunque el número de impactos que presentan actividad GUS (así como la intensidad de éstos) sigue siendo mayor en hojas tratadas con sal.

La actividad GUS en hojas bombardeadas con la construcción  $\Delta$ -314 y tratadas con sal, es muy intensa. Los puntos azules se localizan mayoritariamente en el nervio central y en las nerviaciones secundarias de la hoja, como puede comprobarse en la Figura 21. La actividad GUS detectada en las hojas bombardeadas con la construcción  $\Delta$ -221 desciende notablemente aunque aún parece detectarse se detecta un incremento, aunque leve, de la actividad GUS en las hojas tratadas con sal frente a las hojas incubadas con agua. La muestra bombardeada con la delección  $\Delta$ -69 carece totalmente de actividad GUS tanto en las hojas control como tratadas con sal. Los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente y en cada uno se dispararon todas las muestras en una misma sesión.

**Figura 21.** Actividad GUS en hojas adultas de tomate control (C) ó tratadas con 10 g/l de NaCl (S) bombardeadas con las construcciones  $\Delta$ -1194 (1),  $\Delta$ -314 (2),  $\Delta$ -221 (3) y  $\Delta$ -69 (4).

Los resultados obtenidos por bombardeo sobre plántulas y hojas de tomate indican que:

- la fusión transcripcional es activa tanto en plántulas como en hojas de tomate.
- la actividad del promotor se concentra en el tercio superior del eje de la plántula, fundamentalmente en el gancho del hipocótilo y en los cotiledones.
- la delección  $\Delta$ -221 contiene las señales necesarias para conferir a las plántulas el mismo patrón espacial que la construcción  $\Delta$ -1194 en las muestras ensayadas.
- entre las delecciones  $\Delta$ -314 y  $\Delta$ -221 existen probablemente secuencias que modulan positivamente la transcripción del gen Tsw12 en plántulas y hojas adultas de tomate. Entre las delecciones  $\Delta$ -392 y  $\Delta$ -314 existen indicios de la existencia de secuencias que regulan positivamente la expresión en plántulas de tomate.
- el promotor clonado contiene los elementos necesarios para la respuesta a la sal en hoja adulta de tomate.
- la delección  $\Delta$ -221 sigue manteniendo la capacidad de respuesta a la sal, por tanto, en la secuencia comprendida entre la delección -221 y -69 podrían encontrarse al menos parte de los elementos *cis* mínimos necesarios para interaccionar con los factores de transcripción responsables de conferir esta expresión.

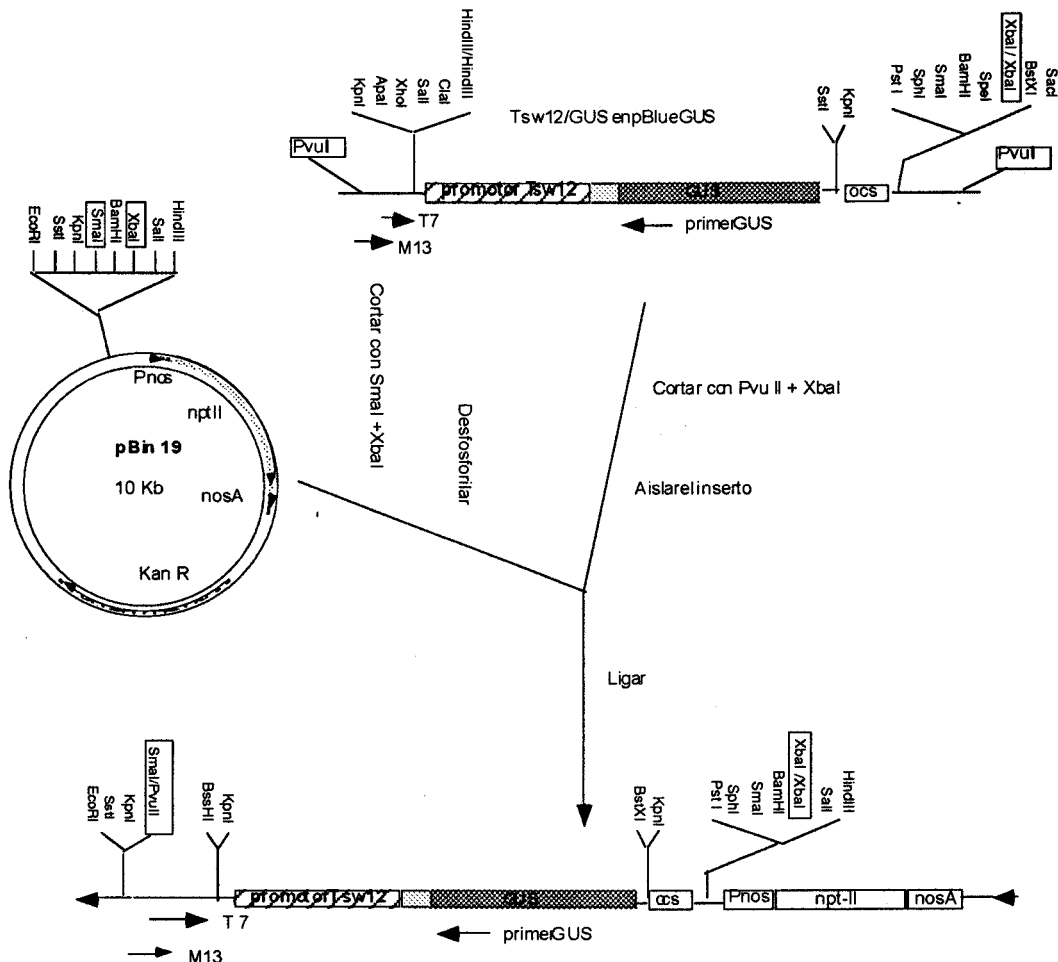
### 3.3. EXPRESION ESPACIAL Y TEMPORAL DEL PROMOTOR

#### 3.3.1. Transformación estable de plantas de tabaco

Con la información obtenida en los experimentos de expresión transitoria se seleccionaron las construcciones  $\Delta$ -1194,  $\Delta$ -522,  $\Delta$ -314,  $\Delta$ -221 y  $\Delta$ -69 en pBlueGus para subclonaras en el vector binario pBin 19 (Bevan, 1984), que permite la introducción de ADN exógeno en el genoma de plantas. En este caso, la transformación se realizó en tabaco. Para facilitar el seguimiento del trabajo, se va a mantener la nomenclatura de las construcciones.

Para la clonación de los fragmentos, se digirieron primero los plásmidos con la enzima PvuII que corta a ambos lados del sitio de clonación múltiple del plásmido pSK+ y después con la enzima XbaI que tenía una diana de reconocimiento en el resto del sitio de clonación múltiple del extremo 3', tras el terminador OCS. Los insertos resultantes se aislaron y se subclonaron en el plásmido pBin19 previamente digerido con las enzimas SmaI y XbaI y desfosforilado. Este proceso se esquematiza en la figura 22.

Figura 22. Esquema de la clonación de las fusiones transcricionales del promotor Tsw12/GUS en el vector pBin19.

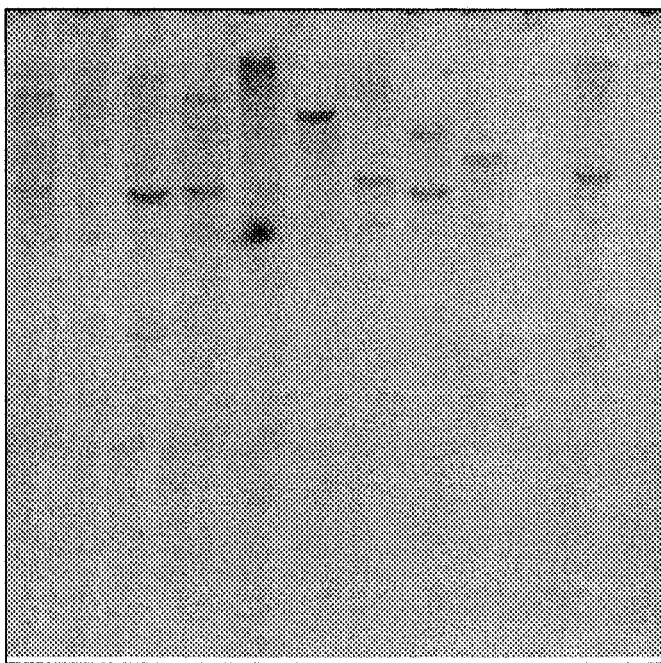


La mezcla de ligación se transformó en la bacteria *E. coli* XL-1 Blue competente. Se picaron cuatro colonias resistentes a kanamicina por cada construcción y se detectó la presencia de los fragmentos mediante la amplificación por PCR de la región comprendida entre la región promotora y la región 5' de la  $\beta$ -glucuronidasa utilizando para ello los oligos M13 y GUS. Aparte, se verificó la presencia del inserto completo (excepto el terminador OCS) mediante la obtención de minipreparaciones de ADN y su posterior digestión con KpnI. Los plásmidos que cumplieron todos los requisitos anteriores se transformaron en *Agrobacterium tumefaciens* competentes, y los transformantes se seleccionaron en presencia de kanamicina y estreptomycin. La presencia del plásmido se comprobó digiriendo minipreparaciones de ADN de al menos tres colonias por construcción con XbaI y EcoRI y los fragmentos resultantes se analizaron por Southern hibridando con la sonda GUS. De las colonias analizadas que contenían el plásmido se eligió un representante de cada deleción para la transformación de los discos de hoja.

Se pasaron a medio de enraizamiento al menos 30 tallos bien formados y verdes por cada construcción. De las plantas que enraizaron en presencia de kanamicina, se pasaron 15 a tierra y posteriormente se analizó por Southern hibridando con la sonda Gus el número de integraciones que había por genomio de planta. Este dato se constató posteriormente mediante el test de segregación de la F<sub>1</sub> durante la germinación en medio con kanamicina. Aquellas plantas cuya F<sub>1</sub> se ajustaba a la proporción 3:1 (viables/no viables), se seleccionaban como portadoras de una sola integración. Se ha escogido el Southern realizado con las plantas transformadas con la deleción  $\Delta$ -1194 (Figura 23) para ilustrar el proceso general realizado con todas plantas transformadas con el resto de las construcciones.

\* \* \* \* \*

10 9 5 14 11 7 8 6 12 4 2 C



**Figura 23.** Southern genómico realizado con ADN total digerido con EcoRI de 12 plantas transgénicas de tabaco transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194, hibridando con la sonda Gus. Se escogieron las plantas señaladas con un asterisco en la figura.

**3.3.2. Análisis cuantitativo**

### **3.3.2. Análisis cuantitativo de la expresión en tejido vegetativo. Respuesta a NaCl y ABA**

#### **3.3.2.1. Plantas transformadas con el promotor completo**

Se establecieron dos criterios para la selección de las plantas que portaban el fragmento de -1194 pb, por una parte, el número de integraciones por genomio de planta, y por otra, la capacidad de respuesta al choque salino. Esta cualidad se determinó en un ensayo GUS preliminar en el cual dos hojas de cada planta transgénica se ponían en contacto con solución Hoagland con y sin 10 g/l NaCl respectivamente.

Se escogieron cinco transformantes independientes que respondían diferencialmente a la sal, de los cuales, cuatro portaban una sola copia, y uno, dos copias. No se encontró diferencia entre el nivel de expresión de esta última planta y las restantes. Todos los ensayos se han realizado con los cinco transformantes, con plantas de tabaco sin transformar, como control negativo y con plantas transformadas con la construcción 35SCaMV:GUS como control positivo.

Para determinar la capacidad de respuesta de los transformantes escogidos al ABA y al estrés salino-osmótico, las plantas se crecieron hidropónicamente y cuando tenían cinco nudos de tamaño se trataron durante 24 h con 15 g/l NaCl, 100  $\mu$ M ABA, 15 g/l NaCl+100  $\mu$ M ABA y 400 mM manitol. Como control, se mantuvo una serie de plantas sin tratar. Se recolectó el material discriminando entre raíz, tallo, hoja y peciolo de los nudos 1 y 4.

Para la realización del ensayo de fluorescencia, se ensayó la misma cantidad de extracto proteico de cada muestra frente al sustrato MUG tomando tres tiempos de incubación a 37 °C; 0, 15 y 60 min.

En la Figura 24 se representa el promedio de la actividad GUS obtenida en los cinco transformantes en cada tejido. La actividad se expresa en picomoles de 4-metilumberyl obtenidos por minuto de incubación y por mg de extracto de proteína ensayada. Las secciones correspondientes al nudo superior se expresan como 1 y las correspondientes al nudo inferior como 2.

La fusión transcripcional  $\Delta$ -1194 es activa en tejido vegetativo de plantas de tabaco. Se observa que existe actividad en todos los tratamientos realizados, incluso en plantas no tratadas (aunque menos). Los experimentos de expresión transitoria realizados en tomate con esta construcción concuerdan con el patrón de acumulación del mensajero tsw12. Por lo tanto, la represión de la expresión que se da en condiciones control en tomate, no se respeta en tabaco.

A)

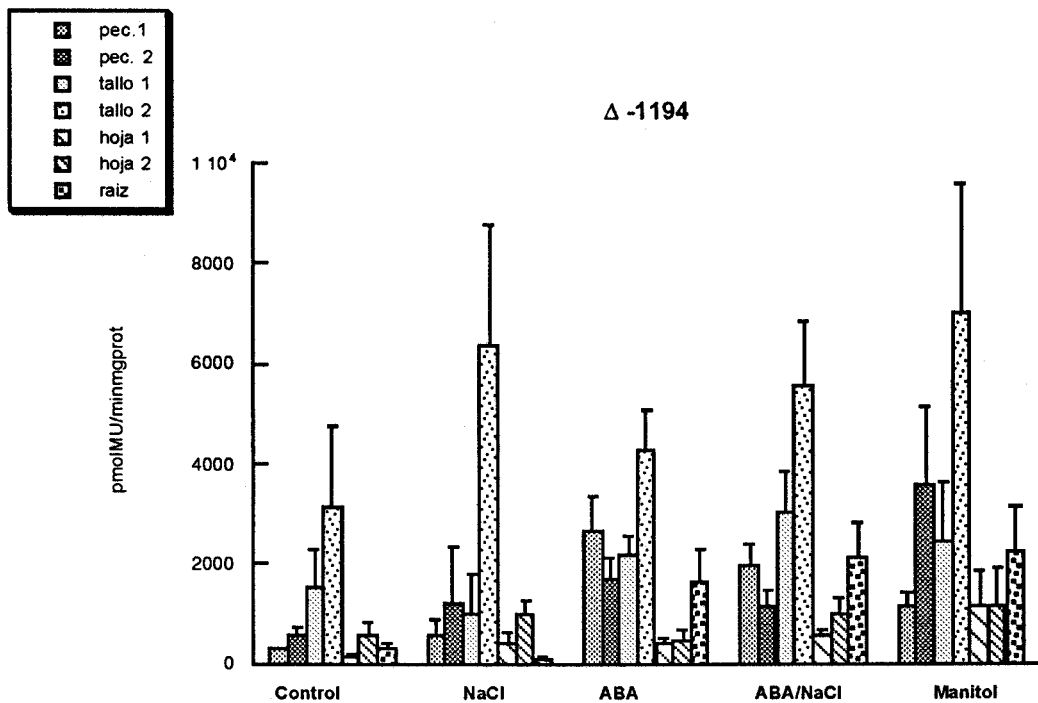


Figura 24. A) Actividad GUS presente en los extractos de plantas transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194. B) Relación entre los niveles de actividad existentes en situación control y bajo los distintos tratamientos.

B)

	sal/cont.	ABA/cont.	ABAsal/cont.	manitol/cont.
pec. 1	2.1	9.8	7.2	4.3
pec. 2	2.0	2.85	2.0	6.0
tallo 1	0.65	1.4	1.95	1.6
tallo 2	2.0	1.4	1.75	2.2
hoja 1	2.5	2.4	3.5	7.0
hoja 2	1.7	0.8	1.6	2.0
raíz	0.4	6.0	7.5	8.2

Con respecto al efecto de los tratamientos, se observa un aumento de la actividad GUS en todos los tejidos ensayados, con excepción de la sección superior del tallo tratada con 15 g/l NaCl donde hay una disminución con respecto al control.

La relación de la actividad existente en los distintos tejidos de plantas tratadas con respecto a plantas control se representa en la Figura 24 B. Constituyen los valores netos de inducción de la expresión del promotor bajo los tratamientos realizados.

En peciolo, los niveles máximos de inducción con respecto al control se alcanzan las sección 1 ó apical de plantas tratadas con ABA y con NaCl+ ABA (9.8x y 7.2x respectivamente). En las secciones basales de estas plantas la inducción es similar a la



registrada en plantas tratadas con NaCl, y es del orden de 2x. La expresión en plantas tratadas con manitol aumenta 4.3x en la sección apical y 6x en la basal con respecto al control. En este tejido, los máximos valores absolutos de actividad se han detectado en las secciones basales tratadas con manitol.

En tallos, la inducción neta es bastante similar en todos los tratamientos y secciones y se sitúa en torno a 2x, excepto en la sección apical de plantas tratadas con sal, como se señaló previamente. Los máximos valores absolutos obtenidos en este tejido corresponden a las secciones basales de plantas tratadas con manitol y con NaCl.

En hojas, la inducción neta es mayor en las secciones apicales que en las basales oscilando entre 2.5-2.4x en los tratamientos con NaCl y ABA respectivamente y hasta 7x con manitol.

Hay que destacar la presencia de actividad GUS en extractos proteicos de raíces, teniendo en cuenta la ausencia o mínima representación del mensajero tsw12 en raíces de tomate en todas las condiciones testadas. Tal como se representa en la Figura 24, existe una inducción de la actividad del promotor en este tejido en todos los tratamientos con respecto a las plantas control, excepto en el tratamiento salino.

Tanto en las plantas control como en las tratadas con NaCl y manitol existe un gradiente pronunciado en la actividad del promotor dentro de la planta. La actividad GUS es más elevada en las secciones basales que en las apicales. La relación de la expresión entre las secciones basales y apicales se muestra en la Figura 25. La mayor diferencia existe dentro de los tejidos de tallos tratados con sal, donde alcanza un valor de 6.3x frente a 2x en control y en los tratamientos con ABA, ABA/sal y 2.8x con manitol. La diferencia de expresión entre las secciones de los tejidos procedentes de plantas tratadas con ABA se hace menos acusada. Esta relación a favor de la sección basal se mantiene también en las hojas y peciolo excepto en las muestras tratadas con ABA y ABA/sal, dónde la relación se invierte.

	pec. 2/pec. 1	tallo 2/tallo 1	hoja 2/hoja 1
Control	2.2	2.0	3.6
NaCl	2.0	6.3	2.5
ABA	0.6	2.0	1.3
ABA/NaCl	0.6	1.8	1.7
Manitol	3.0	2.8	1.0

**Figura 25.** Relación entre las actividades GUS detectadas en las secciones apicales y basales en cada tejido.

En las secciones basales de tallo es dónde se localiza mayor actividad. En la Figura 26, extraída de la gráfica general, se puede observar más claramente las diferencias de actividad existentes entre las dos secciones de tallos.

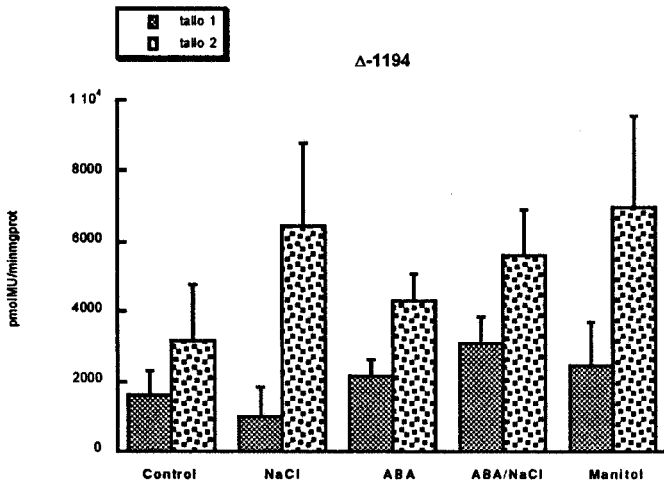


Figura 26. Actividad GUS en tallos de plantas  $\Delta$ -1194.

En los estudios de expresión del mensajero *tsw12* en plantas de tomate realizados inicialmente (Torres-Schumann et al., 1992), no se discriminó entre distintas secciones de la planta. Para comparar los resultados obtenidos con los previos, se representó la media de las actividades detectadas en las dos secciones de tallos. La representación de los valores resultantes se pueden observar en la Figura 27. El comportamiento de las plantas transgénicas frente al tratamiento con sal y ABA se puede correlacionar con la acumulación del mensajero *tsw12* en plantas de tomate, aunque con algunas excepciones.

El tratamiento doble ABA+ NaCl incrementa la actividad del promotor con respecto a los tratamientos simples, mientras que el ABA (100  $\mu$ M) activa el promotor en menor medida que el NaCl. El manitol se destaca como principal inductor global de la expresión siendo ligeramente superior al del tratamiento doble ABA/sal.

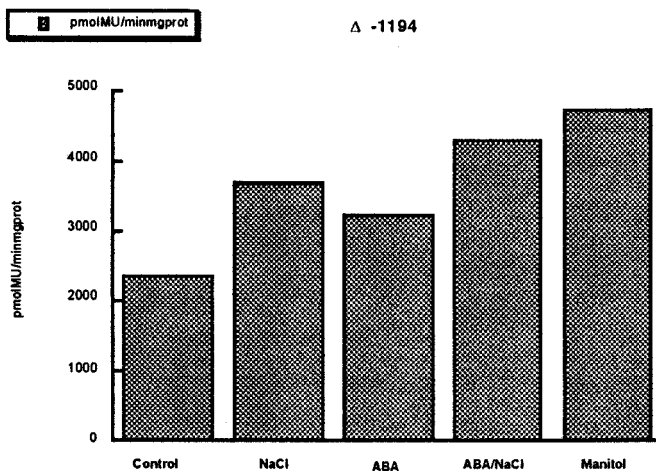


Figura 27. Media de la actividad GUS detectada en las secciones basales y apicales de tallos de las plantas transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194.

### 3.3.2.2. Plantas transformadas con las deleciones del promotor

Se seleccionaron plantas transformadas que contenían una sola copia integrada para realizar los ensayos de cuantificación de la actividad fluorimétrica. No se realizó en esta ocasión un ensayo preliminar para determinar la respuesta frente a la sal, ya que se desconocía si las deleciones mantendrían dicha capacidad de respuesta. Para paliar los posibles efectos posicionales se aumentó el número de transformantes de cada deleción utilizados en cada ensayo.

Dado que en los ensayos realizados con la construcción  $\Delta$ -1194 la actividad resultó ser más elevada en la sección basal de las plantas, para el análisis de las deleciones sólo se recogieron muestras de tallo, hoja y peciolo basales y de raíz. Se midió la actividad de las plantas transgénicas en condiciones control, y tratadas con 15 g/l NaCl y 100  $\mu$ M ABA.

#### - Caracterización de la deleción $\Delta$ -522

Se utilizaron en un primer ensayo seis transformantes independientes que portaban una sola integración del gen quimérico. En ninguno de los tejidos y en ninguno de los tratamientos se detectó actividad GUS por encima de la obtenida con extractos proteicos de plantas de tabaco no transformadas. Se aumentó el número de plantas hasta doce. De las seis nuevas plantas, cuatro tenían dos integraciones y las dos restantes tres. En la repetición de los ensayos, en sólo una de las plantas se registró una mínima actividad. Teniendo en cuenta el número de plantas ensayadas y que esta planta contenía más de una integración, es probable que la escasa actividad determinada se debiera a un efecto posicional.

Los resultados obtenidos con estos transformantes no encajan con los obtenidos en los experimentos de bombardeo de partículas con esta misma deleción en plántulas y hojas de tomate. Volviendo a la Figura 20, se puede observar que el número de impactos registrado en las plántulas bombardeadas con la deleción -522 es mayor que el cuantificado por bombardeo con la construcción  $\Delta$ -1194 y que las hojas de planta adulta de tomate bombardeadas con esta construcción también exhiben actividad GUS. Este resultado indicaría la presencia de secuencias activadoras de la transcripción en el fragmento comprendido entre las deleciones -744 y -522. Es probable que esta región se comporte en un sistema heterólogo como represor en lugar de potenciador, como lo hace en el sistema homólogo.

## - Caracterización de la delección -314

Se seleccionaron siete plantas transformantes independientes, de las cuales una de ellas portaba dos copias mientras que las restantes sólo una. Dos de los transformantes no mostraban actividad, por lo que los experimentos se realizaron con cinco plantas.

En la Figura 28-A se representa la actividad GUS cuantificada en los distintos tejidos en condiciones control y estresadas con 15 g/l NaCl y 100  $\mu$ M ABA. Hay una reducción de los niveles de expresión con respecto a la construcción  $\Delta$ -1194.

Se detecta un incremento de la expresión en las plantas sometidas a ambos tratamientos. Este incremento es observable en todos los tejidos, exceptuando el caso concreto de la raíz tratada con sal. Los valores netos de inducción se representan en la Figura 28-B.

A)

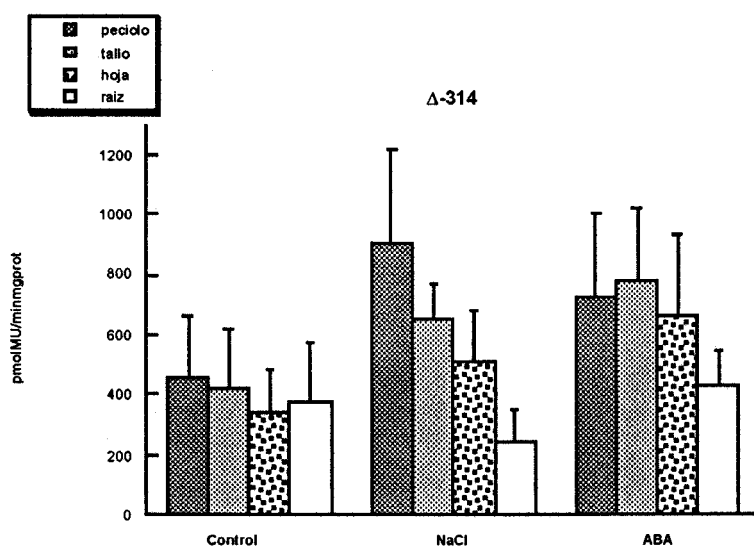


Figura 28. A) Actividad GUS en extractos de plantas transformadas con la delección  $\Delta$ -314. B) valores netos de inducción de la actividad GUS en las plantas  $\Delta$ -314 tratadas frente a plantas no tratadas.

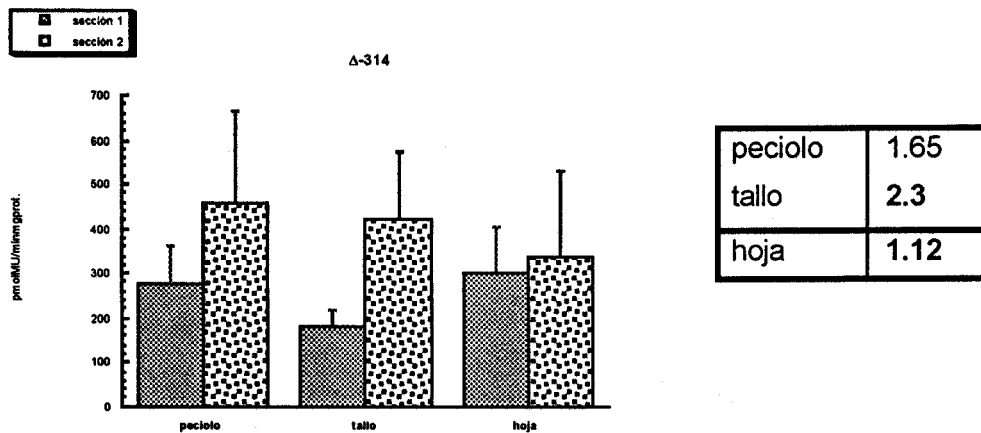
B)

	NaCl/cont.	ABA/cont.
petiolo	2.0	1.6
tallo	1.53	1.85
hoja	1.5	1.96
raíz	0.63	1.15

Según lo expuesto anteriormente, la delección  $\Delta$ -314 del promotor Tsw12 conserva la capacidad de activar la transcripción del gen GUS en condiciones control y de incrementarla en presencia de NaCl y ABA (a las concentraciones probadas). Esto implica

que al menos parte de las secuencias en *cis* mínimas necesarias para llevar a cabo este proceso se localizan en este fragmento del promotor Tsw12.

Por otra parte, en plantas no tratadas, se discriminó entre las secciones 1 y 4 de tallos, hojas y peciolo. La representación de los valores correspondientes a las actividades cuantificadas se muestran en la Figura 29-A, y la relación existente entre ambas secciones en la Figura 29-B. La expresión se sigue concentrando en las secciones basales frente a las apicales. Esta delección mantiene el gradiente de expresión observado previamente en plantas transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194.

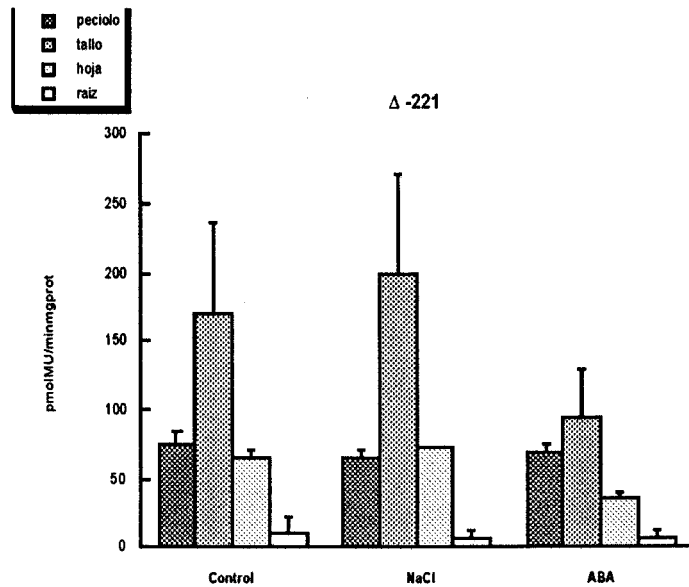


**Figura 29. A)** Actividad GUS en las secciones basales y apicales de plantas transformadas con la delección  $\Delta$ -314 en condiciones control. **B)** Relación entre la actividad detectada en las secciones basales y apicales.

### - Caracterización de la delección $\Delta$ -221

Los ensayos de actividad con esta construcción se han realizado con ocho transformantes independientes que portaban seis de ellos una integración, mientras que los dos restantes, dos.

En la Figura 30-A se representan los niveles de actividad de las plantas en condiciones control y tratadas con sal y ABA. Los valores netos de inducción se pueden apreciar en la Figura 30-B.



A) Actividad GUS en extractos de plantas transformadas con la delección  $\Delta$ -221. B) Valores netos de inducción de la actividad GUS en las plantas  $\Delta$ -221 tratadas frente a plantas control.

	NaCl/cont.	ABA/cont.
peciolo	0.9	0.9
tallo	1.17	0.55
hoja	1.0	0.54
raíz	0.7	0.56

La actividad GUS en los distintos tejidos en condiciones control supera a la cuantificada en los tejidos tratados con ABA. Con respecto al tratamiento con NaCl, la actividad sólo es igualada en tejidos de hojas y ligeramente superada en tallos. Este incremento en la actividad GUS en tallos tratados con NaCl parece ser significativo ya que se observó en la mayoría de las plantas ensayadas.

En conclusión, el fragmento de -221 pares de bases del promotor Tsw12 parece incapaz de promover la transcripción diferencialmente en presencia ABA, aunque parece mantener una mínima capacidad de respuesta a la sal. Esto indica que en este fragmento, no se encuentran las regiones en *cis* necesarias para la respuesta a ABA dichos tratamientos y seguramente se encuentren las regiones mínimas necesarias para la respuesta a la sal.

Aunque estos resultados son preliminares y habría que realizar delecciones internas de estas regiones con la intención de observar una pérdida de respuesta en el promotor completo, los datos obtenidos apuntan a que las secuencias implicadas en la respuesta a ambos tratamientos son distintas.

## - Caracterización de la delección -69

Se escogieron cinco transformantes independientes con una sola integración del transgen para estudiar la actividad GUS conferida por el fragmento de -69 pares de bases del promotor. Los valores obtenidos son extremadamente bajos. En la Figura 31 podemos comprobar la afirmación anterior y también que dentro de estos niveles basales, se registra más actividad (1.5x) en los tejidos de tallos y hojas de las plantas tratadas con sal que en los tejidos de las plantas no tratadas. Las plantas tratadas con ABA muestran una actividad casi nula, en todos los tejidos ensayados es inferior a la detectada en plantas no tratadas. Los tejidos que acaparan mayor actividad en cada tratamiento vuelven a ser los tallos. No obstante, al ser los valores obtenidos tan bajos, habría que manejar estos resultados con bastantes reservas.

A)

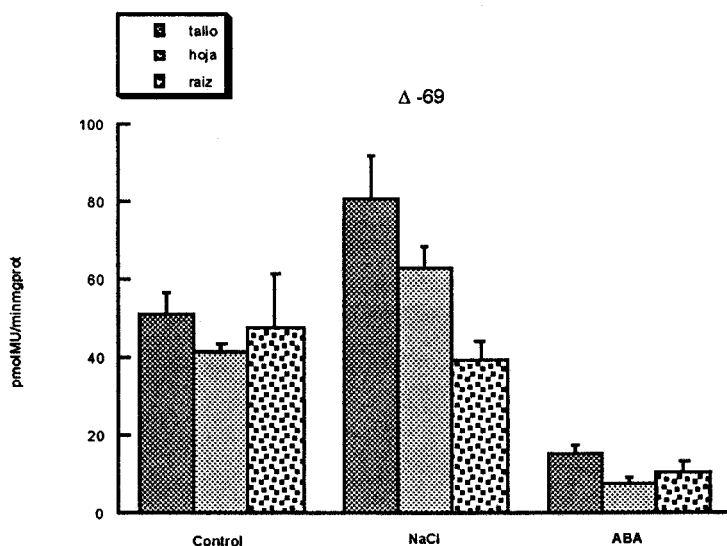


Figura 31. A) Actividad GUS en extractos de plantas transformadas con la delección  $\Delta$ -69. B) Valores netos de la inducción en plantas tratadas frente a plantas control.

B)

	NaCl/cont.	ABA/cont.
tallo	1.5	0.29
hoja	1.5	0.17
raíz	0.8	0.2



## Visión de conjunto del comportamiento de las deleciones

El fragmento  $\Delta$ -1194 contiene las secuencias necesarias para conferir la respuesta al estrés osmótico y al ABA, dada la inducción de la expresión que se registra al tratar las plantas con 15 g/l NaCl, 400 mM manitol ó 100  $\mu$ M ABA.

El fragmento  $\Delta$ -522 anula la actividad del promotor en plantas transgénicas de tabaco. La siguiente deleción caracterizada,  $\Delta$ -314 presenta una disminución cuantitativa de actividad con respecto al fragmento de -1194 pb. Esta deleción conserva la capacidad de inducir la expresión GUS por tratamientos con NaCl y ABA, como puede comprobarse en la Figura 32 que recoge la actividad GUS obtenida en las secciones basales de tallo en todas las deleciones. En las secciones de tallo de plantas transformadas con la deleción  $\Delta$ -221 existe un ligero pero creemos que significativo incremento de la actividad GUS bajo tratamiento salino. Las secciones de tallo tratadas con ABA muestran niveles de actividad por debajo del control. La deleción  $\Delta$ -69 apenas presenta actividad. El tratamiento con ABA produce valores de actividad GUS menores que en plantas control, mientras que el tratamiento salino parece que incrementa ligeramente la expresión. No obstante, estos valores dada la escasa actividad registrada no se han considerado significativos.

En resumen; el fragmento de -314 posiblemente contenga las secuencias responsables para conferir una respuesta a la sal y al ABA, mientras que el fragmento -221, claramente carece de las secuencias responsables de la inducción por ABA y parece probable que contenga las necesarias mínimas para la respuesta al NaCl. Por tanto, las secuencias mínimas responsables para la inducción por ABA probablemente se localicen en el fragmento del promotor comprendido entre los nucleótidos -314 y -221. Las secuencias mínimas responsables de la respuesta al estrés salino se localizarían dentro de la deleción  $\Delta$ -221.

Otro aspecto a señalar es la presencia de secuencias tipo *enhancer* o potenciadoras de la expresión entre los fragmentos -314 y -221, y -221 y -69, dados los distintos niveles de expresión que presentan los transformantes.

**Figura 32.** Actividad GUS en extractos proteicos de tallos control y tratados de las distintas plantas transformadas.



### 3.3.3. Análisis cuantitativo durante la germinación en plantas transformadas con el promotor completo

La presencia del mensajero del gen Tsw12 durante la germinación de las semillas de tomate es muy abundante, y alcanza los niveles máximos cuando la radícula de la plántula tiene 15 mm de longitud. A partir de este momento, la actividad decae hasta desaparecer cuando la plántula expande los cotiledones.

En las plantas transgénicas de tabaco transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194, se ha estudiado la capacidad del promotor completo de reproducir la cinética de expresión del mensajero durante la germinación.

Las semillas de los cinco transformantes descritos previamente se esterilizaron y germinaron en oscuridad sobre papel de filtro humedecido en agua. Unas 25 semillas estériles de cada transformante se sustrajeron del resto de las semillas para la obtención de extractos proteicos y determinar la actividad GUS existente. Este punto se consideró como día 0. Se fueron recogiendo muestras cada 24 h durante 7 días. Los valores de actividad registrados se muestran en la Figura 33.

Los valores máximos de actividad se encuentran en semillas, (en la gráfica día 0). A las 24 h, cuando las semillas están embebidas en agua la actividad decae drásticamente registrándose sólo un 10% de actividad con respecto al día anterior. La actividad se va recuperando progresivamente durante los días siguientes hasta llegar a un 43% de la actividad inicial en el día 5. A partir de este punto la actividad decrece.

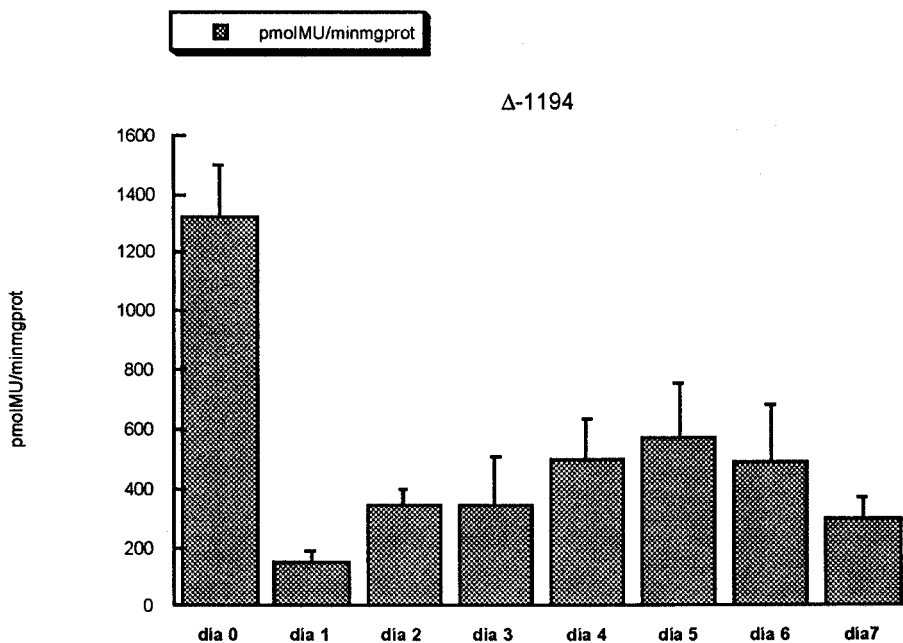


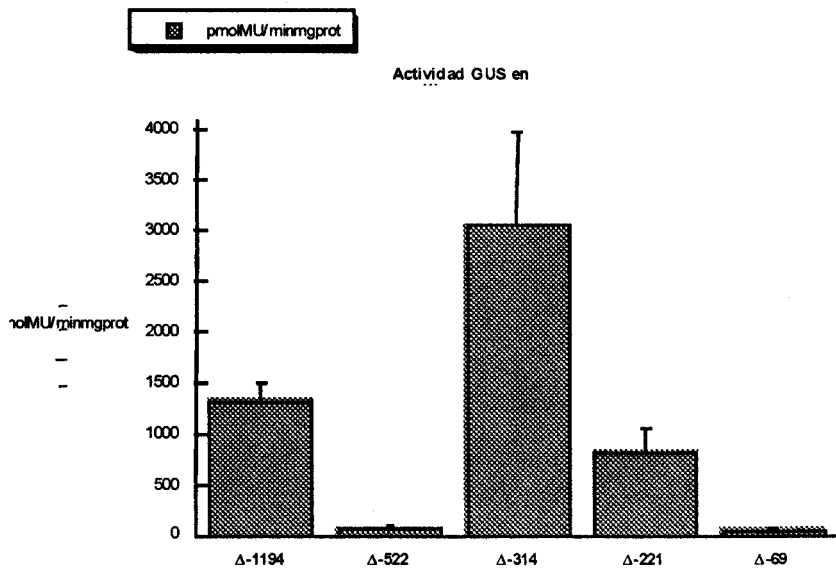
Figura 33. Actividad GUS en extractos de semillas y plántulas transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194 durante la germinación.

La actividad desarrollada por el promotor Tsw12 se ajusta perfectamente a la cinética de expresión del mensajero tsw12 durante la germinación en tomate, si bien la retirada de la actividad parece más lenta en el sistema transgénico, lo cuál podría explicarse por la elevada estabilidad de la proteína GUS (Ref). Esta misma razón podría aducirse para la presencia de actividad GUS en semillas. La presencia del mensajero tsw12 no se detectó en semillas de tomate embebidas durante 24 h en agua (S. Torres, tesis doctoral).

#### **3.3.4. Análisis cuantitativo en semillas de plantas transformadas con las delecciones del promotor Tsw12**

Se escogieron cuatro transformantes de cada construcción y de cada uno se esterilizaron 25 semillas aproximadamente y se extrajo la proteína para determinar la actividad GUS presente. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 34. La actividad GUS registrada en las semillas de las plantas transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194 es 4 veces menor que la existente en las semillas de las plantas transformadas con la delección  $\Delta$ -314. Las semillas de las plantas transformadas con la delección  $\Delta$ -522 carecen de actividad GUS. La delección  $\Delta$ -221 aún confiere expresión al gen de la  $\beta$ -glucuronidasa, mientras que las semillas de la delección  $\Delta$ -69 muestran actividad muy escasa, casi nula.

Se puede concluir que las secuencias mínimas necesarias para que exista transcripción de este gen en semilla se encuentran dentro de la delección  $\Delta$ -221. Nuevamente queda de manifiesto, la presencia de regiones *enhacer* en el fragmento comprendido entre los nucleótidos -314 y -221 que actúan durante esta fase del desarrollo.



**Figura 34.** Actividad GUS en extractos de semillas transformadas con las distintas delecciones del promotor Tsw12.

### 3.3.5. REGULACION ESPACIO-TEMPORAL DE LA EXPRESION DEL

#### PROMOTOR COMPLETO

En el apartado anterior se ha valorado cuantitativamente la actividad (y por tanto, la presencia) de la proteína  $\beta$ -glucuronidasa en extractos proteicos. La existencia de actividad en los extractos proteicos de plantas transformadas con cualquiera de las delecciones no garantiza la conservación de la especificidad de tejido típica de este gen ya que se ha podido perder algún elemento en *cis* responsable de la especificidad de la expresión en algún tipo celular o de tejido. Por esta razón, se ha seguido el patrón de expresión en cada una de las delecciones. Los análisis histoquímicos realizados con plantas transgénicas de tabaco transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194 nos han permitido describir la localización de la expresión del promotor del gen Tsw12 con detalle durante el desarrollo de la planta y en respuesta al estrés.

La localización de la expresión del promotor completo que se detalla a continuación está constatada en los cinco transformantes independientes previamente analizados.

### 3.3.5.1. Expresión del promotor Tsw12 en la semilla madura

La actividad en semillas se localiza en tejidos embrionarios y en el endospermo. Parece improbable que exista expresión en la testa. La distribución de la actividad detectada no es uniforme. Si bien parece que el embrión tiene una actividad basal en toda su superficie (en el protodermo), ésta se acentúa en sus extremos; en el meristemo radicular y la cofia y en los cotiledones. La porción del endospermo que rodea a estas regiones aparece también más teñida. Para evitar una posible difusión de la actividad GUS de un tejido a otro y determinar realmente dónde se estaba produciendo la expresión, los embriones se sacaron del saco endospermico y se tiñeron ambos de forma aislada; se detectó actividad independientemente. Estas diferencias zonales de actividad se detectan en embriones que exhiben poca actividad o teñidos durante poco tiempo. Si prolongamos el tiempo de incubación con el sustrato, la actividad aparece homogéneamente en todo el embrión; lo mismo ocurre en embriones que tienen alta actividad GUS.

Cuando se teñían semillas enteras, se veía una zona con un punto de color azul intenso, que denotaba gran actividad. Por esta región emergerá la radícula durante la germinación.

### 3.3.5.2. Expresión del promotor Tsw12 durante la germinación

Se siguió el curso de la expresión del promotor durante la germinación. Las semillas esterilizadas se germinaron en agua sobre un papel de filtro y se tomaron muestras para la detección histoquímica cada 24 h durante 7 días.

Tras 48 h de incubación, la radícula emerge de la testa. La zona de rotura de ésta está fuertemente teñida, así como la región apical de la radícula, que comprende el meristemo radicular y la cofia. En este punto es difícil discernir si la expresión se da únicamente en tejidos del endospermo o si también participa la testa.

A los cuatro días, la radícula está desarrollada y ha comenzado el crecimiento del hipocótilo. La actividad en la radícula ha desaparecido por completo. La elongación del hipocótilo tiene lugar en la base. La actividad registrada previamente en la radícula desaparece y se va concentrando en el hipocótilo. En los días siguientes, durante el crecimiento del hipocótilo, la parte superior se flexiona formando un gancho o *hook*. La actividad se mantiene en esa región y, finalmente, cuando los cotiledones se expanden, también presentan actividad. Este patrón de expresión se correlaciona perfectamente con

los datos obtenidos previamente en los experimentos de expresión transitoria en tomate. Es de notar la transición gradual de la expresión de este gen desde la región del meristemo radicular en la semilla hasta el polo opuesto, en la región del meristemo apical cuando la plántula tiene los cotiledones expandidos.

**Figura 35.** Histoquímica en semillas, embriones y durante la germinación en plántulas de tabaco transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194.

### 3.3.5.3. Expresión del promotor TSW12 en tejido vegetativo

En plantas de tabaco transformadas con el promotor completo se observa actividad en plantas sin tratar o control, si bien esta actividad aumenta bajo los tratamientos ensayados. Es interesante destacar que la desrepresión de este fragmento no se producía cuando se transformaba la especie homóloga por bombardeo.

Se ha detectado actividad GUS en la epidermis de todos los tejidos probados excepto en raíz. Una visualización más detallada al microscopio reveló la presencia de coloración azul en células especializadas de este tejido, tricomas y estomas.

En secciones de tallo existe actividad en el haz vascular, tanto en el xilema como en el floema. En el xilema, la actividad se confina en las células del parénquima asociado a los vasos. Cuando el xilema se ha desarrollado plenamente, la actividad asociada a este tejido desaparece y se concentra en el floema interno.

En la Figura 36, se puede apreciar la presencia de actividad GUS en el floema interno. La actividad GUS en estas células se mantiene a lo largo de toda la vida de la planta, si bien parece que aumenta cuando el xilema está totalmente desarrollado.

En secciones de hoja, la actividad GUS está asociada al haz vascular, tanto en la vena central o principal como en las secundarias.

Los peciolo muestran la misma distribución de la expresión. Es de destacar la presencia en células parenquimáticas. Esto, que pudiera achacarse a un exceso en el tiempo de incubación se ha detectado en casi todas las plantas ensayadas.

El polo apical de crecimiento vegetativo presenta una actividad GUS elevada. Como se puede observar en la Figura 36, la coloración azul abarca desde el meristemo apical, las capas adyacentes y los primordios foliares. La actividad GUS es también intensa en las axilas foliares.

**Figura 36.** Histoquímica realizada sobre cortes de tejidos vegetativos de plantas de tabaco transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194.

#### **3.3.5.4. Expresión del promotor Tsw12 en flores de tabaco**

La actividad se detecta tanto en tejidos reproductores como no reproductores. Dentro del periantio, la expresión es muy notable en la epidermis de los sépalos. La actividad GUS también se detecta en los tricomas de la epidermis de los sépalos y de la base interna de los pétalos. Tanto los estomas de los pétalos como de los sépalos muestran actividad GUS así como los haces vasculares que recorren el pétalo.

La actividad más intensa es la que se observa en el gineceo. El ovario adquiere una coloración azul intensa tanto en la base como en las paredes, al madurar la flor. Lo mismo ocurre en los óvulos, la actividad aumenta con el grado de madurez de la flor. Cuando el fruto está desarrollado, la actividad decae. En plantas sometidas a desecación, se ha obtenido actividad en los frutos. En el estigma, la actividad es muy alta, de *visu*, se observa que la actividad es máxima durante la antesis, lo cual coincide con la máxima actividad del epitelio secretor.

En el androceo, se ha encontrado actividad en la base del filamento, en el punto de unión con los pétalos. En el momento de la antesis, la antera presenta actividad a lo largo del eje de rotura y en el polo apical, como se observa en la Figura 37. El polen maduro muestra así mismo una coloración azul intensa fruto de la actividad GUS existente.

### 3.3.6. Análisis funcional de las deleciones

Con el fin de delimitar las regiones del promotor responsables de conferir el complicado patrón de expresión de este gen, se analizaron histoquímicamente las plantas transgénicas que portaban las deleciones del promotor  $\Delta$ -314,  $\Delta$ -221, y  $\Delta$ -69.

De cada construcción, se seleccionaron cuatro plantas que portaban una sola integración del transgen. En ellas se analizó la presencia de actividad en los tejidos que mostraron expresión en las plantas transformadas con el promotor completo ( $\Delta$ -1194).

En los embriones maduros procedentes de plantas transformadas con las construcciones  $\Delta$ -314 y  $\Delta$ -221, el patrón de expresión se conserva cualitativamente; se aprecia preferentemente en el extremo radicular. También se conserva la expresión en los tejidos del endospermo.

Los embriones maduros de plantas transformadas con la deleción  $\Delta$ -69 no presentan actividad alguna, tampoco la tiene el endospermo. El ensayo histoquímico se amplió con tres plantas más con más de una integración. Se constató la ausencia de actividad.

Durante el proceso de la germinación, las deleciones  $\Delta$ -314 y  $\Delta$ -221 se comportan del mismo modo que la construcción  $\Delta$ -1194, si bien es observable que en un 50% y 75% de las plantas de cada construcción, apareció actividad en raíces, concretamente en las regiones iniciadoras de la raíz secundaria y en el tejido vascular. La distribución de la expresión, no obstante se mantenía en todas las raíces examinadas.

En tejidos vegetativos se mantiene la expresión en el tejido epidérmico, incluyendo los tricomas y estomas para las deleciones  $\Delta$ -314 y  $\Delta$ -221. La actividad ligada al haz vascular está presente, pero es escasa, hubo que ampliar el tiempo de incubación con el sustrato hasta 24 h. En las plantas  $\Delta$ -221, la expresión en el haz vascular es casi imperceptible, pero se mantiene. En las plantas  $\Delta$ -69 no se detecta actividad alguna en ninguno de los tejidos analizados.

Las flores de las plantas  $\Delta$ -314 y  $\Delta$ -221 presentan la actividad GUS localizada en los mismos tejidos que las flores de plantas transformadas con el promotor completo. Tampoco aquí se ha podido localizar expresión alguna en plantas transformadas con la deleción  $\Delta$ -69.

En función de el análisis histoquímico realizado, las secuencias responsables de determinar la expresión de este gen en embriones, durante la germinación, en tejido vegetativo de planta adulta y en flores se encuentran localizadas dentro del fragmento comprendido entre los nucleótidos -221 y +72. O lo que es lo mismo, la secuencia comprendida entre estos nucleótidos es capaz de conferir el mismo patrón de expresión cualitativo que el promotor completo.

**Figura 37.** Histoquímica realizada sobre secciones de tejidos vegetativos (A), sobre semillas y embriones (B) y sobre flores (C) de plantas transformadas con las deleciones  $\Delta$ -314,  $\Delta$ -221 y  $\Delta$ -69.

**DISCUSSION**



## DISCUSION

### 1. Valoración del papel del ABA la inducción del gen Tsw12 en condiciones de estrés osmótico y salino en mutantes *flacca* de tomate.

Se ha analizado la acumulación del mensajero tsw12 en situaciones de estrés salino, osmótico y por aplicación exógena de ABA en el mutante de ABA *flacca*. El mutante *flacca* posee sólo un 26% del contenido de ABA existente en el silvestre (la especie isogénica *Rheindlands Rhum*) y además, este contenido no se incrementa en situaciones de estrés hídrico (ref). Es posible que estos mutantes ya estén estresados y hayan alcanzado la máxima acumulación de ABA, o bien que sean incapaces de producir ABA en respuesta al estrés. Si esta última opción es la válida, implicaría la existencia de dos rutas biosintéticas de ABA en plantas superiores, una que operaría en hojas turgentes y otra en hojas estresadas (Zeevaart and Creelman, 1988).

El transcrito tsw12 se detecta en tallos y hojas de plantas *flacca* tratadas con ABA, sal, manitol y ABA-sal y está ausente en raíces. La presencia aunque escasa del mensajero en las muestras de tejidos de plantas control puede deberse a la situación de estrés hídrico que sufren estas plantas, al ser incapaces de regular el cierre estomático con la consecuente pérdida de agua por transpiración.

La máxima inducción del mensajero en el mutante se obtiene en el tratamiento simple con ABA 100  $\mu$ M. Se ha descrito la inducción de genes que se regulan por ABA en el mutante *flacca* por aplicación de concentraciones de ABA más bajas que en silvestre (Cohen and Bray, 1990). Consecuencias de la deficiencia de ABA, como el incremento en la transpiración o la reducción en la tasa de oxidación del ABA, deben hacer más efectivo el ABA aplicado exógenamente, y por tanto, la expresión génica por él inducida. Por otra parte, previamente se utilizaron concentraciones de ABA 10  $\mu$ M (Torres-Schumann et al., 1992), en vez de 100  $\mu$ M utilizados en esta ocasión.

La expresión del gen Tsw12 en condiciones de estrés salino y osmótico en mutantes *flacca*, revela la existencia de una vía de inducción en estas condiciones independiente del ABA. La expresión detectada en tejidos de tallos tratados con manitol es mayor en el mutante que en el silvestre, corroborando una situación de estrés osmótico más acusado en el mutante y la inducción de la expresión en estas condiciones con independencia del ABA.

La adición de ABA también produce la acumulación del mensajero tsw12, por tanto existe otra vía paralela de inducción dependiente de ABA. Este gen por tanto responde a ABA pero no depende de la presencia o incremento endógeno de esta hormona para transcribirse en el caso del tratamiento salino y osmótico..

El tratamiento doble ABA-sal produce una mayor acumulación de transcrito *tsw12* con respecto a ambos tratamientos por separado en el silvestre *RR*. En cambio, en el mutante *flacca*, los niveles de transcrito *tsw12* no superan la acumulación presente en el tratamiento con ABA y sólo en tejidos de hojas es ligeramente superior la tratamiento salino.

Los efectos del tratamiento doble ABA/sal no son acumulativos en el caso del mutante, lo cuál sugiere que estas dos rutas son convergentes en algún punto. En este punto, la regulación podría ser dependiente de un factor específico que opere en condiciones de estrés salino regulado a su vez por el contenido de ABA endógeno. Esta interpretación sugeriría que el ABA aplicado exógenamente no paliaría las deficiencias de ABA endógeno.

Se ha caracterizado la respuesta de varios genes que se inducen por estrés hídrico o frío y por ABA en el silvestre y que mantienen esta capacidad de respuesta en el mutante deficiente en ABA en diferentes especies, (Gilmour et al., 1991; Nordin et al., 1991; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993; Mäntylä et al., 1995). Por otra parte, existe otro grupo de genes que se inducen en condiciones de desecación en los cuales en ABA no participa en su expresión (Guerrero et al., 1990; Houde et al., 1992; Takahashi et al., 1994).

Estos resultados son especialmente interesantes si los comparamos con el patrón de inducción del gen *Le16* de tomate. Este gen corresponde a una LTP de tomate que se induce por estrés hídrico, salino, frío y por aplicaciones de ABA en tejidos verdes, especialmente en hojas (Plant et al., 1991). La expresión del gen *Le16* requiere altas concentraciones endógenas de ABA (Bray et al., 1993), lo cuál contrasta con la expresión independiente de ABA del gen *Tsw12* en el mutante en condiciones de estrés.

Para la correcta valoración de la actuación del ABA en la regulación de la transcripción de genes que se inducen por estrés, se hace necesario llevar a cabo este tipo de experimentos en mutantes de ABA o en su defecto, el tratamiento con inhibidores de la síntesis de ABA.

La hibridación de los filtros con la sonda *TAS14* ha servido como control de la inducción de la maquinaria transcripcional que opera en condiciones de estrés salino-hídrico. El gen *Tas14* corresponde a una dehidrina de tomate, cuya expresión en tejido vegetativo es estrictamente dependiente de la presencia de estrés salino o hídrico o de la aplicación exógena de ABA. En ausencia de estas condiciones, la expresión del gen *Tas 14* es nula (o indetectable). Los resultados obtenidos son muy interesantes y difieren de los obtenidos con el gen *Tsw12*, revelando la actuación de distintas vías de inducción en ambos casos.

En raíces de plantas mutantes tratadas con ABA y con manitol existe transcripción del gen Tas14 . El mismo tejido tratado con sal y con sal y ABA simultáneamente no muestra acumulación del mensajero tas14. Por tanto, la expresión del gen Tas14 en presencia de sal es dependiente de ABA y la adición del ABA al medio no suple la falta de síntesis endógena en el mutante.

En tallos, se da expresión en todos los tratamientos ensayados. Se corrobora lo anteriormente descrito para el gen Tsw12; concentraciones de ABA menores producen una alta expresión génica. Existe una leve expresión en tallos tratados con sal, el tratamiento doble ABA,sal incrementa los niveles de transcrito tas14 con respecto al tratamiento salino simple, pero no con respecto al tratamiento simple con ABA. El manitol induce la acumulación de elevados niveles de transcrito.

En hojas, la situación con respecto al tratamiento salino cambia. No existe expresión bajo este tratamiento, sin embargo, si se detecta al adicionar ABA al medio. El tratamiento con manitol sigue siendo muy evidente.

El análisis de estos datos indican que:

- el gen tas14 responde a las aplicaciones exógenas de ABA.
- existe una vía de inducción en condiciones de estrés osmótico independiente del ABA e independiente a su vez de la vía de inducción que actúa durante el estrés salino.
- la expresión en condiciones de estrés salino es dependiente del ABA a distintos niveles dependiendo del tejido en cuestión
  - es absolutamente dependiente en raíces y requiere incremento de ABA endógeno
  - depende de ABA cuantitativamente en tallos, la inducción lleva otra vía paralela
  - es dependiente de ABA en hojas, pero la adición exógena de ABA puede paliar la deficiencia endógena

El distinto comportamiento que tienen los tejidos en respuesta al ABA se había intuido previamente por estudios de retardación.El tamaño de los complejos formados con la misma secuencia ABRE y extractos proteicos procedentes de distintos tejidos diferían entre si, (Pla et al., 1993).

La inducción del gen Tas14 en condiciones de estrés osmótico ( por tratamiento con manitol) no depende del ABA, diferenciandose de la expresión durante el tratamiento salino, que es dependiente de ABA, aunque la severidad de esta dependencia fluctúa entre los distintos tejidos. En tallos parece ser que opera otra vía de inducción, aunque el ABA parece condicionarla cuantitativamente, dados los escasos niveles de transcrito tas14 obtenidos.

Los datos obtenidos son muy interesantes, pues implican una diferencia en la respuesta del gen Tas14 a ambos tipos de estrés. Es sabido que el tratamiento salino conlleva un componente osmótico debido a la falta de disponibilidad de agua, junto con otros componentes típicos de la presencia iónica. Parece ser que la percepción del estrés salino sigue distintas vías con respecto a la que actúa durante la deficiencia hídrica y que se impone de forma dominante en el caso del estrés salino, evidenciándose por la dependencia del ABA.

## **2. Efecto de la herida mecánica, del ácido jasmónico y del ácido salicílico sobre la expresión del gen Tsw12**

El gen Tsw12 se induce por herida mecánica. Las heridas producidas en las hojas de plantas de tomate inducen la expresión en hojas y sobre todo en tallos de plantas de tomate, (S. Torres, tesis doctoral) lo cual implica la existencia de un mediador de la respuesta entre ambos tejidos. En plántulas de tomate cortadas con bisturí e incubadas en cajas Petri selladas para evitar la expresión ligada a situaciones de desecación, se produce una mayor acumulación del mensajero tsw12 con respecto a plantas no dañadas (constatar).

El ABA se ha propuesto como mediador en la respuesta local y sistémica en la respuesta a herida. Tras la herida mecánica, se inducen una serie de proteínas que se acumulan local y sistémicamente en la planta. Entre las mejor caracterizadas, se encuentran los inhibidores de proteinasa I y II (ref). Estas proteínas se inducen por herida mecánica y por aplicación exógena de ABA en plantas silvestres de tomate y patata; en cambio, en plantas mutantes de ABA de patata y de tomate, no se expresan tras la herida mecánica y si se acumulan tras el tratamiento exógeno con ABA. Por otra parte, situaciones de estrés hídrico no inducen la acumulación de PinII ni otros genes relacionados con herida mecánica. Siguiendo esta línea de evidencia, el gen Tas14 se induce por aplicación exógena de ABA y en situaciones de estrés hídrico mientras que por herida, no. Parece ser que el ABA participa en dos vías independientes de transducción de señales en situaciones de estrés hídrico y por herida. Para determinar el papel del ABA en la señalización de la respuesta a herida en el gen Tsw12, se obtendría una información valiosa realizando estos experimentos en mutantes de ABA.

Se ha asignado al ácido jasmónico (JA) un papel central en la señalización por herida y como molécula señalizadora en la resistencia sistémica adquirida (Farmer and Ryan, 1990). Al igual que el ABA, se acumula local y sistémicamente en las zonas dañadas por herida. La aplicación exógena de JA, induce genes que se expresan por herida, muchos de ellos también se inducen por ABA. El JA se libera en los tejidos de plantas tras el ataque por patógenos (Creelman et al., 1992) por tratamiento con elicitores fúngicos (Ref) o con

paredes de plantas(REF) y en tejidos sometidos a estrés osmótico (REF). Los mutantes de ABA *droopy* tratados con JA acumulan PinII, lo cuál sugiere que este compuesto actúe en niveles inferiores al ABA en la cadena de transducción de señales. El ABA pudiera estar implicado en el control de la inducción temprana de alguna de las enzimas biosintéticas de JA.

El gen *Tsw12* se induce por aplicaciones exógenas de ABA y por herida. La mediación del JA en la respuesta a herida del gen *Tsw12* parece dudosa. Los tejidos aéreos de planta adulta de tomate tratados con JA acumulan niveles muy bajos de transcrito *tsw12*; en cambio, si se tratan tejidos aéreos de plántulas (estadio en el que el gen *Tsw12* se transcribe activamente), la expresión se intensifica significativamente. El tratamiento doble de ABA/JA rinde niveles de acumulación del mensajero *tsw12* mayores que la suma de los tratamientos por separado.

Sería recomendable la valoración de la respuesta a herida del gen *Tsw12* en mutantes de ABA, para determinar inequívocamente el papel de ambos mediadores. Ante estos datos, parece improbable el JA actúe de forma independiente en la respuesta a herida, aunque creemos que pueda estabilizar el complejo transcripcional ya activo o favorecer la transcripción mediante un mecanismo desconocido. Otra opción sería que estabilizara selectivamente al mensajero *tsw12* en presencia de JA. Este mecanismo de estabilización de los transcritos no se ha descrito hasta el momento. Si se ha descrito un efecto desestabilizador en transcritos correspondientes a genes que codifican proteínas que forman parte del proceso fotosintético (Reinbothe et al., 1993).

El tratamiento por aplicación exógena con ácido salicílico (SA) 1mM produce muy poca o casi nula acumulación del mensajero *tsw12*. Existen numerosas evidencias que designan al SA como coordinador en la expresión génica durante la respuesta defensiva (Enyedi et al., 1992). El SA media la respuesta asociadas a la infección de plagas. En situaciones de herida mecánica, la concentración de SA endógena no se incrementa (Yalpani et al., 1991) y aplicaciones de SA inhiben la respuesta a herida en tomate (Doherty et al 1988).

Para probar la efectividad biológica real de los activadores transcripcionales del gen *Tsw12*, habría que investigar si existe traducción de proteína en los tratamientos con JA y SA.

En el caso de la osmotina, se conocen hasta 9 activadores transcripcionales distintos, sin embargo, sólo se produce acumulación de la proteína durante la adaptación al estrés osmótico, por infección fúngica y por tratamiento con etileno (a muy bajos niveles) (Kononowicz et al.,). El tratamiento simple de plantas de tabaco con MeJA y con etileno activa la transcripción en ambos casos, pero sólo se produce traducción en el tratamiento con etileno. El tratamiento conjunto E/MeJA inducen altos niveles del mensajero y de la proteína osmotina.

Estos resultados apoyan la necesidad de actuación de múltiples señales para obtener la máxima respuesta defensiva y recuerdan que la situación celular es más compleja que los modelos de experimentación.

### 3. Patrón espacial y temporal de la actividad del promotor Tsw12

En esta sección de la discusión se va a tratar del patrón de expresión del gen Tsw12 determinado mediante varias aproximaciones experimentales y la coincidencia o discrepancia con otras LTPs descritas. Se ha creído conveniente discutir acerca de la posible función fisiológica realizada por estas proteínas, basada en aunar la localización de la expresión y algunas características estructurales y funcionales de las LTPs. La función *in vivo* aún no se ha determinado, aunque existen varias teorías al respecto.

El patrón de acumulación del mensajero tsw12 básico se realizó en trabajos previos. En el presente, se ha completado este patrón de expresión. Mediante análisis por *northern blot* se ha determinado la presencia del mensajero tsw12 está durante la floración; se ha tanto en flores inmaduras (estadio de botón floral) como en flores completamente abiertas, alcanzando este estadio los máximos niveles de acumulación. Esta expresión en tejidos florales es compartida por algunas LTPs, como se describirá posteriormente.

Mediante la técnica de hibridación *in situ* se ha podido determinar en qué tipo de células dentro de los tejidos aéreos de la plántula se produce la expresión del mensajero tsw12. Se ha detectado hibridación en las células epidérmicas de los cotiledones y del hipocótilo y está ausente del tejido vascular. No se detectó señal debida a hibridación en los tejidos correspondientes a radículas.

Los datos obtenidos previamente (Torres, tesis doctoral) mediante *tissue printing*, localizaban la presencia de la proteína TSW12 en el tejido epidérmico y vascular de tallos y peciolos de planta adulta de tomate sometidas a estrés salino. El distinto estado de diferenciación del sistema vascular de la plántula con respecto al de la planta adulta hace que la expresión en estos dos estadios de desarrollo no sea comparable. Otra explicación plausible es que la expresión en el tejido vascular vaya ligada al efecto del tratamiento salino, en cuyo caso, la ausencia sería comprensible.

Tanto los experimentos de hibridación *in situ* como los análisis por *northern blot*, tienen el inconveniente de que la sonda utilizada puede hibridar con otros mensajeros cuyas secuencias tengan homología. Esto puede ser un problema en el caso de genes que pertenecen a familias multigénicas, con distintas isoformas y cada una, por ejemplo, con distinta especificidad de tejido.

El análisis por *Southern* demuestra que el cDNA tsw12 hibrida con un sólo fragmento de restricción de ADN con cualquiera de las enzimas utilizadas aunque no se puede descartar la presencia de varias copias o genes relacionados dentro de los fragmentos de restricción. Utilizando condiciones de baja estringencia de hibridación, se detectaron bandas adicionales más débiles que corresponden a otros genes con menor homología (Torres-Schumann et al.,1992).

Para paliar este posible problema y poder determinar la expresión debida única y exclusivamente al gen Tsw12 se analizó la expresión del promotor Tsw12 fusionado al gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) de *E coli* (Jeferson, 1987).

La construcción transcripcional consistente en la región promotora del gen tsw12 fusionada al gen testigo Gus expresada en distintos sistemas vegetales ha permitido estudiar las secuencias responsables de la regulación de la expresión de este gen y determinar el patrón de expresión celular y de tejido determinado por el promotor Tsw12 en plantas de tabaco. Con el objeto de caracterizar el promotor Tsw12, se han realizado delecciones desde el extremo 5' de la construcción transcripcional inicial  $\Delta$ -1194

Este sistema experimental tiene una serie de ventajas e inconvenientes. Como ventaja, se apunta el hecho de la posibilidad de estudiar el comportamiento del promotor en su entorno natural, es decir, en la planta viva.

Lo óptimo en estos casos es transformar la especie homóloga, de hecho, la transformación de tomate se realiza con éxito actualmente en algunos laboratorios, aunque la eficiencia en la regeneración de plantas transgénicas es menor que en tabaco o en *Arabidopsis*. En este trabajo, se han transformado de forma estable plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi), debido a la alta eficiencia de transformación que presenta. Adicionalmente, se trata de una planta de cultivo muy sencillo, que regenera fácilmente y de crecimiento rápido. El tabaco pertenece al igual que el tomate a la familia de las Solanáceas, aunque no deja de ser un sistema heterólogo.

Dada la buena correlación de la expresión del promotor Tsw12 obtenida en tabaco con respecto a la expresión del gen Tsw12 previamente caracterizada en tomate, asumimos que las proteínas reguladoras deben ser similares en líneas generales en ambos sistemas así como las secuencias reconocidas por estos factores.

Otro inconveniente que conlleva este sistema es la posibilidad de obviar algún elemento en *cis* responsable de la especificidad de la expresión en algún tipo celular o tejido o de la respuesta a distintos efectores. Esta secuencia puede no incluirse por encontrarse en la región 5' upstream con respecto al fragmento que hemos considerado como "promotor completo", o por encontrarse en el intrón o en la región del líder (5' ó 3') del ARNm (REF). Actualmente, las construcciones para la determinación de la expresión utilizando

este sistema se deben realizar incluyendo la mayor cantidad posible de secuencias que pudieran estar implicadas en la regulación final del gen.

Se han descrito artefactos en determinados tejidos, especialmente en flores, frutos y polen debido a la actividad GUS endógena de la planta (Plegt and Bino, 1989; Hu et al., 1990). La actividad GUS de la proteína de plantas es dependiente de pH siendo su pH óptimo 5, distinto al de la proteína de origen bacteriano. Realizando los ensayos de actividad a pH 8, no se detecta actividad de fondo. Por otra parte, la utilización de solventes orgánicos en la reacción histoquímica inhibe la actividad GUS endógena de las Solanáceas y potencia la actividad dependiente de *gus-A* (Kosugi et al., 1990). No obstante, lo óptimo es confirmar la información obtenida (al menos en los tejidos problemáticos) mediante un sistema experimental distinto, por hibridación *in situ* o mediante la localización de la proteína mediante anticuerpos. Por último, una ventaja y un inconveniente a la vez es la alta estabilidad de la proteína GUS, lo cuál puede alterar el panorama real.

### **3.1. Fusión traduccional: Localización subcelular de la proteína híbrida Tsw12:GUS**

Los intentos realizados para detectar la expresión mediante ensayos de actividad GUS en plantas transformadas con la fusión traduccional resultaron infructuosos. La fusión traduccional (-1194/+197) contenía el promotor del gen Tsw12 y parte de la secuencia codificante, concretamente, los primeros 34 aminoácidos de la proteína inmadura en fase con la proteína GUS. Los 23 primeros aminoácidos de la proteína TSW12 mostraban las características típicas de los péptidos señal, por tanto, la proteína híbrida TSW12/GUS se traslocaría al retículo endoplásmico (von Heijne, 1983).

La proteína  $\beta$ -glucuronidasa se N-glicosila en el residuo 358 al traslocarse al retículo endoplásmico, lo cuál conlleva una pérdida de actividad de la proteína (Iturriaga et al., 1989). Actualmente se dispone de una versión del gen Gus (pGUS, Clontech) modificada por mutagénesis dirigida, a la cuál se le ha sustituido el residuo de asparragina de la posición 358 (aceptor de la glicosilación) por una leucina. Este vector presenta un 64% de la actividad con respecto al gen Gus silvestre. En el momento de la realización de la construcción traduccional no se disponía de esta versión modificada y posteriormente, se optó por la construcción de una fusión transcripcional en lugar de sustituir el gen Gus de la construcción traduccional, dada la disminución de la actividad de la proteína GUS modificada con respecto a la silvestre.

Las plantas transformadas con la fusión traduccional se han utilizado para la localización subcelular de la proteína híbrida mediante el anticuerpo antiGUS.





La proteína híbrida TSW12::GUS bajo la dirección del promotor Tsw12 es capaz de procesarse y secretarse a la pared celular en células del floema y de la epidermis (en menor medida) de tejidos de tallos y peciolo de plantas transgénicas de tabaco. Esto implica que el péptido señal junto con once aminoácidos de la proteína madura son suficientes para dirigir el tráfico de la proteína híbrida hasta la pared celular. La presencia de la proteína híbrida en las paredes de las células epidérmicas sólo se ha podido determinar en las impresiones de tallos sobre membranas de nitrocelulosa. En las preparaciones analizadas al microscopio electrónico, procedentes de la misma planta, sólo se ha detectado la presencia de la proteína quimérica en las paredes de los vasos del floema. Por tanto, es probable que debido a la localización extracelular, se haya podido perder la proteína en algún paso durante el procesamiento de las muestras. Por otra parte la presencia de partículas de oro en las paredes de las células del floema de plantas tratadas con sal era mayor que en plantas no tratadas. Por tanto, el fragmento del promotor Tsw12 -1194/+197 contiene las secuencias necesarias para determinar la expresión del gen Gus en células del floema y de la epidermis y para la respuesta al choque salino en plantas de tabaco.

Los primeros pasos de la vía secretoria en las células eucarióticas son similares; el péptido señal dirige las proteínas sobre la membrana del retículo endoplásmico donde tiene lugar la traslocación al lumen. En este compartimento tienen lugar una serie de modificaciones postraduccionales (glicosilación, unión de lípidos, oligomerización, formación de puentes disulfuro, digestiones proteolíticas, etc.), muchas de las cuales deben influir en el destino final de la proteína (von Heijne, 1988). Se ha demostrado que la retención de proteínas en el retículo endoplásmico se produce por la presencia de secuencias específicas localizadas en la región C-terminal de la proteína, K/HDEL (Pfeffer and Rothman, 1987), mientras que la exportación se produce por defecto. Deben existir otras secuencias distintas, ya que existen proteínas residentes en el retículo que carecen de esta señal (Munro and Pelham, 1987, Pelham, 1990). Estos motivos se encuentran ausentes de la secuencia de la proteína TSW12 y del resto de las LTPs.

Utilizando estrategias similares se ha podido demostrar que el péptido señal y 24, 53 ó 124 aminoácidos de la proteína madura de la apoproteína que une clorofila a/b fusionados a la proteína GUS translocan la proteína al interior de cloroplastos de *Nicotiana tabacum* (Kavanagh et al., 1988). 34 aminoácidos de la proteína WAXY de maíz fusionados a la  $\beta$ -glucuronidasa importan la proteína de fusión a los amiloplastos (destino natural de la proteína) y a los cloroplastos de células de patata (Klöggen and Weil, 1991). Se ha descrito también traslocación de la proteína GUS a mitocondria (Schmitz and Lonsdale, 1989), a peroxisomas y al núcleo.

Se han inmunolocalizado a nivel ultraestructural las LTPs de *Arabidopsis* (LTP1) (Thoma et al., 1993) bróccoli (WAX9) (Pyee y Kolattukudy, 1994) y de ricino (Tsuboi et al., 1992). En todos los casos se ha utilizado un anticuerpo que reconoce específicamente cada proteína.

La proteína WAX9 se encuentra entre los componentes de la capa de ceras que recubre la superficie externa de las células epidérmicas principalmente, aunque también se localiza, en menor medida, en las células del mesófilo y en el floema.

La proteína LTP1 de *Arabidopsis*, se localiza preferentemente en la pared de las células de la epidermis superior e inferior, sobre todo en las células estomáticas. También se localiza en las paredes de células parenquimáticas corticales del tallo sobre todo en las paredes adyacentes al espacio intercelular. En algunos espacios intercelulares se ha detectado un marcaje intenso sobre un material celular de composición desconocida, probablemente producto de secreción. También se ha localizado en la superficie del estigma y en células parénquimáticas.

En plantas de ricino, se ha localizado la presencia de LTPs en la pared de los vasos conductores y en la matriz del glioxisoma. La señal se concentra vesículas densas que se depositan por ensamblaje en la vacuola (Tsuboi et al., 1992).

La localización de la LTP de maíz se realizó mediante técnicas inmunocitoquímicas al microscopio óptico (Sossountzov et al., 1991). La proteína se localiza predominantemente en la epidermis externa de los coleóptilos y alrededor de las venas de las hojas. La señal aparece asociada preferentemente con la periferia del citoplasma. No obstante, las técnicas de microscopía óptica carecen de sensibilidad para resolver la membrana plasmática, por tanto, es necesario utilizar las técnicas de microscopía electrónica para determinar en qué lado de la membrana plasmática se localiza la señal.

Según los indicios obtenidos mediante la localización de la proteína híbrida TSW12/GUS en la pared celular y por semejanza con las LTPs descritas, se asume una localización subcelular en la pared celular para la proteína TSW12.

### **3.2. Expresión específica de tejido descrita en miembros de la familia LTPs**

En este apartado se describe el patrón de expresión de LTPs descritas en distintas especies con el fin de analizar las similitudes y discrepancias existentes con respecto al patrón de expresión del gen Tsw12.

Se han descrito dos LTPs de cebada cuya expresión está fuertemente restringida a los tejidos de la aleurona. El mensajero *Ltp1*, se acumula específicamente durante la maduración de la semilla y en la germinación temprana (Skriver et al., 1992; Linnestad et al., 1991). El mensajero *Ltp2* se detecta al poco tiempo de comenzar la diferenciación de las células de la aleurona y desaparece cuando la semilla está madura (Kalla et al., 1994).

La LTP de maíz está presente en el endospermo durante la maduración y la germinación de la semilla y en los tejidos aéreos de la plántula. Durante la germinación, la representación de la proteína en la parte aérea de la plántula aumenta hasta alcanzar un máximo a los cuatro días (Grosbois et al., 1989).

En ricino se han encontrado cuatro isoformas cuya expresión está restringida durante la germinación de la plántula (Tsuboi et al., 1991). Dos de ellas son específicas de cotiledones, otra sólo se expresa en el endospermo y la cuarta, presenta especificidad de expresión en el eje del embrión incluida la radícula.

Se ha determinado la expresión de una LTP en tabaco por hibridación *in situ* (Fleming et al., 1992) en plántulas y en planta adulta en todos los órganos, excepto en raíces. La expresión es baja y uniforme en todos los tipos celulares excepto en hojas y en el meristemo apical donde la expresión es preferentemente epidérmica.

Una LTP de zanahoria denominada EP2 es excretada al medio de cultivo por embriones somáticos (Sterk et al., 1991). Por hibridación *in situ* se ha localizado la expresión en el protodermo y en las capas celulares que van a dar lugar a la cubierta de la semilla durante las etapas tempranas del desarrollo del embrión. Posteriormente, se localiza en la epidermis del embrión, preferentemente en los cotiledones. Cuando la semilla está madura, la expresión desaparece totalmente. En plántulas, se expresa sólo en el meristemo apical y en la planta adulta, también en la epidermis de hojas jóvenes. En flores se expresa en la superficie de todos los órganos, aunque es más abundante en las flores más jóvenes. En flores más viejas, la expresión se concentra sobre todo en la epidermis del ovario y en la antera.

La localización de la expresión del gen *Ltp1* de *Arabidopsis* (Thoma et al., 1994) se ha realizado por hibridación *in situ* y en plantas transgénicas transformadas con el promotor *Ltp1*-GUS. En embriones inmaduros la proteína se localiza en el protodermo. Durante la germinación, la expresión se observa en los cotiledones y en la sección del hipocótilo cercano a la raíz. Cuando los cotiledones se expanden, la expresión se hace mayor en la punta de los cotiledones, región altamente lignificada. Conforme se van desarrollando las plántulas, la expresión se localiza en el meristemo apical, en las estípulas, en el tejido vascular y en los primordios foliares. En la planta adulta la actividad GUS es evidente en células epidérmicas de hoja, tallo y flores y dentro de éstas, la actividad es muy elevada en las células de la superficie del estigma. Al igual que en el

caso de la LTP de tabaco, la expresión es mayor en los tejidos jóvenes localizados en el extremo superior de la planta, cercano a las flores, que en la parte inferior de la planta.

La LTP descrita en *Gerbera hybrida* (Kotilainen et al., 1994) se expresa sólo en flores, concretamente en la corola y en menor medida en el estilo. La expresión de este gen está estrictamente controlada durante el desarrollo de la flor; comienza cuando la flor tienen un tamaño de 10-15 mm (estadio 3), es máxima cuando la flor está medio abierta y desaparece cuando la flor está plenamente desarrollada. Por hibridación *in situ*, se ha localizado la acumulación del mensajero en las células epidérmicas y del mesófilo de la corola y en la epidermis y en el parénquima del estilo.

Según lo expuesto anteriormente, se puede generalizar que;

- Las LTPs se expresan fundamentalmente en los tejidos aéreos de la planta.
- Casi todas o todas están sujetas a un férreo control de su expresión durante alguna etapa en el desarrollo de la planta en la que la expresión es muy abundante.
- Se expresan abundantemente en los meristemos apicales y en los órganos jóvenes en formación.
- La distribución de la expresión dentro de cada órgano es preferentemente epidérmica.
- Se localizan preferentemente en la pared celular de las células que las expresan.

Combinando la habilidad de unir lípidos *in vitro*, la distribución mayoritariamente epidérmica y la localización subcelular en la pared celular, Sterk et al., (1991), propusieron una función en el transporte de monómeros de cutina. Posteriormente, las LTPs también se han encontrado entre los componentes de las ceras cuticulares (Pyee et al., 1994), por lo que se ha ampliado la posible participación de estas proteínas en el transporte de monómeros de ceras al exterior de la cutícula. Ambas hipótesis se resumen en la capacidad de transportar moléculas apolares al exterior de la célula epidérmica.

La función desempeñada por las LTPs y concretamente por el gen Tsw12, está condicionada por las características de los tejidos y los tipos celulares en los que se expresan. Dada la localización mayoritariamente epidérmica de estas proteínas se describen a continuación algunas de las características de este tejido.

La epidermis recubre la superficie de la planta, está directamente expuesta a los agentes atmosféricos y a patógenos. Para evitar una pérdida excesiva de agua y la penetración de patógenos, se encuentra recubierta de una capa de naturaleza lipídica, compuesta fundamentalmente por cutinas y ceras, (organizadas multiestratificadamente) denominada cutícula. La cutina, componente mayoritario de la cutícula es un polímero constituido por múltiples hidroxiácidos grasos de cadena larga (epoxidados y/o hidroxilados) unidos entre si por enlaces éster, formando una red rígida tridimensional. Los ácidos grasos tienen típicamente 16-18 átomos de carbono. La epoxidación y la

hidratación de los ácidos grasos hidroxilados tiene lugar (en parte) en la pared celular. La cutícula está recubierta en su superficie externa por ceras, mezcla compleja de compuestos alifáticos de cadena larga (con 20-36 átomos de carbono).

El mecanismo de deposición de estos compuestos al exterior de la pared celular de la célula epidérmica se desconoce. Si accedieran al espacio periplásmico por deposición de vesículas procedentes vía Golgi del retículo endoplásmico, aún tendrían que atravesar el entorno acuoso de la pared celular para situarse en la cara externa de ésta, dónde tiene lugar el proceso de polimerización (en el caso de la cutina).

En este punto comienza el papel asignado a las LTPs; unirían los monómeros hidrofóbicos, y los transportarían a través de la pared celular. Madrid y von Wettstein, (1991), presentaron un modelo tridimensional de las LTPs basado en el análisis comparativo de las estructuras primarias formadas y en la determinación de los puentes disulfuro de la LTP de ricino (Takishima et al., 1988). El modelo presenta un bolsillo hidrofóbico dentro del cuál tendría lugar la acomodación del ácido graso, cuyas cargas se neutralizarían con los residuos cargados. Este plegamiento permitiría la exposición superficial de los residuos hidrofílicos de forma que el complejo LTP-lípido sería soluble.

La composición, grosor y desarrollo de la cutícula varía según la edad del tejido y en función de las condiciones ambientales, tanto bióticas como abióticas.. Las plantas nativas de regiones áridas poseen una cutícula gruesa, mientras que las plantas de zonas húmedas creciendo en condiciones de desecación, desarrollan frecuentemente una cutícula gruesa en estas condiciones. La infección por patógenos también produce alteraciones en la cutícula. El fenómeno de la adhesión y erosión de la cutícula en el inicio de la infección por hongos se produce mediante la liberación de cutinasas, a la vez que tienen lugar modificaciones enzimáticas en la cutícula del hospedador (Deising et al., 1992). La actividad cutinasa del hongo está relacionada con la especificidad por un huésped o por determinados tipos de tejido; por tanto, existe especificidad entre la composición de la cutina del hospedador y la actividad cutinasa del patógeno, (Trail and Köller, 1990), desempeñando la composición de la cutícula un papel fundamental en el proceso de infección y en la resistencia. Se han encontrado diferencias significativas en la composición de las cutículas de distintas especies entre variedades susceptibles y resistentes a insectos patógenos concretos (Eigenbrode et al, 1991; Yang et al., 1993; Gèrard et al., 1993). Otras variables que deben afectar son el grosor y la estructura tridimensional de la cutícula.

En general, las LTPs se expresan mayoritariamente en tejidos jóvenes en formación. En el caso del gen Tsw12, esta afirmación se confirma en los meristemos y durante la germinación. Esta expresión podría ir ligada a la transferencia de determinados monómeros componentes de la cutícula inicial. En *Clivia miniata* se ha analizado al

microscopio electrónico que cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de los monómeros de la cutícula conllevan cambios en la estructura de la capa cuticular (Riederer and Schönherr, 1988). La máxima variedad en la composición de monómeros se encuentra en estadios tempranos de desarrollo cuticular, donde la representación de monómeros de 16 carbonos es mayor los de 18 carbonos pero según aumenta la edad de la cutícula, la relación se invierte, hasta llegar a ser 3.5 veces mayor la proporción.

Esta teoría podría ser factible ya que las LTPs no transfieren todos los lípidos con la misma eficiencia en los ensayos *in vitro*, (Kader, 1990) y esta "afinidad" por un sustrato o sustratos determinados es típica para cada LTP. La expresión del gen Tsw12 en condiciones de estrés y durante la floración es más elevada en tejidos adultos, por tanto podría tener afinidad por algún componente específico de este estadio.

Otro dato viene a complicar la asignación de una función para estas proteínas y es la capacidad antipatógena de estas proteínas.

Se han realizado ensayos de actividad antipatógena *in vitro* con LTPs purificadas de rábano (Terras et al., 1992) y con varias isoformas de cebada (Molina et al., 1993). El crecimiento del hongo se afecta, aunque no la germinación de las esporas. La presencia de tioninas produce un efecto aditivo en la inhibición del crecimiento en bacterias y sinérgico frente a hongos. Cada miembro de esta familia mostró distinta eficiencia frente a distintos patógenos, aunque como regla general, mostraron una mayor eficiencia frente a bacterias.

Según los autores, la participación de las LTPs sería indirecta, por deposición de los monómeros de cutina en la zona apical de crecimiento de la hifa del hongo, y directa por propiedades antifúngicas intrínsecas de las proteínas.

No obstante, creemos que existen varios puntos oscuros en esta argumentación;

-en los experimentos *in vitro*, la proteína purificada estaría descargada, es decir no podría realizar la deposición de los monómeros de cutina sobre la región de crecimiento del hongo.

-ambos ensayos se han realizado en medios con baja fuerza iónica. En condiciones en las que la fuerza iónica se asemejaba a la fisiológica no existía actividad antipatógena.

Para la obtención de evidencias concluyentes sobre la función antipatogénica, sería clarificador el análisis *in vivo* de la resistencia a la infección por distintos patógenos en plantas que sobreexpresen una o varias LTPs. Por otra parte, la anulación de la expresión de las LTPs mediante la expresión del gen antisentido, permitiría obtener plantas más sensibles al ataque por patógenos, en caso de ser cierta la hipótesis. Ambas estrategias se están realizando actualmente con el gen Tsw12.

Asumiendo ambas funciones, el patrón de expresión del gen Tsw12 estaría ligado a la formación de la cutícula inicial (en meristemas y plántulas), al reforzamiento de la cutícula y a una prevención de infección en estadios de desarrollo especialmente susceptibles a la desecación o al ataque por patógenos, (como en el embrión, durante la germinación, en la floración y en la formación del fruto, situaciones en las que la expresión del gen Tsw12 es constitutiva). Por otra parte, la expresión del gen Tsw12 en tejido vegetativo tras la herida o el tratamiento salino podría paliar el daño producido estrés biótico o abiótico, sellando heridas, modificando la composición de la cutícula, o engrosandola, o a tenor de la capacidad antipatógena, previniendo la penetración de patógenos.

### **FUSION TRANSCRIPCIONAL: EXPRESION DEL GEN Tsw12, COMPARACION CON OTRAS LTPS Y POSIBLE PAPEL FISIOLÓGICO**

Las raíces de las plantas transformadas con el promotor Tsw12/GUS exhiben cierta actividad GUS en plantas control que se incrementa en plantas tratadas. La actividad se localiza en el sistema vascular de las raíces y en las regiones que van a dar lugar a raíces secundarias. Tanto en experimentos tipo *northern* como por hibridación *in situ* en radículas de tomate, no se ha detectado la presencia de mensajero tsw12 (a niveles detectables). Por otra parte, las raíces de las plantas transgénicas de tabaco transformadas con el cDNA tsw12 bajo la dirección del promotor constitutivo 35S expresan el mensajero tsw12 en condiciones control. Esta expresión desaparece en condiciones de estrés salino (O. del Pozo, datos sin publicar). Estos datos indican la posibilidad de existencia de mecanismos de regulación postranscripcional en tejidos de raíces en condiciones de estrés salino.

En general las LTPs están ausentes en raíces, lo cuál se justificaría por la ausencia de cutícula en este órgano. La endodermis y la epidermis tienen las paredes celulares suberizadas, por tanto, parece improbable que las LTPs puedan transportar los monómeros componentes de este polímero.

El gen Tsw12 se expresa intensamente durante la floración. Por *northern blot* se ha determinado la presencia del mensajero tsw12 en todos los tejidos analizados en la flor madura, aunque era especialmente abundante en los tejidos procedentes del gineceo. La expresión era mayor cuando la flor estaba plenamente desarrollada que en estadios de inmadurez. Este dato es característico hasta el momento de la expresión del gen Tsw12 ya que la expresión de otras LTPs descritas en flores se produce mayoritariamente en los estadios de inmadurez de la flor.

El análisis de las plantas de tabaco transformadas con el promotor Tsw12 nos ha permitido definir el patrón de expresión dictado por este promotor a nivel de tejido y celular durante el desarrollo de la flor. Se ha encontrado una buena correlación con los análisis

*northern* previamente realizados. Los análisis histoquímicos han revelado actividad GUS en la epidermis de los pétalos, (en tricomas y estomas) y en los haces vasculares que lo recorren, en la epidermis de los sépalos, siendo especialmente intensa en los tricomas, en las paredes del ovario y en la base de éste; en el estigma en el polen y en las zonas de rotura y de unión del estilo en la antera. La expresión es compartida por algunos de los miembros de la familia de las LTPs, si bien hasta el momento no se ha descrito ninguno que mantenga un patrón de expresión regulado tan variado. Hasta el momento, la expresión en la base del ovario y en las zonas de dehiscencia de la antera son únicas para el gen Tsw12 dentro de la familia de las LTPs.

En numerosas especies de plantas, la epidermis de los tejidos florales está cubierta por una gruesa cutícula. La expresión del gen Tsw12 en flores podría estar asociada a la formación de la capa cuticular. En la mayoría de las plantas, los integumentos están cubiertos por una capa cuticular por ambos lados durante el desarrollo del ovario. Cuando el ovario se desarrolla en fruto, la pared del ovario se transforma en el pericarpio que, en el caso del tomate, es muy grueso (Gillaspy, G., et al., 1993). El pericarpio está recubierto externamente por una fina cutícula que se va engrosando conforme el fruto madura. La "piel" del pericarpio, así mismo, consiste en una capa epidérmica y tres o cuatro capas de tejido colenquimático, (Esau, 1977). El proceso de formación de la flor, maduración del ovario y formación del fruto, implica una continua morfogénesis en la que debe estar involucrada la proteína TSW12.

La presencia de actividad en la base del ovario es la única excepción a la teoría postulada previamente. En el talamo, no existe cutina ni actividad secretora que justifique la presencia de la proteína TSW12.

La actividad GUS detectada en el estigma se puede apoyar por la presencia del epitelio secretor situado en la superficie de éste. Este epitelio papilar secreta compuestos lipídicos, compuestos fenólicos y proteínas. Los compuestos lipídicos evitan una pérdida excesiva de agua y generan una superficie adhesiva que facilita la captura del polen suspendido en el aire o traído por agentes polinizadores. Por otra parte, esta película lipídica repele el agua y por tanto, ralentizaría la germinación de las esporas fúngicas. En la superficie externa de las papilas existe una película proteica externa cuya composición se relaciona con fenómenos de histocompatibilidad y con proteínas implicadas en mecanismos de defensa contra patógenos (Gasser, C.S., and Robinson-Beers, K., 1993). Estas proteínas PRs, (quitinasas, glucanasas), también se expresan durante la floración y especialmente en el tejido transmisor del estilo. Dada la actividad secretora de este epitelio y la presencia de proteínas de defensa, la posible función de la proteína TSW12 se justifica doblemente.

Los tricomas de la epidermis de los sépalos, pétalos y en la base de la antera presentan una intensa actividad GUS. También existe actividad en los tricomas procedentes del tejido epidérmico vegetativo. La actividad en estas células pudiera estar relacionada



con la secreción de algún componente cuticular o ligada a funciones defensivas. La función atribuida a los diversos tipos de tricomas permanece oscura. Se han atribuido funciones a estas estructuras como aislantes térmicos, excreción de sales, defensa química excreción de exudados tóxicos y barrera física frente a patógenos,(Esau, 1977).

También los estomas de los sépalos y pétalos están fuertemente teñidos. En ambos tipos de células (de tricomas y estomas) existe cutícula que las recubre externamente.

Se ha detectado actividad GUS en tejidos de embrión y en el endospermo de semillas maduras de plantas transgénicas de tabaco transformadas con la fusión transcripcional promotor Tsw12/GUS.

La cubierta de la semilla se forma a partir de los integumentos ováricos y está fuertemente recubierta por capas de cutícula. En el caso de las semillas de plantas transgénicas transformadas con el gen Tsw12, no se ha podido observar actividad específica ligada a la testa o cubierta de la semilla en condiciones normales.

El endospermo de las dicotiledóneas es una fuente de nitrógeno, azufre y energía, principalmente durante la embriogénesis. El mecanismo de movilización de estas reservas hacia el embrión no está claro. Una posible función atribuible a las LTPs (incluida la proteína TSW12) en este tejido podría ser la participación en el transporte de nutrientes lipídicos. Otra posibilidad sería la participación en la protección frente a patógenos (Molina and García-Olmedo, 1993).

El gen Tsw12 se expresa ligeramente en toda la superficie del embrión (en el protodermo) pero sobre todo en la región del meristemo radicular y en los cotiledones. Esta expresión ligada al meristemo radicular no se ha descrito en ningún otro miembro de la familia de las LTPs. En embriones de *Capsella* (Schulz and Jensen, 1968), la pared celular externa del embrión y el suspensor están cubiertos por una fina capa de material lipofílico densa a los electrones. El embrión, tan pronto como se forma el protodermo, se recubre de una capa de cutícula cuya función sería evitar que el embrión tomara excesiva agua y aumente de tamaño, lo cuál afectaría negativamente a la diferenciación celular. Otra función atribuible a esta capa lipídica repelente sería la protección de las células embrionarias de la acción de las enzimas hidrolíticas del endospermo. La proteína Tsw12 podría estar implicada en la realización de las funciones descritas.

La actividad GUS determinada por el promotor Tsw12 en tejido vegetativo se confina en la epidermis y en el tejido vascular (asociada al xilema y al floema), en tejidos de hojas, tallos y peciolo de plantas control y tratadas. También se ha encontrado actividad en los meristemos vegetativos y en el apical y en las axilas foliares. La actividad GUS es más abundante en los tejidos vegetativos más viejos o basales y menor en los más jóvenes. Este dato marca una nueva diferencia en la expresión del gen Tsw12 con respecto al resto de las LTPs descritas hasta ahora, que como se ha comentado, son más abundantes

en los tejidos más jóvenes y están generalmente ausentes o menos representadas en los más viejos.

En planta adulta de tomate, sólo se detecta la presencia del mensajero tsw12 en tejidos estresados por sal o por tratamiento con ABA. La proteína TSW12 estaba presente en el haz vascular y en la epidermis de tallos y hojas de tomate estresados con sal (S. Torres, tesis doctoral). La proteína TSW12 podría participar en la regeneración cuticular en plantas sometidas a estrés o bien en el engrosamiento de ésta para prevenir una pérdida excesiva de agua.

La concentración de la actividad GUS en la región basal, podría relacionarse con la partición iónica que realiza la planta glicófita en los tejidos más viejos cuando está expuesta a sal para preservar el aparato fotosintético foliar y los meristemos vegetativos activos. No obstante, se podría argumentar que esta mayor acumulación en la región basal se debe a la elevada estabilidad de la proteína GUS. En estudios previos, la localización de la proteína TSW12 mediante anticuerpo anti TSW12 sobre secciones de tallos en impresiones de nitrocelulosa era más evidente en secciones de tallo más desarrolladas que en secciones menos desarrolladas, (S.Torres, tesis doctoral).

La actividad GUS dirigida por el promotor Tsw12 existente en el haz vascular en cortes de tallos jóvenes se localiza en el cambium asociado al xilema y en los vasos del floema interno. La expresión del xilema disminuye cuando éste está plenamente desarrollado (o lignificado), mientras que la expresión en el floema interno se mantiene y aumenta con el desarrollo del haz vascular. La expresión del gen Ltp1 de *Arabidopsis* (Thoma et al., 1994) también está asociada a células en proceso de lignificación, por tanto, es posible que pudieran estar implicadas de algún modo en este proceso.

En el tejido vascular y en situaciones de estrés, la proteína TSW12 participaría en el sellado de heridas o para evitar posibles puntos de entrada o la dispersión de patógenos; por otra parte, impidiendo la pérdida de agua por transpiración o reforzando el tejido vascular para mantener la turgencia (Showalter, 1993). Se ha descrito la deposición de  $\beta$ -glucanos en el floema en situaciones de estrés físico y por ataque de patógenos (Goodman et al., 1986). Por tanto, la proteína TSW12 podría realizar deposiciones de algún tipo de material insoluble de naturaleza lipídica.

Debido a la baja eficiencia y especificidad del ensayo de transferencia de lípidos *in vitro*, habría que mantener abiertas las posibilidades de que las LTPs realizaran distintas funciones en los distintos tejidos en los que se expresan.

#### **3.4. Similitudes y discrepancias entre las LTPs y otras proteínas implicadas en defensa**

Las LTPs tienen una serie de características comunes con proteínas asociadas a la respuesta defensiva. Las proteínas implicadas en la defensa frecuentemente se expresan en situaciones de estrés biótico o abiótico o en respuesta a ABA, salicílico o jasmonatos.

Algunos miembros de la familia de las LTPs se expresan en condiciones de estrés; la expresión del gen Tsw12 en tejido vegetativo adulto sólo se produce en presencia de tratamiento salino u osmótico, de ABA o por herida; otras LTPs se expresan constitutivamente pero responden a estímulos externos incrementando su expresión, como el gen Blt4, de cebada (Hughes et al., 1992) que responde al ABA, a bajas temperaturas y a desecación, el gen Le16 de tomate (Plant et al., 1992), que responde al ABA y al estrés hídrico, las LTPs de cebada (Molina y García-Olmedo, 1993) que responden a jasmónico y a la infección por patógenos y la LTP de ricino, cuya representación aumenta al irradiar las hojas con luz UV, (Yamada et al., 1994).

En general, proteínas implicadas en defensa que se expresan naturalmente en órganos y etapas del desarrollo especialmente vulnerables al ataque por patógenos también lo hacen en otros tejidos distintos durante la respuesta defensiva. Cada una posee una expresión única y propia en algún momento durante el desarrollo de la planta aparentemente no relacionada con esta función. Casi todas, al igual que las LTPs se excretan, bien a la pared celular o a la vacuola.

La matriz extracelular es continua con los espacios aéreos intercelulares y con el xilema designándose el conjunto como apoplasto. Aquí comienza la colonización de la planta intacta por los patógenos, se originan las señales que inician las funciones defensivas y se acumulan muchos productos defensivos. Las heridas físicas que se producen requieren el restablecimiento de la barrera de difusión, reparación del daño y estimulación del crecimiento y diferenciación.

Las proteínas que participan en las reacciones defensivas, se pueden clasificar funcionalmente en tres grupos (Bowles, 1990).

1) Son proteínas que cambian cualidades de la matriz extracelular por reforzamiento, reparación o alteración de la pared celular. Se incluyen proteínas estructurales (glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGPs) y proteínas ricas en glicina (GRPs)), así como enzimas involucradas en la construcción y/o modificación de otros polímeros de pared como la suberina, lignina, cutina, compuestos fenólicos unidos a pared y callosa. Algunos miembros de las GRPs con localización citoplasmática se inducen por estrés salino y por ácido abscísico, (Showalter, 1993)

2) Son proteínas con actividad antimicrobiana o que catalizan la síntesis de productos antimicrobianos. Se incluyen los inhibidores enzimáticos, (amilasas e inhibidores de proteinasa), proteínas tóxicas, (lectinas y tioninas), hidrolasas (quitinasas,  $\beta$ -1,3 glucanasas y proteinasas), enzimas involucradas en la síntesis de fenólicos taninos, o-quinonas, fitoalexinas y proteínas tipo taumatina, entre las que se encuentra la osmotina.

La osmotina se acumula durante la adaptación osmótica en cultivos celulares de células de tabaco creciendo en medio salino (Singh et al.).

3) Son proteínas que aparecen tras la infección con función desconocida, como las proteínas PR, que se acumulan por herida o por tratamientos con elicitores. Algunas de estas PRs se han identificado como  $\beta$ -1,3 glucanasas y quitinasas.

Las LTPs se podrían integrar dentro del primer grupo como proteínas participantes en la reparación o modificación de los polímeros de la pared celular (ceras y cutinas) o dentro del segundo grupo como agente disuadorio de la infección si se confirma la actividad antipatógena *in vivo*.

Por otra parte, existen algunas similitudes estructurales entre las LTPs y algunas proteínas con funciones defensivas. Las LTPs son proteínas de bajo peso molecular y contienen 8 cisteínas cuyo espaciamiento está estrictamente conservado. Esta ordenación es similar a la que ocurre en el dominio rico en cisteínas de una proteína de pared de alfalfa inducible por sal (Deutch and Winicov, 1995) y en las hidrofobinas de hongos (Ref), también localizadas en la pared celular. En otras proteínas de pared con función defensiva se encuentran dominios ricos en cisteínas como es el caso del dominio de unión a quitina, o en las metalotioneínas aunque la distribución y el espaciamiento de los residuos es distinta. En general, todas estas proteínas, tienen en común la ausencia de funciones catalíticas y la tendencia a unir otras moléculas como lípidos, carbohidratos o metales. Otra cualidad común es la capacidad de formar agregados. Se especula que esta peculiaridad se produzca vía los dominios ricos en cisteínas con la finalidad de enmascarar las paredes del hongo que tienen alta actividad elicitora (Sharp et al.) o para inmovilizar bacterias. Las LTPs purificadas se agregan fácilmente (Kader et al.), y se han determinado formas poliméricas de hasta 90 kDa en condiciones no reductoras (Tanaka and Yamada, 1982). Mundy et al., describieron la formación de complejos con proteínas de la  $\alpha$ -amilasa.

¿ Como se podría relacionar la inducción en condiciones de estrés salino/osmótico del gen Tsw12 con una posible función antipatógena?

Una explicación consiste en que desempeñen distintas funciones en cada uno de los casos o, alternativamente, que exista una vía de transducción de señales más global que funcione en situaciones de estrés severo. Esto implicaría que las situaciones de percepción de la célula bajo estrés hídrico o tras la infección por un patógeno deben ser muy similares. La despolarización de la membrana plasmática tras la invasión por el patógeno produce cambios en la permeabilidad de las membranas de células adyacentes lo cuál debe iniciar los mecanismos para la respuesta defensiva. Muchas de estas respuestas deben ser inespecíficas y pueden ser generadas por una amplia variedad de señales ambientales que incluyen la herida y el estrés osmótico. Por otra parte, el incremento de la permeabilidad de las células hospedadoras puede ser el resultado producido por toxinas y elicitores

liberados por el patógeno. Tanto señales bióticas como abióticas como la herida, infección por patógenos, salinidad, y estrés hídrico pueden afectar la permeabilidad de la membrana plasmática y por ello causar disfunción y desequilibrio de esta (Kononowicz et al., 1993).

### **Secuencias reguladoras en *cis* de la expresión del genTsw12.**

Para los estudios de caracterización del promotor Tsw12, se obtuvieron versiones delecionadas de la fusión transcripcional, que diferían entre si en el extremo 5', para analizar la expresión determinada por estos fragmentos del promotor. Los objetivos de este estudio se centraron la localización de las secuencias responsables de la activación transcripcional por ABA y por estrés osmótico-salino, y la identificación de las secuencias implicadas en dotar a este gen del complicado patrón de expresión espacio-temporal descrito en resultados.

Se llevó a cabo una primera aproximación mediante experimentos de expresión transitoria.

Los protoplastos de mesófilo de hoja de tabaco transformados con la construcción  $\Delta$ -1194 mostraban actividad en condiciones control que no se incrementaba en el caso del tratamiento con ABA 10  $\mu$ M. Las causas de esta falta de incremento de inducción pueden deberse a que las condiciones de estrés osmótico a las que se encuentran los protoplastos (inevitablemente) induzcan la expresión de este gen y en realidad lo que se estén midiendo sean los máximos niveles de inducción. Las limitaciones del sistema, como es la incapacidad de obtención de información acerca de especificidad de tejido así como la inviabilidad de inducción por sal hicieron desestimarlos a para llevar a cabo el análisis con el resto de las construcciones preparadas.

Como alternativa, se realizaron los experimentos de expresión transitoria por bombardeo con microproyectiles. Este método permite el análisis de la expresión en células vegetales intactas. En este caso, sólo se ha realizado un análisis histoquímico de la expresión de las deleciones en plántulas de tomate de 5 días de edad y en hoja adulta de tomate tratada con sal en condiciones control. Lo óptimo es cuantificar la actividad GUS fluorimétricamente y cotransformar con construcciones que funcionen como control interno (luciferasa o CAT) para evitar la dispersión de los datos obtenidos por este sistema. Por tanto, los datos obtenidos en este experimento fueron preliminares aunque muy útiles ya que permitieron seleccionar las construcciones más apropiadas para la transformación estable de plantas de tabaco, proceso muy laborioso y largo que requiere mucho espacio en la cámara de plantas.

El ensayo histoquímico realizado en las plántulas de tomate bombardeadas con las distintas deleciones mostró un patrón de distribución de la actividad GUS similar, excepto en aquellas bombardeadas con la deleción  $\Delta$ -69, donde no existía actividad GUS apreciable. La

actividad GUS se se distribuía por los tejidos aéreos de la planta, siendo la intensidad de los puntos especialmente intensos en el gancho (hook) de la plántula y en los cotiledones. No obstante, si existieron diferencias cuantitativas entre las distintas muestras. El sistema de cuantificación aproximado fue el conteo del número de impactos por muestra., revelando la existencia de posibles elementos reguladores cuantitativos presentes entre -1194 y -314 y entre -221 y -69. Las señales reguladoras de la especificidad de tejido se concentran entre -221 y la caja TATA (0+72).

Los bombardeos sobre hojas de planta adulta de tomate con las distintas delecciones tratadas con sal y en condiciones control dieron una idea preliminar acerca de las regiones implicadas en las respuesta al tratamiento salino. La actividad se distribuía sobre toda la superficie de la hoja y asociada a los nervios vasculares. Entre los nucleótidos-1194 y -522, la respuesta es similar en todas las muestras bombardeadas, en hojas control no existía actividad GUS y en las tratadas si. En cambio, a partir de la construcción -522, aparecía actividad en hojas control, quizá debido a la pérdida de un represor que se localizaría entre los nucleótidos -522 y -744. Las hojas bombardeadas con la construcción  $\Delta$ -314, aún siguen manteniendo diferencia entre las hojas tratadas y las no tratadas aunque esta se hace menos evidente en la muestra transformada con la delección  $\Delta$ -221. Esta muestra registró menor número de puntos azules y de menor intensidad, evidenciando la existencia de una activador entre la secuencia -314 y -221. Las hojas bombardeadas con la delección  $\Delta$ -69, no mostraron actividad GUS alguna, por tanto, las regiones reguladoras para conferir la expresión en tejido vegetativo se concentran principalmente entre -221 y la TATA, y aquellas necesarias para la respuesta a la sal entre -314 y la TATA.

Se determinó la actividad GUS en las plantas transgénicas transformadas con las delecciones  $\Delta$ -1194, -522, -314, -221 y -69 del promotor mediante ensayos fluorimétricos en condiciones control e inducidas con ABA y sal e histoquímicos, para la determinación del patrón de expresión espacio-temporal dirigido por el promotor Tsw12.

El promotor Tsw12 se expresa en plantas de tabaco y es capaz de responder al tratamiento salino-osmótico y al ABA.

El fragmento -1194 del promotor Tsw12 confiere a las las plantas de tabaco la información necesaria para expresar el gen GUS reguladamente durante la germinación de la semilla y durante el desarrollo de la plántula. Los datos obtenidos se ajustan a la cinética de expresión del mensajero tsw12 en plántulas de tomate (Torres-Schumann et al., 1992) y con respecto a la localización de la expresión, se obtuvo una buena correlación con los resultados obtenidos por bombardeo sobre plántulas de tomate de cinco días de edad. La expresión se localizaba en los tejidos aéreos de la plántula y preferentemente en los cotiledones y en el tercio superior del hipocótilo.

En flores de plantas transgénicas transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194 el promotor mostró una expresión regulada espacio-temporalmente. La actividad GUS es más

elevada en flores maduras que en flores inmaduras. La actividad GUS está contrastada por análisis *Northern* en el que se hibridaron muestras correspondientes a los distintos tejidos componentes de la flor madura y botones florales con la sonda tsw12. Existe una buena correlación entre los resultados obtenidos por ambos experimentos.

Las plantas transformadas con la construcción  $\Delta$ -1194 muestran actividad en condiciones control en tejido vegetativo. Las hojas de tomate bombardeadas con la misma construcción no mostraban actividad GUS en condiciones control. Esta discrepancia entre los sistemas de tabaco y tomate evidencia diferencias entre los factores reguladores o entre las secuencias del promotor reconocidas por éstos entre las plantas de tomate y de tabaco. Otra explicación posible es que en condiciones control exista transcripción basal del gen GUS y que debido a la alta estabilidad de la proteína se de un efecto acumulativo. Este efecto no sería observable en la transformación transitoria, debido a la brevedad del experimento.

Las plantas transformadas con la delección  $\Delta$ -522 carecen de actividad GUS. La presencia e integridad de la construcción se detectó por Southern y por PCR, por tanto, no constituían "escapes" o falsos positivos, además la transformación de los discos de hojas se volvió a repetir en vista de la falta de expresión. Se analizaron plantas con una y con varias copias, por tanto se descarta el hecho de que se de un fenómeno de supresión en todas las plantas analizadas. Volviendo a los resultados obtenidos por bombardeo de partículas, esta falta de actividad revela diferencias de comportamiento entre el sistema de tomate y el de tabaco, reprimiéndose la expresión en el sistema heterólogo.

La delección  $\Delta$ -314 tiene capacidad de respuesta a ABA y a NaCl, lo cuál implica que las secuencias en *cis* necesarias para procurar dicha activación se encuentran entre los nucleótidos -314 y +72. No obstante la actividad decae cuantitativamente con respecto al fragmento  $\Delta$ -1194, evidenciando la existencia de regiones potenciadores de la expresión en las secuencias delecionadas (entre -1194 y -314). La expresión específica de tejido se mantiene con respecto al fragmento de -1194.

La siguiente delección estudiada,  $\Delta$ -221, mantiene la especificidad de tejido (en semillas, plántulas, flores y tejido vegetativo). La capacidad de respuesta al ABA no se mantiene y con respecto al NaCl, sólo mantiene actividad por encima del control en tejidos de tallos tratados con sal. No obstante, a pesar de la escasa diferencia existente, creemos que este incremento es significativo, ya que la actividad GUS determinada en extractos proteicos de plantas transformadas con el promotor 35CaMVS fusionado al gen GUS tratadas con sal muestran una reducción de la actividad GUS. Esta reducción puede deberse a una disminución de la actividad metabólica general que se produce en estas condiciones.

Se han realizado controles mediante la detección del mensajero de la glucuronidasa en plantas de tabaco transformadas con las delecciones  $\Delta$ -314 y -221 en situación control y tratadas con ABA y con sal. El objeto era evitar la acumulación de actividad GUS (dada la

alta estabilidad de la proteína) de forma que las diferencias entre el nivel de mensajero presente en condiciones control y bajo el tratamiento con sal fueran mayores. Los niveles de mensajero presentes en las muestras analizadas por Northern son muy escasos e indetectables en las condiciones utilizadas. Lo óptimo es realizar este experimento hibridando con una ribosonda del gen GUS y aumentar la cantidad de ARN a emplear por muestra.

Esto supone la existencia de un ABRE entre los nucleótidos -314 y -221. No se ha encontrado dentro de esta región una secuencia que tenga homología con las ABRE previamente descritas, por tanto debe existir un ABRE cuya secuencia sea distinta a las conocidas pero que realice la misma función de activación en presencia de ABA. No obstante, aún en el caso de que existiera una secuencia con alto grado de homología, este dato por sí mismo sería insuficiente para garantizar la actuación de este posible elemento en la modulación de la expresión por ABA. Un ejemplo de este caso se dió en el promotor del gen PinII de tomate. Se caracterizó la región responsable de la respuesta al ABA, la cuál contenía una secuencia con una alta homología con la caja KKKkk. La mutación dirigida de esta secuencia mantenía la misma capacidad de respuesta a la hormona (Lorberth et al., 1992).

La posibilidad de que las secuencias implicadas en la respuesta al ABA y al estrés salino sean distintas es muy interesante y hasta el momento, que tengamos conocimiento, no se han descrito dentro de un mismo promotor. Esto, combinado con la información obtenida en los experimentos de expresión del mensajero tsw12 realizados con el mutante de ABA de tomate, *flacca* evidenciaría la existencia de dos vías de inducción independientes con distintos elementos reguladores finales. Este dato no elimina la posibilidad de una interacción entre ambas vías de transducción de señales.

Con respecto a la delección -69 no se ha podido determinar actividad GUS mediante el ensayo histoquímico y la actividad fluorimétrica es muy baja. Para determinar la presencia de elementos reguladores que confieran la expresión en tejidos, sería conveniente realizar una fusión con un enhancer o potenciador, ya que es posible que no estemos detectando actividad debido a los bajos niveles de expresión.

El promotor de la osmotina se organiza de forma similar al promotor Tsw12. El fragmento mínimo del promotor requerido para la expresión basal del gen quimérico en tejido vegetativo, flores y granos de polen se localiza entre -246 y +45 (Raghothama et al., en Kononowicz et al., 1993). No detectan actividad GUS apreciable en la fusión del gen marcador con el fragmento del promotor comprendido entre las secuencias -106 hasta +45.

La organización de la expresión del promotor Tsw12 se ajusta a un modelo bipartita. Este modelo se ha propuesto para genes específicos de semillas (Thomas et al.,



1991). Según este modelo, las regiones proximales a la TATA box especifican la expresión típica de tejido y las regiones más distales refinan, potencian y adecúan el patrón de expresión básico dictado por el módulo proximal. En promotores que se expresan en semillas pero no de forma exclusiva en este tejido, se mantiene esta organización, siendo las regiones distales a este módulo proximal las que dictan la especificidad en otros tejidos.

La región proximal del promotor Tsw12 (-221 hasta +72) es suficiente para procurar la expresión ligada al desarrollo en semillas, flores y durante la germinación. No obstante, habría que delimitar mediante delecciones internas posibles módulos independientes o si existe un sólo módulo o secuencia en *cis* común responsable de la expresión en distintos tejidos para la expresión en los distintos tejidos y órganos entre los nucleótidos -221 y -69.

Análisis de la secuencia comprendida entre -314 y +72

ATGACATGTTTAATGCCACAAGATTAAGGCAATTTTGTAATTCTACATAAATTTAATTTAGAA  
TTACATGATCAAAGTCTTTTTTATTTTTAAATTACGTAATAATTAACTGGATCATTTTTGTGAA  
GCGAAGGAAGTATAATCTTTTAATAAATAATGTCCATACTACTAGACCTCATGACTTTATAACCTAATGTGCG  
GCATCTCCATAATAAAATGCATTAATTTACCCCAACATCCACCTAACTCTATTGTCCATCTAGTCCAAAT  
TTTTCTCTATAAAACCCCAAAGATCTCACTATCTTTTTCACCCATCACTCAAACCAAAACACATTTTCATC  
ATACTATACTCTTTACTATAATATTATCCTCTCTA

Las plantas transformadas con la delección  $\Delta$ -314 eran capaces de responder diferencialmente al tratamiento con ABA y con sal. Esta capacidad de respuesta a tratamiento exógeno por ABA se anula en la siguiente delección, que comienza en el nucleótido -221. Por tanto, en la secuencia comprendida entre los nucleótidos -314 y -221 deben existir los elementos (o parte) en *cis* responsables de dicha respuesta. En el nucleótido -285 se encuentra una secuencia invertida *myb* perfecta; GGCAAT. A 25 nucleótidos *upstream* se encuentra una secuencia *myc* también perfecta pero que no puede participar en la expresión de estas plantas ya que ha quedado delecionada a la mitad, aunque no se descarta que *in vivo* pueda actuar cooperativamente con la secuencia *myb* invertida. En las posiciones -199 y -60 se encuentran sendas cajas que mantienen un 85% de homología con el consenso *myb*. Recientemente se ha clonado en *Arabidopsis* un factor de transcripción (Atmyb2) homólogo a la familia Myb que responde transcripcionalmente a desecación, ABA y a condiciones de alta sal (Urao et al., 1993). El

producto génico es capaz de unirse a la secuencia consenso myb. La familia Myb está muy representada en plantas. Se han clonado seis y siete homólogos de myb en *Antirrhinum* y *Arabidopsis* respectivamente, mientras que sólo se ha identificado un homólogo en humanos y tres en *Drosophila*. Este dato puede dar una idea de la diversidad de funciones que pueden llevar a cabo en la regulación de la expresión en plantas.

En promotores de LTPs se ha descrito la presencia de secuencias homólogas al consenso myb (Ref), aunque hasta el momento no se ha llevado a cabo ningún ensayo funcional que apoye la posible actuación en la regulación de la expresión de estos genes.

En el nucleótido -213, del promotor del gen Tsw12 comienza una secuencia homóloga a la caja G. La caja G (ACGT) es muy similar al consenso ABRE C/TACGTG (Marcotte et al., 1989; Mundy et al., 1990). El hecho de que se encuentre dentro de la secuencia contenida en la delección -221 y la carencia de respuesta al ABA de estas plantas puede deberse (en el caso de que fuera responsable de la respuesta a esta hormona) a que se haya perdido el elemento adaptador descrito recientemente por Shen and Ho, 1995. Mediante ensayos mutacionales de pérdida y ganancia de función han definido el complejo mínimo capaz de responder al ABA, consistente en una caja G (ABRE) y un elemento adaptador (CE). La presencia de la caja G es necesaria pero no suficiente para conferir la respuesta al ABA. No se han encontrado secuencias homólogas a las del elemento CE descrito por estos autores a una distancia adecuada para que se pueda dar la interacción, aunque no se descarta que estos elementos pueden tener distinta secuencia a la descrita, al igual que existen ABREs con distinta secuencia.

No obstante, no hay que descartar que la capacidad de respuesta al ABA resida en otra secuencia distinta localizada dentro de la delección -314. Se han descrito ABREs cuyas secuencias no tienen similitud con el consenso de las cajas G (Lam and Chua, 1991; Nelson et al., 1994) y en otros promotores que responden a ABA tampoco se han encontrado secuencias similares (Plant et al., 1991., Urao et al., 1993).

Con respecto a las repeticiones directas localizadas entre los nucleótidos -402 y -368, se desconoce cuál pudiera ser la función ya que se encuentran fuera de las regiones caracterizadas que responden a ABA y a NaCl o que dictan la especificidad de tejido.

Las repeticiones TACPyAT se han descrito en el promotor del gen de la chalcona sintetasa de *Petunia hybrida*. Esta secuencia actúa como un módulo dominante positivo especificando la expresión en flores y durante la germinación y negativo, reprimiendo la expresión en tallos y hojas. La delección  $\Delta$ -69 carece de actividad, tanto en plantas de tabaco transformadas de forma estable como por expresión transitoria en plantas de tomate. Por tanto, parece improbable que esta secuencia, situada entre +38 y +57 pueda estar implicada en la especificidad de tejido típica del gen Tsw12. No obstante cabe la

posibilidad de que realmente sea responsable de la expresión pero que necesite el apoyo de secuencias enhancer que se situarían en las regiones 5' proximales.

Para la asignación inequívoca de una función en la regulación de la expresión a cualquiera de las secuencias discutidas previamente, habría que realizar delecciones internas de estas secuencias o mutaciones puntuales de estas cajas.

Los resultados obtenidos son especialmente interesantes ya que son los primeros resultados de estudios de disección de promotores de LTPs realizados. Se han descrito varios clones genómicos de LTPs, pero no se han realizado estudios de delecciones, por tanto la información existente en cuanto a la organización y funcionamiento de estos promotores es meramente especulativa o preliminar por experimentos de bombardeo de partículas. No obstante, parece improbable que exista un modelo común de funcionamiento y organización de los promotores de las LTPs dada la diversidad de expresión espacio-temporal de los distintos miembros de esta familia, tanto a nivel de desarrollo, tejido vegetativo y en respuesta a señales ambientales.



## **BIBLIOGRAFIA**

- Abel, G.H.** (1969). Inheritance of the capacity for chloride inclusion and exclusion by soybeans. *Crpo. Sci.* 9, 697-698.
- Allan, A.C., Fricker, M.D., Ward, J.L., Beale, M.H., and Trewavas, A.J.** (1994). Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* Guard Cells. *Plant Cell* 6, 1329-1328.
- Anderson, B.E., Ward, J.M., and Schroeder, J.I.** (1994). Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiol.* 104, 1177-1183.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (eds.).** (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene and Wiley-Interscience, New York.
- Bendayan, M., Roth, J., Perrelet, A. and Orci, L.** (1980). Quantitative immunocytochemical localization of pancreatic secretory proteins in subcellular compartments of the rat acinar cell. *J. Histochem. Cytochem.* 28, 149-160.
- Bensadoun, A. and Weinstein, D.** (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 26, 241-250.
- Bernhard, W.R., Thoma, S., Botella, J. and Sommerville, C.R.** (1991). Isolation of a cDNA clone for spinach lipid transfer protein and evidence that the protein is synthesized by the secretory pathway. *Plant Physiol.* 95, 164-170.
- Bevan, M.W.** (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* 12, 8711-8721.
- Binzel, M.L., Hess, F.D., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M.** (1988). Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 86, 607-614.
- Bowles, D.J.** (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 873-907.
- Bowler, C. and Chua, N.H.** (1994). Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell* 6, 1529-1541.
- Bozarth, C.S., Mullet, J.E. and Boyer, J.S.** (1987). Cell wall proteins at low water potentials. *Plant Physiol.* 85, 261-267.

- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bray, E.A.** (1988). Drought- and ABA-induced polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiol.* 88, 1210-1214.
- Breiteneder, H., Michalowski, C.B., and Bohnert, H.J.** (1994). Environmental stress-mediated differential 3' end formation of chloroplast RNA-binding transcripts. *Plant Mol. Biol.* 26, 833-849.
- Cassab, G.I. and Varner, J.E.** (1987). Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seedcoat by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *J. Cell Biol.* 105, 2581-2588.
- Chandler, P.M. and Robertson, M.** (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.* 45, 113-145.
- Cohen, A. and Bray, E.,A.** (1990). Characterization of three mRNAs that accumulate in wilted tomato leaves in response to elevated levels of endogenous abscisic acid. *Planta* 182, 27-33.
- Covarrubias, A.A, Ayala, J.W., Reyes, J.L., Hernandez, M. and Garcarrubio, A.** (1995). Cell-wall proteins are induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 107, 1119-1128.
- Craig, S.** (1992). GUS Protocols: Using the GUS gene as a reporter for gene expression, Ch. 8, 115-123.
- Creelman, R.A., Tierney, M.L. and Mullet, J.E.** (1992). Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4938-4941.
- Chrispeels, M.J. and Maurel, C.** (1994). Aquaporins: The molecular basis of facilitated water movement through living plant cells. *Plant Physiol.* 105, 9-13.
- Daniels, M.J., Mirkov, T.E. and Chrispeels, M.J.** (1994). The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is homolog of the water channel protein TIP. *Plant Physiol.* 106, 1325-1333.

- Deising, H., Nicholson, R.L., Haug, M. Howard, R.J. and Mendgen, K. (1992).** Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticles. *Plant Cell* 4, 1101-1111.
- Delauney, A.J. and Verma, D.P. (1993).** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4 (2), 215-223.
- Demura, T. and Fukuda, H. (1993).** Molecular cloning and characterization of 8 cDNAs associated with tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells. *Plant Physiol.* 103, 815-821.
- Dhindsa, R.S. (1991).** Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation, injury, and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.* 95, 648-651.
- Dittrich, H., Kutchan, T. and Zenk, M.H. (1992).** The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum hortense* cell culture. *FEBS Lett.* 309, 33-36.
- Dix, P.J. (1993).** The role of mutant cell lines in studies on environmental stress tolerance: an assessment. *Plant J.* 3 (2), 309-313.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L. (1995).** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
- Doherty, H.M., Selvendran, R.A. and Bowles, D.J. (1988).** *Physiol. molec. Pl. Path.* 33, 377-384.
- Downing, W.L., Mauxion, F., Fauvarque, M.O., Reviron, M.P., de Vienne, D., Vartanian, N., and Giraudat, J. (1992).** A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress on leaves, but not in seeds. *Plant J.* 2, (5) 685-693.
- Dunn, M.A., Hughes, M.A., Zhang, L., Pearce, R.S., Quigley, A.S. and Jack, P.L. (1991).** Nucleotide sequence and molecular characterisation of the low temperature induced cereal gene, BLT4. *Mol. Gen. Genet.* 229, 389-394.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin, I. (1992).** Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70, 870-886.

**Esau, K.** (1977). *Anatomy of Seeds Plants*. John Wiley, New York.

**Espelund, M., Sæboe-Larsen, Hughes, D.W., Galau, G.A., Larsen, F. and Jakobsen, K.S.** (1992). Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. *Plant J.* 2 (2), 241-252.

**Farrell, L.B. and Beachy, R.N.** (1990). Manipulation of  $\beta$ -glucuronidase for use as a reporter for vacuolar targeting studies. *Plant Mol. Biol.* 15, 821-825.

**Finkelstein, R.R.** (1994). Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J.* 5, 765-771.

**Fleming, A., Mandel, T., Hofmann, S., Sterk, P., de Vries, S.C. and Kuhlemeier, C.** (1992). Expression pattern of a tobacco lipid transfer protein gene within the shoot apex. *Plant J.* 2, 855-862.

**Fleming, A., Mandel, T., Roth, I. and Kuhlemeier, C.** (1993). The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem. *Plant Cell*, 5, 297-309.

**Flowers, T.J., Troke, P.F. and Yeo, A.R.** (1977). The mechanisms of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 28, 89-121.

**Freytag, A.H., Warther, J.A. and Erichsen, A.W.** (1990). Salt tolerant sugarbeet progeny from tissue culture challenged with multiple salts. *Plant Cell Rep.* KKKK, 647-650.

**Gasser, C.S. and Robinson-Beers, K.** (1993). Pistil development. *Plant Cell* 5, 1231-1239.

**Gérard, H.C., Fett, W.F., Moreau, R.A., Osman, S.F. and Miller, R.L.** (1993). Chemical and enzymatic investigation of the leaf cuticle of pear genotypes differing in resistance to pear psylla. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2437-2441.

**Gilmour, S.J., Artus, N.N. and Tomashow, M.F.** (1992). cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 18, 13-21.

**Gilroy S. and Jones, R.L.** (1994). Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare L.*) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 104, 1185-1192.



**Gilroy, S., Read, N.D., and Trewavas, A.J. (1991).** Role of calcium in signal transduction of *Commelina* guard cells. *Plant Cell* 3, 333-344.

**Gillaspy, G., Ben-David, H., and Gruissem, W. (1993).** Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell*, Vol 5, 1439-1451.

**Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., Goodman, F.M. (1992).** Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4, 1251-1261.

**Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P.C., Bouvier-Durand, M. and Vartanian, N. (1994).** Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol. Biol.* 26, 1557-1577.

**Godoy, J.A., Pardo, J.M. and Pintor-Toro, J.A. (1990).** A tomato cDNA inducible by salt stress and abscisic acid: Nucleotide sequence and expression pattern. *Plant Mol. Biol.* 15, 695-705.

Goodman et al., 1986

**Graham, J., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, L. and Ryan, C.A. (1985).** Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves. The cDNA-deduced primary structure of pre-inhibitor I and its post-translational processing. *J. Biol. Chem.* 269, 695-705.

**Graham, J., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, L. and Ryan, C.A. (1985).** Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves. The cDNA primary sequence of pre-inhibitor II. *J. Biol. Chem.* 260, 6561-6564.

**Grosbois, M., Guerbette, F. and Kader, J. C. (1989).** Changes in level and activity of phospholipid transfer protein during maturation and germination of maize seeds. *Plant Physiol.* 90, 1560-1564.

**Guerrero, F., Jones, J.T., and Mullet, J.E. (1990).** Turgor responsive gene transcription and RNA levels increase when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* 15, 11-26.

**Gundlach, H., Müller, M., Kutchman, T.M. and Zenk, M.H. (1992).** Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2389-2393.

- Iturriaga, G., Jefferson, R.A., and Bevan, M.W.** (1989). Endoplasmic reticulum targeting and glycosylation of hybrid proteins in transgenic tobacco. *Plant Cell* 1, 381-405.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 577-580.
- Hattori, T., Vasil, V., Rosenkrans, L., Hannah, L.C., Mc Carty, D.R., and Vasil, I.K.** (1992). The *Viviparous-1* gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes&Devel.* 6, 609-618.
- Hetherington A.M., and Quatrano, R.** (1991). Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytol.* 119, 9-32.
- Hildmann, T., Ebnet, M., Peña-Cortés, H., Sanchez-Serrano J.J., Willmitzer, L. and Prat, S.** (1992). General roles of abscisic acid and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4, 1147-1170.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A.** (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T- region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti- plasmid, *Nature* 303, 179-180.
- Höfgen, R., and Willmitzer, L.** (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl. Acids Res.* 16, 9877.
- Holland, D., Hayyim, G.B., Faltin, Z., Camoin, L., Strossberg, A.D. and Eshdat, Y.** (1993). Molecular characterization of salt-stress protein in citrus; protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidases. *Plant Mol. Biol.* 21, 923-9227.
- Holmström, K.O., Welin, B., Mandel, A., Kristiansdottir, I., Teeri, T.H., Lamark, T., Strom, A.R. and Palva, E.T.** (1994). Production of the *Escherichia coli* betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, in transgenic plants. *Plant J.* 6 (5), 749-758.
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., and Schell, J.** (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163, 181-187.

- Houde, M., Danyluk, J., Laliberté, J.F., Rassart, E., Dhindsa, R., and Sarhan, F.** (1992). Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding a 50 Kda protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiol.* 99, 1381-1387.
- Hu, C.Y., Chee, P.P., Chesney, R.H., Zhou, J.H., Miller, P.D., and O'Brien, W.T.** (1990). Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Rep.* 9, 1-5.
- Hughes, D.W. and Galau, G.A.** (1991). Developmental and environmental induction of *Lea* and *LeaA* mRNAs and the postabscission program during embryo culture. *Plant Cell* 3, 605-618.
- Hughes, M.A., Dunn, M.A., Pearce, R.S., White, A.J. and Zhang, L.** (1992). An acid-responsive, low temperature barley gene has homology with a maize phospholipid transfer protein. *Plant, Cell and Environment* 15, 861-865.
- Iraki, N.M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Carpita, N.C.** (1989). Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth limited plant cells adapted to osmotic stress. *Plant Physiol.* 91, 39-47.
- Ishitani, M., Nayamura, T., Han, S.Y. and Takabe, T.** (1995). Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 27, 307-315.
- Jains, S., Nainawatee, H.S., Jain, R.K. and Chodhury, J.B.** (1991). Proline status of genetically stable salt-tolerant *Brassica juncea* L. somaclones and their parent cv. Prakash. *Plant Cell Rep.* 9, 684-687.
- Jefferson, R.A.** (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5 (4), 387-405.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hirsch, D.** (1986).  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8447-8451.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.
- Jones et al., 1982; Hoagland.
- Joshi, C.P.** (1987). An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucl. Acids Res.* 15 (17), 6643-6653.

**Kader, J.C.** (1990). Intracellular transfer of phospholipids, galactolipids and fatty acids in plant cells. *Subcel. Biochem.* 4, 69-109.

**Kalla, R., Shimamoto, K., Potter, R., Nielsen, P.S., Linnestad, C. and Olson, O.A.** (1994). The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice. *Plant J.* 6 (6), 849-860.

**Kiyosue, T., Beetham, J.K., Pinot, F., Hammock, B.D., Yamaguchhi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1994). Characterization of an *Arabidopsis* cDNA for a soluble epoxide hydrolase gene that is inducible by auxin and water stress. *Plant J.* 2, 259-269.

**Klein, T.M., Gradziel, L.T., Wissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M. and Sanford, J.C.** (1988a). Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4305-4309.

**Klein, T.M., Gradziel, T., Fromm, M.E. and Sanford, J.C.** (1988b). Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles. *Bio/ Technology* 6, 559-563.

**Klöggen, R.B. and Weil, J.H.** (1991). Subcellular location and expression level of a chimeric protein consisting of the maize *waxy* transit peptide and the  $\beta$ -glucuronidase of *Escherichia coli* in transgenic potato plants. *Mol. Gen. Genet.* 225, 297-304.

**Kolattukudy, P.E.** (1987). Lipid-derived defense polymers and waxes and their role in plant-microbe interaction. In: Stumpf, P.K., Conn, E.E.(eds) *The Biochemistry of plants*, Vol 9, 291-314. Academic Press.

**Kononowicz, A.K., Raghothama, K.G., Casas, A.M., Reuveni, M., Watad, A.A., Liu, D., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M.** (1993). Osmotin: regulation of gene expression and function. In *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*, 144-158. T.J. Close and E.A. Bray, eds.

**Koornneef, M.** 199 Genetic aspects of abscisic acid.

**Koornneef, M., Jorna, M.L., Brikhorst-van der Swan, D.L.C., and Karszen, C.M.** (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theor. Appl. Genet.* 61, 385-393.

- Koornneef, M., Reuling, G., and Karssen, C.M.** (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 61, 377-383.
- Kotilainen, M., Helariutta, Y., Elomaa, P., Paulin and Teeri, T.M.** (1994). A corolla- and carpel-abundant, non specific lipid transfer protein gene is expressed in the epidermis and in parenchyma of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae). *Plant Mol. Biol.* 26, 971-978.
- Kosugi, S., Ohashi, Y., Nakajima, K. and Arai, Y.** (1990). An improved assay for  $\beta$ -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous  $\beta$ -glucuronidase activity. *Plant Sci.* 70, 133-140.
- Kueh, J.S.H. and Bright, S.W.J.** (1982). Biochemical and genetic analysis of three proline accumulating barley mutants. *Plant Sci. Lett.* 27, 233-241.
- Lam, E. and Chua, N-H.** (1991). A tetramer of a 21-base pair synthetic element confers seed expression and transcriptional enhancement in response to water stress and abscisic acid. *J. Biol. Chem.* 266, 17131-17135.
- Laemmli, E.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227, 6.
- Lång, V. and Palva, E.,T.** (1992). The expression of a *rab*-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.* 20, 951-962.
- Langdale J. et al., 1993. In situ.
- Läuchli, A.** (1990). Plant responses to saline and sodic conditions. In; *Agricultural Salinity Assessment and Management*, Ch. 6 pp 113-137. K.K. Tanji, ed., by American Society of Civil Engineers, NY.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Cheddor, F., and Giraudat, J.** (1994). *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*; Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264, 1448-1452.
- Linnestad, C., Lönneborg, A., Kalla, R. and Olsen, O.A.** (1991). Promoter of a lipid transfer protein gene expressed in barley aleurone cells contains similar myb and myc recognition sites as Bz-McC allele. *Plant Physiol.* 97, 841-843.

- Lorberth, R., Damman, C., Ebnet, M., Amati, S. and Sánchez-Serrano, J.J. (1992).** Promoter elements involved in environmental and developmental control of proteinase inhibitor expression. *Plant J.* 2 (4), 477-486.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Ludevid, D., Höffe, H., Himmelblau, E. and Chrispeels, M.J. (1992).** The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein  $\gamma$ -TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Physiol.* 100, 1633-1639.
- Madrid, S. (1991).** The barley lipid transfer protein is targeted into the lumen of the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol. Biochem.* 29, 695-703.
- Madrid, S. and von Wettstein, D. (1991).** Reconciling contradictory notions on lipid transfer proteins in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 29 (6), 705-711.
- McCarthy, D.R., Hattori, T., Carson, C.B., Vasil, V., Lazar, M., and Vasil, I.K. (1991).** The *viviparous-1* developmental gene of maize encodes a transcriptional activator. *Cell* 66, 895-905.
- Mäntylä, E., Lång, V., and Palva, T. (1995).** Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LTI78 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 107, 141-148.
- Marcotte, W.R., Russel, S.H., Quatrano R.S. (1989).** Abscisic acid-responsive sequences from the Em gene of wheat. *Plant Cell* 1, 969-976.
- Masuta, C., Furuno, M., Tanaka, H., Yamada, M. and Koiwai, A. (1992).** Molecular cloning of a cDNA clone for tobacco lipid transfer protein and expression of the functional protein in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 311 (2), 119-123.
- Mittler, R., and Zilinska P. (1994).** Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J.* 5(3), 397-405.
- Meyer, K., Leube, M.P., and Grill, E. (1994).** A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* 264, 1452-1455.

- Molina A. and García-Olmedo, F.** (1993). Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *Plant J.* 4 (6), 983-991.
- Molina, A., Segura, A. and García-Olmedo, F.** (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* 316 (2), 119-122.
- Moses, S., Imai R. and Bray, E.A.** (1993). Expression of *le16*, a drought and ABA-induced lipid transfer protein gene, in transgenic tobacco. *LIBRO VERDE*.
- Müller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E. and Zenk, M.H.** (1993). Signalling in the elicitation process is mediated through the octadecanoic pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7490-7494.
- Mundy, J. and Rogers, J.C.** (1986). Selective expression of a probable amylase/protease inhibitor in barley aleurone cells: comparison to the barley amylase/subtilisin inhibitor. *Planta* 169, 51-63.
- Mundy, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Chua, N-H.** (1990). Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid responsive promoter of a rice gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 1406-1410.
- Munns, R.** (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and some hypotheses. *Plant, Cell, Environ.* 16, 15-24.
- Munns, R., Greenway, H. and Kirst, G.O.** (1983). Halotolerant eukaryotes. In *Physiological Plant Ecology. III. Responses to the Chemical and Biological Environment. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol 12 C*, pp 59-135. Springer-Verlag, Berlin.
- Munns, R. and Termaat, A.** (1983). Whole plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 143-160.
- Munro, S. and Pelham, H.B.R.** (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.
- Murashige, Y. and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15, 473-479.



**Nelson, D.E., Ragothama, K.G., Singh, N.K., Hasegawa, P.M. and Bressan R.A.** (1992). Analysis of structure and transcriptional activation of an osmotin gene. *Plant Mol. Biol.* 19, 577-588.

**Nelson, D., Salamini, F., and Bartels, D.** (1994). Abscisic acid promotes novel DNA-binding activity to a desiccation-related promoter of *Craterostigma plantagineum*. *Plant J.* 5, 451-458.

**Nordin, K., Heino, P. and Palva, E.T.** (1991). Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.* 16, 1061-1071.

**Negrutiu, I., Shillito, R., Potrykus, I., Biasini, G. and Sala, F.** (1987). Hybrid genes in the analysis of transformation condition. I Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 8, 363-373.

Novel and Novel, 1973, locus *uid A*

**Parry, A.D.** (1993). Abscisic acid metabolism. *Methods Plant Biochem.* 9, 381-402.

**Pelham, H.R.B.** (1990). The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* 15, 483-486.

**Peña-Cortés, H., Liu, X., Sánchez-Serrano, J.J., Schmid, R. and Willmitzer, L.** (1989). Abscisic acid is involved in the wound induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9851-9855.

**Peña-Cortés, H., Willmitzer, L. and Sánchez-Serrano, J.J.** (1991). Abscisic acid mediates the wound induction but not the developmental-specific expression of the proteinase inhibitor II gene family. *Plant Cell* 3, 963-972.

**Pfeffer, S.R. and Rothman, J.E.** (1987). Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 829-852.

**Pla, M., Gómez, J., Goday, A. and Pagès, M.** (1991). Regulation of the abscisic acid responsive gene *rab28* in maize *viviparous* mutants. *Mol. Gen. Genet.* 230, 394-400.



- Plant, A.L., Cohen, A., Moses, M.S. and Bray, E.A. (1991).** Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and abscisic acid-induced gene in tomato. *Plant Physiol.* 97, 900-966
- Plegt, L. and Bino, R.J. (1989).**  $\beta$ -glucuronidase activity during development of the male gametophyte from transgenic and non transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 210, 321-327.
- Pyee, J. and Kolattukudy, P.E. (1995).** The gene for the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns. *Plant J.* 7 (10), 49-59.
- Pyee, J., Yu, H. and Kolattukudy, P.E. (1994).** Identification of a lipid transfer protein as the major component in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*). *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 460-468.
- Rathinasabapathi, B., McCue, K.F., Gage, D.A. and Hanson, A.D. (1994).** Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta* 193, 155-162.
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B. and Reinbothe, C. (1994).** JIPs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell* 6, 1197-1209.
- Riederer, M. and Schönherr, J. (1988).** Development of cuticles: fine structure and cutin composition of *Clivia miniata* Reg. leaves. *Planta* 174, 127-138.
- Rogers, S.O. and Bendich, A.J. (1985).** Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5, 69-76.
- Roth, J. (1983).** Application of lectin-gold complexes from electron microscopic localization of glycoconjugates on thin sections. *J. Histochem. Cytochem.* 31, 897-999.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

- Saleki, R., Young, P.G. and Lefebvre, D.D.** (1993). mutants of *Arabidopsis thaliana* capable of germination under saline conditions. *Plant Physiol.* 101, 839-845.
- Scheel, D., Colling, C., Hedrich, R., Kawalleck, P., Parker, J.E., Sacks, W.R., Somssich, I.E., Hahlbrok, K.** (1991). Signals in plant defense gene activation. In H. Henecke, DPS Verma, eds, *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol 1, 367-372. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Schulz, R., and Jensen, W.A.** (1968). *Capsella* embryogenesis: The egg, zygote and young embryo. *Am.J.Bot.* 55, 881-916.
- Segura, A., Moreno, M. and García-Olmedo, F.** (1993). Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves from *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Lett.* 332 (3), 243-246.
- Sharp, J.A., McNeil, M. and Albersheim, P.** (1984). The primary structure of one elicitor active and seven elicitor-inactive hexa ( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. *J. Biol. Chem.* 25, 11321-11326.
- Showalter, A.M.** (1993). Structure and functions of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, 9-23.
- Showalter, A.M., Butt, A.D. and Kim, S.** (1992). Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. *Plant. Mol.Biol.* 19, 205-215.
- Singh, N.K., Bracker, C.A., Hasegawa, P.M., Handa, A.K., Buckel, S., Hermodson, M.A., Regnier, F. and Bressan, R.A.** (1987). Characterization of osmotin: a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiol.* 85, 529-536.
- Singh, N.K., Nelson, D.E., Kuhn, D., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A.** (1989). Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol.* 90, 1096-1101.
- Silhavy, D., Hutvagner, G., Barta, and Bánfalvi, Z.** (1995). Isolation and characterization of a stress inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol. Biol.* 27, 587-595.
- Skriver, K., Leah, R., Müller-Uri, F., Olsen, F.L. and Mundy, J.** (1992). Structure and expression of the barley lipid transfer protein gene *Ltp1*. *Plant Mol. Biol.* 18, 585-589.

- Skriver, K. and Mundy, J.** (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2, 503-512.
- Skriver, K., Olsen, F.L., Rogers, J.C., Mundy, J.** (1991). *Cis-* acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonistic abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88,7266-7270.
- Sossountzov, L., Ruiz-Avila, L., Vignols, F., Jolliot, A., Arondel, V., Tchang, F., Grosbois, M., Guerbette, F., Migniac, E., Delseny, M., Puigdomenèch, P. and Kader, J.C.** (1991). Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3, 923-933.
- Southern, E.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoreses. *J. Mol. Bio.* 9, 503.
- Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G.A., van Kammen, A. and de Vries, S.** (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3, 907-921.
- Sumariati, S., Negrutiu, I. and Jacobs, M.** (1992). Characterization and regeneration of salt and water-stress mutants from protoplasts culture of *Nicotiana plumbaginifolia* (Vriani). *Theor. Appl. Genet.* 83,613-619.
- Takahashi, R., Joshee, N., and Kitagawa, Y.** (1994). Induction of chilling resistance by water stress, and cDNA sequence analysis and expression of water stress-regulated genes in rice. *Plant Mol. Biol.* 26, 339-352.
- Takishima, K., Watanabe, S., Yamada, M., Suga, Y. and Mamiya, G.** (1988). Amino acid sequences of two non-specific lipid transfer proteins from germinated castor bean. *Eur. J. Biochem.* 177, 241-249.
- Tanaka, T. and Yamada, M.** (1982). Properties of phospholipid exchange proteins from germinated castor bean endosperm. *Biochemistry and metabolism of plant lipids* (Wintermans and Kuiper, eds.), 99-106. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Tarczynski, M., Jensen, R.G. and Bohnert, H.J.** (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolite manitol. *Science* 259, 508-510.
- Templeton, M.D., Rikkerink, E.H.A. and Beever, R.E.** (1994). Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7 (3), 320-325.

- Terras, F.R.G., Goderis, I.J., van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A. and Broekaert, W.F.** (1992). In vitro antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus* L.) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 100, 1055-1058.
- Thoma, S., Hecht, U., Kippers, A., Botella, J. de Vries, S. and Sommerville, C.** (1994). Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 105, 35-45.
- Thoma, S., Kaneko, Y. and Sommerville, C.** (1993). A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *Plant J.* 3 (3), 427-436.
- Thomas, T.L.** (1993). Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *Plant Cell* 5, 1402-1410.
- Torres-Schumann, S., Godoy, J.A. and Pintor-Toro, J.A.** (1992). A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 18, 749-757.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Trail, F. and Köller, W.** (1990). diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity. *Physiol. Plant Pathol.* 36, 495-508.
- Tsuboi, S., Suga, T., Takishima, K., Mamiya, G., Matsui, K., Ozeki, Y. and Yamada, M.** (1992). Non specific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells. Subcellular localization and a possible role in  $\beta$ -oxidation. *J. Biochem.* 112, 600-608.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. and Shinozaki, K.** (1993). An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5, 1529-1539.
- Vajrabhaya, M., Thanasaipal, T. and Vajrabhaya, T.** (1989). Developmental of salt tolerant lines of KDLM and LIK rice cultivars through tissue culture. *Plant Cell Rep.* 8, 411-414.

- Van der Meer, I.M., Brouwer, M., Spelt, C.E., Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R. (1992).** The TCAPyAT repeats in the chalcone synthase promoter of *petunia hybrida* act as a dominant negative *cis*-acting module in the control of organ-specific expression. *Plant J.* 2 (4), 525-535.
- Von Heijne, G. (1983).** Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* 133, 17-21.
- Von Heijne, G. (1988).** Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 947, 307-333.
- Wadsworth, G.F., Redinbaugh, M.G. and Scandalios, J.G. (1988).** A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. *Anal. Biochem.* 172, 279-283.
- Warne, T.R. and Hickok, L.G. (1987).** Single genes mutants tolerant to NaCl in the fern *Ceropteris*: characterization and genetic analysis. *Plant Sci.* 52, 49-55.
- Welin, B.V., Olson, Å., Nylander, M., and Palva, T. (1994).** Characterization and differential expression of *dhn/leal/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 131-144.
- Wessels, J.G.H., de Vries, O.M.H., Ásgeirsdóttir, S.A., and Schuren, F.H.J. (1991).** Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell* 3, 793-799.
- West, M.A.L. and Harada, J.J. (1993).** Embryogenesis in higher plants: an overview. *Plant Cell* 5, 1361-1369.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T.M.A., Kelier, D.A. and Raskin, I. (1991).** Salicylic Acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3, 809-818, 1991.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., and Shinozaki, K. (1992).** Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* 33: 217-224.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1993).** Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 236, 331-340.

**Yamaguchi-Shinozaki, K. and 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.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D.<sup>a</sup> OLGA del POZO CANJAS

titulada estructura y análisis de la regulación transcripcional del gen TSW12 de tomate

acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE POR UNANIMIDAD

Sevilla, 19 de enero 1995

El Vocál,

El Vocál,

El Vocál,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,

