

Que la presente esta Tesis Doctoral
al folio 129 número 116 del libro
correspondiente.

Sevilla, 17 Mayo 1995

El Jefe del Negociado de Tesis,

P. A. [Signature]

R. 5164

Depositado en Dep. Genética
de la Fac. Biología
de esta Universidad desde el día 14/5
hasta el día 12/6

Sevilla 12 de Junio de 1995

EL DIRECTOR DE

J. C. [Signature]

**ESTUDIO SOBRE LA FUNCION DEL GEN *tas14*,
INDUCIBLE POR ESTRES SALINO Y ACIDO ABSCISICO
EN *Lycopersicon esculentum***

TD
B29



Trabajo presentado por la licenciada Rosa María Luna Varo
para optar al grado de Doctor en Biología

Sevilla, Mayo de 1995



Rosa M. Luna Varo

Director:

[Signature]

Tutor:

Tahía Benítez

Dr. José Antonio Pintor Toro
Investigador del C.S.I.C.

Dra. Tahía Benítez Fernández
Profesora Titular
Departamento de Genética

INTRODUCCION

1. EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD EN LA AGRICULTURA
2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA ADAPTACION DE LAS PLANTAS A LA SALINIDAD: plantas halófitas y plantas glicofitas.
3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA A NIVEL MOLECULAR A ESTRES SALINO
 - 3.1. Estudio de líneas celulares tolerantes a la sal
 - 3.2. Funciones inducidas por estrés salino y otros estrés relacionados.
 - 3.3. Estudio de la respuesta molecular en especies resistentes al estrés salino-hídrico
 - 3.4. Uso de organismos transgénicos y microorganismos en el estudio de la respuesta a estrés salino.
4. EL PAPEL DEL ACIDO ABCISICO EN LA REGULACION GENICA Y LA TOLERANCIA AL ESTRES.
 - 4.1. Regulación de la expresión génica por ABA y estrés.
 - 4.2. El papel del ABA en el estrés
5. ANTECEDENTES
6. OBJETIVOS

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO
 - 1.1. Material vegetal
 - 1.1.1. Especies vegetales
 - 1.1.2. Esterilización de semillas
 - 1.1.3. Cultivo hidropónico
 - 1.1.4. Cultivo in vitro:
 - 1.2. Bacterias
 - 1.3. Vectores
2. MANIPULACION DE ADN
 - 2.1. Purificación de plásmidos bacterianos
 - 2.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa
 - 2.3. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa
 - 2.4. Digestión de ADN con enzimas de restricción
 - 2.5. Defosforilación de extremos 5'
 - 2.6. Ligación de moléculas de ADN
 - 2.7. Transformación de bacterias
 - 2.7.1. Obtención de células competentes
 - 2.7.2. Transformación
3. TRANSFORMACION DE PLANTAS DE TABACO
 - 3.1. Transformación de *A. tumefaciens* : conjugación triple
 - 3.2. Cocultivación de discos de hojas de tabaco con *A. tumefaciens*
 - 3.3. Aislamiento y regeneración de plantas de tabaco transformadas
 - 3.3.1. Formación de callos y brotes
 - 3.3.2. Selección de transformantes: enraizamiento y propagación

4. ANALISIS DEL ADN DE PLANTAS

- 4.1. Extracción de ADN de plantas
- 4.2. Cuantificación del ADN
- 4.3. Análisis Southern
 - 4.3.1. Digestión del ADN, electroforesis y transferencia a membrana de nylon
 - 4.3.2. Marcaje de sondas, hibridaciones y lavados
- 4.4. PCR de ADN de plantas
 - 4.4.2. Reacciones de PCR
 - 4.4.3. Análisis de las reacciones de PCR

5. ANALISIS DE ARN DE PLANTAS

- 5.1. Extracción de ARN de plantas
- 5.2. Cuantificación del ARN
- 5.3. Análisis Northern
 - 5.3.1. Electroforesis y transferencia a membrana de nylon
 - 5.3.2. Tinción reversible de ARN sobre membrana de nylon
 - 5.3.3. Marcaje de sondas (ADN y ARN), hibridación y lavados

6. ANALISIS DE PROTEINAS

- 6.1. Marcaje de proteínas in vivo.
- 6.2. Extracción de proteínas
 - 6.2.1. Método de extracción general
 - 6.2.2. Método de extracción de dehidrinadas
- 6.3. Cuantificación de proteínas
 - 6.3.1. Método de Lowry modificado
 - 6.3.2. Método Bradford
- 6.4. Electroforesis monodimensional
- 6.5. Métodos de detección de proteínas
 - 6.5.1. Tinción con Azul de Coomassie
 - 6.5.2. Tinción con nitrato de plata
 - 6.5.3. Fluorografía

7. TECNICAS INMUNOLOGICAS

- 7.1. Purificación de anticuerpos
 - 7.1.1. Substracción de anticuerpos anti- β -galactosidasa
 - 7.1.2. Purificación por afinidad de anticuerpos con el antígeno unido a membrana de nitrocelulosa
- 7.2. Análisis Western
 - 7.2.1. Transferencia de proteínas a membranas
 - 7.2.3. Inmunodetección con anticuerpos conjugados a peroxidasa y quimioluminiscencia
- 7.3. Inmunolocalización al microscopio electrónico
 - 7.3.1. Preparación de las ultrasecciones.
 - 7.3.2. Inmunodetección con proteína A unida a partículas de oro.
 - 7.3.3. Análisis morfométricos y estereológicos de las secciones
- 7.4. Coinmunoprecipitación

8. OBTENCION DE PROTEINA DE FUSION GST-TAS14

- 8.1. Descripción del sistema de expresión heteróloga
- 8.2. Producción y análisis de los transformantes
- 8.3. Purificación de la proteína de fusión GST-TAS14

9. OBTENCION DE CASEINA QUINASA II
 - 9.1. Purificación de CKII a partir de cerebros de rata
 - 9.2. Ensayo de actividad de la enzima purificada
10. FOSFORILACION DE TAS 14 *IN VITRO*
 - 10.1. Fosforilación con Caseína Quinasa II
 - 10.1.2. Fosforilación con CKII de cerebro de rata
 - 10.1.3. Fosforilación con CKII recombinante
 - 10.2 Fosforilación con Proteína Kinasa PK
11. ENSAYOS DE UNION DE ADN Y PROTEINA
 - 11.1. Ensayos de retardación de ADN en geles de poliacrilamida
 - 11.1.2. Esquema del ensayo
 - 11.1.2. Descripción de los oligonucleótidos
 - 11.1.3. Purificación de los oligonucleótidos
 - 11.1.4. Reacciones de síntesis de la mezcla de oligonucleótidos degenerados con polimerasa Klenow
 - 11.1.5. Ensayos de retardación
 - 11.1.6. Amplificación del ADN retrasado
 - 11.2. Ensayos de retardación de proteína en geles de poliacrilamida
 - 11.2.1. Traducción *in vitro*
 - 11.2.2. Ensayos de retardación de proteína
12. CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL
13. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD GST-TAS14
14. TECNICA DE OVERLAY
15. CROSS-LINKING
 - 15.1. Crosslinking con Dimetil-pimelidato (DMP)
 - 15.1.1. Mecanismo de acción
 - 15.1.2. Reacciones de crosslinking
 - 15.2. Crosslinking con 1-Etil-3(3-Dimetilaminopropil) carbodiimida Hidroclorídrico (EDC)
 - 15.2.1. Mecanismo de acción
 - 15.2.2. Reacciones de crosslinking

RESULTADOS

1. TRANSFORMACION DE PLANTAS CON EL cDNA tas 14
 - 1.1. DISEÑO DE LAS CONSTRUCCIONES
 - 1.2. TRANSFORMACION
 - 1.3. ANALISIS DE LOS TRANSFORMANTES
 - 1.3.1. Análisis por PCR
 - 1.3.2. Análisis por Southern
2. ESTUDIO DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS CON EL GEN tas14 EN ORIENTACION SENTIDO (PLANTAS tas14s)
 - 2.1. ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LAS PLANTAS tas14s
 - 2.1.1. Descripción
 - 2.1.2. Caracterización molecular

- 2.1.3. Análisis de la F1
- 2.2. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE EXPRESION
 - 2.2.1. Estudio de los niveles de ARN tas14
 - 2.2.2. Estudio de los niveles de proteína TAS14.
- 2.3. ANALISIS FUNCIONAL DE LOS TRANSFORMANTES
 - 2.3.1. Selección de los transformantes
 - 2.3.2. Estudio de la respuesta a choque salino
 - 2.3.3. Estudio de la capacidad de enraizamiento en medio salino
 - 2.3.4. Estudios de germinación en medio salino
 - 2.3.5. Estudio de la respuesta a estrés hídrico
- 3. ESTUDIO DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS CON EL GEN tas14 EN ORIENTACION ANTISENTIDO (PLANTAS tas14a)
 - 3.1. ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LAS PLANTAS tas14a
 - 3.2. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE EXPRESION DEL GEN tas14 EN PLANTAS tas14a.
 - 3.2.1. Estudio de los niveles de ARN tas14
 - 3.2.2. Estudio de los niveles de proteína TAS14
- 4. ANALISIS DE LA SECUENCIA DE LA PROTEINA TAS14
- 5. EXPRESION DE TAS14 EN BACTERIAS COMO PROTEINA DE FUSION A GLUTATION S-TRANSFERASA
- 6. FOSFORILACION "IN VITRO" DE TAS14 CON CASEINA QUINASA II Y PROTEINA QUINASA.
- 7. LOCALIZACION INTRACELULAR DE LA PROTEINA TAS14
- 8. DETERMINACION DEL ESTADO DE AGREGACION Y PESO MOLECULAR DE LA PROTEINA TAS14
 - 8.1. Uso de la cromatografía de filtración para determinar el peso molecular y el estado de agregación de tas14.
 - 8.2. Uso de la técnica de cross-linking para detectar posibles uniones inter-intramoleculares de la proteína TAS14.
- 9. INTERACCION DE LA PROTEINA TAS14 CON MACROMOLECULAS
 - 9.1. ESTUDIOS DE INTERACCION DE LA PROTEINA TAS14 CON ADN
 - 9.1.1. Estudio de las condiciones de unión de la proteína TAS14 y el ADN
 - 9.1.2. Ensayos de PCR para el enriquecimiento de la secuencia de ADN unida
 - 9.1.3. Ensayos de retardación de proteína TAS14 con ADN
 - estudios de la interacción de la proteína TAS14 con proteínas.
 - 9.2. ESTUDIOS DE INTERACCION DE LA PROTEINA TAS14 CON PROTEINAS

INTRODUCCION

EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD EN LA AGRICULTURA

La salinidad, presencia de altas concentraciones de sales en los suelos, constituye un problema creciente en la agricultura: el 10% de las tierras cultivables tienen un marcado carácter salino, y la mayoría de las plantas de cultivo son sensibles a la sal. Como consecuencia, en los últimos años se ha mostrado un gran interés en el desarrollo de líneas de investigación con el objeto de conocer los mecanismos de respuesta de las plantas a estas condiciones adversas.

La salinidad en los suelos es un problema debido en parte a causas naturales derivadas de las características hidrogeológicas de los mismos (composición, solubilidad de los minerales, infiltraciones de aguas) y de los efectos de los agentes atmosféricos, fundamentalmente en las regiones áridas y costeras (evaporación, deposiciones atmosféricas de sales oceánicas, etc.) (Tanji 1990). Por otra parte, este problema es consecuencia de la utilización del hombre de los recursos naturales. Con el incremento de la población ha surgido la necesidad de aumentar la producción mediante el uso del regadío y la utilización de tierras que originalmente eran consideradas marginales. El uso y abuso de las técnicas de regadío, junto con la baja calidad de las aguas utilizadas, (la mayor parte del agua en la hidrosfera es salina), ha traído consigo un aumento de las concentraciones salinas de los suelos, efecto que se ha venido a llamar salinización secundaria.

Las cifras reflejan claramente el problema: de los 14,900 millones de hectáreas de la superficie de tierras un 21% son potencialmente utilizables, estando solo un 46% de éstas cultivadas (Tabla 1). La extensión global de suelos afectados por la salinidad se ha estimado entre 400 y 950 millones de ha, y de los 230 millones ha irrigadas entre un 30-50% están afectadas por la salinización (Epstein et al. 1980) (Szabolcs 1989).

El problema no solo está limitado a regiones áridas o semiáridas, sino que puede estar ocasionado estacionalmente debido al clima y a la movilidad de sales. Así por ejemplo, en gran parte de la Península Ibérica, la prolongada sequía estival es la causa de la creciente salinización de nuestros suelos (Alberto et al. 1983).

La tecnología para mantener la productividad de los suelos irrigados y frenar los efectos de salinización existe, drenaje y balance salino de las tierras, pero su uso está limitado por una serie de factores principalmente económicos (alto coste de las infraestructuras apropiadas, canalización de aguas de riego de buena calidad,...) y generalmente el problema se vuelve más acuciante en los países más pobres siendo estas medidas impracticables.

Una alternativa conjunta para solucionar este problema es la obtención de variedades que se adapten mejor a las concentraciones salinas existentes. Mediante los programas de mejora clásica no se han obtenido variedades más resistentes debido

fundamentalmente a la complejidad espacial, temporal, cualitativa y cuantitativa del problema de la salinidad, y a la falta de variabilidad genética de los bancos de germoplasma.

El avance de la biología celular y molecular abre nuevas expectativas para solucionar conjuntamente el problema (regeneración *in vitro* de plantas y transformación), siendo para ello de vital importancia el estudio de las bases del mecanismo de respuesta de las plantas al estrés salino y otros tipos de estrés que ejercen efectos comunes.

TABLA1: Algunas estadísticas de la extensión de varias categorías de tierras. (Flowers, T.J., et al. 1986).

SUPERFICIE DE TIERRAS	
	1 4.900 10 6 ha.
Apropiadas para el cultivo	3.200 10 6 ha.
Cultivadas	1.490 10 6 ha.
Tierras áridas y semiáridas	4900-6200 10 6 ha.
Tierras irrigadas	230-240 10 6 ha.
Tierras irrigadas afectadas por la sal	30-50% tierras irrigadas

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA ADAPTACION DE LAS PLANTAS A LA SALINIDAD: plantas halofitas y plantas glicofitas.

En un ambiente con alta concentración de sales las plantas sufren tres tipos de estres : 1) el estrés hídrico causado por la reducción del potencial osmótico 2) el efecto tóxico debido a las altas concentraciones de iones, 3) deficiencias nutricionales derivadas de interacciones iónicas.

La mayoría de las plantas no sobreviven bajo condiciones de alta salinidad, o si lo hacen pero con un descenso del rendimiento. Las respuestas de las plantas dependen de la severidad y duración del estrés, del genotipo de la planta, del estado de desarrollo y de los factores ambientales que acompañan al estrés (humedad, luminosidad, ...).Atendiendo al grado de tolerancia las plantas se clasifican en halofitas, plantas de hábitas salinos, y en

glicofitas, plantas sensibles a la sal. La mayoría de las especies cultivadas son en mayor o menor grado sensibles a la sal.

Las plantas halófitas, se diferencian por la capacidad para completar su ciclo de vida en altas concentraciones salinas 100-200 mM NaCl. Además, la mayoría de las halófitas dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas, presentan una inducción del crecimiento por sal.

La principal adaptación de estas plantas de hábitat salino reside en su capacidad para incrementar la toma de iones del ambiente para ajustar su potencial osmótico y en su habilidad para translocar y compartimentalizar estos iones que serían nocivos para la célula en vacuolas. Para mantener el potencial hídrico del citoplasma al mismo valor que el de las vacuolas la célula sintetiza solutos orgánicos no tóxicos de bajo peso molecular y los acumula en el citoplasma. se ha detectado la acumulación de prolina y betainas en las plantas halofitas.

Otras adaptaciones frecuentes en las especies halófitas son: la reducción del tamaño de las hojas, recubrimiento con pelos y engrosamiento de la cutícula, para evitar la pérdida de agua; un mayor desarrollo del sistema radicular frente al sistema foliar, para favorecer la extracción de agua de las zonas menos salinas; una reducción en el radio superficie/volumen, succulencia, para reducir la tasa de pérdida de agua relativa al volumen y diluir la concentración de sales a través de la absorción de agua; y la aparición de glándulas especializadas en la excreción de sal. (Revisado por Flowers et al. 1986; Lauchi 1990).

Las plantas glicófitas, al no poder usar las sales para regular el potencial osmótico, sintetizan solutos orgánicos: azúcares (sacarosa, sorbitol), aminoácidos o derivados de éstos (betaina glicina, betaina y prolina). No obstante, aunque la compartimentarización de iones en vacuolas es característica de las halofitas, algunas glicofilas desarrollan esta capacidad (Binzel 1988).

A diferencia de las halofitas tienden a excluir las sales o sequestrar parte de ellas en raíces y tallos para minimizar la exposición de órganos meristemática o fotosintéticamente activos a estas concentraciones iónicas. Estas plantas aunque a nivel celular regulan menos eficientemente el flujo de iones, realizan una repartición de iones más efectiva a nivel de órganos y tejidos que las plantas halófitas (Lauchi 1990). Las plantas glicófitas deben de regular la absorción neta de iones para evitar los efectos tóxicos, esto lo consiguen mediante el uso de transportadores específicos de K^+ , el más estudiado, y una extrusión activa de iones Na^+ , siendo el ratio K^+/Na^+ mayor en las glicofitas que en las halofitas.

La síntesis y transporte de osmolitos orgánicos, el transporte de iones inorgánicos y la compartimentarización, traen consigo un enorme gasto metabólico que deriva en una reducción del crecimiento. Aunque tradicionalmente se ha interpretado que el crecimiento en medio salino está limitado por las tasas de fotosíntesis, ultimamente se ha sugerido que la causa real podría ser que la salinidad afectase a la asimilación de carbono. (Munns 1993). El crecimiento de las raíces está menos afectado que el crecimiento de la parte aérea, pudiendo estar este último regulado por señales químicas y hormonales.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA A NIVEL MOLECULAR A ESTRES SALINO

Estudio de líneas celulares tolerantes a la sal

En los últimos años se han desarrollado muchos estudios de líneas celulares tolerantes a estrés salino, pero a pesar del potencial de estas líneas para la investigación de la base de la respuesta a la salinidad, el énfasis puesto en estos trabajos ha venido principalmente derivado de su posible utilidad en los programas de mejora genética.

El número de mutantes es pequeño debido a la rápida capacidad de adaptación epigenética de las células vegetales a crecientes concentraciones salinas, lo cual hace difícil la selección de mutantes verdaderamente tolerantes, y por otra parte a la dificultad de regeneración de numerosas especies y a la aparición de caracteres no relacionados con los deseados tras la regeneración a partir de suspensiones celulares (ej. esterilidad Wong et al 1983). No obstante, tras una laguna de éxitos, en los últimos años se han conseguido seleccionar *in vitro* líneas celulares y regenerar plantas tolerantes a la sal en arroz, caña de azúcar y en *Brassica juncea* (Revisado por Dix 1993). El éxito de estos trabajos parece residir en el uso de cultivos embriogénicos, u otros cultivos organizados con un gran potencial de regeneración a partir de tallos adventicios o embriones somáticos, a diferencia de los callos y suspensiones celulares tradicionalmente usados. También se han obtenido plantas de alfalfa tolerantes a la sal en las que estos caracteres parecen ser estables pues se mantienen tras ciclos de regeneración de plantas a partir de callos (Revisado por Winicov 1993). Con sistemas celulares alternativos, como los protoplastos, se han conseguido mutantes resistentes a KCl, PEG y NaCl (Sumaryati et al. 1992).

Mientras el número de mutantes es pequeño, la información acumulada a partir del estudio de líneas seleccionadas *in vitro* descritas como tolerantes a la sal es muy extensa. La ventaja del uso de cultivos celulares en estos estudios es la disponibilidad de una población homogénea de células creciendo en medio líquido donde poder analizar de forma uniforme un estrés hídrico -osmótico-salino.

Se han realizado muchos estudios de los cambios de expresión génica que tienen lugar en las células adaptadas a estrés salino. La proteína más estudiada ha sido la osmotina. Originalmente se descubrió como una proteína de 26kDa que se acumulaba en cuerpos de inclusión en las vacuolas de las células adaptadas a NaCl. (Singht et al. 1985) y posteriormente se han descubierto muchas proteínas homólogas en otros sistemas. (Casas et al. 1992) (King et al 1988) (Zhu et al. 1993) (Yen et al 1994). La secuencia de este polipéptido muestra homología con proteínas implicadas en las relaciones de defensa de las plantas frente a patógenos: la taumatina (un inhibidor de α -amilasa/triopsina de maíz) y una proteína PR (pathogenesis related) inducida por el virus del mosaico del tabaco. Estudios

posteriores demuestran un papel antifúngico de esta proteína, por lo que posiblemente las proteínas tipo osmotina sean parte de un mecanismo general de defensa que reconoce síntomas de estrés osmótico tales como cambios en la permeabilidad de membrana y en el flujo de iones. (Revisado por Konowicz et al. 1993).

En estudios realizados en líneas celulares de alfalfa tolerantes a la sal se ha observado la acumulación de transcritos relacionados con la fotosíntesis codificados por el plastoma (Winicov 1991). Los resultados obtenidos en líneas independientes sugieren que la pérdida de tolerancia está correlacionada con la inhibición de la función y del desarrollo del cloroplasto. Los autores de estos trabajos proponen que la alteración de la expresión de los genes implicados en la fotosíntesis sea probablemente debida a una modificación general en un regulador negativo. Estas observaciones coincidirían con estudios realizados en Cyanobacterias, en los que se ha detectado un gran nivel de Rubisco en especies halotolerantes (Revisado por Winicov 1993).

También se han usado líneas celulares adaptadas a estrés salino para estudiar procesos de transporte iónico. Se ha observado un aumento en la toma de K^+ en células adaptadas a NaCl (Wataad 1991), probablemente como resultado de una combinación de la actividad de la H^+ ATPasa del plasmalelma y de una mayor selectividad de la toma de K^+ . El contenido de una H^+ ATPasa de 69 kDa del tonoplasto se reduce en las células adaptadas. Estando esta reducción asociada con una acumulación de iones Na^+ y Cl^- en las vacuolas. (Reuvenie 1990). Otros trabajos sugieren un papel de la acumulación de NaCl como el mecanismo para mejorar el crecimiento en moderadas concentraciones salinas. en líneas seleccionadas de *Vaccinium corymbosum*, blueberry (Muralitharan 1990).

El papel de los osmolitos ha sido también objeto de estudio en los trabajos de líneas celulares adaptadas. Se ha observado una mayor tolerancia a la salinidad en líneas resistentes a análogos de prolina. (Dix et al. 1994) (Van Swaij et al. 1986); y se han detectado unos niveles altos de prolina en mutantes de *N. plumbaginifolia* seleccionados por resistencia a NaCl, KCl y desecación (Revisado por Dix 1993).

Los estudios comparativos de la respuesta adaptativa en células de la glicofita *Nicotiana tabacum* L. y de la halofita *Atriplex nummularia*, realizados por el grupo de Hasegawa, (Revisado en Konowicz et al. 1993) muestran una vez más el gran potencial de los cultivos celulares como herramienta de estudio. Los resultados obtenidos sugieren que las células de las glicofitas cuando se adaptan a concentraciones salinas altas utilizan mecanismos celulares comparables a los utilizados por las halofitas, por lo que estos autores sugieren que la tolerancia a la salinidad pueda ser resultado de una alteración de la expresión de los genes presentes en ambos tipos de plantas.

No obstante, los resultados obtenidos son sólo complementarios a los estudios de plantas, pues no se contemplan ciertos fenómenos tales como las interacciones celulares a nivel de tejido y estructuras superiores, y en definitiva los mecanismos de integración de la

respuesta a nivel de planta que deben de tener un papel importante en la respuesta al estrés.

Funciones inducidas por estrés salino y otros estrés relacionados.

Se han identificado múltiples cambios en la expresión génica durante el estrés salino e hídrico mediante 2-DPAGE y se han aislado por hibridación diferencial de librerías de cDNA muchos genes. Estos cambios de expresión génica responden a la necesidad de la planta de iniciar procesos regulatorios que ajustan el metabolismo celular a las nuevas condiciones.

A continuación se discutirá el posible papel de muchos genes inducidos por estrés salino. No obstante, ya que las respuestas de las plantas a diversos tipos de estrés ambiental están estrechamente relacionadas, en esta revisión se ha considerado necesario integrar los resultados obtenidos en el análisis de otros tipos de estrés: desecación y bajas temperaturas, que al igual que el estrés salino ocasionan un déficit hídrico.

Síntesis y acumulación de osmolitos

Frente a diferentes tipos de estrés las células sintetizan y acumulan compuestos no tóxicos, osmoprotectores (carbohidratos, aminoácidos, alcoholes y compuestos cuaternarios de amonio y terciarios de azufre) con el objeto de contribuir al ajuste osmótico de la células y proteger las estructuras.

A partir de estudios de estabilidad en la desecación de biomoléculas se han asignado diferentes funciones a los carbohidratos. Crowell 1993, propone un modelo de reemplazamiento del agua por parte de los los azúcares en la desecación. De acuerdo con esta hipótesis los disacáridos podrían prevenir la fusión de membranas que tiene lugar durante el déficit hídrico interaccionando con los grupos polares de los fosfolípidos y los grupos funcionales de las proteínas. Así, estos trabajos sugieren que de igual forma que la trealosa ejerce una función protectora en los organismos anhidrobióticos como las levaduras, nematodos, hongos y bacterias, en las plantas este mismo papel lo desempeñaría la sacarosa en el polen y en las semillas.

En adición a la protección de membranas también se han encontrado evidencias de que los carbohidratos puedan estar implicados en la estabilización de proteínas y en el mantenimiento de la actividad enzimática durante la desecación (Carpenter 1988).

Por otra parte, también se han asignado una función protectora a los aminoácidos y sus derivados. Algunos trabajos sugieren que el papel adaptativo de la acumulación de prolina en plantas expuestas a estrés salino pudiera ser el de reducir la peroxidación de los lípidos debido a la existencia de radicales libres, los cuales causarían un deterioro de la membrana (Shardi et al. 1993).

Se han realizado muchos estudios comparativos entre especies y tejidos que difieren en la tolerancia al déficit hídrico y salino con el objeto de identificar las moléculas responsables de dicha capacidad de tolerancia. Así por ejemplo, se ha correlacionado la acumulación de stachiosa con un incremento en la tolerancia a la desecación en semillas.(Blackman 1992) La acumulación de manitol en plantas transgénicas del gen manitol 1-fosfato deshidrogenasa, está correlacionada con una mayor capacidad de enraizamiento y crecimiento en medio salino (Tarczynski et al. 1993.).

No obstante, en otros casos se tienen evidencias de que la sola acumulación de carbohidratos no es la responsable de la adquisición de tolerancia. Estudios realizados con mutantes de *Arabidopsis* demuestran una separación temporal entre la acumulación de carbohidratos y la adquisición de tolerancia, aunque si se ha encontrado un posible efecto de la composición de carbohidratos en el grado de longevidad de las semillas (Ooms 1993). En la misma línea, los estudios comparativos entre especies de arroz, (Still 1994) concluyen que la sensibilidad a desecación del arroz *Zizania palustris* no puede ser correlacionada con una deficiencia en la síntesis de oligosacaridos.

Una prueba más del papel de estos compuestos osmoprotectores es la inducción por estrés salino e hídrico de los genes que codifican para enzimas implicadas en la síntesis de estos compuestos. Así por ejemplo se han clonado los genes BADH, betaina aldehído deshidrogenasa, inducido por estrés salino en espinaca y remolacha (Weretilnyk et al 1990).(McCue y Hanson, 1992); un gen que codifica para una aldosa reductasa dependiente de NADH+ implicada en la síntesis de sorbitol, en embriones tolerantes a la desecación (Bartels et al. 1991); y un gen homólogo al enzima Imt1 hidroximetil transferasa que cataliza el último paso de la síntesis del alcohol pinitol, en la halofita *Mesembryanthemum* (Vernon 1992).

Control del transporte iónico

En la respuesta al estrés salino son de vital importancia las adaptaciones celulares que conllevan el ajuste del potencial osmótico y la compartimentarización de iones en la vacuola. En las plantas se piensa que este transporte de iones y solutos a través de la vacuola ocurre gracias a un gradiente de H⁺ generado por H⁺-ATPasas y H⁺ translocating pirofosfatasas. Los estudios realizados en células adaptadas a la sal, parecen indicar la existencia de un mecanismo de regulación de las moléculas implicadas en este transporte iónico.(apartado X). Se ha detectado un mayor transporte de H⁺ y una mayor actividad ATPasa en las células adaptadas; también se ha observado una regulación por NaCl de la subunidad de 70KDa de la ATPasa del tonoplasto de tabaco (Narasimha 1991) y una inducción por estrés salino de una posible Ca²⁺ ATPasa (Perez Prat 1992).

Otras moléculas que podrían ejercer un papel importante en el ajuste osmótico son aquellas moléculas que forman canales específicos de agua, iones o solutos. En plántulas de guisante se ha aislado un clon de cDNA inducible por desecación, el cual corresponde a una proteína que presenta seis dominios transmembrana que aparecen en las proteínas que forman canales iónicos de Na⁺, K⁺ o Ca²⁺; además el extremo carboxilo de esta proteína

muestra homología con la nodulina-26 de soja, una proteína de la membrana peribacterial (Guerrero 1990 y Yamaguchi 1992.) No obstante para probar esta hipótesis se debe estudiar si estas proteínas se localizan en el tonoplasto y si forman canales.

La estructura y permeabilidad de la membrana es un factor muy importante que determina la composición de iones y compuestos orgánicos osmorreguladores en el citoplasma de las células sometidas a estrés salino. Las propiedades de la membrana dependen en gran parte de la composición y grado de saturación de los lípidos de la bicapa. Los resultados obtenidos en estudios comparativos entre especies que difieren en su tolerancia a la sal, indican que la regulación del metabolismo de los esteroides es crítica en la permeabilidad de las membranas. Recientemente se ha conseguido aumentar la tolerancia a sal transformando plantas con el gen glicerol-3-fosfato aciltransferasa, el cual codifica para una enzima del cloroplasto que determina el nivel de insaturación de los ácidos grasos (Murat 1992).

Proteínas con posible papel estructural inducidas por estrés: Genes *Lea*, *rab* y *dehidrinas*

Se ha sugerido que la función de algunos genes inducidos por estrés salino, desecación y frío, pudiera ser la protección de estructuras celulares. Esta hipótesis está basada en las predicciones realizadas a partir de la secuencia de los mismos y de su patrón de expresión.

Genes *Lea*

Los genes *Lea* (Late embryogenesis abundant) se identificaron originalmente en algodón como genes que se expresaban en las últimas fases del desarrollo embrionario desapareciendo rápidamente en los primeros estadios de la germinación (Dure et al. 1981) (Galau et al. 1986) (Baker et al. 1988) (Galau et al. 1992). Existen genes homólogos a *Lea* que se inducen por estrés salino, por desecación, por frío o por ABA, por lo que estas proteínas no están necesariamente reguladas con el desarrollo.

Estos genes codifican para proteínas solubles, muy hidrofílicas, no compartimentarizadas y presentes en cantidades grandes en las células, lo cual excluye su posible función enzimática, habiéndoseles asignado diversas funciones protectoras en relación a estudios derivados de la estructura y acumulación de estas proteínas. (Revisado por ((Dure IIIa 1993)(Dure IIIb 1993)(Dure IIIc 1993)).

Los genes *Lea* Familia D19 o grupo 1, codifican para proteínas muy hidrofílicas, con una alta proporción de residuos cargados y ricas en el aminoácido Gly. Por todo ello se predice que sean moléculas muy hidratadas y con una estructura amorfa, 70% random coil. Estas características sugieren que estas proteínas puedan unir moléculas de agua. Las proteínas *Lea* del grupo D-113o grupo 4 se han encontrado en cantidades del orden de 0.3mM en el embrión y distribuidas uniformemente en todos los tipos celulares (Roberts et al. 1993). Sólo presentan una estructura definida de α -hélice en el extremo amino terminal, la

cual podría servir para la dimerización de estas proteínas. Los autores sugieren que estas proteínas podrían actuar como chaperonas-reversas, preservando las estructuras de la membrana en la desecación, interaccionando a lo largo de la longitud de ésta en base a su abundancia y propiedades.

Las proteínas Lea Grupo3, D-7 Familia, presentan un número variable de repeticiones de una secuencia consenso de 11 mer.con estructura de hélice anfifílica. Se localizan en la célula a concentraciones de 0.2mM (Roberts et al. 1993). Dada su abundancia y la presencia de aminoácidos distribuidos formando bolsillos de unión a fosfato se postula que podrían secuestrar combinaciones de iones y sales aminoácidas evitando su precipitación (Dure IIIb 1993). Se ha atribuido una función similar a las proteínas del grupo 5 Familia D-29.

Las proteínas Lea D-11 Grupo 2 , presentan un número variable de repeticiones de una secuencia consenso de 14 aa KKGimeKIKEKIPG. Esta característica es compartida por proteínas del tipo de las dehidrinas, rab, cor y otras proteínas inducidas por ABA, estrés salino, hídrico y por frío que se estudiarán a continuación.

Dehidrinas

Bajo el término de dehidrinas, definido por Close, se agrupan proteínas que tienen en común una serie de características que se ilustran en la tabla X.

Estas proteínas están presentes tanto en gimnospermas como en angiospermas, (Close et al. 1993), y generalmente están codificadas por una familia multigénica cuyos miembros individuales están presentes como alelos múltiples en el pool genético de cada especie de planta. Existen evidencias inmunológicas de la presencia de estas proteínas en Cyanobacterias, levaduras y otros microorganismos. (Close y Lammers 1993).(Close et al. 1993 revisión).

Generalmente se acumulan en respuesta a un programa de desarrollo o son inducidas por un estrés ambiental. Así por ejemplo se han identificado en procesos de desecación, salinidad, baja temperaturas, así como en el desarrollo embrionario o inducidas por ABA (ver tablaX2); aunque algunas pueden estar presentes en ausencia de estrés o manifestar un patrón de inducción claramente diferente.(Schneider et al. 1993) (Robertson y Chandler 1994) (Welin 1994).

Estas proteínas han sido inmunolocalizadas en el citoplasma y en el núcleo, (localización citoplasmática: (Mundy y Chua 1988) (Neven et al. 1993) (Schneider et al. 1993)) (Localización citoplasmática y nuclear: (Godoy et al. 1994) (Close et al. 1994) (Godoy-Luna et al. 1994)). Las diferencias observadas probablemente indican una diferente regulación del transporte al núcleo en función del tratamiento, tipo celular, o la existencia de diferentes isoformas con diferentes localizaciones.

TABLA II: Características de las dehidrinas.

Características comunes:

- Secuencia consenso de 15 aa EKKGIMDKIKELPG en el extremo carboxilo, y repetida una o varias veces en dirección al extremo amino, en algunos casos como una secuencia algo modificada.*.
- Presentes como proteínas solubles tras el calentamiento de extractos.
- Hidrofílicas
- Ausencia de los aminoácidos Cys y Trp.

* D-111

Otras características (no comunes):

- Tamaño 10 -150 kDa.
 - Muchas dehidrinas presentan un tracto de residuos de Ser adyacente al dominio conservado rico en Lys. (posibles señales de localización nuclear NLS)
 - Secuencia DEYGNP cerca del extremo amino, y delante del motivo consenso.
 - Repeticiones en tandem ricas en Gly entre las repeticiones de la secuencia conservada de 15 aas.
 - Repeticiones de GT
-

Dado que el motivo de aminoácidos ricos en Lys está conservado en todas las dehidrinas, es lógico pensar que sea la clave de la función de estas proteínas. Diferentes algoritmos predicen que este dominio consenso podría formar una α -hélice de marcado carácter anfipático, donde los aminoácidos no polares están en un lado, los residuos cargados negativos al otro lado y entre ambos estarían dispuestos los residuos cargados positivamente. Esta asimetría sugiere que la función de estas proteínas sea la de interaccionar con otras moléculas. En el citoplasma las dehidrinas podrían estabilizar proteínas y membranas, y quizás actuar de forma sinérgica con los osmolitos contribuyendo a la exclusión de solutos de macromoléculas; y en el núcleo podrían tener un papel protector similar al del citoplasma, o incluso podrían estabilizar el transporte de proteínas al núcleo.(Goday et al. 1994).

No obstante hasta el momento no se ha determinado ninguna función *in vivo* para estas proteínas (lea y dehidrinas). Los estudios realizados demuestran que la inducción de estos tipos de proteínas parece ser necesaria en la respuesta al estrés, así por ejemplo se ha observado una asociación entre la presencia/ausencia de proteínas del grupo III de Lea y la capacidad/ incapacidad de ciertos tejidos de recuperarse de la desecación (Ried 1993). Sin embargo, algunos estudios comparativos realizados entre especies que difieren en su tolerancia al déficit hídrico, (Ooms, Still) demuestran que la menor capacidad de respuesta no está asociada a una deficiencia en la acumulación de estas proteínas. Así mismo, la sobreexpresión de estos genes en plantas transgénicas (Iturriaga et al. 1992) parece indicar

secuencia	planta	gen	induccion	Referencia
EKKGMMDKIKDKIPG	<i>L. esculentum</i>	tas14	S.A.D.	Godoy et al. 1990.
EKKGVMDKIKEKLPG	<i>H. vulgare</i>	dhn1	D.A.	Close et al 1989.
EKKGVMDKIKEKLPG	<i>H. vulgare</i>	dhn2	D.A.	Idem
EKKG IMDKIKEKLPG	<i>H. vulgare</i>	dhn3	D.A.	Idem
EKKG IMDKIKEKLPG	<i>H. vulgare</i>	dhn4	D.A.	Idem
EKKG IMDKIKEKLPG	<i>Z. mays</i>	dhn1	D.	Idem
EKKG IMDKIKEKLPG	<i>Z. mays</i>	rab17	D.A.	Villardell et al. 1990
EKKG IMDKIKEKLPG	<i>O. sativa</i>	rab16A	A.S.D F.	Yamaguchi et al. 1989.
EKKGFMDKIKEKLPG	<i>O. sativa</i>	rab16B	Lib A..S.	Idem.
EKKGFMDKIKEKLPG	<i>O. sativa</i>	rab16C	Lib..A.S.	Idem.
EKKGIVEKIKEKLPG	<i>O. sativa</i>	rab16D	Lib..A.S	Idem
EKKGVMKIKEKLPG	<i>C. plantagineum</i>	dsp14	D.A.	Piatkowski et al. 1990.
EKKGIMDKIKEKLPG	<i>C. plantagineum</i>	dsp16	D.A.	Idem.
EKKGMMDKIKDKIPG	<i>L. esculentum</i>	le4	A.D.S.	Cohen et al. 1990.
EKKGFLKIKDKIPG	<i>S. oleracea</i>	cap85	F.D.	Neven 1993.
EKKGILEKIKEKLPG	<i>A. thaliana</i>	cor47	F.D.A.	Gilmour et al. 1992.
EKKGFMDKIKEKLPG	<i>A. thaliana</i>	lti45	F.D.A.	Welin et al. 1994.
KKKGITEKIKEKFPG	<i>S. longipes</i>	H26	Lib*.A.O.D.	Zhang et al. 1993.
EKKGMMDKIKEKLPG	<i>A.thaliana</i>	rab18	F.D.A.	Lang et al. 1992.
EKKXXMXXIKXKLPG	<i>T. aestivum</i>	cor39	F.D.A.	Guo et al. 1992.
EKKGIMEKIKEKIPG	<i>M. falcata</i>	cas18	F. (no A.D.)	Wolfraim et al. 1993.
EKKGFLDKIKEKLPG	<i>S. tuberosum</i>	C17	F.	Berkel et al. 1994.
EKKGMEKIKEKLPG	<i>A. thaliana</i>	dhnX	Lib. const.	Rouse et al. 1992.
EKKGILEKIKEKLPG	<i>P. sativum</i>	dhn-cog	Cot.D-A	Robertson et al. 1994.
EKKGIMDKIKEKLPG	<i>P. sativum</i>	X	Cot..D.A.	Robertson, M. et al 1992.
EKKGVMDKIKEKLPG	<i>G. hirsutum</i>	d147b	Cot.D.A.O.	Galau et al. 1992.
EKKSMDKIKSKLPG	<i>D. carota</i>	ECP40	c.e..A.D.	Kiyosue et al. 1993
EKKGILEKIKEKLPG	<i>R. sativus</i>	lea2	D(e.)	Raynal et al. 1990.

que estas proteínas relacionadas con la desecación no son suficientes per se para incrementar la tolerancia en las plantas transgénicas.

Estos datos parecen indicar que estos genes sean necesarios pero no suficientes para la osmoprotección y puedan trabajar solo en cooperación con otras moléculas.

Funciones metabólicas

El efecto primario del estrés salino es su efecto tóxico, y su disturbancia? metabólica. Otros tipos de estres: hídrico y térmico también producen cambios metabólicos. El resultado es que las plantas tienen que incrementar sus costes para el crecimiento y mantenimiento frente a estas condiciones.

Algunas plantas se adaptan mediante cambios metabólicos, tomando la ruta CAM del metabolismo ácido de las Crasuláceas. En la planta halófila facultativa, *Mesembryanthemum crystallinum*, se han aislado dos isoformas de la PEPCasa, enzima del primer paso de fijación de CO₂ en C₄ y CAM, las cuales difieren en la inducción por sal y desecación (Cushman 1989). En estudios con células tolerantes a NaCl se ha observado una inducción en la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis y muchos trabajos parecen indicar que la inhibición de la función y desarrollo del cloroplasto está correlacionada con la pérdida de tolerancia (Winicok. 1993) (Schneider et al. 1993).

En la planta *Craterostigma plantaginenum* se ha detectado la acumulación de ARNm de GADH, gliceraldehido deshidrogenasa, durante la deshidratación y el tratamiento con ABA, esto puede responder a una preparación de la célula para las posibles demandas de ATP y NADH₂ durante la recuperación. (Velasco et al. 1994)

El estrés oxidativo es una de las causas del daño en los tejidos de plantas sometidas a diferentes tipos de estrés (salino, desecación, bajas temperaturas, alta intensidad de luz, así como exposición a agentes químicos) y se ha correlacionado con un incremento de la actividad de enzimas antioxidantes. Se han clonado muchos genes que se inducen por estrés salino e hídrico que codifican para enzimas con función antioxidante o detoxificadora: epóxido hidrolasa (Kiyosue 1994), glutatión peroxidasa (Holland 1993), ascorbato peroxidasa (Mittler 1994).

Otras funciones

Por estres salino-hídrico también se inducen algunos genes cuyas funciones son características de la respuesta al ataque por patógenos: osmotina, y transportadores de fosfolípidos.

La inducción de osmotina y otras proteínas relacionadas por estrés osmótico y su función en la defensa por patógenos, podría indicar la existencia de una ruta de transducción de señales global inducida por diferentes condiciones ambientales. La percepción de las células del estrés salino-hídrico podría tener características comunes con la percepción de la infección por patógenos. Señales bióticas y abióticas como la herida, la infección por virus,

la salinidad y el estrés hídrico, pueden afectar a la permeabilidad de la membrana plasmática. Por otra parte, las respuestas de las plantas al ataque de patógenos son directa o indirectamente consecuencia del daño celular: la ruptura de membranas trae consigo la despolarización, cambios en la permeabilidad y liberación de ciertos solutos que activan los mecanismos de defensa contra patógenos.

En nuestro laboratorio se ha clonado por hibridación diferencial en una librería de cDNA de germinulas de *Lycopersicon esculentum* tratadas con sal y ABA, un gen que codifica para una proteína que tiene gran homología con proteínas transportadoras de lípidos, TSW12 (Torres-Schummann et al. 1992). En otra especie de tomate se ha clonado un gen homólogo, inducido por desecación (Plant et al. 1991). En estudios realizados con proteínas homólogas a transportadores de fosfolípidos se ha demostrado la transferencia *in vitro* de lípidos y la inhibición del crecimiento de fitopatógenos (Terras et al. 1992) (Olmedo). La posible función como transportadores de fosfolípidos, estaría relacionada con la importancia en los procesos de estrés del mantenimiento de la estabilidad y permeabilidad de la membrana; y la posible función de defensa contra patógenos, podría ser consecuencia de la convergencia de señales a diferentes tipos de estrés como se explicó anteriormente.

Otras funciones que también se inducen por estrés salino-hídrico son las implicadas tanto en la degradación de proteínas, proteasas y ubiquitinas, como en la inhibición de dichos procesos degradativos: chaperonas e inhibidores de proteasas. En estudios de aclimatación a sequía, salinidad o por tratamiento con ABA, se ha clonado un gen BnD22, el cual codifica para una proteína con homología a los inhibidores de proteasas de Kunitz (Downing 1992). Los autores sugieren que esta proteína protegería frente a las proteasas endógenas cuya actividad aumenta durante el proceso de senescencia acelerada que se observa en las hojas tras el largo periodo de tratamiento

Por último, cabría citar que durante el estrés salino-hídrico se induce una respuesta compleja que comienza en la percepción de dicho estrés, iniciándose unas rutas de transducción de señales que finalmente se manifiestan en cambios a nivel celular, fisiológico y niveles de desarrollo. Aunque no se conoce bien las moléculas implicadas en esta cadena, el ácido abscísico, ABA, debe ser un eslabón determinante, pues la mayoría de los genes inducidos por estrés salino e hídrico se inducen también por ABA, hormona cuyos niveles aumentan en estas condiciones de estrés.

Una estrategia de estudio de las posibles moléculas y señales implicadas la constituye el estudio de posibles elementos en *cis* y *trans* que regulen la expresión de los genes inducidos. Además de estas secuencias y factores de transcripción pueden existir otras moléculas reguladoras implicadas en el proceso. Así por ejemplo se han clonado genes que se inducen por estrés salino que codifican para proteínas que se unen a ARN, (REF), inhibidores de quinasas (Chen et al. 1994), e incluso moléculas de adhesión como en las células animales (Zhu 1993, 1994).

Estudio de la respuesta molecular en especies resistentes al estrés salino-hídrico.

Los estudios realizados en especies que tienen una respuesta buena y definida al estrés salino-hídrico constituyen un modelo para investigar los mecanismos de adaptación que tienen lugar en las plantas sometidas a dicho estrés.

Se han realizado muchos estudios a nivel molecular de la respuesta de las plantas halófitas. Entre ellos podrían destacarse los realizados en *Lophopyrum elongatum*, halófito facultativo, que por estar filogenéticamente relacionada con el trigo presenta muchas ventajas tanto para la obtención de especies agrícolas más tolerantes como para la investigación de la respuesta a la adaptación de las plantas halófitas a la sal.

En esta especie se han clonado genes que se inducen de forma muy rápida con el estrés salino por lo que se han denominado ESI (early salt stressed induced) (Gulick 1990). Estos genes presentan un patrón de expresión bifásico: una primera de 24 h. en la que los genes se inducen rápidamente a las 2 h. de tratamiento, alcanzándose unos niveles de expresión máxima a las 6 h. que luego empiezan a decrecer; una segunda fase en la que la respuesta se caracteriza por una constante, o un pequeño incremento en la cantidad de ARNm. Lo más interesante de estos estudios es la posibilidad de comparar esta respuesta en genotipos diferentes; así la primera fase es mucho más pronunciada en *L. elongatum* que en el anfiploide, y concomitantemente éste es mucho más tolerante que el trigo cultivado, por lo que es posible que la expresión de estos genes sea crítica durante las primeras 24 horas. No se sabe bien la función de la segunda fase, quizás el elevado estado de equilibrio del ARNm se deba a la necesidad de reemplazar las proteínas ESI (Galvez, A.F. et al 1993).

Los niveles de ARNm en el anfiploide constituyen una cuarta parte de los niveles observados en *L. elongatum*. Esta aditividad genómica sugiere que si se introducen los genes ESI de *L. elongatum* en especies de baja ploidía se pueden conseguir buenos resultados.

También ha recibido especial atención la planta de hielo, *Mesembryanthemum crystallinum*, por su capacidad de cambiar el metabolismo C3 a CAM en condiciones de estrés salino. El metabolismo de las crasuláceas es una respuesta de adaptación al estrés hídrico, las plantas cierran sus estomas durante el día para evitar pérdidas de agua y los abren durante la noche para fijar CO₂ en compuestos orgánicos ácidos, que durante el día son convertidos en carbohidratos. Esta es una estrategia a largo plazo, se detecta en la planta después de 1 o 2 semanas en condiciones salinas o de deficiencia hídrica. Este cambio de metabolismo lleva consigo la inducción de las enzimas involucradas en estas rutas (Ostrem 1990). Se han clonado isoformas de estas proteínas y se ha podido detectar una regulación diferente de estas proteínas en función del estrés (Cushman 1989).

La respuesta de esta planta también está sirviendo como modelo en estudios de regulación por diferentes estímulos: sal, y reguladores del crecimiento de plantas (citoquininas y ácido abscísico) (Thomas 1993).

Otra planta cuya respuesta a nivel molecular ha sido muy estudiada es la planta de resurrección, *Craterostigma plantagineum*. El estudio de la expresión génica en este sistema es único para analizar que moléculas y señales pueden ser críticas en la limitación del daño y mantenimiento de la integridad fisiológica durante la transición de los estados seco-hidratado. Se ha detectado la expresión de proteínas tipo lea y dehidrinas, otras proteínas localizadas en el cloroplasto, (Piatkowsky 1990) (Schneider 1993) (Bartles 1992); genes que codifican para enzimas de la síntesis de osmoprotectores y genes implicados en el metabolismo. ((Bartels 1991); (Velasco et al. 1994)).

Son destacables los estudios de la conversión de carbohidratos que tiene lugar en *C. plantagineum* y otras plantas de resurrección *Boea hygroscofia* y *Myrothamnus flabellifolia*, cuando pasan del estado hidratado al desecado. El azúcar dominante en las hojas hidratadas es 2-octulosa, pero tras la deshidratación bajan los niveles de este compuesto siendo la sacarosa el azúcar predominante, aumentando también los niveles de glucosa y fructosa. E incluso se ha detectado en *M. flabellifolia* la acumulación de trealosa y glucosilglicerol, compuestos de actividad osmótica en organismos inferiores. (Revisado por Bartles et al. 1993).

Uso de organismos transgénicos y microorganismos en el estudio de la respuesta a estrés salino.

La transformación de plantas es una herramienta que permite estudiar la función de muchos genes, mediante la sobreexpresión o la inactivación por genes antisentidos.

Por otro lado la aplicación de esta técnica en la obtención de plantas resistentes a diferentes condiciones ambientales ha tenido gran éxito, sobre todo en aquellos procesos en los que está implicado un solo gen, como por ejemplo la resistencia de plantas a herbicidas.

No obstante existen una serie de limitaciones en esta estrategia que deben ser consideradas: 1) el producto del gen introducido puede no ser estable, o los niveles acumulados pueden no ser suficientes para que se manifieste una mayor tolerancia 2) pueden existir problemas de fondo derivados de la expresión de genes endógenos homólogos al introducido 3) el producto del gen introducido puede que no funcione en otras especies por requerir la interacción con determinados productos celulares específicos (ej.: osmolitos, proteínas) 4) el gen introducido puede no ser limitante en términos de tolerancia al estrés. (Chandler y Robertson 1994).

En el tema que nos ocupa se han realizado algunos experimentos de transformación con bastante éxito. Así por ejemplo mediante la transformación con el gen manitol 1-fosfato deshidrogenasa, se ha podido demostrar que la acumulación de manitol aumenta la capacidad de tolerancia al estrés salino en las plantas transgénicas. (Tarczynski et al. 1993). En esta misma línea se están realizando experimentos de transformación para introducir la ruta de biosíntesis de betaína en plantas de tabaco para mejorar la tolerancia (Holmström et al. 1994) (Rathinasabapathi et al. 1994).

También se ha conseguido aumentar la tolerancia en plantas de tabaco transformadas con el gen glicerol-3-fosfato aciltransferasa, el cual codifica para una enzima del cloroplasto que determina el nivel de insaturación de los ácidos grasos (Murat 1992).

Sin embargo, en otros estudios la transformación de plantas con genes tipo dehidrininas no ha conferido mayor tolerancia al estrés aplicado, pudiendo estos resultados indicar que estas proteínas sean necesarias pero no suficientes en el mecanismo de respuesta al estreshídrico-salino. (Iturriaga et al. 1992) (El presente trabajo)).

La complejidad de la respuesta celular sugiere que sólo algunos procesos sean críticos/limitantes a la hora de conferir mayor tolerancia a la salinidad. Algunos autores sugieren que los pasos más limitantes podrían ser a nivel de transporte iónico. (Munns 1993; Glaxiola et al. 1992).

Los microorganismos constituyen una herramienta de estudio fundamental en muchas investigaciones, debido a las facilidades de manipulación genética de estos sistemas.

Saccharomyces cerevisiae sirve como un sistema modelo para aislar genes halotolerantes, pues los mecanismos de transporte iónico son básicamente iguales a los de plantas, se pueden aislar genes fácilmente por complementación y con la disponibilidad de plásmidos multicopias se pueden seleccionar genes en condiciones donde su sobreexpresión confiera un aumento en el crecimiento.

Mediante la transformación de células de *S. cerevisiae* con una genoteca construida en un plásmido multicopia se han podido aislar dos genes que confieren resistencia a la salinidad. HAL1 y HAL2 (Glaxiola et al. 1992) (Murgía et al. 1995)

El gen HAL1 codifica para una proteína de 32KDa que no muestra homología con ninguna proteína presente en la base de datos. Este gen está conservado en plantas y se induce por NaCl y ABA. El papel fisiológico de HAL1 está relacionado con la tolerancia al Na⁺, probablemente nivelando los niveles de cationes Na⁺/K⁺ en la célula. La sobreexpresión de este gen confiere un incremento en la tasa de crecimiento de las levaduras y las células transformadas acumulan más K⁺.

El gen HAL2 presenta homología con inositol fosfatasas, confiere tolerancia al litio y al sodio, y está implicado en la biosíntesis de metionina. Probablemente codifique para una 3'5'-bifosfato nucleotidasa necesaria en reacciones de transferencia de sulfato, y posiblemente esta proteína esté inhibida por litio y sodio. Es interesante destacar que se ha

descrito la existencia de reacciones de transferencia de sulfato en procesos de detoxificación, modificación de carbohidratos y proteínas.

También se han usado mutantes de *S. cerevisiae* con el objeto de identificar genes que sean esenciales en la tolerancia a NaCl. Así por ejemplo, por complementación se ha clonado un gen (CNB1) que codifica para una proteína fosfatasa dependiente de Ca²⁺ y calmodulina, denominada calcineurina (Mendoza et al. 1994). Los mutantes de este gen no discriminan bien el transporte de K⁺/Na⁺ y acumulan iones Li⁺, debido a esto último a una reducción en la expresión de un gen que codifica para una ATPasa implicada en el eflujo de Na⁺ y Li⁺. Los resultados obtenidos sugieren que esta proteína podría estar coordinando la expresión y actividad de transportadores de iones para lograr la homeostasis y que las señales de transducción en las que están implicados el Ca²⁺ y las fosforilación/desfosforilación de proteínas pueden jugar un papel importante en la adaptación a NaCl en *S. cerevisiae*.

Todos estos resultados son muy interesantes, y confirman la gran utilidad de la levadura en el estudio de la respuesta a estrés salino. No obstante aunque el sistema de transporte iónico sea muy semejante en estos microorganismos y en plantas, hay que tener en cuenta que la respuesta en estas últimas puede ser mucho más compleja, dado que todas estas señales deben de integrarse en una estructura superior.

EL PAPEL DEL ACIDO ABSCISICO EN LA REGULACION GENICA Y LA TOLERANCIA AL ESTRES.

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal presente en todas las plantas superiores y en algunas algas, briofitas, hongos fitopatógenos y bacterias. Químicamente es un compuesto sesquiterpeno sintetizado a partir del ácido mevalónico a través de la ruta de síntesis de carotenoides, existiendo en las plantas tanto en forma libre como conjugada. (Zeevaart & Creelman 1988).

El ABA está implicado en muchos procesos biológicos: cierre de estomas, embriogénesis y formación de la semilla (morfogénesis del embrión, síntesis de proteínas de reserva, tolerancia a la desecación y dormancia); crecimiento de raíces, heterofilia en plantas acuáticas y en procesos de estrés ambiental donde se ha observado un aumento en los niveles de esta hormona y de la expresión de genes que podrían estar regulados por ella. (Revisado por Hetherington y Quatrano 1991)(Skriver y Mundy 1990).

Regulación de la expresión génica por ABA y estrés

La primera evidencia de la regulación de la expresión génica por ABA fue la observación de que los cambios de los niveles hormonales endógenos estaban asociados a

puede ser muy complejo, estando implicados varias combinaciones de elementos en *cis* y factores en *trans* que puedan actuar cooperativamente.

Hasta el momento no se han podido descubrir moléculas receptoras de ABA, y está por dilucidar la ruta de transducción de señales en la que está implicada esta hormona. Apoyado por datos bioquímicos en otros sistemas, como el cierre de estomas, Hetherington y Quatrano 1991 proponen que el Ca^{2+} podría ser una señal, regulando la fosforilación y desfosforilación de factores de transcripción, teniendo como resultado una alteración de los niveles de ARNm. No obstante estos estudios de regulación transcripcional deben ser complementados por otro tipos de análisis. Así por ejemplo el estudio de mutantes en la respuesta a ABA puede ayudar a identificar genes intermediarios o reguladores en esta cadena de estímulo-respuesta.

El papel del ABA en el estrés

Se ha sugerido que el ABA juega un papel importante en la respuesta de las plantas a diversos tipos de estrés ambiental, ya que muchos tratamientos con esta hormona parecen proteger a las plantas de los efectos de los estrés ensayados (frío: Chen et al. 1983; Lalk y Dörfflingly, 1985; Orr et al. 1986; sal LaRosa et al. 1985; anoxia: Hwang y VanToai 1992). No obstante, como con estos tratamientos se induce la expresión de genes regulados por ABA, podrían ser estos productos génicos los realmente implicados en la adquisición de la tolerancia.

Por un lado estos genes podrían ser factores limitantes en la tolerancia, pero por otro lado podrían no estar relacionados directamente con esta respuesta adaptativa. Algunos genes se podrían expresar porque el ABA normalmente regula su expresión en determinados estados de desarrollo y crecimiento, pudiendo reflejar estos cambios de expresión ajustes derivados de la alteración del estado fisiológico de las plantas. Así por ejemplo los cambio en los niveles de proteínas de reserva y factores de elongación, parecen adecuarse a este modelo.(Chandler y Robertson 1994) Ya que el estrés conduce a una reducción de la tasa de crecimiento, es lógico pensar que los cambios de los niveles de ciertas proteínas respondan a ajustes a este crecimiento lento. La situación podría ser distinta para otros genes inducidos por ABA y diferentes tipos de estrés (lea/rab/dehidrinas) para los que se ha sugerido un papel protector durante el estrés (Dure III et al.).No obstante hasta el momento la mayoría de las evidencias provienen de predicciones de estructura y de estudios de correlación en especies con diferente grado de tolerancia al estrés, no existiendo pruebas directas de un papel esencial para estas proteínas, sendo por tanto necesarios más estudios para determinar la función de estos genes.

Aunque se han encontrado evidencias que prueban que el ABA puede realizar funciones independientemente de la expresión de genes (efectos rápidos en el transporte iónico en células de estoma tras la aplicación de ABA), en general el mecanismo de acción de esta hormona parece estar asociado a la regulación génica. Según algunos autores, (Hetherington y Quatrano 1991), la función del ABA podría ser la de preparar al tejido

cambios en los niveles de los productos de dichos genes. Posteriormente estudios de inducción en diferentes condiciones de estrés, aplicación exógena de ABA, y uso de mutantes e inhibidores del ácido abscísico (fluridona), han permitido analizar el papel del ABA en la inducción de estos genes.

La expresión de los genes que responden a ABA es muy variada: existen algunos genes en los que se requieren ciertos niveles de esta hormona para su expresión, (Cohen and Bray 1990; Pla et al 1991; Lang and Palva 1992), mientras que otros genes no necesitan ABA para su inducción. (Gilmour 1991, Nordin 1991 Yamaguchi 1993). El uso de ABA exógeno también ha permitido determinar la existencia de genes que se inducen por estrés pero no por ABA (Guerrero 1990; Yamaguchi 1992). Así mismo, también se ha demostrado que existe una regulación negativa de esta hormona en la expresión de ciertos genes, probablemente porque estos productos génicos puedan no ser apropiados en las nuevas condiciones fisiológicas derivadas del estrés. (Bartholomew et al. 1991).

La regulación de la expresión génica por ABA es a veces específica de órgano o de un estado de desarrollo determinado. Algunos genes que muestran una regulación por ABA en la expresión tras un tratamiento de desecación en tejido vegetativo, sin embargo no parecen requerir esta hormona para su expresión en semillas, por lo que estarían bajo un programa de desarrollo independiente de ABA. (ej. rab 17 y rab 28; Pla et al. 1989; Pla et al. 1991). Otros genes regulados por ABA presentan también una regulación independiente de esta hormona en algunas partes de las plantas (inhibidor de proteinasa de patata; Pena-Cortés et al. 1991).

De la extensa información acumulada de los estudios de inducción por estrés y uso de mutantes se puede concluir que deben existir varias rutas de inducción en genes que responden a ABA. Así por ejemplo estudios del patrón de expresión de un gen inducido en *Arabidopsis thaliana* por baja temperatura, estrés hídrico y ABA, ponen de manifiesto la posible existencia de 3 rutas de inducción diferentes que podrían converger. (Nordin 1991). Un ejemplo más de la complejidad de las vías de inducción, lo constituyen los estudios comparativos del patrón de expresión durante la aclimatación al frío y al estrés hídrico de cinco genes relacionados las proteínas lea/rab/dehidras, identificados en *A. thaliana* (Welin 1994).

Los estudios de los mecanismos moleculares de la regulación génica por ABA se han centrado en estudios de activación transcripcional mediante: 1) la identificación de elementos en *cis* que respondan a ABA en los promotores de genes regulados por esta hormona 2) la caracterización de factores que actúen en *trans* interaccionando con los factores en *cis* 3) análisis funcionales para testar si la regulación de la expresión por ABA es resultado de una interacción *in vivo* de estos factores. Siguiendo esta estrategia se ha estudiado la regulación de muchos genes (Revisado por Chandler y Robertson 1994). Se ha podido identificar un elemento en *cis* (ABRE) con una secuencia conservada en muchos genes regulados por esta hormona, así como la existencia de factores nucleares que parecen unirse a estos motivos. Los numerosos estudios demuestran que el sistema regulatorio

para en un estado diferente de desarrollo, probablemente mediante un reajuste del metabolismo celular, pudiendo ésto ocurrir bien en respuesta a un programa de desarrollo o en respuesta a una alteración (estrés).

ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se ha aislado un gen del grupo de las dehidrinas, tas 14, inducido por NaCl y ácido abscísico en plántulas de tomate a partir de hibridación diferencial de una clonoteca de cDNA (Godoy et al. 1990).

Se ha detectado un gen único por genoma haploide, aunque generalmente las dehidrinas una familia multigénica.

El polipéptido TAS14 consta de 130 aminoácidos, con un peso molecular de 13,984 dalton y un punto isoeléctrico de 6,52. En la composición aminoacídica destaca un 23% de residuos de glicina, seguido de un 9,2% de residuos de ácido glutámico, metionina y treonina.

La secuencia de la proteína presenta dos repeticiones del dominio conservado en las dehidrinas, con estructura de α -hélice. Además, hay, durante un tracto de Ser, adyacente a la primera repetición, que contiene varios motivos consenso para la fosforilación por CKII. Como en otras dehidrinas, la secuencia presenta dos repeticiones directas de aminoácidos ricos en glicina, la primera es una duplicación perfecta, parcialmente solapante y la segunda aunque no es perfecta muestra similitudes muy significativas.

El ARNm tas14 se acumula en plántulas tratadas con ABA, NaCl y manitol y en raíces, tallos y hojas de plantas tratadas con 10 g/L NaCl durante 24 horas. Este gen no se induce por otras condiciones de estrés: frío y herida.

La proteína se acumula en germinulas tratadas con NaCl, ABA y manitol. La inducción por NaCl es rápida, detectándose proteína tras 6 horas de tratamiento y alcanzándose los máximos niveles al cabo de 24-48 horas. En plantas adultas el gen se induce por NaCl en las partes aéreas (tallos y hojas) de forma abundante y continua, sin embargo en las raíces solo se detecta una expresión transitoria tras un día de tratamiento.(?)

Mediante ensayos de inmunohistoquímica se ha detectado que la proteína se acumula en primordios adventicios de raíz y está asociada a los tejidos provasculares y vasculares de tallos y hojas (Godoy-Luna et al. 1994).

OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

La finalidad de este trabajo es la de contribuir al conocimiento del gen *tas14*, siendo el objetivo principal determinar la posible función de este gen.

Los objetivos concretos de este proyecto han sido:

- 1) La obtención y análisis de plantas transgénicas que sobreexpresen el gen *tas14* en orientación sentido y antisentido.
- 2) La purificación, caracterización y localización de la proteína TAS14.
- 3) El análisis *in vitro* de las posibles interacciones de la proteína TAS14 con otras moléculas.

Los resultados que aquí se presentan han sido ya publicados parcialmente o están en vías de publicación. (Godoy-Luna et al. 1994)

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Material vegetal

1.1.1. Especies vegetales

Se utilizan semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) var. Rutgers-Marglobe, de Semillas Batlle S.A., Barcelona y semillas de tabaco *Nicotiana tabacum* var. xanthi.

1.1.2. Esterilización de semillas

Previamente a la germinación, la superficie de las semillas se esteriliza mediante lavados sucesivos en etanol 96% (30s.), en hipoclorito sódico 2% (20 min.), y finalmente varios lavados en agua destilada estéril.

Las semillas estériles de tomate se colocan sobre papel de filtro autoclavado y saturado en agua destilada estéril y se incuban a 25 °C en oscuridad.

Las semillas de tabaco estériles se colocan en cajas de Petri con medio MS (semillas tabaco silvestre) ó con medio MS + kanamicina 300 mg/ml, MSK300 (semillas de plantas transgénicas) y se incuban a 25°C.

1.1.3. Cultivo hidropónico

Las plántulas de tomate y tabaco con cotiledones expandidos se colocan en contenedores con las raíces sumergidas en solución nutritiva de Hoagland II (Jones et al. 1982), diluida a la mitad, se cultivan en cámaras con luz y temperatura controladas, bajo un régimen de 16 horas de luz y 8 de oscuridad con temperaturas de 25°C y 20°C, respectivamente. Para ir adecuando las plántulas a las nuevas condiciones de humedad, los primeros días se cubren con una bolsa de plástico que se va abriendo progresivamente cada día.

Solución nutritiva de Hoagland II:

Macronutrientes: 1 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 6 mM KNO_3 , 4mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 mM MgSO_4 . Las sales se diluyen a partir de una solución stock 1 M de cada una de ellas.

Micronutrientes: 46.25 mM H_3BO_3 , 9.15 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.76 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.32 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.11 mM $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Se añaden a partir de una solución stock 1000x.

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

1.1.4. Cultivo *in vitro*

Para manipular tejido vegetal en condiciones estériles se utiliza una cabina de flujo de aire horizontal, medios autoclavados y pinzas y demás material de manipulación esterilizados por calor.

El material vegetal se incuban en cámaras de cultivo con la temperatura y luz controladas.

El cultivo *in vitro* se ha utilizado para:

- propagación vegetativa de plantas de tabaco.
- transformación, regeneración y propagación de plantas transgénicas.

- estudios de segregación (germinación de semillas en medio selectivo)
- estudios de respuesta en medios salinos (germinación y capacidad de enraizamiento)

El medio base utilizado es el medio MS, (Murashige y Skoog, 1962. Los medios se esterilizan mediante autoclave, y los antibióticos (esterilizados por filtración) se añaden una vez enfriado el medio. Se utilizan cajas de Petri y contenedores Magenta (Sigma).

Medio MS 4.3 g/L de mezcla basal de MS (Sigma), 10 ml/L de mioinositol 100 X, 1 ml/L Vitaminas 1000X, 30 g/L Sacarosa. El pH se ajusta a 5.7 con NaOH 1M. Si se desea sólido se añade 6g/L Agar (Difco).

Mioinositol 100X; 10 mg/ml mioinositol.

Vitaminas 1000X: 0.05g/L Nicotina, 0.005g/L Tiamina, 0.005g/L Piridoxina, 0.005g/L Acido fólico, 0.0005g/L Biotina, 0.025 g/L Glicina.

MS Cocultivación: Medio MS líquido sin vitaminas.

MSS (regeneración de brotes): Medio MS sólido; 50 ml/L ácido acético naftaleno (NAA) (2mg/ml en NaOH 1N). 500 ml/L benziladenina (BA) (2mg/ml en NaOH 1N); (kanamicina 100 mg/L, Carbenicilina 250 mg/L para la regeneración de brotes a partir de discos de hojas transformados con *A.tumefaciens* +pBin19)

MS enraizamiento: Medio MS sólido, kanamicina 100 mg/L y Carbenicilina 250 mg/ml para brotes transgénicos

Para estudios de enraizamiento en presencia de sal se utilizó MS sólido suplementado con NaCl hasta una concentración final de 275mM/300mM.

MS germinación: MS sólido, kan 300 mg/ml para semillas de plantas transgénicas.

Para estudios de la capacidad de germinación en presencia de sal se utilizó MS sólido, sin vitaminas y con NaCl hasta una concentración final de 250 mM.

1.2. Bacterias

Para la transformación con plásmidos y la multiplicación de éstos se usan indistintamente estirpes de *Escherichia coli* NM522 y XL1-blue. Para la transformación de discos de hoja de tabaco se utiliza la estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, y una estirpe de *E.coli* HB101 como estirpe portadora del plásmido conjugativo pRK2013.

Las bacterias se cultivan en medio LB. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos se suplementa el medio con el antibiótico correspondiente. (100 mg/L ampicilina ó 50mg/L kanamicina).

La transformación de *Agrobacterium* mediante el método del triparental mating requiere unos medios especiales que se especifican en el apartado correspondiente.

En la tabla III se muestran las estirpes de bacterias utilizadas en este trabajo y sus genotipos.

Medio LB: 10g/L bacto triptona, 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L NaCl. Para medio sólido se añaden 15g/L agar.

1.3. Vectores

El plásmido pBluescrip II SK (+)(Stratagene Cloning Systems) se ha usado para la traducción *in vitro* del inserto TAS14-2, previamente clonado en nuestro laboratorio, así como para la obtención de ribosondas del cDNA clonado.

El plásmido pGEX2T (Pharmacia) se ha usado para la expresión heteróloga de proteínas en bacterias.

El plásmido pRT101 se ha utilizado como vector para la fusión traduccional del cDNA *tas14* con el promotor y la señal de poliadenilación del virus del mosaico de la coliflor. El vector binario pBin19 se han utilizado para la transformación de plantas de tabaco con *A. tumefaciens*.

Tabla III: Relación de estirpes de *E. coli* y *A. tumefaciens* usadas en este trabajo.

Estirpes	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> NM522	$\Delta(lac^- proAB) thi hsdD5 supE$ [F' <i>proAB, lacI^qZ</i> Δ M15] l-	Gough y Murray, 1983
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F' [proAB⁺ lacI^q lacZ</i> Δ M15 Tn10 (te ^r)]	Bullock et al., 1987
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44, hsdS20 (r_B⁻m_B⁻), recA13, ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Bolivar y Backman 1979
<i>A. tumefaciens</i> LB4404	plásmidos Cr (críptico), pAL4404 Fondo cromosómico C58-C9	Hoekma et al. 1983.

2. MANIPULACION DE ADN

2.1. Purificación de plásmidos bacterianos

Básicamente se ha seguido el protocolo de la lisis alcalina descrito originalmente por Sambrook et al., 1989. Este método está basado en la desnaturalización del ADN con álcali y la posterior precipitación del ADN plasmídico con etanol.

El protocolo original está decrito para 1.5 ml de cultivo crecido O.N.(mini-prep), pudiéndose escalar para volúmenes mayores, 15 ml (midiprep) y 250 ml (maxiprep).

2.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio, utilizándose este mismo tampón como electrolito. A las muestras se les añade 10% de tampón de carga 10X. La concentración de agarosa usada varía entre 0.5-2%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a aislar.

Como marcadores de peso molecular se han utilizado ADN del bacteriófago lambda digerido con PstI o HindIII.

Tampón TAE: 40 mM Tris-acetato pH8, 2mM EDTA, 5mM AcNa.

Tampón de carga 10X: 25% ficol, 0.25% azul de bromofenol, 10 mM EDTA.

2.3. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Tras separar los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, se recortan y se aíslan siguiendo el método de GeneClean. Este método está basado en la solubilización de la agarosa en presencia de NaI 6M y en la unión del ADN a una matriz de perlas de vidrio.

2.4. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizan en las condiciones recomendadas por los fabricantes. Una vez concluida la reacción, la mezcla de digestión se puede cargar directamente en geles de agarosa o bien, si son necesarias manipulaciones posteriores, se fenoliza y el ADN se precipita de la fase acuosa añadiendo acetato sódico hasta 0.3M y 3 volúmenes de etanol. Se incuba a -80°C durante 20 min., se centrifuga (14000 rpm, 15 min. en microcentrífuga), el sedimento se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en tampón TE.

TE: 10mM TrisHCl pH8, 1mM EDTA pH8.

2.5. Defosforilación de extremos 5'

Este método se utiliza para eliminar los grupos fosfatos en los extremos 5' de los plásmidos utilizados como vectores de clonación, con el objeto de evitar el autoligamiento del plásmido.

Después de la digestión del plásmido se añade 1/10 del volumen final de tampón de fosfatasa alcalina 10X, 1-2 U de fosfatasa alcalina y se incuba a 37°C durante 30 min.

Una vez defosforilado se carga en un gel de agarosa y se purifica el ADN por Gen Clean.

Tampón de fosfatasa 10X: Tris-HCl 0,5mM pH8.5, EDTA 1mM.

2.6. Ligación de moléculas de ADN

La ligación de moléculas de ADN en presencia de ligasa T4 se realiza en las condiciones recomendadas por los fabricantes. La relación molar de vector a inserto se ajusta a 2. Las ligaciones de fragmentos cohesivos se incuban a 14°C durante 4-18 horas; en el caso de extremos romos, la incubación se realiza a 25°C durante 1-3 horas.

2.7. Transformación de bacterias

2.7.1. Obtención de células competentes

Se sigue el método descrito por Hanahan (1983).

Se inoculan 5 ml de medio Ψ con una colonia de la estirpe apropiada, y se cultiva a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} de 0.3. Con este precultivo, se inoculan 100 ml de medio Ψ , precalentado a 37°C , y se incuba con agitación vigorosa (300-350 rpm) hasta alcanzar una DO_{600} de 0.48.

Una vez que las células están en fase exponencial, se pasa el cultivo a hielo y se recogen por centrifugación (2500 g, 7 minutos, 4°C). El sedimento se resuspende en 30 ml de solución TB1 fría y se centrifuga como antes. Finalmente se resuspenden las células suavemente en 4 ml de solución TFB2 fría, se distribuye en alícuotas y se almacena a -80°C hasta su uso.

Solución TFB1: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM acetato potásico, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol. El pH se ajusta con precisión a pH 5.8 con ácido acético 0.2M. Se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C.

Solución TFB2: 10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glicerol. Se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C.

Medio Ψ: 2% bactotripton, 0.5% extracto de levadura, 0.4% MgSO₄, 10 mM KCl. Se ajusta el pH a 7.6 con KOH.

2.7.2. Transformación

El protocolo de transformación de *E. coli* utilizado es el descrito en Sambrook et al 1989.:

Las células competentes se descongelan lentamente en hielo.

Se añade ADN (<100 ng) en un volumen (< 20 µl) se mezcla suavemente y se incuba en hielo 20 minutos.

Se incuban 90 seg a 42°C ó 5 minutos a 37°C y se colocan inmediatamente en hielo.

Se añaden 800 µl de medio LB y se incuban 30-60 minutos a 37°C, con agitación.

Finalmente se plaquean en el medio selectivo correspondiente.

3. TRANSFORMACION DE PLANTAS DE TABACO

3.1. Transformación de *A. tumefaciens* : conjugación triple

El método consiste en la movilización de un vector de transformación binario desde una estirpe de *E. coli* a otra de *A. tumefaciens* mediante la acción de un plásmido auxiliar portado por otra estirpe de *E. coli*. La transferencia se realiza vía conjugación de las 3 estirpes bacterianas y selección positiva para *A. tumefaciens* con el vector de transformación. En la figura 1 se presenta un esquema del proceso.

Se crecen las bacterias hasta fase estacionaria, inoculando una colonia en 5ml de medio con antibióticos* e incubando toda la noche. Para eliminar los antibióticos se centrifugan los cultivos y se resuspenden en LB.

En medio LB se plaquean 0.1 ml de cada cultivo y se crece a 30°C toda la noche.

Se raspa un poco del cultivo crecido y con él se inoculan 20 ml de medio selectivo: M9/sacarosa/Kan50/Streptomocina 100 y se incuba a 30°C con agitación fuerte durante 2 días.

Para confirmar que se ha seleccionado *Agrobacterium* frente a *E. coli* se plaquea una gota del cultivo anterior sobre cajas con medio M9/sacarosa/kan50/Streptomocina 250 en duplicado y se incuba a 30°C y 37°C. (*Agrobacterium* crece mucho más lento a 37° C que *E. coli*)

*Las estirpes bacterianas y las condiciones de crecimiento son:



E. coli HB101 con pRK2013 (LB, Kan50, 37°C)
E. coli XL1-Blue con pBin19-cDNA (LB, Kan50, 37°C)
A. tumefaciens LBA4404 (LB, Str100, 30°C, agitación vigorosa)

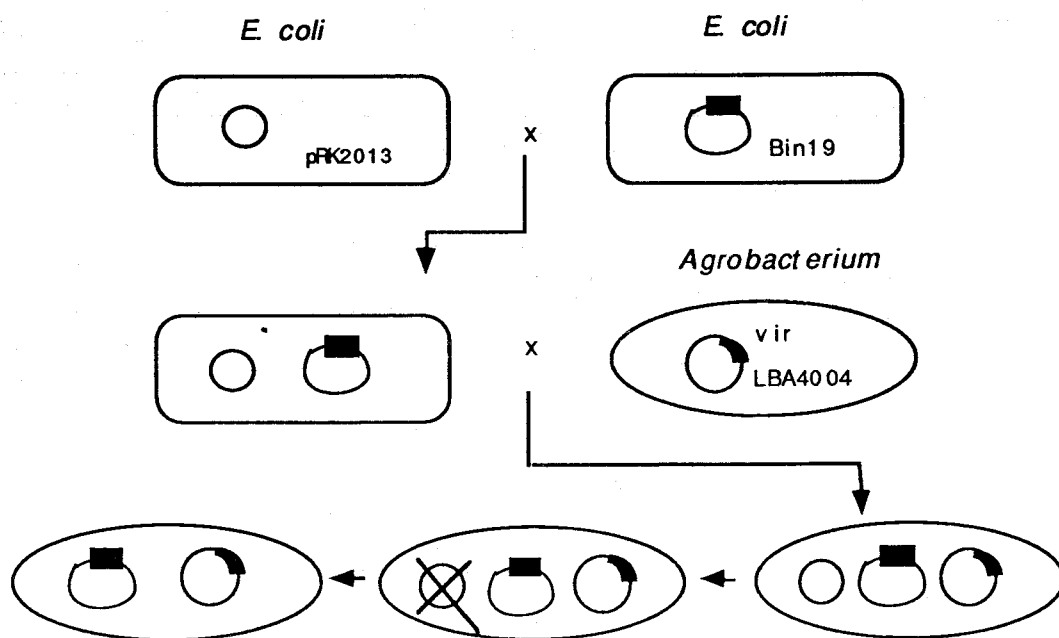


Figura 1: Conjugación triple: Movilización del plásmido pBin19 en *A. tumefaciens* LBA4404 usando el plásmido auxiliar pRK2013, y eliminación del plásmido auxiliar en *Agrobacterium*.

3.2. Cocultivación de discos de hojas de tabaco con *A. tumefaciens*

Consiste en incubar la estirpe de *A. tumefaciens* LBA4404 portadora del vector de transformación para plantas con trozos recién cortados de hojas de tabaco. La herida de la planta conlleva la liberación de moléculas y el establecimiento de una traducción de señales mediante la cual se activan las funciones vir y otras del plásmido Ti necesarias para la movilización e integración del T-DNA.

Se cortan trozos de hojas, de aproximadamente 1cm², de plantas de tabaco jóvenes (3-4 semanas) y se colocan con el envés hacia arriba y sin sumergir en cajas Petri con 20 ml de MS de cocultivación y *A. tumefaciens* diluido, (200 µl de un cultivo de 20 ml crecido durante 48 horas). Por cada transformación se cocultivan 100 discos de hojas (10-15 discos/placa) a 25°C y en oscuridad durante 2 días.

Para la elaboración de los discos se prescinde del nervio central de las hojas. Es importante que todas las manipulaciones se realicen con pinzas planas (Milipore) y que se coloquen los discos sobre medio de cocultivación conforme se cortan.

3.3. Aislamiento y regeneración de plantas de tabaco transformadas

Una vez que la bacteria ha transferido su T-DNA en el genomio de la planta, se procede a seleccionar y regenerar plantas a partir de las células en las que se ha integrado el gen marcador y por tanto el cDNA adyacente.

3.3.1. Formación de callos y brotes

Se lavan los discos de hoja después de la cocultivación en H₂O o en medio de cocultivación estériles para eliminar el exceso de bacteria. Los discos se lavan sin sumergir y se secan ligeramente sobre papel de filtro estéril.

Se colocan los discos sobre cajas de Petri con medio de formación de brotes MSS/kan100/Carb250 y se incuban en una cámara de cultivo hasta la formación de callos y posteriormente de brotes de plantas (15-30 días, renovando cada 2 semanas el medio).

3.3.2. Selección de transformantes: enraizamiento y propagación

Se cortan los brotes de plantas y se traspasan a contenedores Magenta con medio de enraizamiento MS/kan100 (Carb250 opcional). Se consideran falsos transformantes aquellos incapaces de enraizar en medio selectivo.

Las plantas se crecen en la cámara de cultivo *in vitro* y cuando alcanzan una altura de 5-15 cm se traspasan a macetas con tierra, acondicionándolas al cambio de humedad mediante bolsas de plástico, y cultivándolas en una cámara de crecimiento hasta la floración.

4. ANALISIS DEL ADN DE PLANTAS

4.1. Extracción de ADN de plantas

Para la extracción de ADN total de plantas se sigue el método de Murray y Thompson (1980), basado en el uso del detergente CTAB (cetil trietilamonio bromuro). En condiciones de alta sal (0.7 M NaCl) los ácidos nucleicos forman complejos estables y solubles con el CTAB, sin embargo, al bajar la concentración de sal por debajo de 0.4 M NaCl, los complejos precipitan dejando la mayoría de los polisacáridos en solución. Posteriormente se elimina el CTAB aprovechando su solubilidad en etanol.

El material vegetal se tritura bajo N₂ líquido y con alúmina hasta conseguir un polvo fino, y se transfiere a tubos de centrifuga.

Se añade tampón de extracción previamente calentado a 95°C, 1ml/g tejido, se homogeniza rápidamente y se incuba a 56°C durante 20 minutos.

Una vez enfriado a temperatura ambiente, se añade un volumen de cloroformo:octanol (24:1) y se homogeniza volcando el tubo suavemente. Se centrifuga

(8000 g, 10 minutos a 20°C), se traspara la fase acuosa a un tubo nuevo y se añaden 0.1 volumen de una solución 10% CTAB, 0.7M NaCl y se repite la extracción con cloroformo:octanol.

Al sobrenadante, se le añade un volumen igual de tampón de precipitación CTAB, se mezcla y se incuba a 25°C durante 30 minutos a toda la noche.

El precipitado se sedimenta por centrifugación (1500g, 10-15 minutos), el tiempo de centrifugación no debe prolongarse para evitar que el sedimento sea difícil de resuspender. El sedimento se resuspende en 1 M NaCl, calentando a 56°C si es necesario. El ADN se precipita añadiendo 2 volúmenes de etanol e incubando 30 minutos a -80°C o toda la noche a -20°C. El ADN se sedimenta por centrifugación (8000g, 20 minutos), se lava con etanol 70% y se resuspende en agua destilada estéril.

En caso de que la muestra contenga ARN, se trata con RNAsa hasta una concentración final de 1mg/ml, incubando durante 1 hora a 37°C. Para eliminar las proteínas se añade un volumen de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1), se centrifuga y se extrae con cloroformo centrifugando de nuevo y el sobrenadante se precipita con acetato sódico hasta 0.3M y 3 volúmenes de etanol. El sedimento final se lava con etanol 70%.

Tampón de extracción CTAB 2X: 100 mM Tris-HCl pH8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB. Se disuelve calentando, se autoclava y se guarda a temperatura ambiente.

Tampón de precipitación CTAB: 50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA, 1% CTAB. Se prepara igual que la solución anterior.

4.2. Cuantificación del ADN

La concentración de ADN en soluciones se estima a partir de la medida de absorbancia de la muestra a 260 nm, asumiendo que $ID.O. 260 = 50 \text{ mg/ml ADN}$.

Para una medida más exacta se utilizan métodos fluorimétricos. Para ello se utiliza un fluorocromo, Hoechst 33258, cuya fluorescencia se incrementa de forma específica al unirse al ADN y esta emisión es recogida por un fotodetector de un fluorímetro (TK100 MiniFluorímetro, Hoefer). Para la cuantificación se utiliza como patrón ADN comercial de timo de ternera.

4.3. Análisis Southern

4.3.1. Digestión del ADN, electroforesis y transferencia a membrana de nylon

Digestión:

Se digieren 10-15 μg de ADN genómico con 5 U enzima restricción / μg ADN durante al menos 4 horas, añadiendo el enzima en 2 ó mas etapas.

Electroforesis:

Los fragmentos de ADN genómico digerido se separan por electroforesis 1V/cm durante toda la noche en geles de agarosa al 0.8%, con BrEt. Es conveniente una vez cargadas las muestras aplicar 100V durante 5 minutos, para que no se quede retenido en los pocillos ADN de alto peso molecular.

Una vez finalizada la corrida se visualiza el ADN con luz UV, (la eficacia de la digestión se corresponde con la aparición de bandas repetitivas). Se marca la posición de los marcadores de peso molecular pinchando el gel con una aguja impregnada de tinta china.

Procesamiento del ADN y transferencia a filtro:

Se baña el gel en 0.25 M HCl durante 15 minutos a temperatura ambiente para hidrolizar los fragmentos de alto peso molecular y facilitar su posterior transferencia.

Se trata el gel con solución Southern I durante 30 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar el ADN.

A continuación se trata con solución Southern II, 30 minutos a temperatura ambiente para neutralizar.

Se equilibra el gel en solución de transferencia, 20XSSC durante 20 minutos a temperatura ambiente.

El gel se coloca entonces sobre un puente de papel de filtro (Whatman 3MM) que sumerge sus extremos en tampón 20XSSC; sobre el gel se coloca sucesivamente: la membrana de transferencia de nylon cortada al tamaño del gel, 3 papeles de filtro (Whatman 3MM) cortados igualmente al tamaño del gel y una pila de papel absorbente. Sobre el conjunto se coloca un peso, y se deja que se lleve a cabo la transferencia capilar durante 18 horas.

Terminada la transferencia se fija el ADN al filtro de Nylon, por fijación al vacío y con calor (80°C, 2-horas en una estufa de vacío), o bien por iluminación con luz ultravioleta en una cross-linker UVP CL-1000, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Solución Southern I: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

Solución Southern II: 1M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl

Tampón 20XSSC: 3M NaCl, 0.3M citrato sódico. Ajustar pH a 7.

4.3.2. Marcaje de sondas, hibridaciones y lavados

Preparación de sondas radioactivas de ADN:

Las sondas (50-100 ng ADN) se marcan utilizando Kits de Boehringer y Pharmacia basados en el método de los cebadores aleatorios (random primer) con 30-50 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. Los nucleótidos no incorporados se separan por cromatografía usando columnas de Sephadex G-50.

Hibridación:

Las hibridaciones se llevan a cabo en un horno de hibridación Hybaid TM micro-4 de la siguiente manera:

Se prehibrida el filtro en solución de hibridación, durante al menos 1 hora a 42°C.

Se desnaturaliza la sonda (95°C 10 minutos, e inmediatamente a hielo). El filtro se hibrida 12-18 horas a 42°C con la sonda en solución de hibridación.

Lavados:

El filtro se lava a 65°C con solución de lavado 1 y 2.

La frecuencia y duración de los lavados se monitoriza con un contador Geiger. Generalmente basta con 1 ó 2 lavados de solución 1, siendo variable los lavados con solución 2.

El filtro se envuelve en Saram-Wrapp para conservarlo humedo y se expone a una película radiográfica con pantallas intensificadoras a -80°C.

Solución de hibridación: SDS 0.1%, SSPE 5X, solución Denhardt 1X, Formamida 50% y ADN de espermatozoos de salmón 100 mg/ml.

SSPE 20X: 3.6M NaCl, 200 mM NaH_2PO_4 , 20 mM EDTA. Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH.

Denhart 50X: 5g/l Ficoll, 5g/l Polivinilpirrolidona y 5g/l BSA.

Solución lavado 1: SSPE 2X, 1% SDS

Solución de lavado 2: SSPE 0.2X, 0.1% SDS.

4.4. PCR de ADN de plantas

La técnica de amplificación de ADN mediante reacción de polimerasa en cadena PCR se ha utilizado para el análisis de las plantas transformantes, (resistentes a Kanamicina), siguiendo el protocolo descrito por Saiki (1990).

4.4.1. Descripción de los oligonucleótidos

Con el objeto de amplificar el cDNA integrado en las plantas transgénicas, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

5'GGAAGTTGATTTTCATTTTCGAGAGGA3' OLIGO 35S

5'AGAGAGACTGGTGATTTGCG3' OLIGO POLYA.

La secuencia del oligo 35S se corresponde con la secuencia 3' del promotor del Virus del mosaico de la coliflor, promotor35S, presente en el vector de expresión pRT101 usado para la clonación del cDNA. La secuencia del oligo oligo polyA se corresponde con la secuencia 5' de la señal de poliadenilación del virus de la coliflor presente en el mismo vector.

4.4.2. Reacciones de PCR

En un tubo de PCR (0.5ml) se mezclan:

50 µl mezcla PCR 2X

50 µl H₂O estéril con 100 ng ADN genómico de planta

50 µl de aceite mineral para evitar la evaporación.

Las reacciones se llevan a cabo usando un termociclador de Pharmacia, con el siguiente programa:

1 ciclo de 72°C 20 seg/ 30 ciclos de amplificación: 94°C 20 seg./40°C 20 seg/72°C 1 minuto/ y un último periodo de extensión 72°C 5 minutos.

Después del primer ciclo el aparato se programa para suspender los ciclos siguientes durante el tiempo necesario para añadir la mezcla PCR 2X a cada tubo precalentado a 72°C.

Mezcla PCR 2X: (para una muestra) 10 µl H₂O, 10 µl tampón PCR 10X, 10 µl dNTPs10X, 10 µl stock10x primer1, 10 µl stock primer 2 y 0.8 µl taq Polimerasa (3u/µl)

Tampón PCR10x: 500mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 15 mM MgCl₂ y 1mg/ml gelatina. Se dispensa en alícuotas y se almacena a -20°C.

dNTPs10X: 2mM dATP, 2mM dGTP, 2mM dCTP, 2mM dTTP, neutralizados a pH 7 con NaOH.

Stock primer: solución 2.5 mM del primer correspondiente en TE.

4.4.3. Análisis de las reacciones de PCR

Las reacciones de amplificación se analizan por electroforesis en geles de agarosa y se comprueba el tamaño del ADN amplificado.

Para verificar la autenticidad de la banda amplificada, así como para analizar los productos menos claros, se transfiere el ADN de los geles a membranas de Nylon y se hibridan con una sonda no radiactiva del cDNA correspondiente usando un Kit de marcaje de ADN con digoxigenina.

El método de marcaje no radiactivo está basado en el método de los cebadores aleatorios, pero en el que se sustituye el uso de nucleótidos radioactivos por Digoxigenina-dUTP. La detección posterior de la sonda se realiza mediante técnicas inmunológicas usando un anticuerpo frente a Digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. El marcaje, la hibridación y la detección se realizan siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante (Boehringer).

5. ANALISIS DE ARN DE PLANTAS

5.1. Extracción de ARN de plantas

Se sigue el método descrito por Wadsworth (1989) con ligeras modificaciones.:

Se tritura el material bajo N₂ líquido.

Se añade tampón de extracción, 0.5 ml/0.2 g tejido, y se homogeniza con vortex 30 seg.

Se añade 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), y se agita con vortex. Se centrifuga a 9000 rpm, 4°C, 15 minutos y el sobrenadante se pasa a un tubo nuevo. La fenolización se repite dos veces más.

Los restos de fenol presentes en el sobrenadante se eliminan añadiendo un volumen de cloroformo, se centrifuga y se recoge la fase acuosa.

Al sobrenadante se le añade un volumen de CILi 6M para precipitar el ARN, y se incuba a 4°C, durante toda la noche.

Se centrifuga a 9000 rpm, 4°C, 30-45 minutos, y se lava el sedimento con CILi 3M centrifugando en las mismas condiciones.

El precipitado se resuspende en 400 µl de AcNa 0.3M pH 5.8 y se calienta a 55°C, 10 minutos para disolver el ARN. Se centrifuga a 13000 rpm para eliminar las partículas no solubles.

El sobrenadante se precipita con 1 ml de etanol, a -80°C 15 minutos. Se centrifuga a 13000 rpm, 15 minutos, se seca el precipitado y se resuspende en H₂O a 55°C durante 10 minutos.

Las muestras así obtenidas se guardan a -80°C hasta su análisis.

Tampón de extracción: 25 mM citrato sódico pH 7, 4 M isocitrato de guanidinio, 1.5% (p/v) lauril sarcosina sódica, 100 mM 2-mercaptoetanol. El tampón se prepara sin 2-mercaptoetanol, esterilizándolo por filtración y guardándolo a 4°C.

5.2. Cuantificación del ARN

La concentración de ARN en soluciones se estima a partir de la absorbancia a 260 nm, asumiendo que $1 \text{ D.O.}_{260} = 40 \text{ mg/ml ARN}$.

5.3. Análisis Northern

5.3.1. Electroforesis y transferencia a membrana de nylon

Electroforesis en geles con formaldehído:

El análisis de poblaciones complejas de ARN por electroforesis se realiza en geles de agarosa en tampón Northern 10X con formaldehído. Posteriormente se han incorporado las modificaciones descritas por Tsang et al. 1993, incluyendo formaldehído tanto en el gel como en el tampón de corrida a una concentración final de 0.22M. Con esta variación se consigue una corrida más uniforme del ARN a través del gel y por consiguiente una mejor resolución final.

Transferencia:

Una vez terminada la electroforesis, se lava el gel 5 minutos en agua destilada para retirar el formaldehído.

Se trata el gel en 50 mM NaOH, 10 mM NaCl, 20 minutos, para eliminar posibles estructuras secundarias.

A continuación se incuba 20 minutos en 100 mM Tris-HCL pH 7.5, para neutralizar el pH.

Por último se equilibra el gel en tampón 20X SSC.

La transferencia a filtro, se hace por capilaridad como se describe para el análisis Southern.

Composición de los geles: 1.2% agarosa (disuelta en el 70% del volumen final de H₂O), 10% volumen de MOPS 10 X, 0.22 M formaldehído (se añade en campana de extracción, una vez enfriada la agarosa).

Preparación de la muestra: Las muestras de ARN se preparan en tampón Northern 1X, 50% formamida, 6.5% formaldehído, y 0.1 volumen de tampón de carga 10X. Se calientan a 65°C, 15 minutos, antes de ser cargadas.

Tampón Northern 10X: 0.2 M MOPS, 80 mM AcNa, 10 mM EDTA. Se ajusta a pH 7 con NaOH.

Tampón de carga 10X: 50% glicerol, 1 mM EDTA (pH 8), 0.25% azul de bromofenol.

5.3.2. Tinción reversible de ARN sobre membrana de nylon

La transferencia se puede valorar tiñendo de forma reversible el filtro, (Herrin y Schmidt, 1988).

Después de la transferencia y la fijación del ARN, se baña la membrana en solución de tinción, durante 3 minutos. A continuación el exceso de tinción se lava en 1X

SSPE hasta que las bandas son claramente visibles sobre un fondo claro. La tinción se retira completamente antes de la hibridación lavando el filtro en 0.2X SSPE, 1% SDS

Solución de tinción: 0.02% Azul de metileno, 0.3M AcNa pH 5.5.

5.3.3. Marcaje de sondas (ADN y ARN), hibridación y lavados

Marcaje de sondas ADN :

Las sondas de ADN se realizan con el método de cebadores aleatorios como se describe en el análisis Southern.

Sin embargo cuando se necesita una detección diferencial de transcritos en orientaciones 5'-3' y 3'-5', es necesario el uso de sondas de ARN específicas.

Ribosondas:

La elaboración de ribosondas consiste en la transcripción *in vitro* de un ADN en presencia de un ribonucleótido marcado radioactivamente $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP. Para ello se clona el ADN en un vector de transcripción, de forma que la transcripción se puede realizar en ambas direcciones desde cada uno de los promotores del vector que flanquean a la secuencia clonada.

Reacciones:

Para la transcripción *in vitro* se ha utilizado el vector pBluescrip SK (+), y un Kit de Promega.

1) El ADN a transcribir se lineariza por digestión y se purifica por GeneClean.

2) En un tubo libre de RNasas se mezcla:

-4 μl tampón de transcripción 5X

-2 μl DTT 100 mM

-20 U de RNasin, inhibidor de ribonucleasa

-4 μl ATP, GTP, UTP, (2.5 mM cada uno)

-2.4 μl CTP 100 mM

-0.2-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ADN linearizado clonado en pSK +

-5 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP, (10 mCi/ml)

-15-20 U T7 polimerasa ó T3 polimerasa.

- H₂O hasta 20 μl

Se incuba durante 1 hora a 37°C.

3) Se trata con ADNasa durante 15 minutos para eliminar el ADN.

4) Se añade un volumen de fenol, se centrifuga y se retiran los ribonucleótidos no incorporados por cromatografía en columna de Sephadex G-50.

Hibridación:

Los filtros se prehibridan (al menos 1 hora) e hibridan (12-18 horas) en tampón B con ARNt 50 mg/ml a 60°C.

Lavados:

Una vez hibridados se lavan los filtros:

- 30 minutos en tampón PSE a 65°C

- 2x 30 minutos en tampón PES a 65°C

- 10 minutos con 0.1% SSPE y 0.1% SDS a 60 °C.

Se envuelve el filtro en Saram-Wrap y se expone a una película radiográfica a

-80°C.

Buffer B Hibridación : 50% formamida, 0.25 M NaPO₄, pH 7.2, 0.25 M NaCl, 1 mM EDTA, 7% SDS., 5-10% PEG (se añade el SDS y PEG después de disolver los otros componentes y calentar a 42°C).

Tampón PSE: 0.25 M NaPO₄, pH 7.2, 2% SDS, 1 mM EDTA.

Tampón PES: 0.04 M NaPO₄, pH 7.2, 1% SDS, 1 mM EDTA.

6. ANALISIS DE PROTEINAS

6.1. Marcaje de proteínas *in vivo*.

Las proteínas de nueva síntesis se marcan con una mezcla : 70% L-Metionina (³⁵S), 15% L-Cisteina (³⁵S) y varios aminoácidos sin marcar. (TRAN³⁵S-LABEL™ ICN Biomedicals, INC.).

Para el marcaje de germinulas se colocan 6 germinulas de 4 días en una caja de Petri con las radículas sumergidas en 300 µl de la solución de tratamiento conteniendo 100-400 µCi de la mezcla TRAN³⁵S-LABEL™, y se incuban 20 horas a 25°C y en oscuridad. Transcurrido este periodo de marcaje, las radículas se lavan con H₂O, se secan con papel de filtro y se guardan a -80°C hasta su posterior análisis.

Para el marcaje de otros tejidos: hojas, flores y fruto, se procedió de igual manera, aunque la incorporación de aminoácidos radioactivos fue mucho menor.

Extracción de proteínas marcadas *in vivo*:

El material marcado se tritura con N₂ líquido en un mortero pequeño, añadiendo un poco de alúmina para mejorar la rotura de los tejidos. En el mismo mortero se añade tampón de extracción ECB, y se tritura hasta conseguir el máximo homogenizado. Se centrifuga el lisado para retirar el material no soluble y el sobrenadante se utiliza en los ensayos pertinentes.

Tampón de extracción ECB: 50 mM Tris pH8, 120mM NaCl, 0.5% NP40, 100 mM NaF, 1mM PMSF.

6.2. Extracción de proteínas

6.2.1. Método de extracción general

El material a analizar se tritura bajo N₂ líquido hasta convertirlo en polvo fino.

Se añade 1 volumen de tampón de extracción Laemli 2X y se homogeniza.

La mezcla se calienta a 95°C durante 10 minutos y se centrifuga a 13000 rpm 15 minutos para retirar el material insoluble.

Si la muestra contiene pigmentos (hojas, tallos y flores) se procede de la siguiente manera:

Las proteínas en tampón Laemli 2X se precipitan con al menos 3 volúmenes de TCA al 10% en acetona fría, con 0.07% 2-mercaptoetanol.

Se incuban durante 45 minutos a -20°C y se centrifuga 15 minutos a 13000 rpm.

El sedimento se lava varias veces con acetona fría con 0.07% 2-mercaptoetanol, incubando a -20°C y centrifugando como antes. Se lava hasta retirar los pigmentos del precipitado.

Se seca muy bien el sedimento y se resuspende en tampón Laemli 1X, se hierve a 95°C durante 5 minutos y se centrifuga para retirar la fracción no soluble.

Tampón Laemli: 0.0625M TrisHCl pH 6.8, 10% glicerol, SDS2%, 5% 2-mercaptoetanol, 0.05%(p/v) Azul de bromofenol.

6.6.2. Método de extracción de dehidras

Las proteínas de las plantas transformadas con el cDNA *tas14* se extraen siguiendo el método descrito por Close et al 1989.

El material se tritura, se homogeniza en un volumen de solución 0.5M NaCl, 20 mM TES-KOH pH 8, y el material insoluble se separa por centrifugación (10 minutos 13000 rpm).

El sobrenadante se calienta a 95°C durante 10 minutos.

Se incuba en hielo 15 minutos y se centrifuga para eliminar el material precipitado (10 minutos 13000 rpm).

Las proteínas presentes en el sobrenadante se precipitan añadiendo 4 volúmenes de acetona y centrifugando posteriormente.

El sedimento final se resuspende en tampón de electroforesis Laemli 1X.

6.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se lleva a cabo con dos métodos diferentes según la composición del tampón en el que van disueltas las proteínas:

Si el tampón de la muestra de proteína no contiene SDS, Triton X-100 ó NP-40, ó el contenido de estos detergentes es inferior al 0.2%, se cuantifican las muestras mediante ensayo Bradford.

La concentración de las muestras analizadas por electroforesis monodimensional, se realiza en tampón de electroforesis siguiendo el método de Lowry et al (1951) modificado por Bensadoun y Weinstein (1976).

6.3.1. Método de Lowry modificado

A partir de una solución de BSA en el tampón de extracción correspondiente (1mg/ml), se prepara una serie de tubos que contienen de 5 a 50 µg de BSA/tubo para construir la curva patrón.

Se utiliza 5-10 µl de cada muestra.

Se lleva a 0.6 ml el volumen final con H₂O.

Se añade 5 µl de deoxicolato sódico 2%, se agita e incuba 15 minutos a temperatura ambiente.

Se añade 200 µl de TCA 24% para precipitar las proteínas, se agita y se centrifuga (6500 rpm, 30 minutos, temperatura ambiente).

Una vez retirado completamente el sobrenadante se resuspende bien el precipitado en 1.4 ml de reactivo D. Se añade 100 µl de reactivo Folin-Ciocalteus (Merck) diluido 1:1 en H₂O.

La reacción colorimétrica tiene lugar incubando 45 minutos en oscuridad. Se mide la absorbancia a D.O660, y se calcula la concentración extrapolando a partir de la recta patrón de BSA.

Reactivo C: 20 g CO_3Na , 10 ml tartrato NaK 2%, 6.2 ml NaOH.

Reactivo D: se añaden 0.5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1.4% por cada 50 ml de reactivo C. Se prepara inmediatamente antes de la cuantificación.

6.3.2. Método Bradford

Se añade 1.5 ml de solución Bradford (Biorad) diluida 1:5 en H_2O a 5-10 μl de muestra. Se incuba durante 5-30 minutos y se mide la absorbancia a 595nm. Se utiliza BSA para construir la recta patrón.

6.4. Electroforesis monodimensional

Las electroforesis monodimensionales se realizan en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, según Laemli (1970). La separación de proteínas se realiza en un sistema discontinuo con un gel de apilamiento y un gel de separación. Las muestras se corren a amperaje o voltaje constante hasta que el bromofenol alcanza el borde 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 y 0.1% TEMED para polimerizar

Gel de separación: 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, A/B (29.2% acrilamida, 0.8% bis-acrilamida) hasta el porcentaje deseado, 0.05% APS y 0.05% TEMED para polimerizar.

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

6.5. Métodos de detección de proteínas

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida se detectan por tinción con Azul de Coomasie, tinción con AgNO_3 , o en el caso de extractos marcados radioactivamente, mediante fluorografía y autorradiografía.

6.5.1. Tinción con Azul de Coomasie

Inmediatamente después de la electroforesis, los geles se bañan durante 30 minutos en una solución de Azul de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250), al 0.25% en 50% de ácido tricloroacético. Posteriormente se destiñen en 40% metanol, 10% ácido acético.

6.5.2. Tinción con nitrato de plata

Fijación:

Se fijan los geles con Metanol 50%, ácido acético 12% y 0.074% formaldehído durante 1 hora.

Se lavan con Etanol 50% (3 veces 20 minutos cada lavado)

Pretratamiento del gel:

Se bañan los geles 1 minuto en una solución $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L durante un minuto

Se lavan con H_2O , 3 veces (20 seg cada lavado).

Impregnación:

Los geles se tratan durante 20 minutos en una solución de AgNO_3 2g/L y 0.1% formaldehído en oscuridad.

Se lavan en H_2O 2 veces (20 seg. cada lavado).

Revelado :

La tinción se revela incubando en una solución con Na_2CO_3 60g/L, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L y 0.074% formaldehído. Se revela sólo hasta que las bandas de proteínas aparecen nítidas, (incubaciones más largas saturan la imagen). Se lava en seguida 2 veces con H_2O (2 minutos cada lavado)

Parada:

Los geles se fijan con 50% Metanol 12% acético durante 10 minutos.

Los geles se guardan a 4°C en 50% Metanol.

Es importante usar H_2O miliQ para todas las soluciones, preparando estas el mismo día que se utilizan. Durante el revelado es conveniente agitar para que disuelvan los posibles precipitados.

6.5.3. Fluorografía

Esta técnica se utiliza para mejorar la detección de moléculas marcadas radioactivamente

Las proteínas marcadas y resueltas por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS, se fijan en una solución de isopropanol: H_2O :ácido acético, (25:65:10), durante 30 minutos. A continuación se incuban los geles en una solución de Amplify™ (Amersham), durante 15-30 minutos. Se secan los geles a 70°C al vacío en un secador de geles y se exponen a una película radiográfica a -80°C.

7. TECNICAS INMUNOLOGICAS

7.1. Purificación de anticuerpos

El anticuerpo anti-TAS14 había sido previamente obtenido en el laboratorio mediante la inmunización de conejos con proteína de fusión β -galactosidasa-TAS14 expresada en *E. coli*. Por tanto el suero es una mezcla de anticuerpos anti- β galactosidasa, y anti-tas14.

La purificación de anticuerpos específicos se realiza en dos etapas: primero, los anticuerpos anti- β galactosidasa son retirados del suero por cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa 4B- β galactosidasa. El suero libre de anti- β -galactosidasa se emplea entonces para purificar anticuerpos específicos por afinidad a la proteína de fusión transferida a filtros de nitrocelulosa. En principio se ha seguido este protocolo,

pero una vez que se disponía de proteína TAS14 expresada heterológicamente en *E.coli* como proteína de fusión GST-TAS14, se ha suprimido el primer paso de eliminación de anticuerpos anti- β -galactosidasa.

El material de partida de la purificación es un suero ya procesado, (libre de coágulos), con las inmunoglobulinas precipitadas con sulfato amónico y dializado frente a PBS.

7.1.1. Substracción de anticuerpos anti- β -galactosidasa

La Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma) se lava y se deja hinchar en 10 mM HCl y se mezcla con una solución de β -galactosidasa de *E.coli* (Sigma) en una proporción de 1ml resina por cada 5-10 mg proteína. La solución de proteína se dializa previamente frente a PBS. La mezcla se agita suavemente durante la noche y se centrifuga a 1000 g durante 2 minutos. Se mide la D.O.₂₈₀ del sobrenadante para estimar la eficiencia del acoplamiento y el sedimento se resuspende en 1 volumen de solución 1M etanolamina, 10 mM Tris-Cl pH 8,5 y se incuba con agitación suave durante 2 horas a 4°C, con lo que los sitios de unión a proteína que quedan libres son bloqueados. Después de lavar con PBS dos veces, la resina se empaqueta en una pipeta Pasteur. A continuación se realiza una preelución con 1M glicina pH 2.8, determinándose la D.O.₂₈₀ del eluido. Una vez que ésta se hace cero, se lava la columna con 3-5 volúmenes de PBS y se aplica el antisuero. Se recogen las fracciones, agrupándose y conservándose las que registran una D.O.₂₈₀ mayor a 0,5. Este eluido es el suero libre de anticuerpos anti- β -galactosidasa. La columna se lava con BBS-Tween hasta que la D.O.₂₈₀ del efluente es cero y se equilibra en PBS. Finalmente los anticuerpos anti- β -galactosidasa se eluyen con 1M glicina pH 2.8, recogiendo fracciones de 500 μ l en tubos que contienen 25 μ l de 1M Tris. La columna se lava, se reequilibra en PBS conteniendo 0.05% azida sódica y se guarda a 4°C.

7.1.2. Purificación por afinidad de anticuerpos con el antígeno unido a membrana de nitrocelulosa

En primer lugar se resuelven 700 μ g de extracto enriquecido en proteína de fusión por electroforesis en un gel preparativo. Las proteínas se transfieren como se describe en el apartado(7.2.1.). La membrana se tiñe con solución 0.5% Ponceau S en 0.1% ácido acético y se corta la banda correspondiente a la proteína de fusión. Tras bloquear los sitios de unión inespecífica de proteína con solución de bloqueo, se incuba la banda con el antisuero diluido 50 veces en solución de bloqueo, en un volumen final de 3 ml, durante la noche a 4°C. Tras lavar 4 veces durante 15 minutos con PBS, se eluye el anticuerpo unido incubando durante 5 minutos en 1,5 ml de 0.2M glicina pH 2.8, 0.2% gelatina. Tras retirar las tiras de inmobilon se neutraliza inmediatamente la solución con 0.1 volúmenes de solución 1M Tris base: se comprueba con papel indicador si el pH es neutro y se añaden 0.1 volúmenes de PBS 10X y azida sódica hasta 0.05%. La solución se guarda a 4°C.

7.2. Análisis Western

El método, originalmente descrito por Towbin (1979), permite caracterizar los antígenos correspondientes a un anticuerpo y determinar la presencia y cantidad relativa de éstos en mezclas complejas.

Los extractos protéicos son primeramente resueltos por electroforesis y transferidos a filtros de nitrocelulosa o de difluoruro de polivinilideno (PVDF, ó Immobilon). La membrana se incuba con los anticuerpos y, tras lavar los anticuerpos no unidos, éstos se detectan sobre el filtro. Los sistemas de detección de anticuerpos son variados; en este trabajo se han usado anticuerpos anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina y a peroxidasa.

7.2.1. Transferencia de proteínas a membranas

La transferencia de proteínas a membrana se ha realizado en un aparato de transferencia semi-seca de la firma comercial LKB.

Tras la electroforesis se equilibra el gel en el tampón de transferencia durante 15 minutos a temperatura ambiente.

La transferencia se realiza colocando el gel en contacto con la membrana de PVDF entre el cátodo y el ánodo, entre 6 papeles de Whatman 3MM del tamaño del gel a cada lado, empapados en tampón de transferencia. Se aplica un amperaje de 0.8V/cm² de gel durante 90 minutos.

Las proteínas transferidas se pueden visualizar en el filtro tñiendo durante 3 minutos con la solución de Ponceau S, y destñiéndolo con PBS ó TBS.

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

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

7.2.2. Inmunodetección con anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina

La membrana se trata con solución de bloqueo durante 30 minutos -toda la noche, según las muestras.

Una vez bloqueadas, se incuba con el anticuerpo específico purificado a la dilución apropiada, (determinada previamente), en solución de bloqueo.

Se lavan los filtros: 4 lavados 5 minutos con solución de bloqueo.

Las membranas se incuban con el anticuerpo secundario (anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a fosfatasa alcalina) diluido en solución de bloqueo (dilución aconsejada por el fabricante).

Se lava como se indica anteriormente.

Para el revelado por reacción de la fosfatasa alcalina, se lava la membrana con 50 mM Tris-Cl pH8, 150 mM NaCl, y se equilibra en tampón de fosfatasa alcalina durante 5 minutos. Entonces se añade la solución cromogénica hasta que las bandas se hacen claramente visibles. La reacción se para lavando con abundante agua destilada, y la membrana se fotografía o se guarda en oscuridad.

Solución de bloqueo: 5% p/v leche desnatada en polvo (Molico Sveltesse, Nestle), 0.2% Tween-20 en TBS.
TBS 5X(Tris-buffered saline): NaCl 40 g/l, KCl 1g/l, Tris base 15 g/l. Se lleva a pH 8 con HCl
Solución cromogénica: Se prepara inmediatamente antes de su uso añadiendo 66 µl de solución NBT y 33 µl de solución BCIP a 10 ml de tampón de fosfatasa alcalina.
Solución NBT: Se disuelven 50 mg NBT(Nitro-blue tetrazolium, Sigma) 1ml de dimetilformamida al 70%. Se guarda a -20°C.
Solución BCIP: Se disuelven 50 mg de BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma) ml de dimetilformamida 100%. Se guarda a -20°C.
Tampón de fosfatasa alcalina: 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl , 5 mM MgCl₂.

7.2.3. Inmunodetección con anticuerpos conjugados a peroxidasa y quimioluminiscencia

La membrana se bloquea y se incuba con el primer anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

Se lavadurante 15 minutos en TBS, 0.2% Tween -20, seguido de 3 lavados de 5 minutos en la misma solución.

Se incuba con anticuerpo anti-IG de conejo conjugado a peroxidasa (Promega) diluido en solución de bloqueo.

Se lava 25 minutos en TBS, 0.2% Tween-20, seguido de 4 lavados de 5 minutos en la misma solución.

Para detectar la señal del anticuerpo mediante quimioluminiscencia catalizada por peroxidasa, se mezclan cantidades iguales de los 2 sustratos de la reacción (reactivos 1 y 2; Amersham, ECL Western blotting reagents), preparando un volumen final de 0.125 ml/cm² de membrana. Se añade esta mezcla sobre la membrana y se incuba durante 1 minuto.

Inmediatamente se expone a una película radiográfica. El tiempo de exposición final varía según las muestras.

7.3. Inmunolocalización al microscopio electrónico

7.3.1. Preparación de las ultrasecciones.

El material vegetal se fija en solución de fijación durante 60 minutos a 4°C. Una vez fijado se lava con tampón Cacodilato 0.5M NH₄Cl durante 4 h. a 25°C para bloquear los grupos aldehidos libres.

Las muestras se incluyen en una resina hidrofílica Lowicryl K4M (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, FRG), según el método descrito por Roth.(1983), con las siguientes modificaciones: las muestras se deshidratan tratándolas con soluciones de metanol, con concentraciones decrecientes de este alcohol, y a temperaturas progresivamente más bajas; la polimerización de la resina se lleva a cabo mediante irradiación con una lámpara de luz UV de longitud de onda 360 nm durante 24 h.

Una vez incluida la muestra en la resina se utiliza un ultramicrotomo (Reicher-Jung Ultracut E) para obtener ultrasecciones, las cuales se montan en rejillas de níquel para su posterior procesamiento.

Solución de fijación: 0.1M tampón cacodilato pH 7,3, con 4% paraformaldehído y 0.5% glutaraldehído.

Tampón cacodilato:

7.3.2. Inmunodetección con proteína A unida a partículas de oro.

Las rejillas conteniendo las secciones se incuban con una gota de tampón PBTT, durante 5 minutos a 25°C. Se retira esta solución y se incuban las secciones con el anticuerpo anti-TAS14 diluido en tampón PBTT, durante toda la noche a 25°C. Se lava con PBS y se incuban las secciones con proteína A unida a partículas de oro, preparadas según Bendayan et al. 1980. Para que las muestras adquieran contraste se lavan las secciones con H₂O destilada y se tratan con una solución de acetato de uranilo 2%.

Tampón PBTT: Tampón 0.1M PBS, pH7,4, conteniendo BSA 0.05%, Triton X-100 0.05% y Tween 20 0.05%

7.3.3. Análisis morfométricos y estereológicos de las secciones

Las secciones se fotografían utilizando un microscopio de transmisión de electrones (Philips CM-10; Servicio de Microscopía Electrónica, Universidad de Sevilla).

Para llevar a cabo estos estudios morfométricos y cuantitativos se eligen al azar 30 imágenes de los compartimentos celulares que se desean analizar (eucromatina, heterocromatina y citosol). Las imágenes se procesan en un programa automático de análisis de imagen IMAGO, tomando como parámetro el número de partículas de oro por unidad de superficie (1 mm²). Posteriormente los datos se analizan estadísticamente: análisis de varianza, test- Student, test Kolmogorov-Smirnov, y test U. Se considera una diferencia estadística cuando $P < 0.001$.

7.4. Coinmunoprecipitación

Esta técnica sirve para detectar interacciones *in vivo* de proteínas. El método se basa en un reconocimiento doble: en una primera fase el anticuerpo reconoce a la proteína (antígeno) la cual puede estar unida a otras proteínas; y en una segunda fase el complejo anticuerpo-proteína antígeno-proteínas es fijado a una matriz de sepharosa-proteína A, por la afinidad de la proteína A por las cadenas constantes (Fc) de las inmunoglobulinas.

Como control en los experimentos de coinmunoprecipitación se debe utilizar un anticuerpo que proceda, a ser posible del mismo animal, pero que no reconozca el antígeno estudiado. En nuestro caso usamos el suero preinmune del conejo que inmunizamos con proteína tas14.

Preparación de la sepharosa-proteínaA:

Para cada ensayo se utiliza 50 µl de matriz preparada de la siguiente manera:

Se rellena un eppendorf con el volumen de sepharosa que se desea usar, se añade 1ml de tampón NETN y se deja hinchar la matriz a 4°C, 15 minutos con agitación suave.

Una vez hinchada se lava 3 veces con el mismo tampón centrifugando 30 seg a 12000 rpm.

Tras el último lavado se pasa la sepharosa a un eppendorf nuevo y se bloquea con 1ml de TBS con 10% BSA, a 4°C, 1 hora, con agitación suave.

Incubación de los extractos proteicos:

Para una mejor detección se marcan proteínas *in vivo*, como se indica en el apartado(X). La lisis se realiza en tampón ECB, el cual es un tampón de fuerza salina intermedia.

Los extractos se centrifugan 15 minutos a 13000 rpm antes de incubarlos con el anticuerpo para retirar cualquier material insoluble.

Los extractos se incuban con el suero durante 3 horas a 4°C y con agitación suave, en un volumen de 500 µl: 100 µl extracto + 400 µl tampón NETN. El tiempo de incubación y las diluciones de anticuerpo usadas se determinan empíricamente.

Incubación con la proteína A:

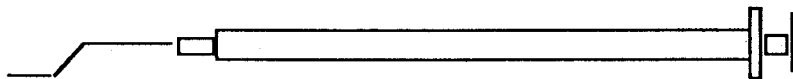
Una vez incubadas las proteínas con el suero se centrifuga 10 minutos a 4°C 12000 rpm y el sobrenadante se añade a un tubo eppendorf con 50 µl de sepharosa-proteína A, preparada como se ha indicado anteriormente.

Se incuba durante 1 hora a 4°C con agitación suave.

Se lava la sepharosa 4 veces con 1ml de tampón NETN centrifugando en cada lavado a 12000 rpm 30 seg .

Es importante ir renovando los tubos eppendorf en cada lavado para no arrastrar complejos que precipiten.

Para evitar que se pierdan bolas de la matriz durante los lavados, se utiliza una jeringa de 1ml con una aguja doblada como se indica en el esquema siguiente:



Después del último lavado se añade un volumen de Laemli 2X equivalente al volumen de la sepharosa, y se hierve a 95°C durante 5 minutos. Se centrifuga y el sobrenadante se carga en un gel de poliacrilamida-SDS, y tras el tratamiento fluorográfico, el gel se seca y se expone a una película radiográfica.

Tampón NETN: 20 mM Tris pH8, 100 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM EDTA, 1mM PMSF.

8. OBTENCION DE PROTEINA DE FUSION GST-TAS14

8.1. Descripción del sistema de expresión heteróloga

Los vectores de expresión de la serie pGEX están diseñados para la expresión en bacterias de polipéptidos como fusiones con la proteína glutatión S-transferasa (GST). La clonación se efectúa en dianas situadas tras la secuencia codificante de la GST, y precedidas por un sitio específico de proteasas. Para ello existen versiones del vector con diferentes fases de lectura en los sitios de clonación y sitios específicos para proteasas diferentes (Trombina y factor Xa).

Los vectores pGEX tienen el gen de la GST bajo el control de un promotor Ptac inducible químicamente y un gen lac Iq, para dar independencia del huésped al plásmido. El represor lac, producto del gen lacIq, se une al promotor Ptac, reprimiendo la expresión de la proteína de fusión GST. Cuando se añade IPTG se desreprime la expresión a partir del promotor Ptac y se expresa la proteína híbrida.

8.2. Producción y análisis de los transformantes

1) El ADN estudiado se clona en el vector de la serie pGEX apropiado, se transforman células competentes de *E. coli*, y se seleccionan los transformantes en cajas con LB Ampicilina 100 mg/L. Las cajas se incuban de 12-15 horas a 37°C.

2) Se inoculan tubos de 2ml de LB/Amp100 con colonias transformantes. Como control se inocula una colonia transformante del vector pGEX. Se incuba 3-5 horas a 37°C con agitación.

3) Se añade IPTG 0.1-100 mM a la mitad del cultivo para inducir la expresión de las proteínas. Se continua la incubación durante 1-2 horas.

4) Se centrifugan los cultivos (20seg, 13000 rpm), y el sedimento se resuspende en tampón Laemli 1X. Se hierve 10 minutos a 95°C, se centrifuga y el sobrenadante se analiza en un gel de poliacrilamida SDS. Se tiñen las proteínas con Coomassie y se eligen aquellos transformantes que expresen la proteína tras la inducción con IPTG.

8.3. Purificación de la proteína de fusión GST-TAS14

Las proteínas de fusión se purifican a partir de lisados celulares por absorción en columnas de sepharosa 4B-glutación (Pharmacia) y posterior elución con glutación libre. La purificación por tanto se realiza en condiciones no desnaturizantes; además de esta ventaja el sistema permite obtener el polipéptido deseado libre de la GST mediante la digestión de la proteína de fusión con la proteasa correspondiente.

1) Se inocula una colonia transformante en 100 ml LB/Amp100 y se incuba 12-15 horas a 37°C con agitación.

2) Se diluye el cultivo 1:10 en 1 litro de LB/Amp100, repartiendo el volumen en dos matraces de 2 litros, y se incuba 1 hora a 37°C.

3) Se añade IPTG a una concentración final de 1mM y se continua la incubación durante 3-7 horas.

4) El cultivo se centrifuga 10 minutos a 5.500 rpm para sedimentar las células. El sedimento se resuspende en 40 ml de PBS frío.

5) Las células se lisan usando un sonicador (La sonicación, no debe ser muy fuerte, evitando durante el proceso la formación de espuma; la lisis se monotoriza por el cambio de aspecto de la muestra (viscoso-transparente).

6) Se añade Tritón al sonificado hasta una concentración final del 1%, y se mezcla bien con agitación suave durante 30 minutos para ayudar a la solubilización de la proteína.

7) El sonificado se centrifuga 5 minutos a 9500 rpm a 4°C para eliminar el material insoluble y las células intactas. El sobrenadante se pasa con cuidado a un tubo nuevo.

8) Además de la centrifugación es conveniente filtrar el sobrenadante a través de un filtro de 0.45 µm de Milipore.

9) Una vez limpio, se incuba el sobrenadante con 2-3 ml de sepharosa 4B-glutación equilibrada en PBS 1% Tritón(*) durante 20 minutos. El proceso que se describe a continuación se puede realizar en columna, o en tubo; en este último caso se centrifuga en cada paso la sepharosa a 500 rpm en una centrífuga de mesa.

10) Se lava la sepharosa con 10 volúmenes de PBS y se eluye la proteína de fusión (Paso 14); o bien se lleva a cabo la digestión de la proteína unida a la matriz (Paso 11).

11) Se añade 1 volumen de PBS igual al volumen de la sepharosa y 400 unidades de trombina (Sigma) y se incuba 12 horas a 25°C con agitación suave.

12) Se recoge el sobrenadante que contiene la proteína digerida mediante centrifugación. Y se añade un volumen de PBS para recoger el resto de proteína. Este último paso se repite dos veces más, pero sin mezclar las alícuotas hasta ser analizadas.

13) Se lava la sepharosa con 10 volúmenes de PBS, igual que en el paso 10.

14) Se eluye la proteína GST o la proteína de fusión GST-TAS14 (continuación del paso 10), con 5 volúmenes de una solución recién preparada de Glutación 5mM en Tris-HCl 50 mM pH 8

15) Una vez eluidas las proteínas se eliminan los restos de glutación libre de la columna lavando con 10 volúmenes de PBS.

16) Se trata la sepharosa con 10 volúmenes de 3M NaCl en PBS para retirar cualquier molécula restante.

17) Se lava la sepharosa con 10 volúmenes de PBS, 10 volúmenes de ETOH 20% y se guarda en esta solución de alcohol a 4°C hasta nuevo uso.

*La sepharosa 4B se conserva en EtOH por lo que para su uso se debe lavar con 5-10 volúmenes de PBS

Las proteínas GST-TAS14 y TAS14 purificadas se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS. Se añade glicerol al tampón PBS en el que van las proteínas hasta una concentración final del 15%, y se almacenan en alícuotas a -80°C. En caso de que las muestras estén muy diluidas se concentran las proteínas por filtración con centricones (Ultrafree-CL Filters (5000) Milipore).

9. OBTENCION DE CASEINA QUINASA II

La Caseína Quinasa II, CKII, es una proteína quinasa presente en todos los organismos eucariotas analizados, presentando una secuencia conservada. Se ha aislado en forma activa a partir de diferentes tejidos. El protocolo que se ha seguido en este trabajo es básicamente el descrito por Alcazar et al. 1988, e incluye dos pasos de purificación: un primer paso por cromatografía de intercambio iónico (columna DEAE celulosa) y un 2º paso de purificación por cromatografía de afinidad, (columna de heparin agarosa).

9.1. Purificación de CKII a partir de cerebros de rata

Se parte de 6 ratas y se extraen sus cerebros.

Se homogeniza el material con Potter en la proporción de 1 gramo por mililitro de tampón de homogeneizado.

Se centrifuga a 100.000 g durante 1 hora a 4°C en un rotor T8565.

El sobrenadante se recoge y se aplica en una columna de DEAE-celulosa de 10 ml.

Una vez pasada la muestra se lava con el mismo tampón conteniendo 200 mM NaCl, hasta que la absorbancia a 280 nm sea cero.

A continuación se eluye con el tampón de homogeneizado conteniendo 500 mM NaCl. Se mide la absorbancia de las fracciones recogidas y se conservan las

correspondientes al pico de elución. Se diluyen 10 veces en tampón de homogeneizado para conseguir una concentración final de 50 mM.

La muestra eluida se aplica con un flujo lento, en una columna de Heparin-agarosa (Sigma) de 10 ml equilibrada en el tampón descrito anteriormente. Para un mayor rendimiento se aplica la muestra 2 ó 3 veces.

Se lava hasta conseguir absorbancia cero a 280 nm.

Se vuelve a lavar con mayor fuerza iónica: tampón de homogeneizado con 0.4 M NaCl.

Se eluye con 1M NaCl en el tampón de homogeneizado.

Las fracciones eluidas se precipitan con sulfato amónico al 70 % de saturación. Y el sedimento se resuspende en el mínimo volumen de tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM Cl_2Mg , 2 mM EGTA.

Las fracciones se conservan a 4 °C con azida al 0.1% como conservante.

Tampón de homogeneizado: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM Cl_2Mg , 2 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF.

9.2. Ensayo de actividad de la enzima purificada

Para comprobar la actividad de la enzima purificada se llevan a cabo ensayos de actividad en presencia/ausencia de sustrato y activadores e inhibidores, como se indica en la tabla siguiente.

Tubo	1	2	3	4
B 10X	10	10	10	10
Caseina (10 mg/ml)	0	3	3	3
Heparina (5 mg/ml)	0	0	0	1
Poly-L-lisina (10 mg/ml)	2	0	2	0
CKII	10	10	10	10
H ₂ O	68	67	65	66
ATP (40 µl 10 mM ATP) + [$\gamma^{32}P$ -ATP] (4 µl- 10 mCi/ml)	10	10	10	10

Los volúmenes están referidos en µl

Se incuba a 37°C durante 30 minutos. Las reacciones se paran añadiendo 0.5 mM de pirofosfato sódico

Se precipitan las proteínas de cada reacción añadiendo BSA hasta 50 mg/ml, y 1 ml de TCA al 10%. Se incuba durante 1 hora a 4°C, y se centrifuga a 12000 rpm a 4°C 10 minutos. El sedimento se lava con TCA al 10% 3 veces.

Con un contador de Cerenkov, se mide la radioactividad incorporada en cada reacción.

El tubo 1: corresponde a la medida de la autofosforilación de la preparación.

El tubo 2: corresponde a la fosforilación basal

El tubo 3: corresponde a la medida de la fosforilación en presencia de activadores.

El tubo 4: corresponde a la medida de la inhibición de la actividad de la preparación.

10. FOSFORILACION DE TAS 14 *IN VITRO*

10.1. Fosforilación con Caseína Quinasa II

La fosforilación de tas14 se realizó con dos fuentes diferentes de CKII: a) enzima purificada a partir de cerebros de rata, como se describe en el apartado (9.1.); b) las subunidades a y b de una línea celular de glioblastoma humano HeRo-SV expresadas en E.coli y reconstituidas en el curso de la purificación (disponible comercialmente por Boehringer Mannheim).

10.1.2. Fosforilación con CKII de cerebro de rata

En un tubo eppendorf se mezcla:

10 µl tampón CKII 10X

5 µg proteína a fosforilar

4.84 µl ATP 100 mM

5 µl [γ 32 P-ATP] (3000 Ci/mmol)

5 µl CKII (previamente titulada)

H₂O hasta 100 µl

Se incuba durante 1 hora a 37°C

La reacción se para añadiendo 100 µl de tampón de carga de electroforesis Laemli 2X, se hierve 5 minutos a 95°C y se analiza en un gel de poliacrilamida-SDS.

Si no se desea desnaturalizar la proteína se añade 20 mM EDTA para parar la reacción.

Los nucleótidos no incorporados se eliminan pasando la muestra por una columna de Sephadex G-50.

Tampón CKII 10X: 200 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM EGTA, 10 mM Cl₂Mg, 0.1M NaCl.

10.1.3. Fosforilación con CKII recombinante

Se mezcla en un tubo:

10 μ l Cl_2Mg 0.1M
13 μ l CIK 1M
4.8 μ l DTT 0.1M
2 μ l Tampón MES 1M pH6.9
1.5-5 μ g proteína a fosforilar
4.84 μ l ATP 100 mM
5 μ l [^{32}P -ATP] (3000Ci/mmol)
5 μ l CKII (0.2 U/ml)
 H_2O hasta 100 μ l
Se incuba durante 1 hora a 37°C.
Para parar la reacción se procede como se indica en el apartado anterior.

10.2 Fosforilación con Proteína Kinasa PK

Se utiliza la subunidad catalítica de la proteína quinasa (Sigma).
La reacción de fosforilación se realiza a 30°C durante 1 hora, mezclando en un tubo:

TrisHCl 0.1M pH8, 20% Glicerol hasta 100 μ l.
10 μ l Cl_2Mg 0.1M
4.84 μ l ATP 100 mM
5 μ l [^{32}P -ATP] (3000 Ci/mmol)
1.5-5 μ g proteína a fosforilar
25 U PK
Se para la reacción como antes se ha descrito.

11. ENSAYOS DE UNION DE ADN Y PROTEINA

11.1. Ensayos de retardación de ADN en geles de poliacrilamida

11.1.2. Esquema del ensayo

Los ensayos de retardación en gel de poliacrilamida permiten detectar la formación de complejos ADN-proteína, a partir del cambio de movilidad electroforética de éstos con respecto al ADN libre/proteína libre. (Ver fig.2).

Generalmente se conoce la secuencia de unión de ADN, se marca éste radioactivamente, y se incuba con extractos de proteína para así localizar factores de transcripción que se unen a dichos motivos. En este trabajo la situación es completamente distinta, el objetivo es estudiar la posible capacidad de unión de una proteína con ADN de secuencia desconocida.

La estrategia seguida fue usar como ADN una mezcla de oligonucleótidos con Xn secuencias degeneradas, de forma que estuvieran representadas todas las posibles combinaciones de secuencias de X nucleótidos en esta preparación. Este ADN se marca radioactivamente por síntesis con polimerasa Klenow, (ver figura). El ADN así marcado se incuba con la proteína y tras la electroforesis, se analiza por autorradiografía. En caso de observar retrasos en la movilidad, se recortan las bandas del complejo (ADN-proteína), se amplifica por PCR el ADN retrasado y se realizan nuevos ensayos de retardación con este ADN amplificado. La repetición de este ciclo de retardación-amplificación, tiene como objetivo enriquecer la muestra de ADN en las secuencias de ADN que interaccionan con las proteínas.

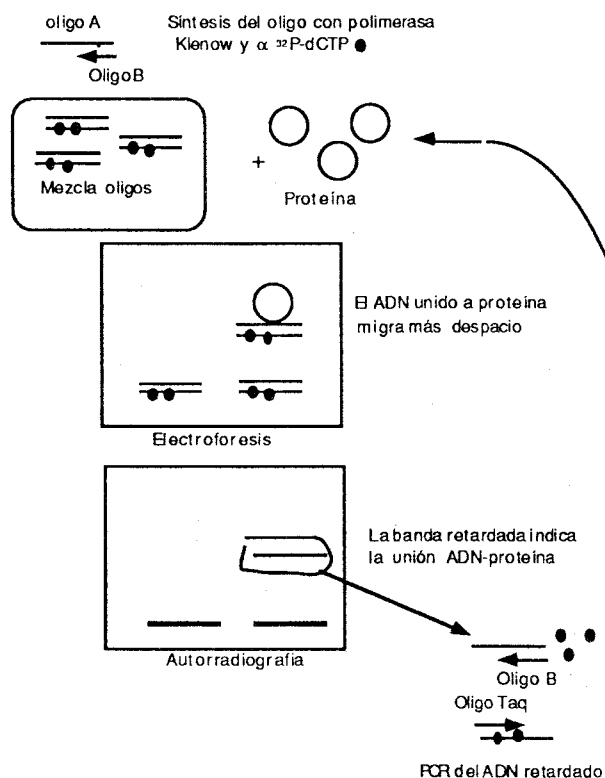


Figura 2: Ensayos de retardación de ADN en gels de poliacrilamida.

1.1.2. Descripción de los oligonucleótidos

Para los ensayos de retardación de DNA se utiliza una mezcla de oligonucleótidos degenerados, que contiene todas las combinaciones posibles de 18 nucleótidos flanqueadas por dos regiones constantes: OLIGO A.

La síntesis de estos oligonucleótidos se lleva a cabo con polimerasa Klenow o mediante PCR utilizando dos oligonucleótidos: OLIGO B y OLIGO taq, como se muestra en el esquema anterior.

OLIGO A:

5'-TGGATCCCTCGACTGCAGG-N₁₈GGATCCTGCAGAATTCGCG -3'

OLIGO B:

5' -CGCGAATTCCTGCAGGATCC -3'

OLIGO Taq:

5'-TGGATCCGTCGACTGCAGG - 3'

11.1.3. Purificación de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados y purificados por Sephadex G-25 por el servicio de síntesis del Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C, Madrid. No obstante, para los siguientes ensayos se purifican los oligonucleótidos hasta la homogeneidad en geles de poliacrilamida.

A cada preparación de oligo, 500 µg, se le añade un volumen de tampón de carga y se corren en un gel a 2800 V. Para purificar el OLIGO A se utilizan geles de acrilamida al 19%, y para el OLIGO B y OLIGO Taq, geles al 12% de acrilamida.

El oligonucleótido se visualiza usando una lámpara de ultravioleta de onda larga, y se recorta la banda de acrilamida correspondiente. Se trocea bien el fragmento, se añaden 2 volúmenes de tampón de elución y se deja la mezcla en agitación durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifuga para sedimentar la acrilamida y el sobrenadante se filtra dos veces a través de un filtro de GFC.

Una vez eliminada toda la acrilamida se añade 1 volumen de fenol y se centrifuga a 13000 rpm, se extrae con cloroformo y se precipita el oligonucleótido con 0.3M de AcNa y 3 volúmenes de ETOH. Se centrifuga a 13000 rpm durante 1 hora a 4°C, y se lava el precipitado con ETOH 80% centrifugando en las mismas condiciones. El ADN precipitado se seca y se resuspende en TE.

Para cuantificar el oligonucleótido se mide una dilución de éste al espectrofotómetro y se calcula la concentración según la relación: $D.O.260nm/longitud\ oligonucleótido \times 10 = Y\ mmoles\ oligonucleótido$

Composición de los geles:

31.5 g Urea

37.5 ml ó 23.5 ml (19% ó 12%)A/B (38:2)

7.5 ml TBE 10X

H₂O hasta 75 ml
450 µl APS 10%
35 µl Temed

TBE 10X: 0.89 M tris, 0.89 M ácido bórico, 20 mM EDTA.

A/B (38:2): 76 g Acrilamida, 4 g Bisacrilamida y H₂O hasta 200 ml La mezcla se filtra a través de un

filtro de 0.45 µm de Milipore.

Tampón de carga: 95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol, 0.05 % xilen-cianol.

Tampón de elución: 0.5 M CH₃COONH₄, 1 mM EDTA, 0.1% SDS.

11.1.4. Reacciones de síntesis de la mezcla de oligonucleótidos degenerados con polimerasa Klenow

La reacción se lleva a cabo utilizando el OLIGO A como molde y el OLIGO B como cebador. La síntesis contiene varias etapas:

Apareamiento del oligo cebador:

En un tubo ependorf se mezclan

1.5 µl BX10 Klenow
1.5 µl Oligo B (15ng/ml)
2 µl Oligo A (30 ng/ml)
5 µl H₂O

Se calienta a 65°C durante 2 minutos y se deja enfriar la mezcla lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente.

Reacciones de extensión:

Se añaden al tubo anterior

6 µl H₂O
0.63 µl BX10 Klenow
3 µl dCTP (10 µM)
1 µl dNTPs (dATP,dGTP,dTTP),(500 mM)
1 µl Enzima Klenow
4 µl [α^{32} PdCTP] (3000 Ci/mmol)
Se incuba durante 20 minutos a 37°C.

Reacciones de caza :

Para que se completen las reacciones se añaden deoxinucleótidos a la muestra:

0.75 µl BX10 Klenow
1 µl dCTP (500 mM)
1µl dNTPs (dATP, DTTP, dGTP),(500mm)
1 µl Enzima Klenow
5.25 µl H₂O
Se incuba 20 minutos más a 37°C.

Para parar la reacción se añade 1.5 µl EDTA

El volumen de la reacción se lleva hasta 100 µl con TE, se fenoliza, y tras el tratamiento con cloroformo, el sobrenadante se pasa por una columna de 1 ml de

Sephadex G-25 para eliminar los nucleótidos no incorporados. En algunas ocasiones se purifica el oligonucleótido por gel de poliacrilamida como se indica en el apartado ()

BX10 Klenow: 50mM Cl₂Mg, 100 mM Tris pH 8

11.1.5. Ensayos de retardación

Reacciones de unión ADN-proteína:

Para permitir que se formen los complejos de ADN-proteína, se incuba la mezcla de oligonucleótidos degenerados con diferentes cantidades de proteína en presencia de poli dI-dC, como competidor, y de diferentes cantidades de oligonucleótido frío. Así en tubo eppendorf se mezclan:

- 1 µg poli dI-dC
- 10 % Glicerol
- 100-150 mM NaCl
- x oligonucleótido marcado
- x oligonucleótido frío (0-10 ng)
- x proteínas *(1µg-100ng-10 ng)
- H₂O hasta 10 µl

Las reacciones se incuban durante 30 minutos a 4°C ó a 25°C, e inmediatamente se cargan en un gel de retardación.

Condiciones de corrida:

Los geles de retardación se corren a 150 V, durante 3-4 horas a 4°C en tampón TBE 1X como electrolito. Una vez finalizada la electroforesis, se seca el gel a 80 °C y se expone a una película radiográfica.

Tampón de unión BB10X: 10 mM TrisHCl pH7.8, 150mM NaCl, Glicerol 10%, 1mM EDTA pH8.

***Tampón de dilución de proteínas:** 10% Glicerol, 0.1 mg BSA en tampón de unión BB1X.

Geles de retardación de ADN

TBE 10 X	3 ml
A/B (40:1)	9 ml
H ₂ O	48 ml
Temed	60 µl
APS 10%	240 µl

A/B (40 :1): 80 g Acrilamida, 2 g bisacrilamida, H₂O hasta 200 ml. Se filtra la mezcla a través de un filtro de 0.45 µM de Milipore.

11.1.6. Amplificación del ADN retrasado

Se recortan del gel aquellas bandas que presentan una movilidad alterada (retraso) con respecto a la del oligonucleótido libre. Y se emplea este fragmento como molde en una reacción de PCR como la que se indica a continuación:

Para una reacción se utiliza:

- 5 µl BX20 PCR
- 0.8 µl Oligo B (0.69 µg/µl)
- 1.1 µl Oligo Taq (0.5 µg/µl)

83.5 μ l H₂O

Molde: banda retrasada (papel y acrilamida)

Se hierve a 95°C durante 5 minutos y se coloca inmediatamente en hielo. Una vez desnaturalizada la muestra se añade:

8 μ l dNTPs (2.5 mM)

0.6 μ l [α ³²P -dCTP]

1 μ l Taq polimerasa

Las reacciones de PCR se llevan a cabo en un termociclador, siguiendo 15 ciclos de amplificación (94°C 1minuto, 55°C 1minuto 72°C 2 minutos), y un periodo de extensión final a 72 °C 5 minutos.

La mezcla de reacción se trata con fenol, a continuación se extrae con cloroformo y se precipita el oligonucleótido con 0.3M AcNa y 3 volúmenes de ETOH 100%. Se lava con ETOH 80% y el sedimento se resuspende en TE. El oligonucleótido amplificado se purifica en un gel de poliacrilamida como se indica en el apartado 11.1.3..

Cuando es necesaria una mayor cantidad de oligonucleótido se realiza un segundo proceso de amplificación, siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

11.2. Ensayos de retardación de proteína en geles de poliacrilamida

Se procedió de igual manera que en los ensayos de retraso de ADN, solo que en esta ocasión es la proteína la que se marca, detectándose finalmente la unión entre proteína y ADN en la autorradiografía como un retraso en la movilidad de la proteína.

11.2.1. Traducción *in vitro*

La traducción *in vitro* se realiza con un Kit de traducción basado en el sistema de lisado de reticulocitos de conejo, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utiliza pBluescript SK + como vector para la transcripción del cDNA, y TRAN³⁵S-LABEL™ como mezcla de aminoácidos radioactivos para la traducción.

Transcripción:

Se lineariza el vector conteniendo el inserto y se aísla en geles de agarosa por GeneClean.

En un tubo eppendorf libre de RNAsas se mezclan:

20 μ l 5X tampón de transcripción

10 μ l DTT 100 mM

4 μ l RNasin (inhibidor de ribonucleasas 25 U/ μ l)

20 μ l ATP, CTP, UTP, GTP (2.5mM cada uno)

2 μ g ADN linearizado y purificado

10-20 U de T7 RNA polimerasa

35 μ l H₂O libre de RNAsa

Se incuba a 37°C durante 1 hora y 30 minutos.

Extracción del ARN transcrito:

Una vez finalizada la reacción de transcripción, se hidroliza el ADN y se extrae el ARN. Para ello se añaden:

4 μ l EDTA 0.5M pH 8

20 μ l ácido acético 10%

800 μ l H₂O

100 μ l AcNa 2M pH4

1000 μ l fenol ácido

Se agita en vortex durante 1 minuto

Se incuba a 4 °C durante 10 minutos y se centrifuga a 12000 rpm a 4°C 15 minutos.

Finalmente se recuperan sólo 800 μ l del sobrenadante.

El protocolo original incluye un tratamiento con DNasa, pero en nuestro caso se ha utilizado este protocolo alternativo ya que las muestras se usan en ensayos de retraso de ADN.

Traducción:

Para la traducción *in vitro* se utilizan extractos de lisados de reticulocitos.

Para cada reacción se emplea:

16 μ l Extracto

1 μ l TRANS ³⁵S-LABEL™ 1125 Ci/mmol

1 μ l RNasin

1-6 μ g ARN

La mezcla se incuba durante 1 hora a 30°C.

Después se calienta a 37°C 10 minutos

Se cogen 18 μ l de la reacción, se añade glicerol hasta el 15% y se congelan en N₂ líquido, almacenándose a -80°C hasta su uso. Los 2 μ l restantes se reservan para analizar el resultado de la traducción.

Análisis de los productos de traducción:

A 2 μ l de la reacción de traducción, se les añade metionina fría hasta una concentración 1 mM y se precipitan las proteínas traducidas con 5 volúmenes de acetona durante 2 horas a 4°C. Se centrifuga a 12000rpm 20-30 minutos y se lava el sedimento con acetona, volviendo a centrifugar de 5 a 10 minutos. El sedimento final se resuspende en Laemli 1X y se carga en un gel de poliacrilamida-SDS. Se hace una fluorografía, como se indica en el apartado 6.5.3. y una vez seco el gel se expone a una película radiográfica.

11.2.2. Ensayos de retardación de proteína

En este ensayo se utiliza proteína marcada por traducción *in vitro*, como se indica en el apartado anterior, y oligonucleótido sintetizado en ausencia de nucleótidos radioactivos. *Se utilizan 1-3-8 μ g de oligo y 2 μ l extracto de proteína.

(*para la síntesis de μ g de oligo se sigue el protocolo descrito en el apartado 11.1.4., escalando los valores.)

La incubación de los extractos con el ADN, y la electroforesis se realiza en las mismas condiciones descritas para los ensayos de retardación de AND.

12. CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL

La filtración sobre gel o la cromatografía de exclusión molecular es una técnica que permite separar proteínas basándose en las diferencias de peso molecular.

La cromatografía se realiza en una columna cuya matriz y volumen se determinan en función del rango de peso molecular que se desea resolver y del volumen de la muestra que se aplica, respectivamente.

Antes de añadir la muestra de proteínas que se quiere analizar, se debe calibrar la columna con marcadores de peso molecular, (proteínas de peso molecular conocidos), cuyas masas abarquen el intervalo de PM que se desea estudiar.

La determinación de la masa molecular de las proteínas estudiadas se lleva a cabo según las aplicaciones de Andrews (1965), extrapolando a partir de la representación de K_{av} frente al logaritmo de la masa molecular de las proteínas marcadoras; siendo

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o).$$

(V_o) volumen de vacío, se calcula como el volumen de elución de una muestra de azul de dextrano a 10 mg/ml.

(V_t) volumen total, se corresponde con el volumen del cilindro que contiene el lecho

(V_e) volumen de elución de cada muestra, se determina por el peso del líquido eluido correspondiente.

La cromatografía se desarrolla a 4°C, de la siguiente manera:

Se utiliza una columna de vidrio calibrado K 16/40 (1.6 cm de diámetro, 40 cm de altura) (Pharmacia), que contiene un lecho de 24 ml de Sephacryl S-200HR (Pharmacia). El empaquetado se realiza siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante, y limitando la parte superior con una cestilla de aplicación para las muestras.

Primero se equilibra la columna con tampón acetato 100 mM, pH 5.5, suplementado con 100 mM KCl.

Se aplican las muestras (500 µg proteína con 20 mg/ml de sacarosa en un volumen de 500 µl) sobre la cestilla usando una jeringa Hamilton de 1 ml.

Se aplica un flujo de 7 ml/h proporcionado mediante una bomba peristáltica (Modelo Pharmacia LKB P1).

Y se recogen alícuotas de 0.65 ml aproximadamente con la ayuda de un colector automático (Pharmacia Frac-100).

La columna se calibra con diferentes proteínas marcadoras :

citocromo c (12 KDa).

ribonucleasa A (14KDa).

quimiotripsinógeno (25 KDa).

anhidrasa carbónica bovina (31KDa).

ovoalbúmina de gallina (43KDa)

seroalbúmina bovina (67 KDa).

La elución de todas las proteínas marcadoras se detecta midiendo la absorbancia a 280 nm y para detectar el citocromo c a Xnm El volumen de elución de la proteína TAS14 se calcula cuantificando mediante ensayo Bradford las proteínas presentes en las diferentes alícuotas y el posterior análisis por western-blot de las proteínas eluidas.

Finalmente se calcula el PM de la proteína a partir del volumen de elución obtenido, como se ha explicado anteriormente.

13. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD GST-TAS14

Este ensayo consiste en detectar uniones de las proteínas presentes en un extracto con la proteína GST-TAS14 inmobilizada en Sepharosa-glutación 4B (Pharmacia).

Para cada ensayo se utilizan 3 columnas de 100 μ l de Sepharosa \ tubo ependorf:

(S): Sepharosa-glutación

(S-G): Sepharosa-glutación con proteína GST purificada

(S:GTas): Sepharosa-glutación con proteína GST-TAS14 purificada.

El ensayo consiste en la incubación secuencial de extractos de proteínas marcadas "in vivo" con columnas S, SG, SGTas, y la posterior elución y análisis de las proteínas unidas. La incubación secuencial se utiliza para eliminar de los extractos las proteínas que tengan afinidad por la Sepharosa-glutación, o por la proteína GST (en algunos casos se han utilizado 500 μ l de columna S y SG).

En la figura 3 se presenta un esquema del proceso:

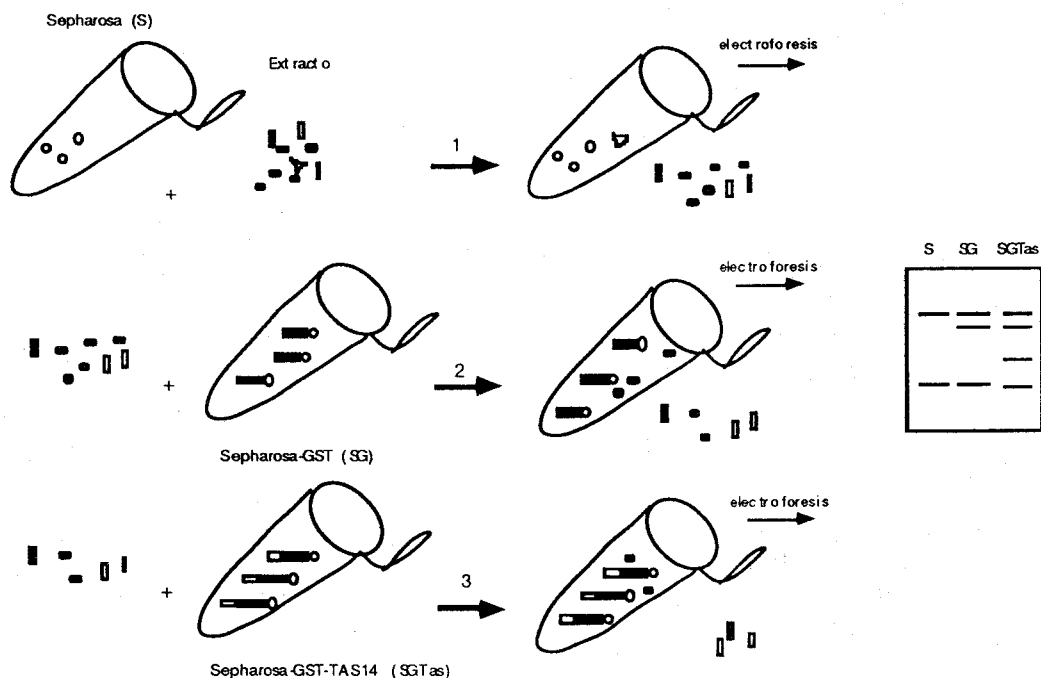


Figura 3: Esquema de la técnica de cromatografía de afinidad GST-TAS14.

Preparación de la Sepharosa-glutatin

La Sepharosa-glutatin se conserva en una solución de PBS 1X ETOH 20%. Para eliminar el ETOH se lava la matriz 3 veces con PBS durante 5 minutos a 4°C agitando suavemente y centrifugando en cada lavado a 500 rpm 2 minutos en una centrifuga de mesa.

Una vez lavada la sepharosa se preparan las diferentes columnas.

Preparación de columnas (S):

Se lava 2 veces con 1 ml de tampón ECB durante 5 minutos a 4°C.

Preparación de columnas (SG) y (SGtas):

Se incuba la sepharosa durante 1 hora a 4°C con 10 ó 100 µg de proteína GST ó GST-TAS14, previamente purificada como se explica en el apartado 8.3.

Se lava 2 veces la matriz con PBS, y se equilibra en el tampón ECB.

Incubación de los extractos proteicos:

En un tubo se mezclan:

100 µl de extracto

200 µl de tampón ECB

100 µl de sepharosa (S), (SG), (SGtas).

La mezcla se incuba durante 1 hora a 4°C, con agitación suave. Se centrifuga a 500 rpm y el sobrenadante se incuba con la columna siguiente.

Una vez incubada la columna con los extractos proteicos, se lava 4 veces con tampón NETN a 4°C y con agitación suave

Se centrifuga para retirar el volumen de NETN que queda y se añade un volumen equivalente al de la sepharosa de tampón Laemli 2X.

Se hierve 5 minutos a 95°C para eluir las proteínas unidas a la matriz. Tras centrifugar se carga el sobrenadante en un gel de poliacrilamida-SDS. Tras la fluorografía y secado del gel se expone a una película radiográfica.

14. TECNICA DE OVERLAY

Esta técnica se llevó a cabo según Lohman et al. 1988. El ensayo permite detectar uniones de la proteína a estudiar con otras proteínas transferidas a filtro.

Las proteínas se resuelven en geles de poliacrilamida-SDS, y se transfieren a filtro Inmobylon, como se indica en el apartado 7.2.1.

La membrana se incuba durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo para renaturalizar las proteínas del filtro y evitar la interacción inespecífica.

Una vez equilibrada, se incuba con 1,5-5 µg de proteína tas14 fosforilada, como se indica en el apartado 10, en 10 ml de solución de interacción durante 5 horas a 25°C.

Después de la incubación se lava el filtro varias veces en solución de lavado, y una vez mas durante toda la noche. Se seca y se expone a una película radiográfica a -80°C.

Solución de bloqueo: PBS 1X, 5% BSA, 0.25% geletina.

Solución de interacción: Solución de bloqueo con 1mM ATP, 30 mM EDTA, 0.30% Tritón X-100 y 0.05% Tween-20.

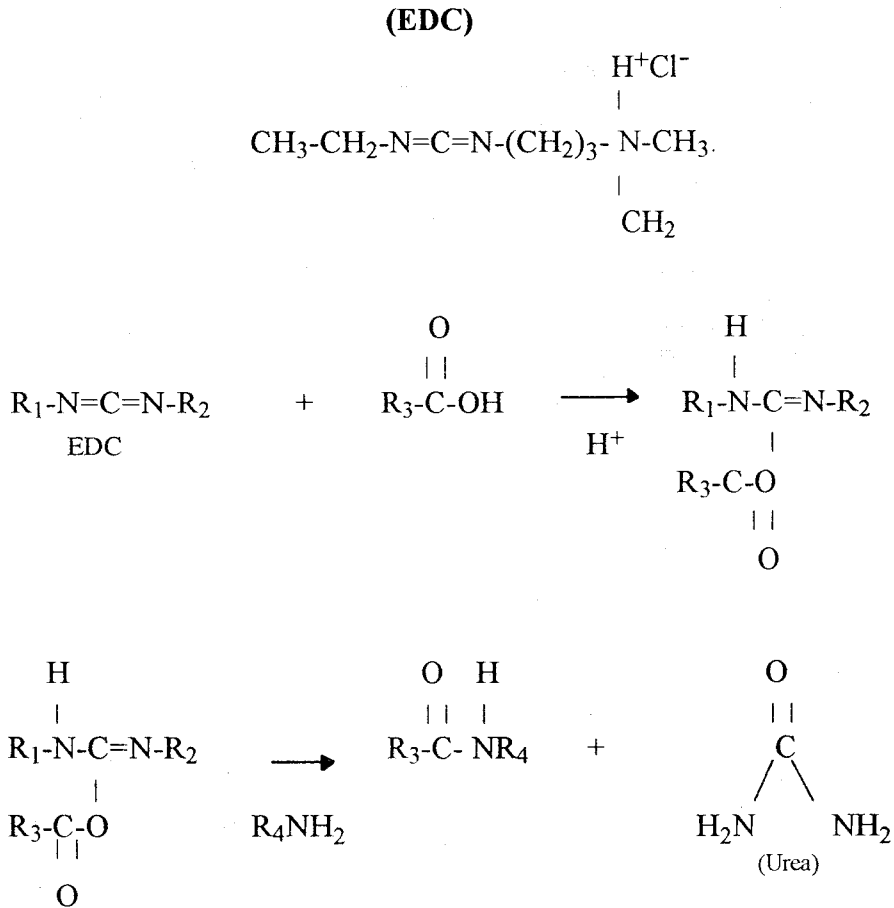
Solución de lavado: PBS1X, 30% Tritón X-100, 0.25% Tween-20.

Tampón TESH: 10 mM tris, 1mM Tris, 1 mM EDTA, 12 mM 1-thioglicerol pH 7.6.

15.2. Crosslinking con 1-Etil-3(3-Dimetilaminopropil) carbodiimida Hidroclorídrico (EDC)

15.2.1. Mecanismo de acción

El EDC es un agente de crosslinking que requiere un contacto directo entre los residuos que activa. Este compuesto reacciona con un grupo carboxilo de la proteína formando un O-acilisourea inestable que es capaz de reaccionar con un grupo amino que se encuentre próximo. A continuación se presenta un esquema de este tipo de reacciones.



15.2.2. Reacciones de crosslinking

Se incubaba 1 μg de proteína TAS14 con 4mM EDC en PBS1X, durante 1 hora a 25°C. Durante este periodo se van recogiendo alícuotas a diferentes tiempos. Las reacciones se paran añadiendo 0.2M de glicina. A continuación se añade un volumen equivalente de Laemli 2X, y las muestras se analizan por Western -blot.

RESULTADOS

1. TRANSFORMACION DE PLANTAS CON EL cDNA *tas14*

1.1. DISEÑO DE LAS CONSTRUCCIONES

Para sobreexpresar de forma constitutiva el gen *tas14*, se subclonó el inserto *tas14-2* (ref.) en el vector de fusión transcripcional pRT101. La subclonación se realizó tanto en dirección 5'-3', (sentido), como en la dirección contraria (antisentido), entre el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y la señal de poliadenilación del mismo (fig. 4).

Una vez dirigida así la expresión de *tas14* bajo el promotor constitutivo 35S, se subclonó el fragmento que contenía promotor, cDNA, y sitio de poliadenilación, p35S-TAS14-polyA en el vector de transformación de plantas pBin19. El proceso se esquematiza en la figura 4.

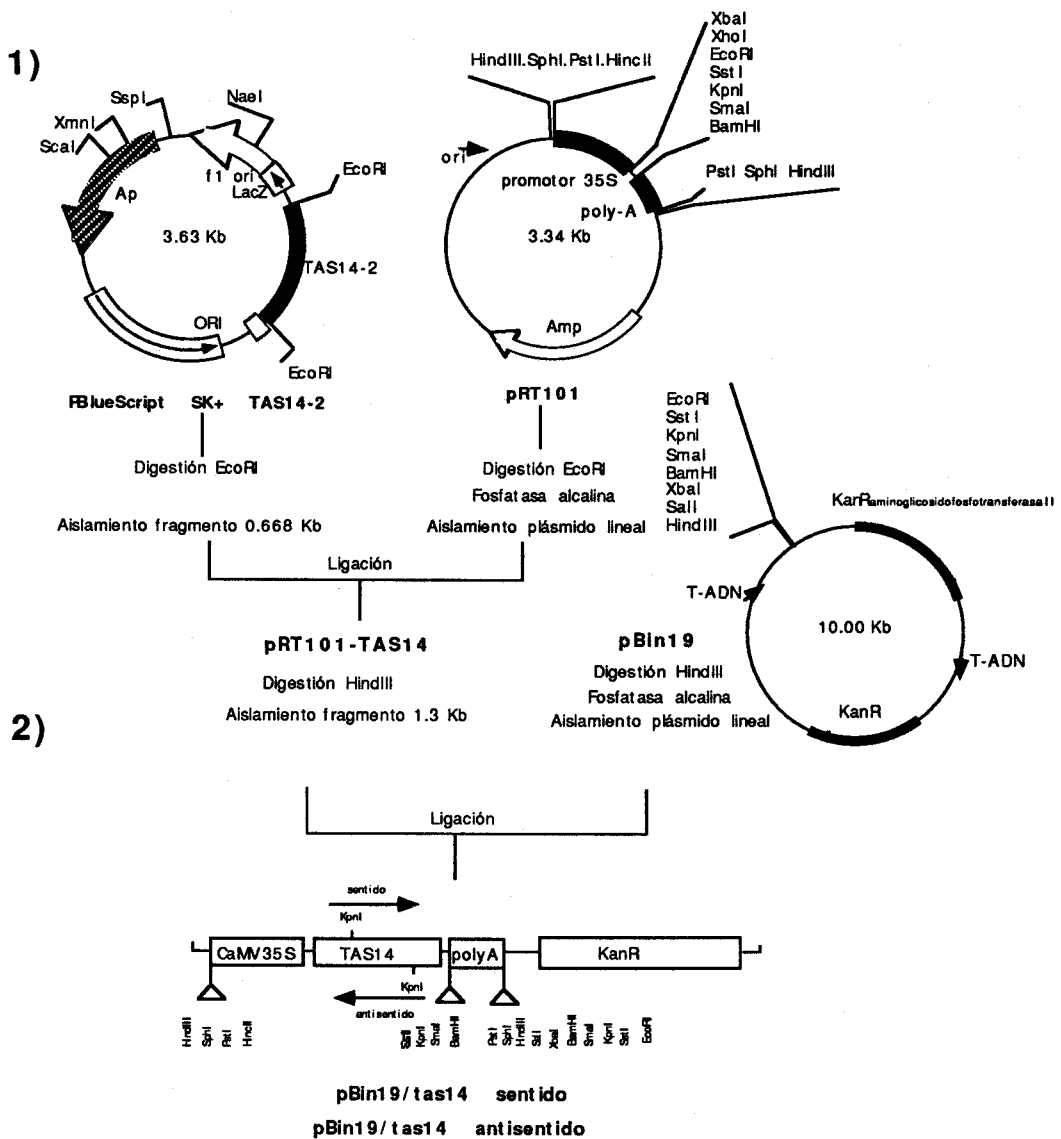


Figura 4: Construcción de los plásmidos pBin19/*tas14*s y pBin19/*tas14*a. 1) Subclonaje del inserto *tas14-2* en el vector de fusión transcripcional pRT101. 2) Subclonaje de las construcciones CaMV35S-*tas14* sentido/antisentido-polyA en el vector pBin19.

1.2. TRANSFORMACION

La transformación de plantas se realizó mediante la técnica de transformación de discos de hojas con *Agrobacterium tumefaciens*, descrita por Horsch et al. 1985. Para ello se transformó previamente una cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 con la construcción pBin19/tas14s y pBin19/tas14a (sentido y antisentido respectivamente), vía conjugación triple, como se describe en el apartado 2 de materiales y métodos. A continuación se incubaron trozos de hojas de plantas de tabaco con la bacteria transformante y se regeneraron plantas a partir de los callos desarrollados tras la infección, en medio selectivo con kanamicina.

Por cada transformación se aislaron 20 plantas capaces de enraizar en medio con kan100, procedentes de callos diferentes, y por tanto de eventos diferentes de transformación; las cuales fueron analizadas como se describe a continuación.

1.3. ANALISIS DE LOS TRANSFORMANTES

1.3.1. Análisis por PCR

La presencia del gen *tas14* en las plantas resistentes a kanamicina fue detectada por análisis por PCR del ADN genómico de dichas plantas. Se eligió esta técnica por la facilidad de analizar de forma rápida un número elevado de muestras.

Los ensayos de amplificación se realizaron utilizando dos oligonucleótidos (*35S* y *polyA*) cuyas secuencias correspondían a las secuencias 3' del promotor 35 S y a la secuencia 5' de la señal de poliadenilación del Virus del mosaico de la coliflor, presentes en el vector pRT101 utilizado en la construcción del plásmido con el que se transformó *A. tumefaciens* LBA4404.

En la figura 5 se presentan los resultados finales tras hibridar los productos obtenidos en las reacciones de amplificación, transferidos a filtros de nylon, con una sonda no radioactiva de ADN correspondiente a la secuencia del gen *tas14-2*. Como se puede observar en la figura, aproximadamente un 18% de las plantas analizadas parecían ser escapes, es decir plantas que teniendo integrado el gen para la resistencia a kanamicina no tenían integrado el gen *tas14*. Este porcentaje es relativo, pues hay que tener en cuenta que la ausencia de banda en algunos casos pudiera indicar que el ADN no se ha amplificado mas que no se haya integrado. No obstante, considerando esta posibilidad, los resultados mostrados, corresponden al resultado final tras repetir varias veces los ensayos de amplificación, y la purificación del ADN utilizado.

8 1 8 2 8 3 8 4 8 5 8 6 8 7 8 9 8 10 8 11



8 12 8 13 8 14 8 15 8 16 8 22 8 23 8 24 8 27 8 28



1 1 1 2 1 3 1 4 1 5 1 6 1 7 1 8 1 9 1 10



1 11 1 12 1 13 1 14 1 15 1 16 1 17 1 18 1 19 1 23

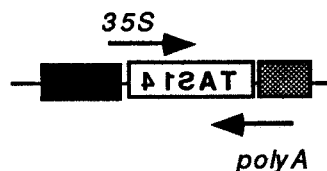
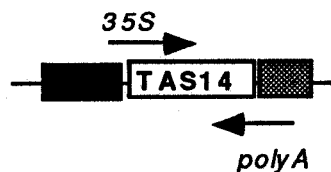


Figura 5: Análisis de los transformantes por PCR. Hibridación con una sonda de *tas14*-dioxigenina de los productos de amplificación del ADN genómico de las plantas resistentes a kanamicina con los oligonucleótidos *35S* y *polyA*. 8n Transformantes gen sentido; 1n transformantes gen antisentido. n número del transformante.

1.3.2. Análisis por Southern

Paralelamente se confirmó la integración del gen *tas14* en algunas de las plantas transgénicas por ensayo Southern. Tras la digestión del ADN de estas plantas con el enzima *EcoRI* que libera el gen *tas14*, y la posterior hibridación con una sonda radioactiva correspondiente al inserto *tas14-2*, se observó en todos los casos una banda de peso molecular de 0.7 Kb.

Se realizaron ensayos Southern (fig. 6), digiriendo el ADN de las plantas transgénicas del gen sentido con enzimas que cortaban una vez ó ninguna en la construcción de ADN introducida, (*BamHI* y *ClaI-ApaI* respectivamente), para confirmar la existencia de transformantes independientes mediante la detección de patrones de hibridación diferentes, y para conocer aproximadamente el número de inserciones del gen en dichas plantas.

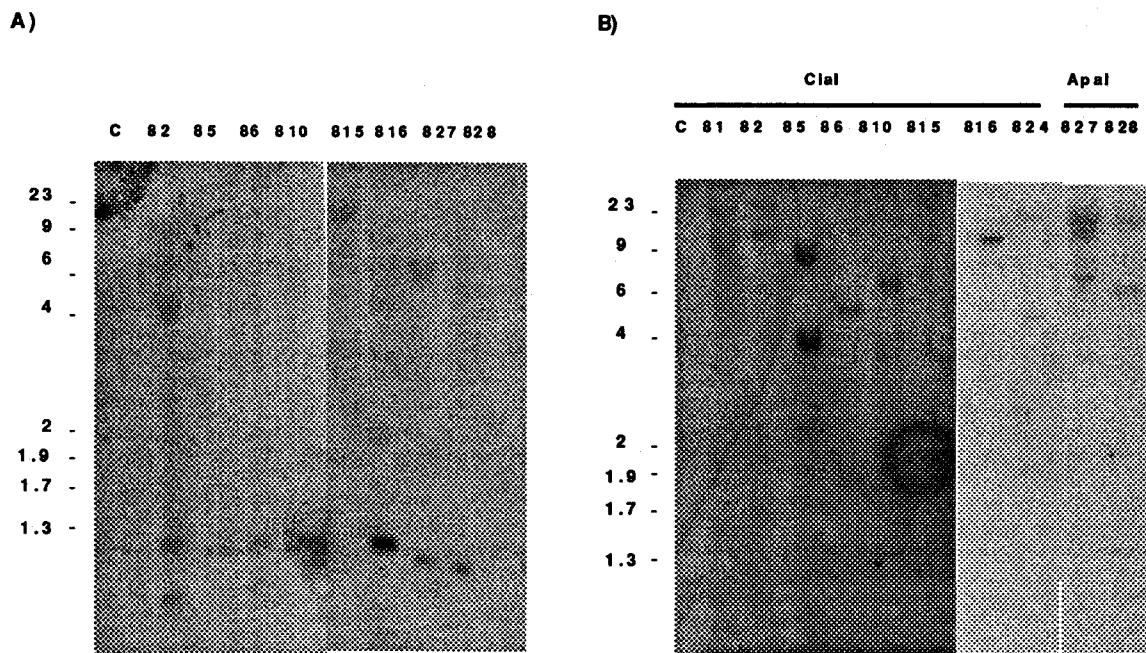


Figura 6: Análisis Southern de los transformantes del gen sentido *tas14*. Hibridaciones del ADN genómico de los transformantes digeridos con BamHI (A) y ClaI o ApaI (B) con una sonda radioactiva del inserto *tas14-2*.

2. ESTUDIO DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS CON EL GEN *tas14* EN ORIENTACION SENTIDO (PLANTAS *tas14s*).

2.1. ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LAS PLANTAS *tas14s*

2.1.1. Descripción

Tras la transformación de discos de hojas con el gen sentido *tas14* se aislaron 20 plantas a partir de callos independientes. De los estudios por PCR, pudimos detectar la integración del gen *tas14* en 16 plantas. Estos transformantes, una vez propagados en cultivo *in vitro*, fueron trasplantados a macetas y crecidos en cámaras con temperatura, iluminación, fotoperiodo y humedad controlados.

Durante el crecimiento no se observaron diferencias apreciables entre las plantas transformantes y las plantas no transformadas, fue en el momento de la floración cuando las diferencias se hicieron plausibles. Tomando como criterio la morfología floral decidimos ordenar los transformantes en grupos:

Grupos 1 y 2) En estos grupos se incluyen plantas que tenían flores de tamaño inferior al de las flores de plantas sin transformar y con el pistilo sobresaliente, como puede apreciarse en la figura 7A. Además estas plantas presentaban inflorescencias con mayor número de flores (fig. 7B). Estas características no se manifestaron con igual intensidad entre los transformantes, por lo que se determinó subdividirlos en dos grupos: grupo 1 (transformantes 81 y 82) y grupo 2 (transformantes 816, 822 y 824) con características acusadas en mayor o menor intensidad respectivamente.

Estas flores "enanas" eran estériles por impedimentos estéricos (pistilo sobresaliente), ya que por análisis morfológicos realizados por microscopía electrónica de barrido se pudo observar una morfología del polen idéntica al de flores de plantas sin transformar, y posteriormente fue posible autofecundar manualmente algunas de estas plantas.

Estas plantas presentaron en principio un tamaño inferior a la media alcanzada por plantas controles crecidas en las mismas condiciones (fig. 7C); no obstante esta diferencia dejó de ser significativa pues propagaciones vegetativas de éstas plantas, tanto en tierra como en cultivo hidropónico, dieron como resultado plantas de tamaño medio igual a la de las plantas de tabaco sin transformar.

Grupo 3) (transformantes 810 y 815) Formado por plantas que presentaban el pistilo de longitud marcadamente superior a la longitud de los estambres, igual que las plantas de los grupos 1 y 2, pero en las que el tamaño de las flores era igual al de las controles como se ve en la figura 7D.

Grupo 4) Grupo de plantas con fenotipo floral exactamente igual al de las plantas de tabaco sin transformar. (transformantes 84, 85, 86, 87, 89, 811, 813 y 814)

Grupo 5) El fenotipo más sorprendente fue el presentado por dos plantas, grupo 5 (transformantes 827 y 828), denominadas familiarmente "apétalas", en las cuales los pétalos, las anteras, el estigma y los sépalos del cáliz presentaban significativas anomalías con respecto a los de flores de plantas de tabaco sin transformar.

Los pétalos no aparecían fusionados formando la corola, sino que se enrollaban independientemente hacia abajo como se puede apreciar en la figura 8A. Se observó una variabilidad en la morfología de estos pétalos, así como en el grado de fusión presentado en las diferentes plantas resultado de la propagación vegetativa de los originales.

Las anteras tenían una morfología distinta a las anteras de flores de plantas de tabaco sin transformar como se puede observar en la figura 8B, y permanecían siempre verdes y prácticamente libres de polen durante el desarrollo floral. Por microscopía electrónica de barrido (fig. 8C) se pudo detectar la presencia de polen en el interior de estas anteras, aunque éstas no maduraban y no llegaban por tanto a la dehiscencia.

Estas flores además presentaron un estigma trilobulado, a diferencia del estigma bilobulado de las flores de tabaco de plantas sin transformar (fig. 8D). El conjunto de sépalos no aparecía fusionado, sino que presentaba una escisión. Como resultado de todas estas anomalías, las plantas eran estériles, aunque si formaban fruto.

2.1.2. Caracterización molecular

El hecho de encontrar estos fenotipos florales entre las plantas transformadas con el gen *tas14*, nos llevó a estudiar la expresión de este gen en flores, pues hasta el momento solo había sido estudiada en tejidos vegetativos y en semillas.

Para ello se crecieron plantas de tomate hasta la floración y se recogieron muestras de flores en distintos estadios: flores no abiertas (botón floral 1 y 2 definidos por el tamaño), y flores abiertas de 0, 1, 2, 3-4, 5-6, 8-10 y 11-14 días; considerándose el día 0 como el día de la apertura floral. Se extrajo el ARN de estas muestras y se hibridó con una sonda radioactiva correspondiente al inserto *tas14-2*, (fig. 9). Como puede observarse en esta figura, se detectó señal en flores desde que adquirían el estadio de botón floral 2 hasta transcurridos 10 días una vez abierta la flor, siendo máxima en las muestras de flores de 1 y 2 días.

La expresión de ARN *tas14* en flores está confirmada por resultados de expresión del gen *gus* bajo el promotor del gen *tas14*.

Al mismo tiempo, se realizaron ensayos para la detección de proteína en estas mismas muestras. Tras varios intentos, se logró detectar por incubación con anticuerpo específico y posterior detección con sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham) una proteína de peso molecular superior a *tAS14*, cuyo patrón de acumulación fue paralelo al del ARN, como puede observarse en el western-blot mostrado en la figura 10.

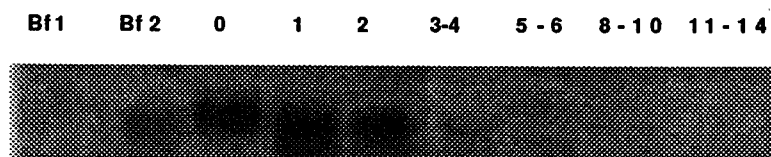


Figura 9: Expresión del gen *tas14* en flores de *Lycopersicon esculentum*. Hibridación del ARN de flores de tomate con la sonda *tas14*. Bf. Botón floral; los números indican los días transcurridos una vez abierta la flor.

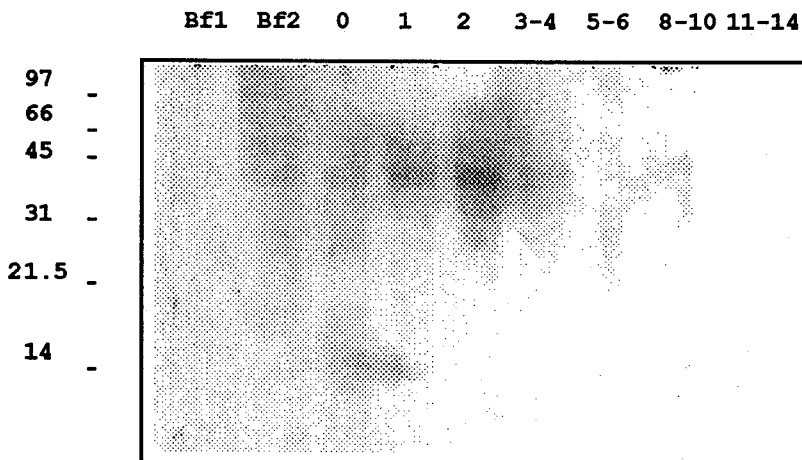


Figura 10: Inmunolocalización con anticuerpo anti-TAS14 en extractos de proteínas de flores. Ensayo western de extractos de proteínas de flores en distintos estadios. Bf. Botón floral; los números indican los días transcurridos una vez abierta la flor.

Una vez conocido que el gen *tas14* se expresaba en flores estudiamos la expresión de este gen y el homólogo en tabaco, *tas14tab.*, en flores de plantas transgénicas con el fin de detectar diferencias moleculares que pudieran explicar los fenotipos observados.

Se analizó la expresión en flores de plantas transgénicas correspondientes a los grupos 1, 3 y 5, y plantas no transformadas en diferentes estadios: botón floral, preantesis, antesis, y postantesis, estadios que se podrían homologar a los estadios (1-5); (6-11); (12), (posterior a 12) respectivamente, descritos por Koltunov et al. 1990. En las flores de las plantas del grupo 5 fue difícil delimitar estos estadios, a excepción del botón floral, debido a la anómala morfología floral.

Se hibridaron filtros con muestras de ARN de flores con una sonda-*tas14* en condiciones de alta y baja estringencia como se indica en materiales y métodos. En estos experimentos se detectó la expresión del gen *tas14* en todos los estadios analizados en las plantas transgénicas del grupo 1 y 3, así como la expresión del gen *tas14tab.* en las plantas de tabaco sin transformar, como se puede ver en la figura 11. Sin embargo solo se detectó señal en antesis en las flores de las plantas del grupo 5 cuando se hibridó en condiciones de baja estringencia.

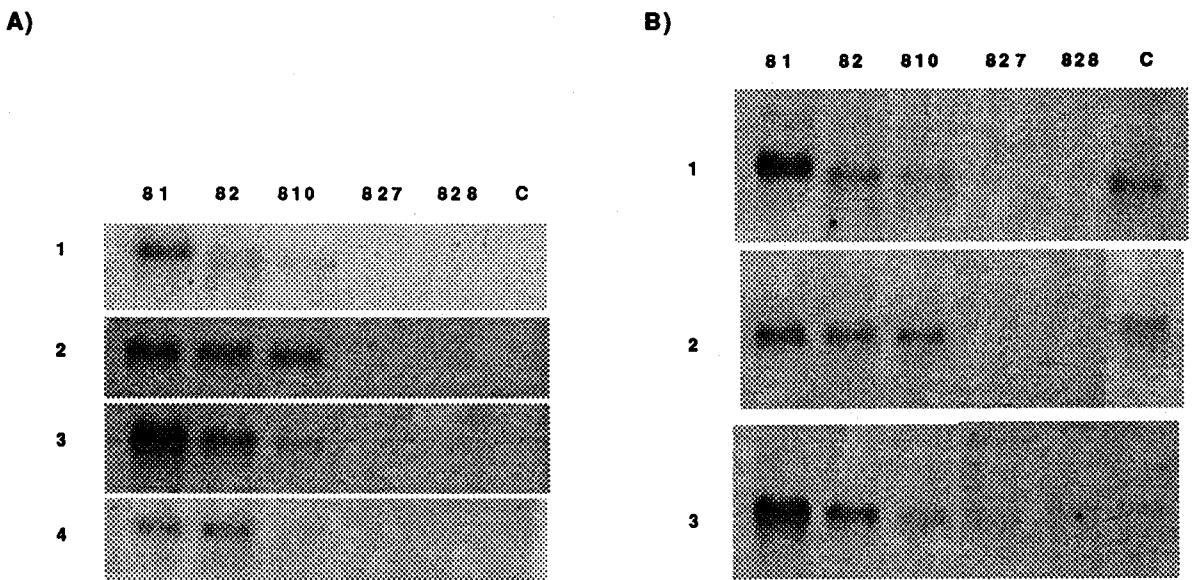


Figura 11: Expresión del gen *tas14* de *Lycopersicon esculentum* y la de su homólogo/s de *Nicotiana tabacum* en plantas *tas14s* y plantas no transformadas. Hibridación del ARN de flores en distintos estadios de plantas *tas14s* y plantas no transformadas con una sonda radioactiva del gen *tas14* en condiciones de alta (A) y baja estringencia (B). 81 y 82 (grupo 1), 810 (grupo3), 827 y 828 (grupo 5) y C plantas no transformadas. 1: Botón floral, 2: Preantesis, 3: Antesis; 4: Postantesis.

También se realizaron experimentos de western-blot para detectar los niveles de proteína TAS14 acumulados en cada estadio, (fig. 12). Las diferencias observadas entre las plantas parecen ser fundamentalmente cualitativas: solo se detectó proteína TAS14

en el estadio de botón floral en las plantas del grupo 1, aunque la señal detectada en botón floral fue muy débil.

En las flores de los transformantes del grupo 5 sólo se detectó proteína TAS14 en el estadio de antesis. En repeticiones de estos ensayos se llegó a detectar la proteína en el estadio de preantesis, quizás debido a la dificultad en diferenciar las etapas en estas flores, no obstante no se detectó proteína en el estadio de botón floral.

Estas plantas tampoco expresan el gen *tas14* en tejido vegetativo, como se describe en el apartado 2.2. Así pues, estas plantas aunque tienen integrado el gen *tas14* no lo expresan constitutivamente.

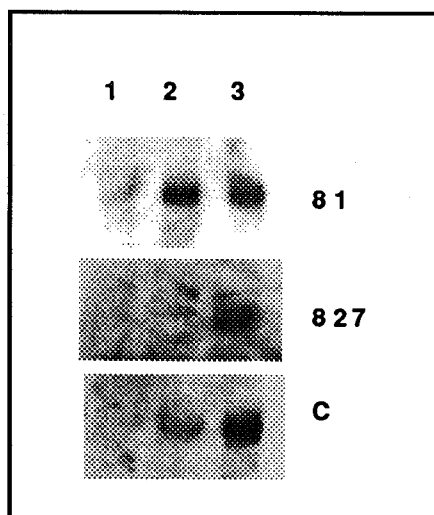


Figura 12: Detección de la proteína TAS14 en flores de tabaco de plantas *tas14s* y de plantas no transformadas. Incubación con el anticuerpo anti-TAS14 de los extractos de proteínas de flores en diferentes estadios. Detección de la señal por quimioluminiscencia (ECL Amersham). 1: Botón floral, 2: Preantesis y 3: Antesis. 81 (grupo 1), 827 (grupo 5) y C (planta no transformada).

1.2.3. Análisis de la F1

Una de las preguntas que nos planteamos al obtener plantas transgénicas con fenotipos diferentes al control fue la heredabilidad de estos fenotipos. La solución no resultó fácil, pues en las plantas que mostraban una morfología más anómala no se llevaba a cabo la autofecundación de forma natural, como se ha mencionado anteriormente, y se tuvo que recurrir a la fecundación manual, la cual no resultó siempre fructífera.

La F1 de las plantas del grupo 3 estuvo compuesta por flores con fenotipo igual al de las plantas de tabaco sin transformar, y por flores que presentaban diferencias en la longitud del pistilo y los estambres.

Como resultado de la autofecundación de la planta transformante número 8-1 grupo 1, se obtuvieron en la progenie resistente a kanamicina una segregación de fenotipos, existiendo desde plantas con el mismo fenotipo que las parentales, plantas con algunas características como las descritas y plantas con fenotipo igual al de las plantas de tabaco sin transformar. Los números de plantas que presentaban cada tipo de fenotipo, 3, 10 y 12 respectivamente, se alejan de cualquier tipo de segregación genética.

Se obtuvieron resultados similares tras fecundar el transformante 8-16 perteneciente al grupo 2.

Tras repetidos intentos se logró fecundar manualmente plantas del grupo 5 con polen procedente de plantas de tabaco sin transformar, obteniéndose sólo algunos frutos con escaso número de semillas. Se germinaron estas semillas en medio MSK300, y se crecieron 10 plántulas resistentes hasta la floración, no repitiéndose en ninguna de ellas el fenotipo anteriormente descrito.

2.2. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE EXPRESION

Se ha descrito que la expresión de los genes introducidos en las plantas transgénicas es muy variada y depende de muchos factores tales como el número de copias, el sitio de inserción en el genoma de la planta, las posibles metilaciones del ADN, así como de efectos epigenéticos y fisiológicos (Revisado por Flavell 1994).

En el presente trabajo, dada la diversidad de fenotipos encontrados en los transformantes primarios se eligieron dos representantes de cada grupo fenotípico para el estudio de los niveles de expresión del gen introducido. El objeto de esta selección fue por una parte establecer una posible conexión entre la morfología observada y el nivel de expresión del gen introducido, dada la incapacidad para estudiar la F1 de forma inmediata.

La expresión del gen *tas14* fue estudiada mediante ensayos de northern-blot y western-blot del ARN y proteínas extraídos de diferentes órganos de las plantas transformantes crecidas en cultivo hidropónico.

2.2.1. Estudio de los niveles de ARN *tas14*

Como se puede ver en la figura 13, los niveles máximos de ARN se detectaron en tallo, siguiéndoles los observados en hojas y por último los de raíces. Así pues, aunque la expresión del gen *tas14* en las plantas transgénicas estaba dirigida por un promotor constitutivo, los niveles de ARN detectados en los diferentes órganos mostraron el mismo patrón que el presentado por el gen *tas14* en los órganos equivalentes de plantas de *L. esculentum* sometidas a estrés salino (Godoy et al. 1990).

2.2.2. Estudio de los niveles de proteína TAS14.

Los niveles de proteínas detectados en tallos y hojas están relacionados con los niveles de ARN observados. En raíces no se detectó proteína (fig. 11) pese a la existencia de ARN, hecho que se había observado previamente en el estudio de la expresión del gen *Tas14* en *Lycopersicon esculentum*.

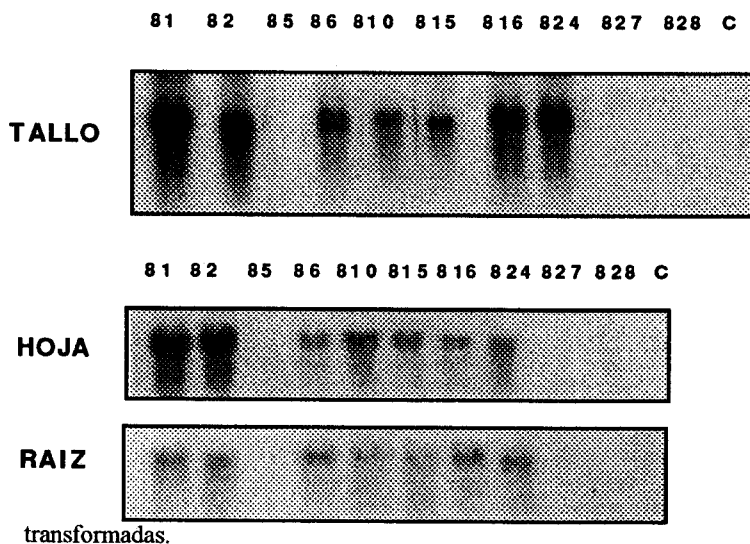


Figura 13: Niveles de expresión del gen *tas14* en las plantas de tabaco *tas14s*. Hibridación del ARN de tallos, hojas y raíces de plantas *tas14s* crecidas en cultivo hidropónico en ausencia de sal, con la sonda *tas14*. 81 y 82 (grupo 1), 85 y 86 (grupo 4), 810 y 815 (grupo 3) y 827 y 828 (grupo 5). C plantas no transformadas.

La expresión del gen *tas14* introducido, varió extremadamente entre los distintos grupos de transformantes. Así mientras el grupo 1 presentaba unos niveles altos de expresión, en el grupo 5 no se detectaba expresión alguna.

Los transformantes del grupo 1 mostraron unos niveles de ARN y proteínas superiores al resto de los grupos, como puede observarse en las figuras 13 y 14; las plantas del grupo 2 presentaron niveles inferiores a los del grupo 1 y similares a los del grupo 3 y 4, aunque el nivel de ARN en tallos fue similar al del grupo anterior y marcadamente superior al resto de plantas. Los grupos de transformantes 3 y 4 presentaron niveles de ARN inferiores; en el grupo 5 no se detectó expresión alguna.

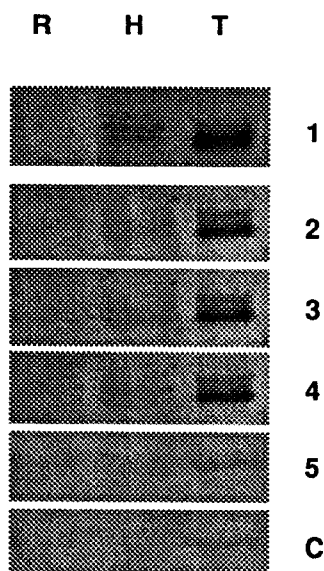


Figura 14: Niveles de expresión de la proteína TAS14 en diferentes tejidos de las plantas *tas14s*. Incubación con el anticuerpo anti-TAS14 de los extractos de proteínas de raíces (R), hojas (H) y tallos (T). El número indica el grupo al que pertenecen las plantas analizadas. C plantas no transformadas.

2.3. ANALISIS FUNCIONAL DE LAS PLANTAS tas14s.

2.3.1. Selección de los transformantes

Para los estudios de respuesta a estrés salino-hídrico, siempre que fue posible, se utilizaron líneas homocigotas de transformantes con una sola copia del gen, con el objeto de analizar poblaciones homogéneas en estos ensayos. La selección de estas plantas se realizó en base a los análisis Southern y el análisis del porcentaje de germinación de las semillas de la F1 en medio con kanamicina

Con el fin de poder valorar la posible influencia de los niveles de expresión de tas14 en la respuesta a las condiciones de estrés ensayadas, así como para disponer de una muestra representativa, se utilizaron plantas representantes de los grupos que expresaban constitutivamente el gen tas14: 81KC-81VC (nivel de expresión más alto), 816D (nivel de expresión intermedio) y 810E, 810C y 815D (nivel de expresión más bajo). Estos transformantes son homocigotos con una copia del gen tas14, excepto el transformante 81, el cual presentaba más de una copia. Las primera y segunda letras simbolizan las planta de la F1 y de la F2, respectivamente, a partir de las cuales se recogieron las semillas utilizadas en estos ensayos.

2.3.2. Estudio de la respuesta a choque salino

El objetivo de estos ensayos fue valorar la respuesta a estrés salino de las plantas transformantes del gen sentido tas14 con respecto a la respuesta de las plantas no transformadas, y determinar si la sobreexpresión del gen tas14 proporcionaba a la planta mayor tolerancia al estrés.

Basándonos en los estudios de tolerancia descritos por Tarczynski et al. 1992 con plantas transgénicas de un gen implicado en la síntesis de manitol, en un experimento preliminar se crecieron 10 plantas de tabaco sin transformar y 10 plantas transgénicas del transformante 81 (81V) en cultivo hidropónico y al cabo de 4 semanas se traspasaron a medio con 275 mM NaCl. Al comienzo del ensayo se tomaron notas del peso fresco, longitud de raíces y tallos así como del número de hojas de cada planta para comparar posteriormente el crecimiento en función de estos parámetros. Este tratamiento afectó gravemente a la planta y al cabo de 4-5 días, solo 2 plantas de cada grupo sobrevivieron al choque. Las plantas transgénicas mostraron un aspecto más favorable que las plantas controles: hojas verdes oscuras y lisas/ hojas verde claro y rugosas, pero al cabo de los días el aspecto presentado por ambos tipos de planta fue indiferenciable. Tras este resultado se realizaron ensayos utilizando medio con 250 mM NaCl, con objeto de utilizar condiciones que permitieran la supervivencia de las plantas a analizar. En estos ensayos, así como en los realizados posteriormente con representantes de la F1 de los transformantes 810, 815 y 816, no se observaron diferencias apreciables con respecto a las plantas de tabaco sin transformar.



2.3.3. Estudio de la capacidad de enraizamiento en medio salino.

La capacidad de enraizamiento de una planta en presencia de sal es un parámetro utilizado para determinar su grado de tolerancia. Por ello se crecieron plantas en medio MS y al cabo de 45-60 días se cortaron los ápices y se traspararon a medio MS con 275-300 mM NaCl respectivamente. Se tomaron medidas del número de plantas con raíces al cabo de 10-20 y 30 días después del trasplante, y se determinó de *visum* la coloración de las hojas de las plantas al final del tratamiento.

Los resultados de estas observaciones, se muestran en la tabla IV. Se puede concluir que las plantas transgénicas no presentaban una mayor capacidad de enraizamiento que la presentada por las plantas de tabaco sin transformar.

Tabla IV: Estudio de la capacidad de enraizamiento en medio MS con 275-300 mM NaCl de plantas de tabaco *tas14s* y plantas no transformadas.

Planta	Medio	% plantas con raíz			% plantas con hojas verdes
		10 d	20 d	30 d	
81VC	MS275	83	83	83	66
	MS300	0	60	60	30
81KC	MS275	91	91	91	91
	MS300	0	80	90	80
816D	MS275	50	58	66	58
	MS300	0	30	30	10
815D	MS275	58	66	75	50
	MS300	0	70	70	30
810C	MS275	91	100	100	100
	MS300	0	60	70	50
C1	MS275	83	91	91	83
	MS300	0	100	100	100
C2	MS275	75	83	91	83
	MS300	0	100	100	100

2.3.4. Estudios de germinación en medio salino

Continuando los estudios de respuesta a estrés salino de las plantas transgénicas, se llevaron a cabo ensayos de germinación en sal como los descritos por Saleki et al. 1993 en el estudio de mutantes de *Arabidopsis* resistentes a NaCl.

En primer lugar se realizó una cinética de germinación de semillas de plantas no transformadas en medio MS con diferentes concentraciones de NaCl (0, 100, 150, 200, 250, 300 mM) (fig. 15). El objetivo de este experimento fue determinar la concentración de NaCl en la que la tasa de germinación se viera reducida lo suficiente como para poder detectar diferencias en aquellas plantas que mostraran mayor tolerancia.

Como se observa en la figura 15A a medida que aumentaba la concentración de sal se retrasaba la germinación, pero el porcentaje total de semillas germinadas se conservaba relativamente alto; esto ocurrió con las concentraciones ensayadas, excepto cuando se utilizó 300 mM NaCl, en la cual la germinación se vió seriamente afectada.

Cuando se analizó el efecto de la concentración salina sobre la expansión de los cotiledones (fig. 15B) se encontró que a partir de 250 mM NaCl el desarrollo de estos se reducía. Se escogió esta última concentración para los ensayos de germinación que además causaba un retraso en la germinación.

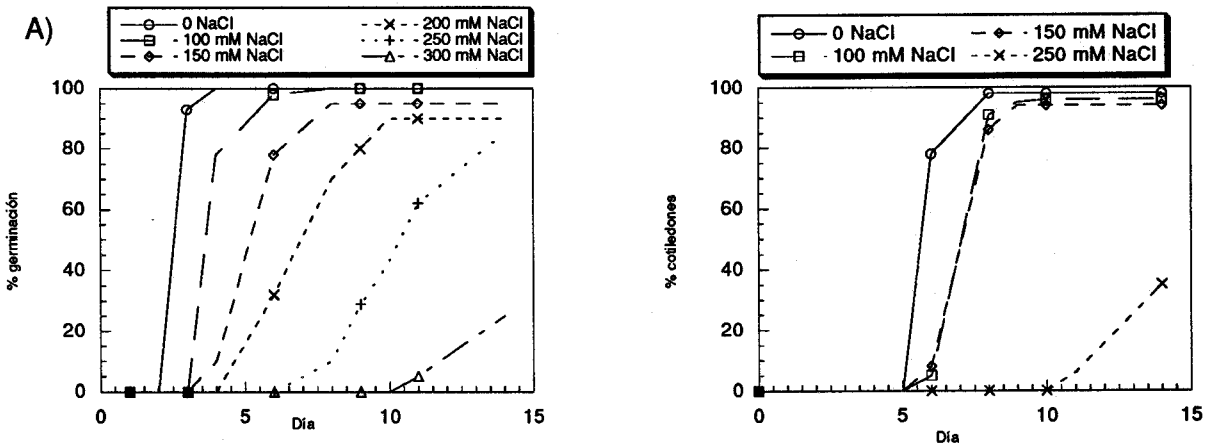


Figura 15: Cinética de germinación de semillas de plantas de *Nicotiana tabacum* sin transformar en medio MS con diferentes concentraciones de NaCl. A) Representación del porcentaje de semillas germinadas frente al tiempo (días). B) Representación del porcentaje de semillas con cotiledones expandidos frente al tiempo (días).

Para el estudio de la germinación en plantas transgénicas se definieron arbitrariamente tres estados de desarrollo: 1) imbibición o rotura de la testa de la semilla (imbibición)(fig. 16A); 2) emergencia de la radícula (radícula) (fig. 16B); y 3) expansión de los cotiledones (cotiledones) (fig. 16C).

Los primeros ensayos se realizaron con 100 semillas de cada una de las siguientes plantas: plantas sin transformar (C) y plantas transformantes (81V), (81K), (810E). En estos estudios se observó que las semillas de las plantas 81v y 81k alcanzaban antes los estadios anteriormente descritos. Además las semillas de estas plantas presentaban un porcentaje de germinación mayor que las otras semillas de las plantas analizadas(Fig.17).

Analizando el tiempo transcurrido desde que las semillas pasan de un estado de desarrollo a otro, se puede concluir que no existe diferencia entre las plantas sin transformar y los transformantes, es decir una vez iniciado el programa de germinación éste se lleva de igual forma en todas las plantas. Por tanto la diferencia observada, sobre todo en las semillas 81V, podría residir en la capacidad de iniciar más tempranamente la germinación en las condiciones estudiadas.

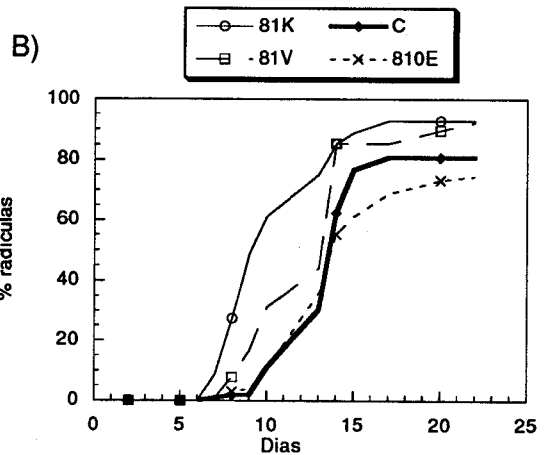
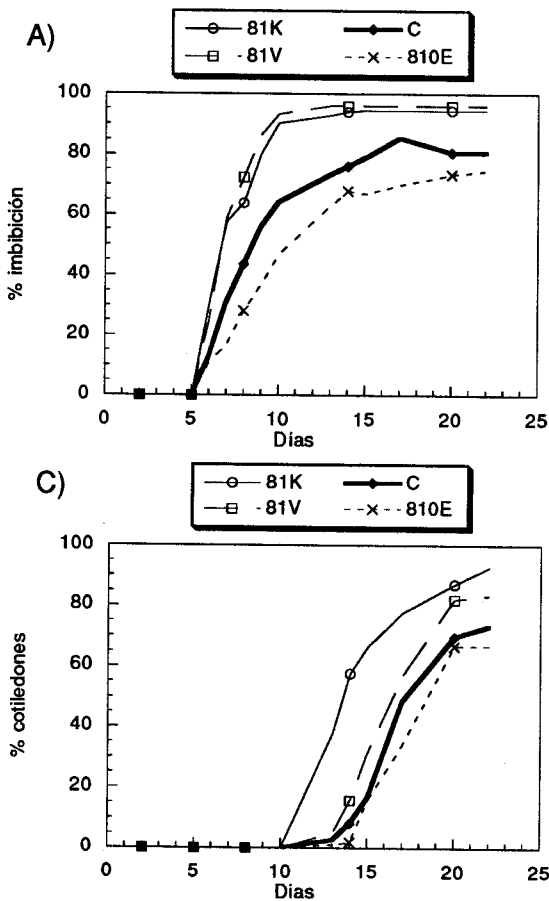
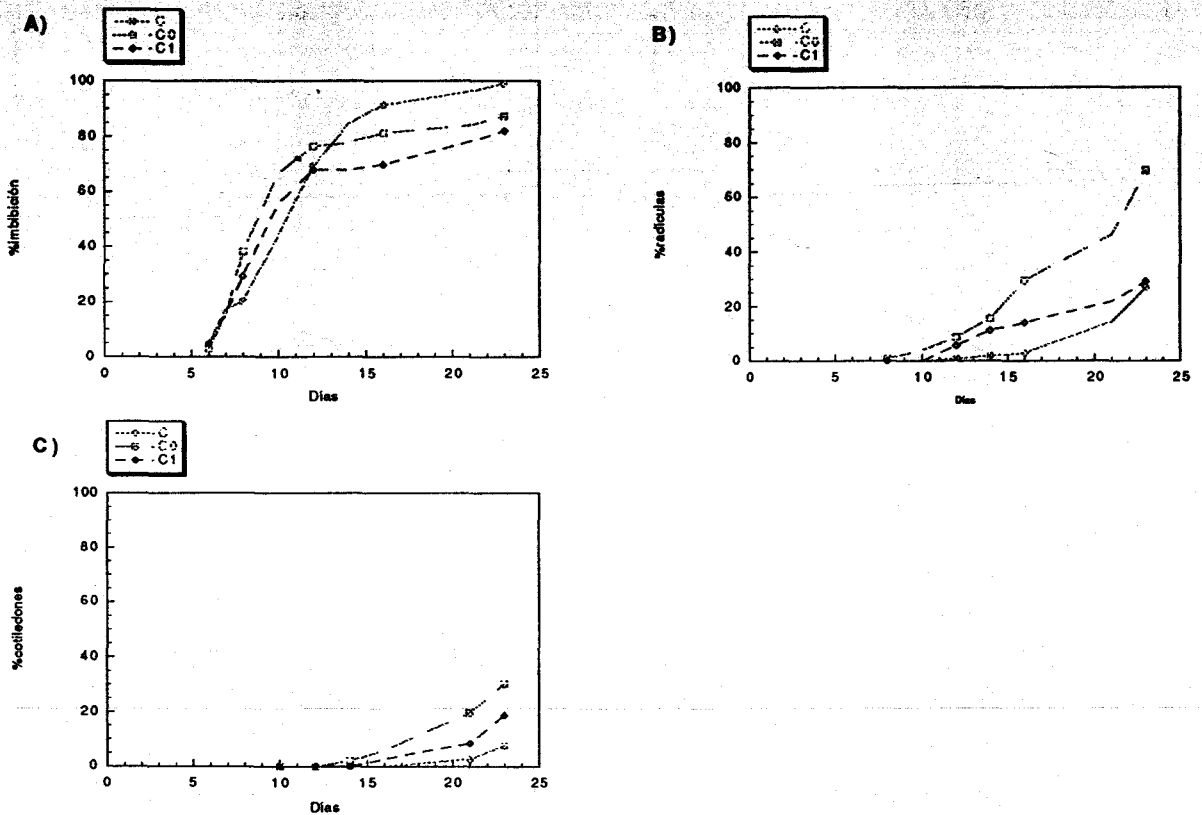


Figura 17: Cinética de germinación de plantas tas14s y plantas de tabaco no transformadas, en medio MS con 250 mM NaCl. A) Representación del porcentaje de semillas embebidas frente al tiempo; B) Representación del porcentaje de semillas que alcanzan el estadio de emergencia frente al tiempo; C) Representación del porcentaje de semillas con cotiledones expandidos frente al tiempo. C semillas de plantas de tabaco no transformadas.

Se realizaron experimentos iguales a los anteriores con semillas de otros transformantes, 815D, 816D, semillas de plantas sin transformar C1, C0 y C2 y semillas de los transformantes 81 y 810: 81VC, 81KC y 810C (Fig. 19)

En la figura 18 se refleja la variabilidad en el comportamiento de las semillas de las plantas sin transformar. No obstante para simplificar la representación de los porcentajes de germinación de las diferentes plantas estudiadas (Fig. 19) se ha optado por utilizar la media de los valores obtenidos con las diferentes plantas no transformadas.



Asumiendo esta variación se podría concluir que no se encontraron diferencias significativas entre la respuesta de las plantas transgénicas y las plantas no transformadas. No obstante se observó de nuevo una ligera diferencia en el comportamiento de las plantas 81VC (fig. 19) respecto a las plantas sin transformar. Esta diferencia no fue tan marcada como en los primeros ensayos, manifestandose solo en el primer estadio.

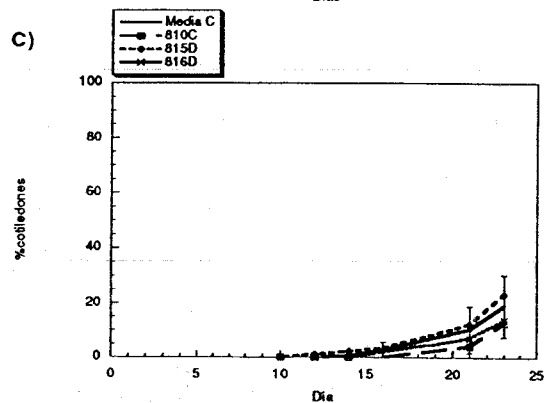
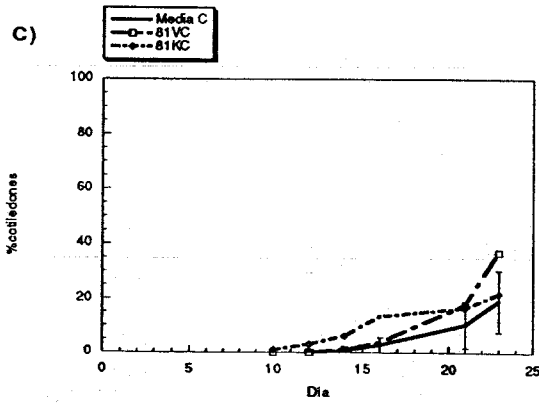
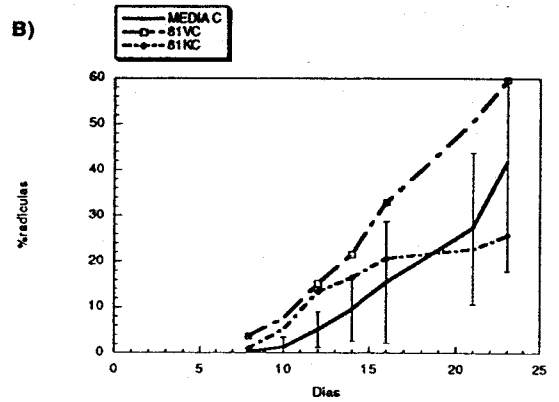
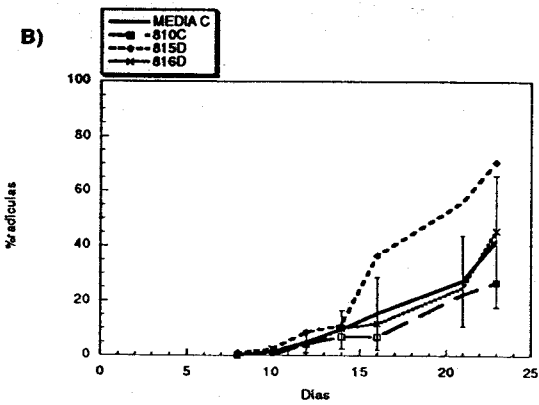
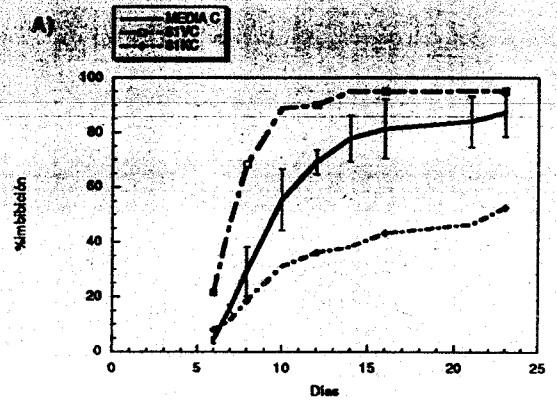
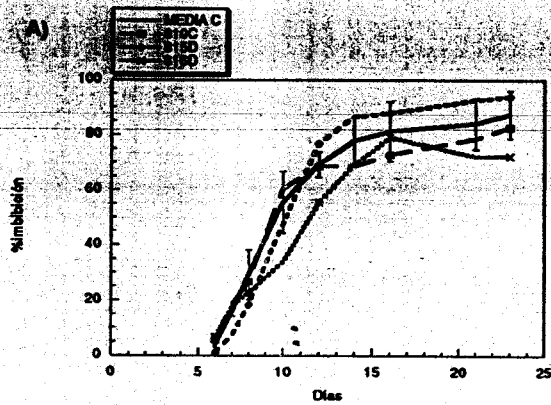


Figura 19: Cinética de germinación de semillas de plantas Tas14s y plantas de tabaco no transformadas, en medio MS con 250 mM NaCl. A) Representación del porcentaje de semillas embebidas frente al tiempo; B) Representación del porcentaje de semillas que alcanzan el estadio de emergencia frente al tiempo; C) Representación del porcentaje de semillas con cotiledones expandidos frente al tiempo. Se ha representado la media y la desviación típica (I) de los valores obtenidos en los grupos de semillas de tres plantas no transformadas diferentes (C,C0,C1).

Tras finalizar estos ensayos se analizaron las cantidades de proteína TAS14 presentes en cada grupo de semillas. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 20.

Se detectó mas proteína en las germinulas del transformante 81 que en las germinulas de plantas no transformadas, y a su vez más proteína en las germinulas control que en las germinulas del transformante 810. Es interesante señalar la posible correlación existente entre los mayores niveles de proteína tas14 en las semillas de las plantas 81Vy 81K y la mejor respuesta frente al tratamiento en las germinulas.

Analizando mediante tinción con Coomasie el patrón de proteínas de las germinulas crecidas en sal, se observó la acumulación de una proteína de aproximadamente 27 kDa, preferentemente en las germinulas 81V y 81K.

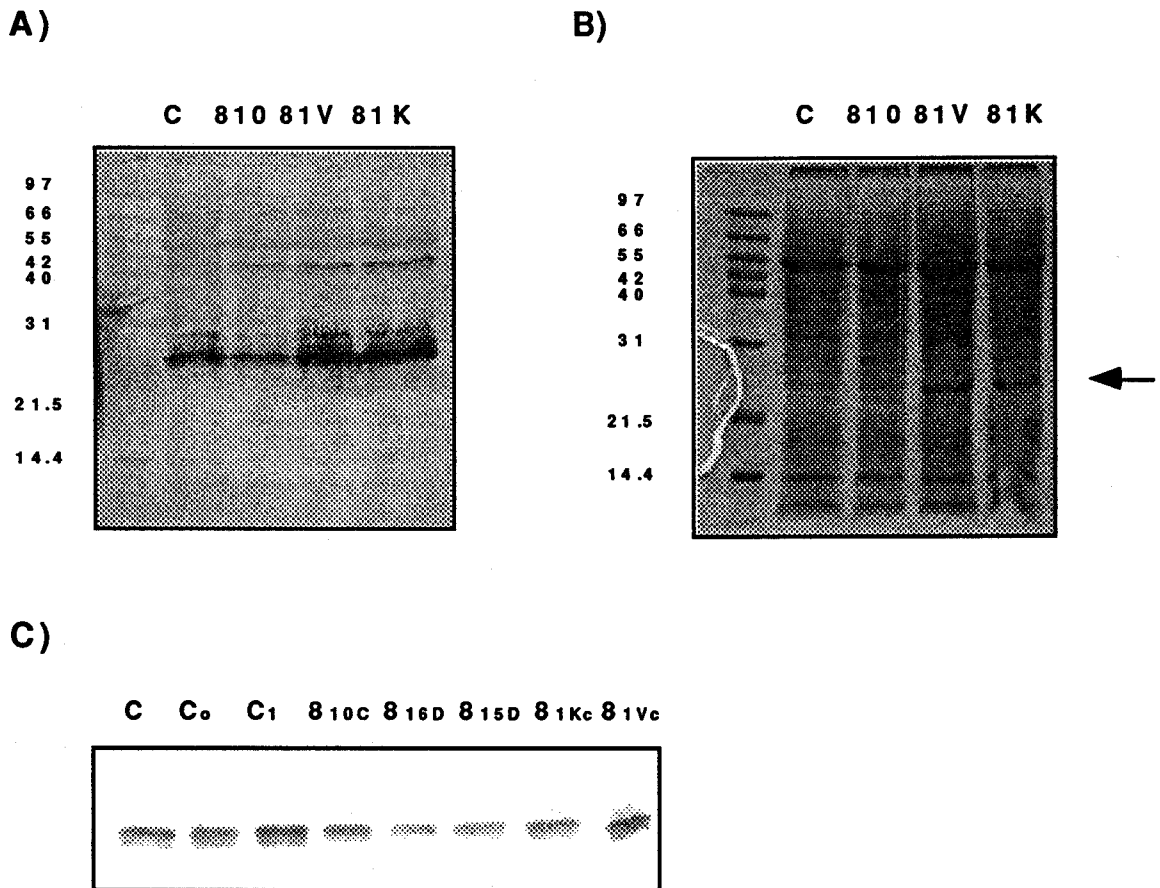


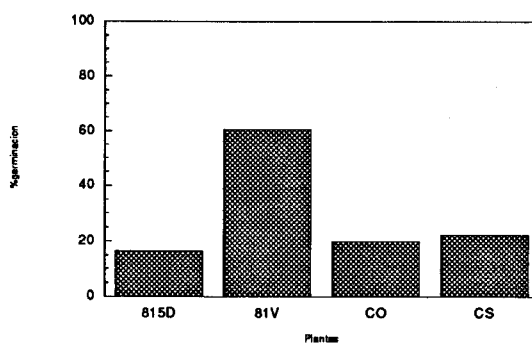
Figura 20: Estudio de los niveles de proteína TAS14 acumulados en las semillas de plantas tas14s y de plantas de tabaco sin transformar germinadas en presencia de sal. A y C) Western de las proteínas de las semillas germinadas en medio MS-250 mM NaCl (muestra recogida al X día del tratamiento, fig. X). Cn. Semillas de plantas no transformadas. B) Gel de poliacrilamida tefido con Coomasie en el que se resuelven las proteínas de las semillas germinadas en sal (muestra equivalente a la presentada en el western A).

2.3.5. Estudios de la respuesta a estrés hídrico

Como el estrés salino conlleva, entre otros, un componente de estrés hídrico, también se han llevado a cabo ensayos en los que se ha evaluado el grado de tolerancia de las plantas *tas14s* a la desecación.

Se han realizado experimentos con germinulas de plantas *tas14s* y de plantas sin transformar en los que se ha estudiado la capacidad de supervivencia tras un periodo de desecación (48 horas) y una posterior rehidratación (7 días) (Figura 21). Los resultados obtenidos parecen indicar que las semillas del transformante 81 tienen una mayor tolerancia al estrés hídrico.

Figura 21: Ensayos de desecación/rehidratación de germinulas de tabaco. CS y Co semillas de plantas de tabaco sin transformar. 81V y 815D semillas de la F1 y la F2 de plantas transgénicas *tas14s* respectivamente.



También se han realizado experimentos similares en plantas adultas de tabaco, gracias a la colaboración con la compañía CIBA. En estos ensayos se sometieron las plantas a diferentes periodos de desecación (5, 8, 12 días) tras los cuales se volvieron a hidratar y se evaluó el daño ocasionado por el estrés impuesto. A partir de los 8 días las plantas empezaron a manifestar síntomas de desecación (hojas muertas), observándose una ligera diferencia entre las plantas silvestres y las plantas transgénicas.

Estos resultados vuelven a confirmar que las plantas de la F1 del transformante 81 tienen una mayor capacidad de tolerancia a la desecación. Actualmente se prevee completar estos estudios con otros transformantes.

3. ESTUDIO DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS CON EL GEN *tas14* EN ORIENTACION ANTISENTISENTIDO (PLANTAS *tas14a*)

3.1. ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LAS PLANTAS *tas14a*.

Entre las 20 plantas transformantes analizadas, sólo una de ellas presentó un fenotipo diferente a las plantas de tabaco sin transformar: flores con estambres que en su extremo apical se diferenciaban en pétalos (fig.22).

En un intento de explicar este cambio como consecuencia de la transformación con el gen antisentido, la escasa representación de este posible efecto podría ser debida a una menor eficiencia del efecto antisentido en el sistema heterólogo usado. Para intentar resolver este problema se transformaron de nuevo plantas de tabaco con el gen antisentido *tas14*: no se observó la aparición de este fenotipo u otro diferente al silvestre entre 20 plantas obtenidas en este nuevo experimento de transformación.

Posteriormente y en experimentos independientes realizados en nuestro laboratorio, se encontró un fenotipo parecido en plantas transformadas con un gen diferente, por lo que probablemente el fenotipo observado sea un efecto derivado del proceso de transformación, quizás en nuestro caso debido al lugar de inserción pues las plantas correspondientes a la F1 presentan también flores anómalas.

3.2. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE EXPRESION DEL GEN *tas14* EN PLANTAS *tas14a*.

3.2.1. Estudio de los niveles de ARN *tas14*

La introducción de genes antisentido en eucariotas se ha convertido en una estrategia de estudio rutinaria en los últimos años, sin embargo los mecanismos moleculares por los que se consigue bloquear la expresión de un gen no se conocen de forma tan extensa como lo es su aplicación.

La explicación básica del efecto del antisentido consiste en la formación de un duplex entre el ARNm y el ARN antisentido, el cual puede ser rápidamente degradado, o interferir en el posterior procesamiento o traducción del ARN. Se han descrito muchos casos en los que la transformación con el antisentido conduce a una disminución de los niveles de ARNm del gen estudiado, así como de los niveles de proteína (Revisado por: Van der Krol, 1988; Nellen y Lichtenstein 1993).

En el presente trabajo como primer paso, una vez que se identificaron plantas que tenían integrado el *tas14* antisentido, se procedió a estudiar en ellas la posible reducción de los niveles de ARNm *tas14*. Se utilizaron varias plantas de la F1 de cada uno de los transformantes analizados y se sometieron a un tratamiento tras el cual se inducía el gen endógeno *tas14*: 7 días en solución Hoogland II con 10 g/L NaCl.

En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos tras hibridar el ARN total de hojas de estas plantas con sondas radioactivas correspondientes a la transcripción *in vitro* de cDNA sentido y antisentido, sondas antisentido y sentido respectivamente. En todas las plantas analizadas se observó expresión del ARN antisentido, pero los niveles de ARNm detectados no fueron inferiores a los niveles de ARNm presentes en plantas controles crecidas en las mismas condiciones. En estos ensayos se hibridaron los filtros de ARN con una sonda de ARN ribosómico con el objeto de estandarizar las señales de hibridación con la cantidad de ARN cargado en cada carril.

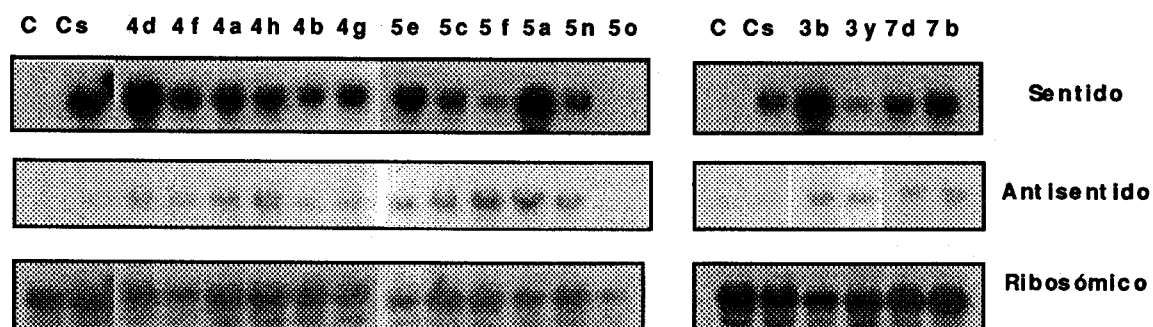


Figura 23: Detección del ARNm *tas14* y del ARN antisentido en los transformantes. Hibridación de ARN de hojas de plantas *tas14a* tratadas durante 7 días con 10 g/L NaCl. C y Cs plantas no transformadas crecidas en ausencia o presencia de 10 g/L NaCl respectivamente. Los números indican el transformante y la letra la planta de la F1 estudiada.

3.2.2. Estudio de los niveles de proteína TAS14

Aunque no se detectó una reducción en los niveles de ARNm *tas14*, se investigó un posible efecto del ARN antisentido sobre los niveles de proteína *tas14* acumulados en estas mismas plantas y en otros transformantes tratados también durante 7 días con 10 g/L NaCl.

Se extrajeron las proteínas de las hojas de estas plantas, se transfirieron a filtro Immobylon y se incubaron con anticuerpo anti-TAS14. No se pudo observar ninguna reducción significativa en el nivel de proteína de estos transformantes respecto al nivel de proteína acumulada en las plantas sin transformar sometidas a las mismas concentraciones salinas (fig. 24).

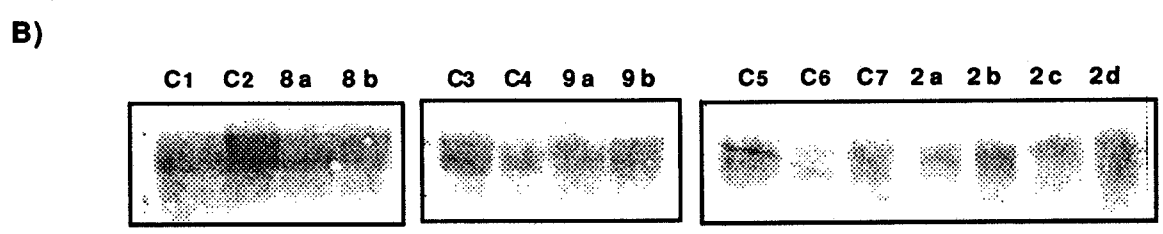
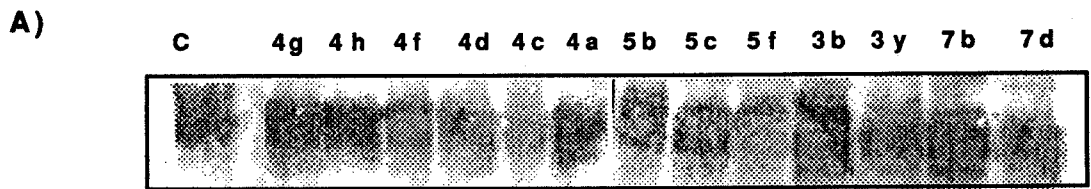


Figura 24: Estudio de los niveles de proteína TAS14 acumulados en plantas tas14a Ensayos western de los extractos de proteínas de hojas de plantas tas14a tratadas durante 7 días con 10 g/L NaCl. A) Plantas equivalentes a las utilizadas en los ensayos de detección de ARN mostrados en la figura 13; B) Otras plantas transformantes del gen antisentido. CX diferentes plantas no transformadas. Los números indican el transformante y la letra la planta de la F1 estudiada.



4. ANALISIS DE LA SECUENCIA DE LA PROTEINA TAS14

En trabajos precedentes se ha llevado a cabo un estudio de la secuencia de la proteína TAS14: composición aminoacídica, punto isoelectrico, peso molecular, predicción de estructura y comparación con otras secuencias (Godoy et al. 1990). En el presente trabajo se presentan algunas características que complementan los estudios anteriores.

En los últimos años se han desarrollado estudios que demuestran que el transporte de proteínas al núcleo es un proceso específico, en el que están implicadas ciertas secuencias básicas denominadas señales de localización nuclear NLS (nuclear localization site) (Raikhel 1992; Dingwall, C., Laskey, R.A. 1991).

Las NLSs se pueden agrupar en varias categorías: 1) NLSs tipo SV40, formada por una región pequeña de aminoácidos básicos, (PKKKRKV); 2) NLSs tipo MAT α_2 , consiste en una región hidrofóbica que contiene uno o mas aminoácidos básicos, (KIPIK); 3) NLSs bipartitas, consiste en dos regiones de aminoácidos básicos separadas por cuatro o más residuos aminoacídicos. Además, existen NLSs que no se ajustan a ninguno de los modelos descritos y que son características de algunas proteínas nucleares de virus. Aunque las NLSs se pueden agrupar en estas categorías, no existe una secuencia consenso.

En la secuencia de la proteína TAS14 se pueden observar dos motivos básicos que muestran una gran homología con las señales de localización nuclear (NLS) bipartitas descritas en proteínas nucleares (Tabla V).

Por otra parte, la proteína tas14 presenta motivos de fosforilación por proteína quinasa dependiente de AMPcíclico, PK: RXS* y RXXS* (Pearson et al. 1993); y por la caseína quinasa II: S/XX(D/E)X. Estos motivos se encuentran localizados entre las posibles señales de localización nuclear. En algunas proteínas nucleares como la topoisomerasa I, se han encontrado señales de fosforilación que presentan esta misma disposición (Dingwall y Laskey 1991).

En la figura 25 se esquematiza los motivos de fosforilación y localización nuclear encontrados en la secuencia de la proteína TAS14.



Figura 25: Señales de localización nuclear y de fosforilación de la proteína TAS14. - NLSs; = α -hélices; * sitios de fosforilación por PK; círculos negros, sitios de fosforilación por CKII.

Tabla V: Secuencia de aminoácidos de las señales de localización nuclear de la tas14 y otras proteínas. *Revisado por Raikhel 1992; p53(Zakut-Houri et al. 1990); Nucleoplasmina (Ncplm) (Dingwall et al. 1988); topoisomerasa I (Topo I) (Dingwall y Laskey 1991.); SV40 T-antígeno (Kalderon et al. 1984.); c-Rel (Wilhelmsen et al. 1984); RAD7 (Perozzi y Prakash 1986) PHO2 (Sengstady Hinnen 1987).

Secuencia	Gen (organismo)
LRRSDSSSSSEDDGEGGRRKK	TAS14 (tomate)
RRLAQNREAARKSRLRKK	TGA (Tabaco)*
KKRARLVRNRESAQLSRQRKK	TGA (Tabaco)*
KKNQKHKLKM-32aa-KRK	NIa (Potyvirus)*
KRPREDDDGEPSEKREK	VirD2 (Agrobacterium)*
KLRPEDRYQTEKYGRR	VirE2 (Agrobacterium)*
RKRKESNRESARRSRYRK	O2 (maíz)*
MEEAVTMAPAAVSSAVVGD MEYNAILRRKLEEDLE	O2 (maíz)*
GDRRAAPARP	R (maíz)*
MSEKRRREKL	R (maíz)*
MISEALRKAIGKR	R (maíz)*
KRALPNNTSSSPQPKKK	P53
KRPAATKKGQAKKKK	Ncplm
KKSKSESEDDIPIRKR	Topo I
SSDDEATADSQHSTPPKQKQR	SV40
RRVLSFQNLGIQCVKKK	c-Rel
KRQNTAKIIQNRRRKR	RAD 7
RKFEINPTPSLVERKK	PHO 2

5. EXPRESION DE TAS14 EN BACTERIAS COMO PROTEINA DE FUSION A GLUTATION S-TRANSFERASA

Con el objetivo de obtener proteína TAS14 para posteriores ensayos *in vitro*, se optó por su expresión heteróloga en bacterias como proteína de fusión con Glutathion S-Transferasa, (GST). Se eligió este sistema porque: 1) preserva la funcionalidad de la proteína, gracias a que la purificación se lleva a cabo en condiciones no desnaturalizantes; 2) permite obtener el polipéptido deseado libre de la GST mediante la digestión de la proteína de fusión con la proteasa correspondiente, evitando de esta manera posibles cambios conformacionales del polipéptido en la proteína de fusión.

Se utilizó el vector de expresión pGEX2T de la serie de vectores pGEX. Estos vectores contienen el gen de la GST bajo el control de un promotor pTac, un gen *lacIq* que les confiere independencia del huésped, y dianas para la digestión con proteasas situadas después de la secuencia codificante de la GST. El resultado fue una fusión génica traducional, bajo el control de un promotor inducible químicamente por adición de IPTG, estando la expresión a partir del promotor *ptac* normalmente reprimida por el represor *lac* (producto del gen *lacIq*).

En la figura 26 se presenta un esquema del proceso de construcción del plásmido recombinante pGEX2T-TAS14-2. El fragmento clonado corresponde al fragmento de 668 pb del clon *tas14-2*.

La purificación de la proteína de fusión se llevó a cabo por cromatografía de afinidad, en columnas de sepharosa 4B-glutathión. La proteína TAS14 se obtuvo digiriendo con Trombina la proteína de fusión y separando por cromatografía los productos digeridos, como se describe en el apartado 8 de materiales y métodos.

La figura 27A muestra un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, donde se han resuelto los extractos totales de proteínas de cultivos de células portadoras del plásmido pGEX2T-TAS14-2: (1) cultivos sin inducir, y (2) cultivos inducidos. Las bacterias incubadas con IPTG acumulaban una proteína, no presente en los extractos de cultivos no inducidos, que migraba por debajo del marcador de peso molecular de 45 KDa; esta movilidad se correspondía con la esperada en la proteína de fusión GST-TAS14 (41 KDa). El carril (3) corresponde a la proteína de fusión GST-TAS14 purificada por cromatografía. El resultado de la digestión de la proteína GST-TAS14 y de su posterior purificación por afinidad se muestra en el carril 1 de la figura 27B. Como se observa en la figura el peso molecular de la proteína TAS14 expresada en *E. coli* es mayor al deducido por la secuencia de aminoácidos (13,9 KDa). Esta discrepancia entre los pesos moleculares deducidos a partir de la secuencia y los calculados a partir de la

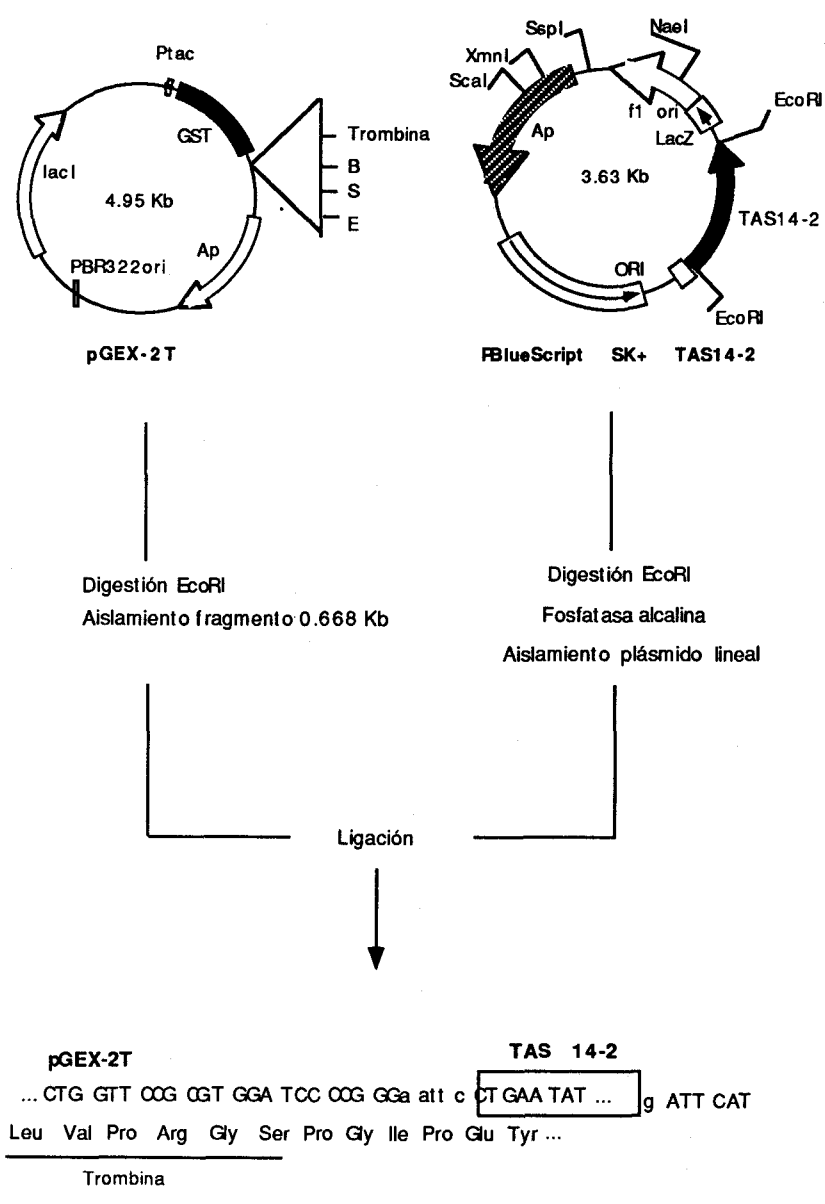


Figura 26: Esquema del proceso de construcción del plásmido pGEX2T-TAS14-2. Clonación del inserto tas14-2 en el vector de expresión pGEX2T para su expresión a partir del promotor Ptac de E.coli. B, BamHI; S, SmaI; E, Eco

movilidad relativa en geles se ha observado en otros genes inducidos por ABA (Mundy y Chua 1988; Villardel et al. 1990), habiendo sido atribuida a anomalías en la migración electroforética de estas proteínas.

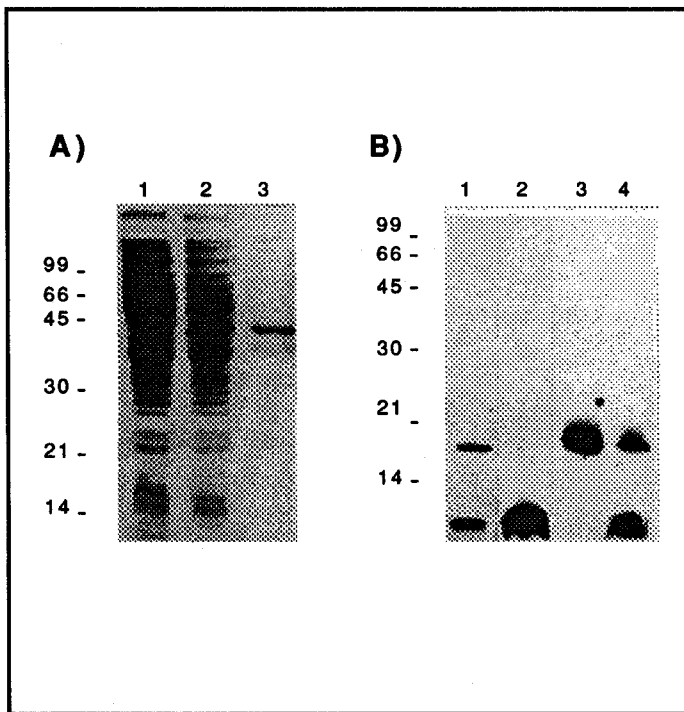


Figura 27: Expresión heteróloga de la proteína TAS14 en *E. coli* : purificación y fosforilación *in vitro*. A) Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie donde se han resuelto extractos totales de proteína de bacterias portadoras del plásmido recombinante pGEX2T-TAS14-2. Extractos de cultivos sin inducir (1), de cultivos inducidos con 1mM IPTG (2). Proteína GST-TAS14 purificada por cromatografía de afinidad (3). El carril 3 muestra la proteína GST-TAS14 purificada por cromatografía de afinidad. B) Proteína tas14 purificada por cromatografía tras la digestión con trombina de la proteína GST-TAS14 (1). Autorradiografía de los productos de las reacciones de fosforilación de la proteína TAS14 con CKII (2), PK (3) y en ausencia de enzima (4). La banda inferior del carril (1) se debe a poly-L-lysina presente en la reacción de fosforilación y en los carriles (2) (3) (4) a nucleótido libre.

6. FOSFORILACION "IN VITRO" DE TAS14 CON CASEINA QUINASA II Y PROTEINA QUINASA.

El polipéptido TAS14 es un polipéptido fosforilable como lo demuestran experimentos de marcaje *in vivo* con ^{32}P , realizados previamente en nuestro laboratorio (Torres-Schumann et al. 1991). En estos experimentos se demuestra que las proteínas de diferente punto isoelectrónico reconocidas por el anticuerpo anti-TAS14 corresponden a diferentes formas fosforiladas de la proteína, puesto que se resumen en una sola forma, tras el tratamiento de los extractos con fosfatasa alcalina.

La presencia de la secuencia consenso para la fosforilación por caseína-quinasa II en la secuencia de tas14 y demás genes relacionados, parece indicar que esta quinasa es la responsable de la fosforilación de estos polipéptidos.

Para determinar si la proteína TAS14 es realmente un sustrato para la CKII se procedió a fosforilar la proteína expresada heterológamente en *E. coli*, libre de la porción GST, con CKII extraída de cerebros de ratas, según Alcazar et al. 1988, como se describe en los apartados 9 y 10 de materiales y métodos.

En la figura 27 se muestra el resultado de la fosforilación de la proteína TAS14 con CKII y con $(\gamma^{32}\text{P})\text{-ATP}$. En la autorradiografía pueden observarse dos bandas que

probablemente correspondan al menos a dos formas fosforiladas de la proteína con diferente movilidad electroforética debido a las cargas de los grupos fosfatos.

La secuencia de tas14 presenta además en la zona básica de la proteína dos motivos de fosforilación por proteína quinasa (PK): RXS* ó RXXS*, como se indica en la figura 25. En la figura 27 se muestra la autorradiografía correspondiente a la reacción de fosforilación de la proteína TAS14 con proteína quinasa. Como puede observarse sólo aparece una banda, lo cual indica que existe una sola forma fosforilada o que ambas formas tienen igual movilidad electroforética.

En estos ensayos de fosforilación se llevaron a cabo controles de autofosforilación y controles de especificidad para la quinasa usada. En los primeros se procedió a incubar la preparación de proteína TAS14 con ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP para descartar la existencia de contaminaciones de quinasa en la preparación, ó la posible capacidad de autofosforilarse de la proteína TAS14. En la figura 27, carril 2, se muestra el resultado de las reacciones de control de autofosforilación, como puede apreciarse no se observa fosforilación alguna en ausencia de quinasa. Los controles de especificidad se realizaron incubando con estas quinasas la proteína GST que no presentaba secuencia consenso de fosforilación, para así descartar posibles fosforilaciones inespecíficas. Aunque no se muestra en la figura, el resultado de estos controles fue positivo; es decir no se detectó fosforilación inespecífica. La elección de la proteína GST permitió utilizarla como control para las reacciones de fosforilación de la proteína de fusión GST-TAS14.

7. LOCALIZACION INTRACELULAR DE LA PROTEINA TAS14

La existencia en la secuencia de la proteína TAS14 de una señal nuclear bipartita y de motivos de fosforilación para CKII, características compartidas por muchas proteínas nucleares, nos llevó a determinar la localización intracelular de la proteína.

Para ello, se utilizaron células de meristemo adventicio de plantas de tomate tratadas con 10 g/L NaCl. Se eligió este tejido y estas condiciones de tratamiento porque previamente se había detectado esta proteína abundantemente en estas células mediante inmunohistoquímica (Godoy-Luna et al. 1994).

La inmunolocalización se llevó a cabo, como se describe en el apartado 7.3. de materiales y métodos, con anticuerpo específico anti-TAS14 purificado por afinidad y con proteína A unida a partículas de oro.

En la figura 28A, 28B y 28C se muestran las micrografías de transmisión de electrones correspondientes a la inmunolocalización de la proteína TAS14 en células de

meristemo adventicio de plantas tratadas con 10 g/L NaCl durante 7 días. Como se observa en las micrografías, la proteína TAS14 se localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma. En el núcleo las partículas de oro estaban asociadas a la cromatina nuclear y nucleolar, y se localizaban preferentemente en la eucromatina (fig. 28A y 28B). Las partículas encontradas en la heterocromatina, estaban en su mayor parte distribuidas por la periferia (fig. 28C). En el citoplasma no se observaron partículas asociadas a ningún orgánulo detectándose el marcaje en el citosol (fig. 28C). Tampoco se observaron señales del anticuerpo en la pared y vacuolas de las células examinadas.

Como control de la inmunolocalización se procesaron cortes equivalentes a los anteriores con suero preinmune, observándose un nulo o escaso fondo de partículas de oro, (fig. 28E). Además, se analizaron preparaciones de células de plantas no tratadas (fig. 28D) no detectándose proteína TAS14 en estas condiciones.

En la tabla VI se muestran los resultados de los estudios morfométricos y estereológicos, realizados como se indica en el apartado 7.3.3. de materiales y métodos. Aunque la proteína TAS14 se localiza en el núcleo y en el citoplasma, estos análisis muestran que el número relativo de partículas de oro dentro del núcleo es dos veces mayor que en el citoplasma.

	Eucromatina	Heterocromatina	Citosol
Partículas oro/ μm^2	12.87 \pm 0.973	3.20 \pm 0.241 ^b	6.48 \pm 0.53 ^{bc}

a . Cada valor corresponde a la media sde los valores obtenidos en 30 células \pm error estándar.

b. P<0.01 comparación con los valores en la eucromatina.

c P<0.01 comparación con los valores en la heterocromatina.

Tabla VI: Estudios morfométricos-cuantitativos de las micrografías correspondientes a la inmunolocalización celular de la proteína TAS14. Análisis cuantitativo del inmuno-marcaje obtenido con anticuerpo anti-tAS14 en preparaciones de células de tallo de *Lycopersicon esculentum* sometidas a estrés salino.

Figura 28: Localización intracelular de la proteína TAS14. Micrografías de transmisión de electrones, correspondientes a la inmunolocalización de la proteína TAS14 en células de meristemas adventicios de plantas de tomate crecidas en presencia de 10 g/L NaCl (A, B y C), y en condiciones control, H₂O (D). Micrografía correspondiente a la incubación de una sección equivalente a las mostradas en las figuras A, B, y C, incubada con suero preinmune (E). Cy, citosol; Ch, cromatina; N, núcleo; nu, nucleolo; V, vacuola; W, pared celular. Las flechas indican la localización de partículas de oro en la periferia de la heterocromatina. La longitud de la barra corresponde a 0.5 μ m.

8. DETERMINACION DEL ESTADO DE AGREGACION Y PESO MOLECULAR DE LA PROTEINA TAS14

Las hélices anfipáticas predichas a partir de la secuencia de tas14 podrían estar implicadas en interacciones intra o intermoleculares como se ha descrito para otras proteínas relacionadas (Dure, 1993). Por ello se trató de determinar el estado de agregación de la proteína.

8.1. Uso de la cromatografía de filtración para determinar el peso molecular y el estado de agregación de la proteína TAS14.

Para estudiar el estado de agregación posible de la proteína bien como monómero, dímero o bien como estructura más compleja, se empleó la técnica de cromatografía de exclusión molecular. Esta técnica permite calcular el peso molecular de la forma nativa de la proteína por comparación del volumen de elución en un gel de tamaño de poro definido, con el volumen de elución de proteínas de peso molecular conocido.

Para ello se obtuvo la proteína TAS14 en grandes cantidades mediante el sistema de expresión GST, como se ha descrito anteriormente y se analizaron en una columna de Sephacryl-S200 250 µg de proteína TAS14, y 170 µg de proteína TAS14 fosforilada *in vitro* con CKII, como se indica en el apartado 10.1.3. de materiales y métodos.

El volumen de elución de la proteína TAS14 se calculó cuantificando mediante ensayo Bradford las proteínas presentes en las diferentes alícuotas, (fig. 29A y 29B) y comprobando posteriormente la presencia de la proteína TAS14 en estos eluidos por análisis western como se muestra en las figuras 29C y 29D. Los volúmenes de elución obtenidos fueron 45.7 y 46.8 ml para la proteína TAS14 y para la proteína TAS14 fosforilada con CKII respectivamente.

La determinación de la masa molecular de la proteína TAS14 se llevó a cabo según las aplicaciones de Andrews 1965; extrapolando a partir de la representación de los valores de K_{av} frente al logaritmo de la masa molecular de las proteínas marcadoras (fig. 30). Los valores de K_{av} obtenidos para la proteína tas14 y para la proteína TAS14 fosforilada con CKII, fueron: 0.47 y 0.49 respectivamente y por tanto los pesos moleculares calculados por extrapolación en la recta patrón fueron muy similares: 30.9 y 27.5 KDa respectivamente.

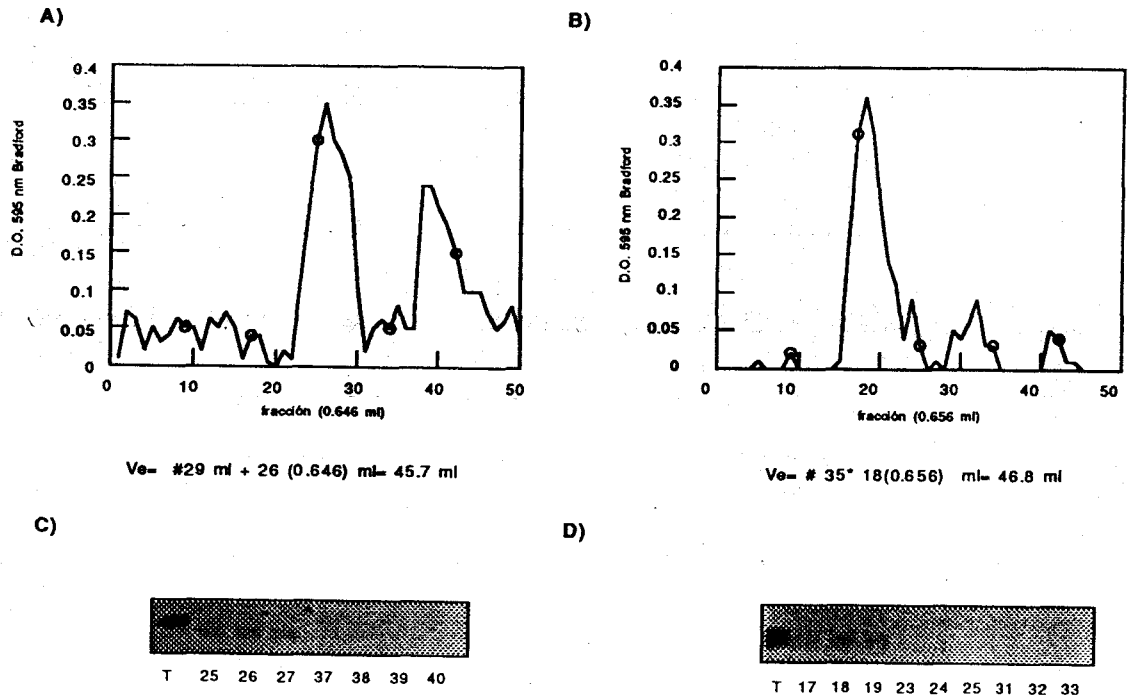


Figura 29: Cromatografía de exclusión de la proteína TAS14: cálculo del volumen de elución en columna Sephacryl-S200. A y B. Representación de los valores de absorbancia a 595 nm, obtenidos con ensayo Bradford de las alícuotas recogidas de la columna de cromatografía de filtración en gel. Los números del eje X indican el número de la fracción analizada. # volúmenes recogidos en una sola fracción, anterior a la recogida de alícuotas con el colector. C y D Ensayos western de las muestras que contenían mayor cantidad de proteína. T, proteína TAS14 purificada, incluida como control positivo en los ensayos de western blot.

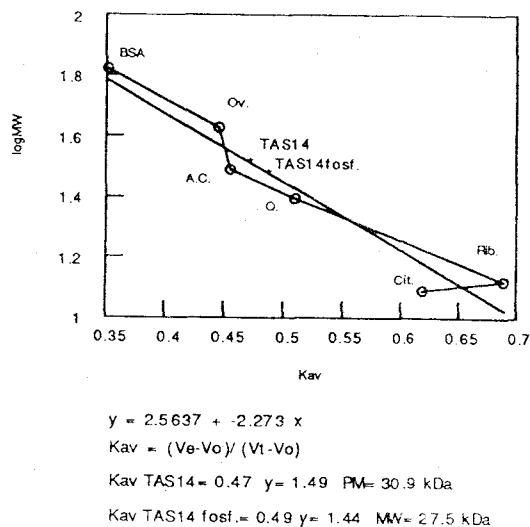


Figura 30: Determinación del peso molecular de la proteína TAS14 por cromatografía de exclusión. Cálculo del peso molecular de la proteína TAS14 por extrapolación en la recta de regresión obtenida tras la representación de los valores $Kav/\log MW$ de las proteínas marcadoras. ($\log MW$), logaritmo del peso molecular de las proteínas. *Definición de Kav según Andrews, (Ref). **Extrapolación a partir de los valores de Kav obtenidos para la proteína TAS14. BSA. (seroalbúmina bovina); Ov. (ovoalbúmina de gallina); A.C. (anhidrasa carbónica de bovina); Q. (quimiotripsinógeno); Rib. (ribonucleasa A); Cit (citocromo c).

8.2. Uso de la técnica de cross-linking para detectar posibles uniones inter-intramoleculares de la proteína TAS14

Para estudiar el estado de agregación de la proteína TAS14 se realizaron ensayos de crosslinking con diferentes agentes. Esta estrategia ha sido empleada en el estudio de numerosas moléculas, ya que gracias a la introducción de enlaces covalentes entre subunidades o partes de la/s molécula/s que están interaccionando, se puede obtener información sobre la estructura cuaternaria de las moléculas estudiadas.

Para nuestros estudios se eligieron dos tipos de agente con diferente especificidad de reacción: 1) dimetil-pimelidato (DMP), compuesto que forma enlaces covalentes entre grupos aminos y 2) 1-Etil-3(3-Dimetilaminopropil) carbodiimida Hidroclorídrico, (EDC), el cual forma enlaces entre grupos aminos y carboxilos próximos.

En el experimento que se muestra en la figura 31, se incubaron diferentes cantidades de proteína TAS14: 0.035 μ g-0.7 μ g, durante 30 minutos con 2mM de DMP, como se describe en el apartado 15 de materiales y métodos. Tras parar las reacciones con 20 mM etanolamina, se analizaron las reacciones por electroforesis, transferencia a filtro e incubación con el anticuerpo anti-TAS14. Como se ve en la figura, la adición de DMP no altera la movilidad de la proteína TAS14; en todos los carriles la proteína migra por debajo del marcador de 21.5 KDa, exactamente igual que cuando no se añade agente de crosslinking, carril 5.

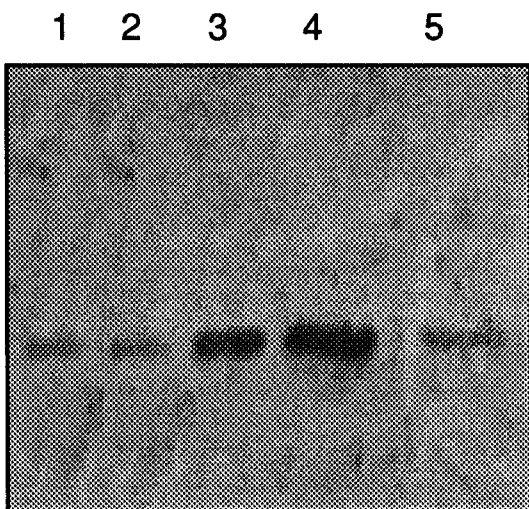


Figura31: Ensayos de crosslinking de la proteína TAS14 con el agente DMP. Immunolocalización de los productos de las reacciones de crosslinking con anticuerpo anti-TAS14. Los números 1-4 se corresponden con diferentes cantidades de proteína, (0.035, 0.07, 0.175, 0.35, y 0.7 μ g respectivamente). El carril 5, corresponde a una reacción paralela con 0.35 μ g de proteína TAS14, sin añadir DMP.

Los experimentos de crosslinking con EDC, se muestran en la figura 32. En esta ocasión, se fijó una cantidad de proteína, 700 ng, y se realizó una cinética de tiempo 0-60 minutos en presencia de 2mM EDC a 25°C. Las reacciones se pararon con 0.2 M glicina y los productos se analizaron por western.-blot. En este ensayo se observó que a medida que aumentaba el tiempo de reacción aparecía una banda, reconocida por el anticuerpo, justo por encima de la correspondiente a la proteína TAS14. El peso molecular estimado para esta nueva banda es aproximadamente 2 KDa mayor que el peso de la proteína TAS14.

0 5 10 15 30 60

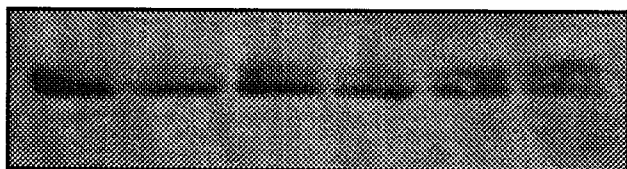


Figura32: Ensayos de crosslinking de la proteína TAS14 con el agente EDC. Análisis western de la cinética de tiempo de las reacciones de crosslinking. Los números indican el tiempo de incubación de la reacción en minutos.

9. ESTUDIOS DE INTERACCION DE LA PROTEINA TAS14 CON ADN

Al encontrar la proteína localizada en el núcleo y principalmente en la eucromatina, es decir la cromatina activa; nos preguntamos si la proteína TAS14 podría unirse a ADN. Para contestar a esta pregunta se llevaron a cabo ensayos de retardación de ADN en geles de poliacrilamida; en los cuales se puede detectar la formación de complejos ADN-proteína, a partir del cambio de movilidad electroforética de éstos con respecto a la movilidad del ADN libre.

Como se desconocía cualquier secuencia de ADN candidata para la posible unión de la proteína TAS14, se optó por usar una mezcla de oligonucleótidos de secuencia degenerada, como se describe en el apartado 11 de materiales y métodos. En la figura 2, pag x, correspondiente a este mismo apartado, se presenta un esquema de la estrategia utilizada.

9.1. Estudio de las condiciones de unión de la proteína TAS14 y el ADN

Los primeros experimentos de retardación, consistieron en el estudio de las condiciones más favorables para la posible unión de la proteína TAS14 a ADN. Para ello se incubó la mezcla de oligonucleótidos marcados con 1 µg de proteína en tampón de

unión con 100 mM NaCl a 4°C. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 1µg de polidIdC como competidor y de 10 ng de mezcla de oligonucleótidos sin marcar, siendo esta última utilizada de forma opcional. Se utilizaron las proteínas GST-TAS14, TAS14 y GST, purificadas por cromatografía de afinidad, ésta última fue utilizada como control en estos ensayos. En estos experimentos previos se observó una débil banda de retardación sólo cuando se incubaba la proteína TAS14 en ausencia de oligonucleótido sin marcar.

Una vez observada retardación en ausencia de oligonucleótido sin marcar, se estudiaron el efecto de la fuerza iónica y el efecto de la fosforilación de la proteína en la unión al ADN. Las reacciones se llevaron a cabo en tampón de unión a ADN con 100 mM NaCl, 10 mM Cl₂Mg; y 50 mM NaCl. Los ensayos de retardación se realizaron con 1 µg de proteína TAS14 y 1 µg de proteína TAS14 fosforilada con CKII de rata. Como se ve en la figura 33, la proteína TAS14 se une al ADN en todas las condiciones iónicas, sin embargo cuando está fosforilada, estos complejos desaparecen.

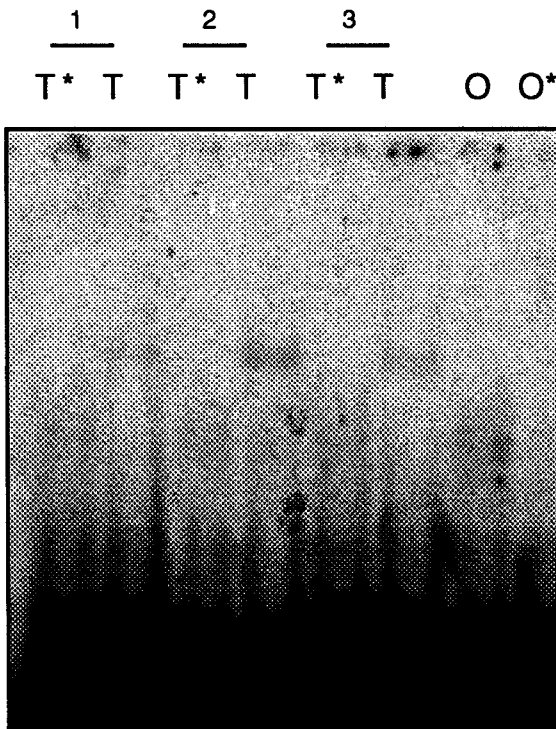


Figura 33: Efecto de las condiciones iónicas y de la fosforilación en la unión de TAS14 a ADN. Ensayo de retardación de las proteínas TAS14 (T) y TAS14 fosforilada (T*) con CKII, con mezcla de oligonucleótido marcado. O y O* reacciones del oligonucleótido incubado con tampón de dilución de proteínas y mezcla de reacción de fosforilación, respectivamente.

Para completar los estudios, se realizaron nuevos experimentos (fig. 34) en los que se analizó la unión en función de la cantidad de proteína TAS14. Como se observa en la radiografía, 100 μg de proteína son suficientes para observar un retraso del ADN, pero cantidades mayores de proteína no incrementan la señal de la banda de retardación correspondiente. En estos últimos ensayos se usaron 3 ng de oligonucleótido sin marcar, para hacer mas restrictivas las condiciones de interacción.

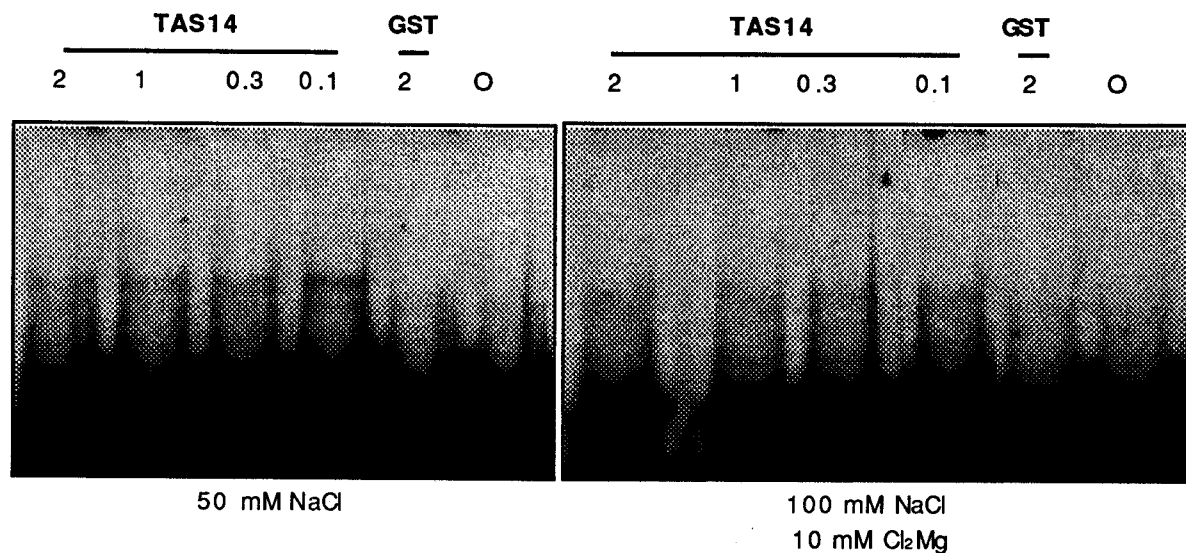


Figura 34: Efecto de la concentración de la proteína TAS14, en la unión con ADN. Los números indican los μg de proteína TAS14 utilizados.

9.1.2. Ensayos de PCR para el enriquecimiento de la secuencia de ADN unida

Con el objeto de probar la unión de la proteína a una secuencia de ADN específica y de enriquecer la mezcla de oligonucleótidos en dicha secuencia, se realizaron experimentos de amplificación por PCR del ADN de la banda retrasada y ensayos de retardación con esta mezcla de ADN enriquecido. Se realizaron dos ciclos consecutivos de PCR y con la mezcla nueva de oligonucleótidos se realizó un nuevo ensayo de unión que dió resultados negativos; es decir no se observó unión de la proteína TAS14 con el ADN amplificado.

Tras este último resultado existían varias hipótesis de trabajo: 1) que la banda de retardación no se debiera a la proteína TAS14, sino a otra proteína presente en el extracto; 2) que la proteína TAS14 se hubiera parcialmente desnaturizado durante el proceso de purificación; 3) que la secuencia de ADN de unión fuera lo suficientemente larga y variable como para estar representada mínimamente en la mezcla de oligonucleótidos.

Para comprobar la primera hipótesis se realizaron ensayos de retardación con trombina, por ser ésta la única variante introducida en la purificación de GST-TAS14 con respecto a la de la proteína GST. Se probaron diferentes concentraciones de trombina (0.01-4 U), sin que con ninguna de ellas se produjera un retraso del ADN.

Para responder a la segunda hipótesis (pérdida de funcionalidad de la proteína) se realizaron nuevas purificaciones de la proteína. Se purificó de nuevo proteína GST, GST-TAS14 y TAS14, y para evitar cualquier posible degradación, se congelaron las proteínas, obviando en unos casos la purificación por cromatografía (extractos crudos) y en otros, los pasos de diálisis y concentración por centrifugación de las muestras (extractos purificados). La figura 34A muestra los ensayos de retardación con proteína de extracto crudo; en el carril correspondiente a la incubación del ADN con la proteína GST-TAS14 puede observarse una banda de retardación de mayor peso molecular a la paralela observada incubando con la proteína GST. Para comprobar la especificidad de este complejo, se recortó la banda, se amplificó el ADN por PCR y se realizaron nuevos ensayos de retardación con las proteínas de extractos crudos, y de extractos purificados. En la figura 34B se muestran las radiografías correspondientes a estos ensayos; como puede observarse, las bandas de retardación aparecen también con la proteína GST. De este último resultado, se podría deducir que la banda diferencial, del experimento anterior (fig.34A) era debida a la proteína GST, siendo probablemente el resultado de una ligera modificación de la movilidad del complejo, debido a la presencia de una proteína mayor, GST-TAS14.

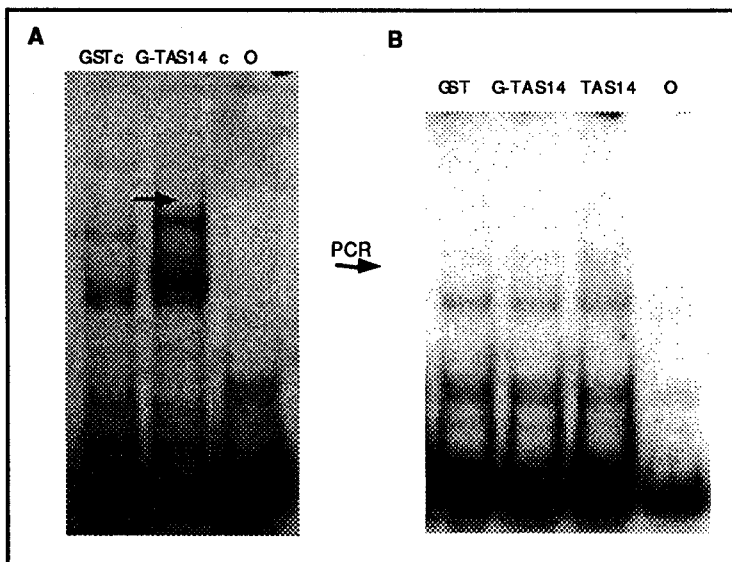


Figura 34: Ensayos de retardación de ADN con extractos protéicos sin purificar y con proteína TAS14 purificada. A) Ensayo de retardación con extractos crudos de proteína, (GSTc) y (G-TAS14c). B) Ensayo de retardación con el ADN de la banda, amplificado por PCR y las proteínas GST, GST-TAS14 (G-TAS14),TAS14.

Habiendo obtenido estos resultados, se llevaron a cabo ensayos de retardación de ADN con proteína TAS14 obtenida por traducción *in vitro* del cDNA correspondiente, como se indica en el apartado 11.2.1. de materiales y métodos. Nuevamente los ensayos de retardación de ADN dieron un resultado negativo; como puede observarse en la figura 35, no existe ninguna banda diferencial entre las incubaciones con los extractos de la traducción *in vitro* de la proteína TAS14 y con los extractos correspondientes a las reacciones de traducción sin adición de ARN exógeno

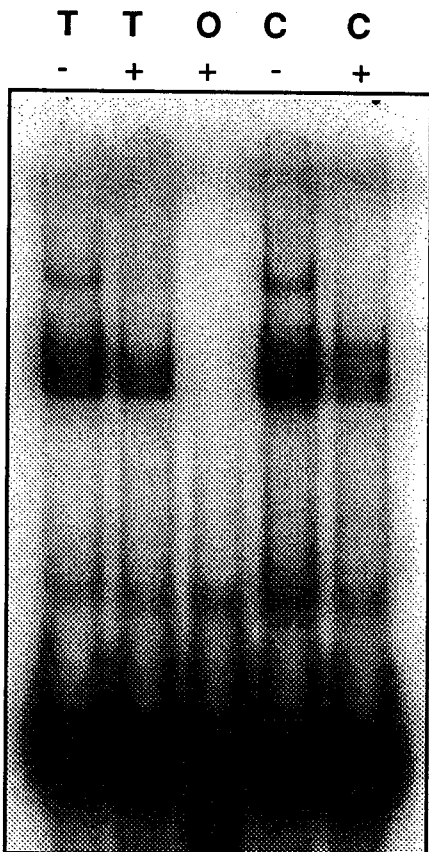


Figura 35: Ensayo de retardación de ADN con proteína TAS14 traducida *in vitro*. Ensayo de retardación de la proteína TAS14 traducida *in vitro* (T) incubada con la mezcla de oligonucleótidos marcados. (C) es el carril correspondiente a los ensayos de retardación con los extractos de las reacciones de traducción "in vitro" sin adición de ARN exógeno. O reacciones con el oligonucleótido incubado en ausencia de proteína. + y - simboliza la presencia o ausencia de polidIdC en las reacciones.

9.1.3. Ensayos de retardación de proteína TAS14 con ADN

Por último se procedió a utilizar la proteína TAS14 traducida *in vitro* en ensayos de retardación de proteína en presencia de grandes cantidades de ADN. El objeto de esta nueva estrategia era responder a la última hipótesis: unión de la proteína con secuencias de ADN muy poco representadas en la mezcla de oligonucleótidos.

La movilidad de la proteína TAS14 no se vió alterada en presencia de cantidades crecientes de ADN (1-8 µg de mezcla de oligonucleótido sin marcar) como se muestra en

la figura 36; a diferencia del cambio de movilidad del factor de transcripción, myb x, incluido como control positivo en estos experimentos.

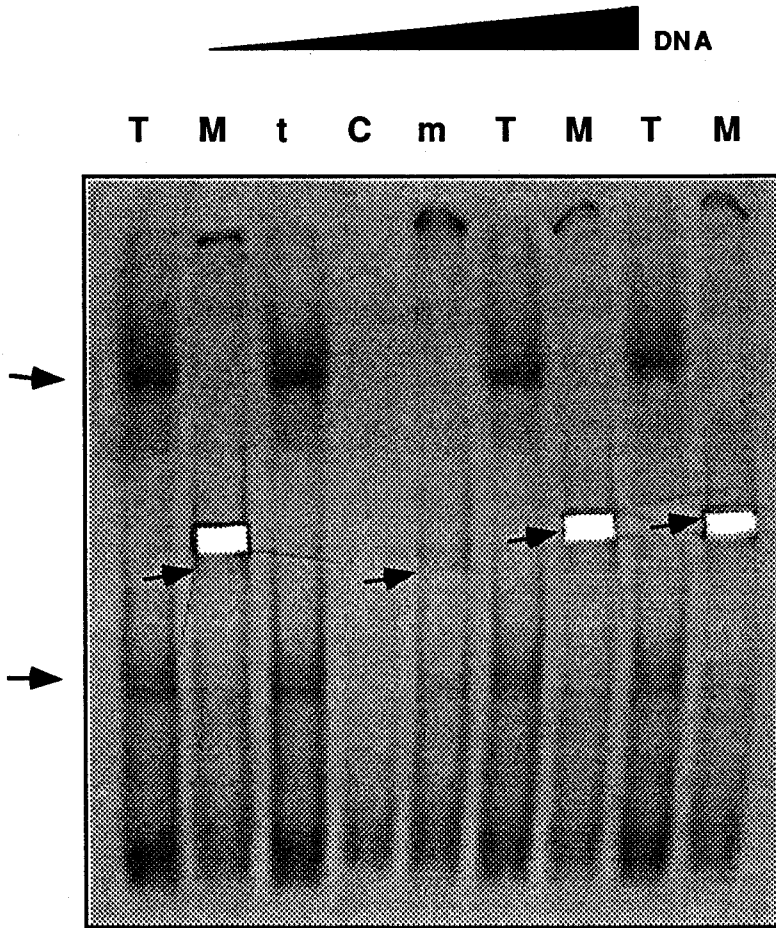


Figura 36: Ensayo de retardación de la proteína TAS14 con ADN. Ensayo de retardación de las proteínas TAS14 (T) y mybX (M), traducidas *in vitro*, con 1, 3, y 8 μ g de mezcla de oligonucleótido sin marcar. (C) Ensayo de retardación con los extractos de las reacciones de traducción *in vitro* sin adición de ARN; t y m, son las proteínas traducidas *in vitro* e incubadas sin ADN.

9.2. ESTUDIOS DE LA INTERACCION DE LA PROTEINA TAS14 CON PROTEINAS.

Como se ha mencionado anteriormente, nuestra hipótesis de trabajo se basa en la posibilidad de que las hélices anfipáticas predichas a partir de la secuencia tas14, pudieran estar implicadas en interacciones intermoleculares como se ha sugerido para otras proteínas relacionadas.

Una vez que se había demostrado que la proteína TAS14 no se unía directamente a ADN, se procedió a estudiar la posible interacción de tas14 con otras proteínas, utilizando para ello diferentes técnicas que se han descrito en otros estudios de interacción entre proteínas (Ref.), con el fin de confrontar los resultados obtenidos por

estos métodos. Las técnicas utilizadas fueron: cromatografía de afinidad, coimmunoprecipitación y overlay.

9.2.1. ESTUDIOS DE INTERACCION ENTRE GST-TAS14 Y OTRAS PROTEINAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Esta técnica permite detectar las posibles interacciones entre las proteínas presentes en un extracto con la proteína GST-TAS14 inmovilizada en Sepharosa-glutatin 4B. Como se esquematiza en la figura 3, pág.X, el proceso consiste en la incubación secuencial de extractos de proteínas marcadas *in vivo* con columnas S, (sepharosa), SG, (sepharosa con GST inmovilizada), SGTas, (sepharosa con GST-TAS14 inmovilizada) y en la posterior elución y análisis de las proteínas unidas.

9.2.1.1. Interacción de tas14 con proteínas de germínulas

Con el fin de detectar proteínas que pudieran unirse a la proteína TAS14, se marcaron germínulas de 4 días con ^{35}S - metionina/cisteína, (TRAN ^{35}S -LABEL TM ICN), que se incluía en la solución de tratamiento. Las proteínas marcadas se extrajeron en tampón ECB, y se incubaron con columnas de sepharosa, sepharosa-GST 100 μg , y sepharosa-GST-TAS14 100 μg , como se especifica en el apartado 13 de materiales y métodos. Trás lavar con tampón NETN, las proteínas eluidas de cada columna se resolvieron por electroforesis y fluorografía.

Para comenzar, se realizaron los primeros estudios con extractos protéicos de germínulas en los que estuviera presente la proteína TAS14. Se eligieron germínulas tratadas con 10 g/L NaCl, ya que por experimentos previos realizados en nuestro laboratorio se había detectado la inducción del gen *tas14* y la acumulación de la proteína (Godoy-Luna et al. 1994.).

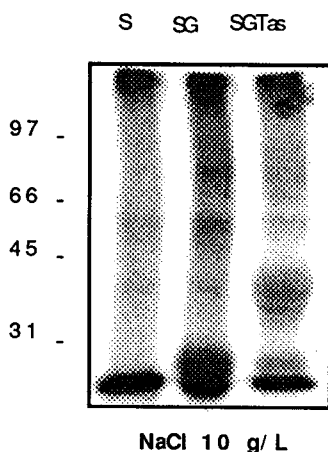


Figura 37: Estudios de interacción de la proteína TAS14 con proteínas de germínulas mediante cromatografía de afinidad (1). Ensayo de cromatografía de afinidad de extractos de germínulas marcadas con TRAN ^{35}S -LABEL en presencia de 10 g/L NaCl y . Las incubaciones se realizaron con columnas de sepharosa, (S), sepharosa-100 μg GlutathionS-transferasa, (SG), y sepharosa-100 μg GlutathionS-transferasa-TAS14, (SGTas).

En la figura 37 se muestra el resultado de los ensayos de cromatografía de afinidad utilizando extractos de germinulas marcadas con 200 μCi de $\text{TRAN}^{35}\text{S-LABEL}$, durante 20 horas en una solución con 10g/L Na. En la autorradiografía correspondiente a las proteínas unidas a GST-TAS14 se detectaron dos bandas correspondientes a proteínas de peso molecular comprendido entre los marcadores de 31 y 40 KDa, las cuales no aparecieron unidas a la sepharosa ó a la sepharosa-GST, como puede apreciarse en los carriles correspondientes. Por lo tanto puede decirse que la unión detectada es una unión debida a la proteína TAS14.

Tras estos primeros resultados, se procedió al estudio de las posibles interacciones de la proteína TAS14 con proteínas de germinulas marcadas en otras condiciones de estrés donde se expresa el gen *tas14*, así como en condiciones en las que no se detecta la proteína. En la figura 38 se presentan las autorradiografías correspondientes a los ensayos de interacción con extractos de germinulas marcados en condiciones controles, (H_2O), en presencia de ABA 100 μM o de Manitol 300mM. En todos los ensayos, se observó la retención diferencial de proteínas del mismo peso molecular que las obtenidas con extractos de germinulas tratados con 10 g/L de NaCl. No obstante, en algunos casos la fluorografía, no fue lo suficientemente nítida como para definir el número de bandas.

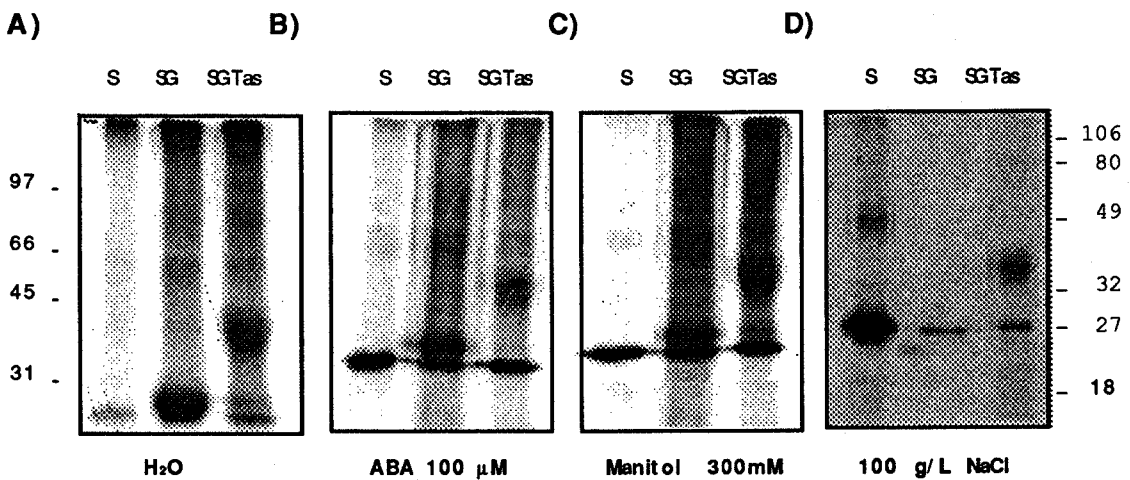


Figura 38: Estudios de interacción de la proteína TAS14 con proteínas de germinulas mediante cromatografía de afinidad (2). Ensayos de interacción de proteínas de germinulas incubadas con columnas S, SG y SGTas. Ensayos con extractos de proteína marcadas en presencia de H_2O (A), ABA 100 μM (B), 300 mM Manitol (C) y 100 g/L NaCl (D).

En un experimento adicional, en el que se utilizaron extractos de proteínas de germinulas tratadas con 100 g/L NaCl, se siguió observando, como se ve en la figura 38D, la unión de estas proteínas, siendo la banda más abundante la de mayor peso molecular. Es notable la aparición en todos los eluidos de la columna de una proteína que migra por debajo del marcador de 31 KDa y que podría tratarse de la GST de plantas, pues es retenida en gran cantidad por la sepharosa-glutation, y además coincide en peso molecular, 27 KDa, con la proteína GST de *Schistosoma japonicum*.

9.2.1.2. Interacción de tas14 con proteínas de orgánulos de plantas

Para estudiar las interacciones de la proteína TAS14 con proteínas presentes en otros estadios y órganos de la planta, se utilizaron extractos de proteínas de diferentes tejidos de planta adulta. Para ello se marcaron hojas, flores y frutos de plantas de tomate crecidas en cultivo hidropónico, en solución Hoogland II; se extrajeron las proteínas y se incubaron como antes con las distintas columnas. El resultado de estos experimentos se muestra en la figura 39.; de nuevo fueron proteínas del mismo rango de peso molecular las que se unieron de forma diferencial a la proteína TAS14.

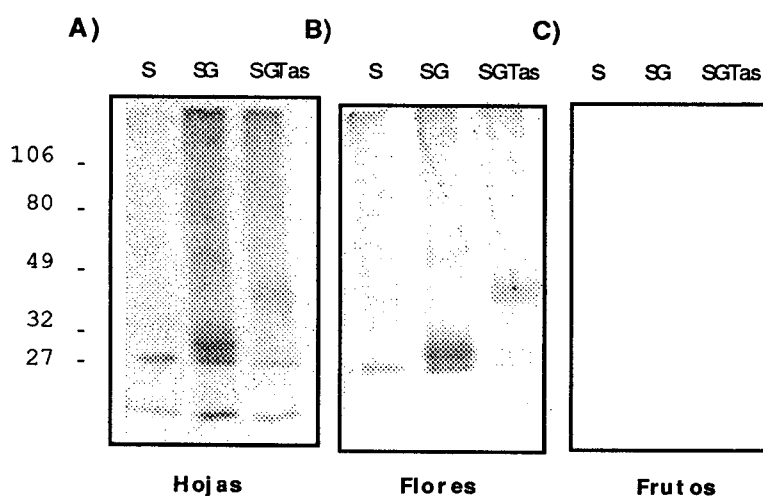


Figura 39: Estudios de interacción de la proteína TAS14 con proteínas de órganos de plantas mediante cromatografía de afinidad. Cromatografía de afinidad con extractos de proteínas de hojas, flores y frutos de tomate procedentes de plantas crecidas en solución Hoogland II. (S) sepharosa, (SG) sepharosa-100µg GlutationS-transferasa, (SGTas) sepharosa-100µg GlutationS-transferasa-TAS14.

9.2.1.3. Efecto de la fosforilación de TAS14 sobre la interacción con otras proteínas

Hasta ahora, en todos los ensayos de cromatografía de afinidad se había utilizado proteína GST-TAS14 sin fosforilar, por lo que nos preguntamos como influiría la fosforilación de TAS14 en su interacción con otras proteínas. Con este fin, se realizaron

nuevos experimentos con extractos de germinulas marcadas en condiciones controles y se utilizaron 100 μg de proteína GST-TAS14 y 100 μg de proteína GST-TAS14 fosforilada con CKII de rata como se indica en materiales y métodos. La figura 40 muestra las autorradiografías correspondientes a estos ensayos de cromatografía; como puede apreciarse en la figura, al utilizar la proteína fosforilada no cambió el patrón de proteínas unidas de forma diferencial.

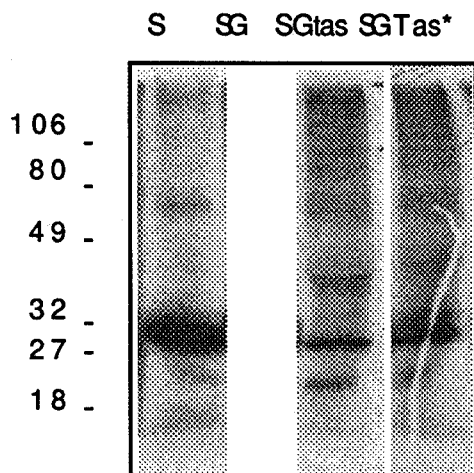


Figura 40: Efecto de la fosforilación en la interacción de TAS14 con proteínas de germinulas. Cromatografía de afinidad de la proteína TAS14 con extractos proteicos de germinulas crecidas en H_2O . (S) sepharosa, (SG) sepharosa-100 μg GlutathionS-transferasa, (SGTas) sepharosa-100 μg GlutathionS-transferasa-TAS14 y (SGTas*) sepharosa-100 μg GST-TAS14 fosforilada con CKII de rata.

9.2.2. COINMUNOPRECIPITACION DE TAS14 Y OTRAS PROTEINAS

Para detectar interacciones *in vivo* de la proteína TAS14 con otras proteínas, se realizaron experimentos de coinmunoprecipitación. Para ello se marcaron germinulas de tomate crecidas en H_2O durante 4 días con $\text{TRAN}^{35}\text{S-LABEL}$ y 100 μM ABA. Se extrajeron las proteínas con tampón ECB y los extractos proteicos obtenidos se incubaron primero con el anticuerpo anti-TAS14 (a), o con el suero preimmune (p), utilizado como control de la reacción, y posteriormente con proteína A unida a sepharosa. Finalmente tras lavar la sepharosa, las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron por electroforesis y fluorografía.

En los primeros ensayos realizados no se consiguió inmunoprecipitar la proteína TAS14. Con el objeto de aumentar los niveles de antígeno se repitieron los ensayos de coinmunoprecipitación añadiendo proteína de fusión a los extractos. La figura 41A muestra el resultado de la inmunoprecipitación de la proteína nativa TAS14 en presencia de proteína TAS14 expresada en bacterias añadida a los extractos proteicos de germinulas marcadas en solución ABA 100 μM , o en H_2O). En este experimento se

conseguió inmunoprecipitar la proteína TAS14 junto con dos proteínas de 40 y 18 KDa. La proteína TAS14, como era de esperar, sólo se detectó en los extractos tratados con ABA e incubados con el anticuerpo específico. Así en la figura 41A, en el carril 3, pueden observarse una serie de bandas por debajo del marcador de 21.5 KDa, que se corresponderían con las diferentes formas fosforiladas de la proteína. Las proteínas de 40 y 18 KDa se coimmunoprecipitaron tanto a partir de los extractos protéicos de germinulas marcadas en solución ABA, como de los extractos marcados en condiciones controles (H₂O); no obstante en la inmonoprecipitación a partir de los primeros extractos no se puede afirmar la existencia de la banda de 18 KDa ya que debido a su peso molecular, solapa con las bandas correspondientes a la proteína TAS14.

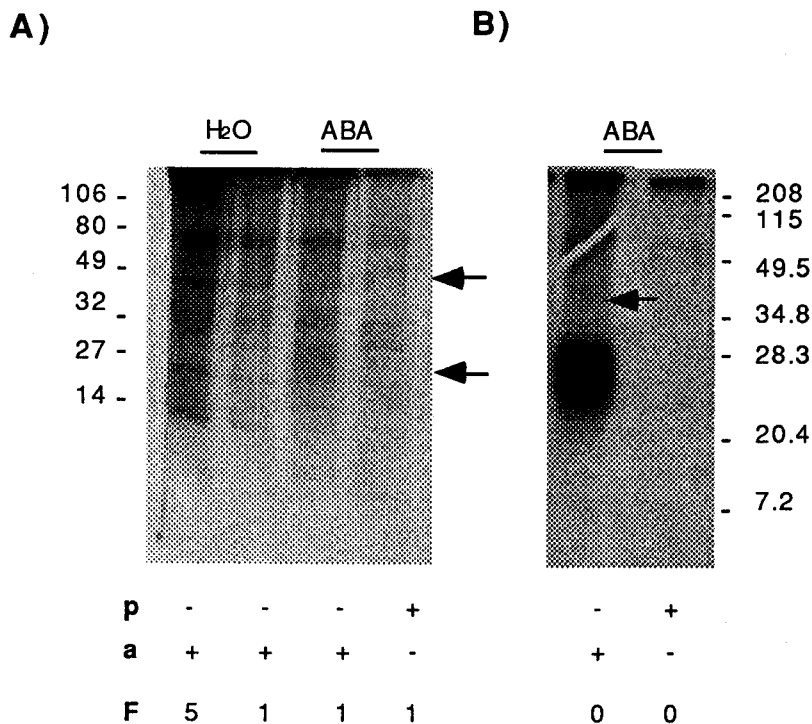


Figura 41: Coimmunoprecipitación de la proteína TAS14 con proteínas de germinulas. A) Ensayo de coimmunoprecipitación de la proteína TAS14 nativa y de la proteína TAS14 expresada en bacteria B) Ensayo de coimmunoprecipitación de la proteína TAS14 nativa. (a) Incubación con el anticuerpo específico anti-TAS14; (p) incubación con el suero preimmune. Los números simbolizan la cantidad (μ g) de proteína de fusión GST-TAS14 añadida en estos ensayos.

Tras muchos intentos, se pudo optimizar la extracción de proteínas y se consiguió inmunoprecipitar la proteína TAS14 y a su vez, de forma muy débil y de forma no consistente, otra proteína de aproximadamente 40 Kda (ver fig. 41B).

Los problemas encontrados al tratar de coimmunoprecipitar la proteína TAS14 y otras proteínas podrían deberse bien a que la unión entre las proteínas fuera débil, o bien a que la proteína-s que se unieran a la proteína TAS14 estuvieran en concentraciones limitantes.

9.2.3. ENSAYOS DE OVERLAY PARA DETECTAR UNIONES DE TAS 14 A OTRAS PROTEINAS

Para obtener más información acerca de las interacciones de TAS14 con otras proteínas, se optó por complementar los estudios anteriores utilizando una estrategia diferente. Para ello se eligió la técnica de overlay, descrita previamente por Lohman et al. 1988, la cual permite detectar uniones de una proteína concreta con otras proteínas que han sido previamente transferidas a filtro.

En el experimento que se muestra en la figura x, se fosforilaron 6 μ g de proteína TAS14 con PK y 50 μ Ci de (γ^{32} P)-ATP, como se indica en materiales y métodos, y se incubó con extractos de proteínas de germinulas de 4 días crecidas en condiciones controles, resueltas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y transferidas a filtros de Immobilon. La interacción se llevó a cabo a 25°C durante 5 horas en solución de interacción PBS 1X, 5% leche y 0.25% gelatina. Como puede apreciarse en el carril 1 de la figura 42, la proteína TAS14 interacciona fuertemente con una proteína de peso molecular aproximado de 18 KDa y de forma más débil con una proteína de aproximadamente 40 KDa. El carril x de la figura muestra los resultados obtenidos usando la misma solución de interacción que en el experimento anterior, pero suplementada con 5% de hemoglobina. Como puede derivarse de la radiografía, los resultados fueron prácticamente equivalentes, pero la resolución de las bandas fue de peor calidad, por lo que en los sucesivos experimentos se omitió el uso de hemoglobina como agente bloqueante.

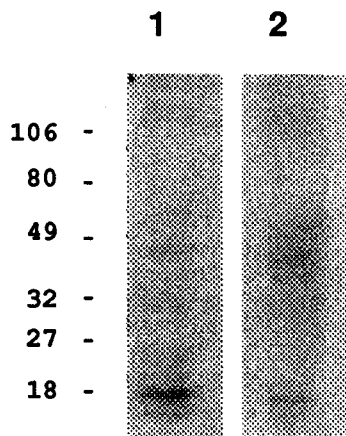


Figura 42: Ensayo de interacción de la proteína TAS14 fosforilada con PK con proteínas transferidas a filtro. Unión de la proteína TAS14 fosforilada con PK con proteínas de germinulas de 4 días, resueltas por electroforesis y transferidas a filtros de Immobilon. 1) Ensayos de unión en tampón: PBS 1X, 5% BSA, 0.25% gelatina. 2) Ensayos de unión en el mismo tampón con 5% hemoglobina.

En nuevos experimentos de overlay, que se muestran en la figura 43, se trató de comparar la unión de proteínas con TAS14 fosforilada con CKII y con PK. Para ello se marcaron 1,5 μg de proteína con 50 μCi de $(\gamma^{32}\text{P})\text{-ATP}$, PK (fig. 43A) y con CKII recombinante (fig. 43B), como se indica en el apartado 10 de materiales y métodos. En estos experimentos se utilizaron extractos de proteínas de germinulas de 4 días, tratadas durante 7 días con una solución de 10g/L NaCl (S), o con H₂O,(C). Las proteínas se extrajeron con tampón Laemli 2x, hirviendo a 95°C, (h) ó sin hervir (sh). Tras la incubación con la proteína fosforilada, el patrón de unión obtenido fue semejante, aunque la autorradiografía correspondiente al ensayo con proteína TAS14 fosforilada con PK, está mucho menos impresionada, quizás debido al menor marcaje de la proteína con esta quinasa.

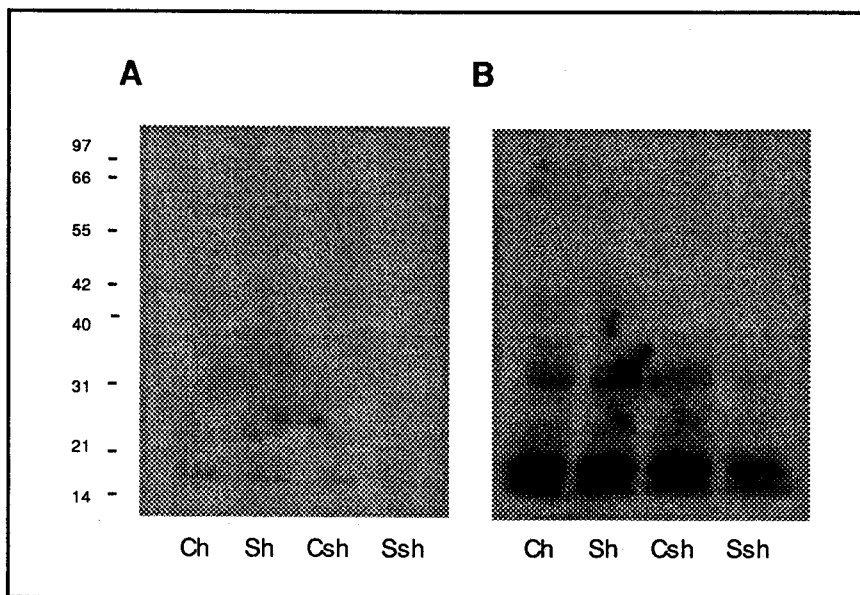


Figura 43: Comparación de la interacción de la proteína TAS14 fosforilada con PK y con CKII; con proteínas transferidas a filtro. Ensayo Overlay de la proteína tas14 fosforilada con PK (A), y con CKII (B); con extractos protéicos de germinulas de 7 días crecidas en H₂O, (C), o en solución 10 g/L NaCl (S). Los carriles (h), corresponden a ensayos con proteínas extraídas a 95°C y los carriles sh a ensayos con proteínas sin hervir.

Se repitieron los ensayos de overlay incubando la proteína TAS14 fosforilada con CKII y extractos de proteínas equivalentes a los anteriores, resueltos en geles de acrilamida de mayor tamaño. Como puede verse en la figura 44A, el patrón de unión fue muy complejo y de difícil interpretación, debido a la existencia de uniones inespecíficas. Para interpretar los resultados se realizaron comparaciones de los patrones de unión, con los patrones de proteínas transferidas al filtro, obtenidos mediante tinción con Ponceau; (fig. 44B). De estas comparaciones se puede concluir que la proteína TAS14 se une específicamente con una proteína de 18 KDa, presente en todos los extractos de forma no mayoritaria. Además de esta proteína puede observarse otra banda de aproximadamente 31 KDa, mucho más débil, pero que parece específica, según los criterios establecidos. En la autorradiografía se detectaron uniones con otras proteínas, pero la especificidad de estas interacciones no parece clara.

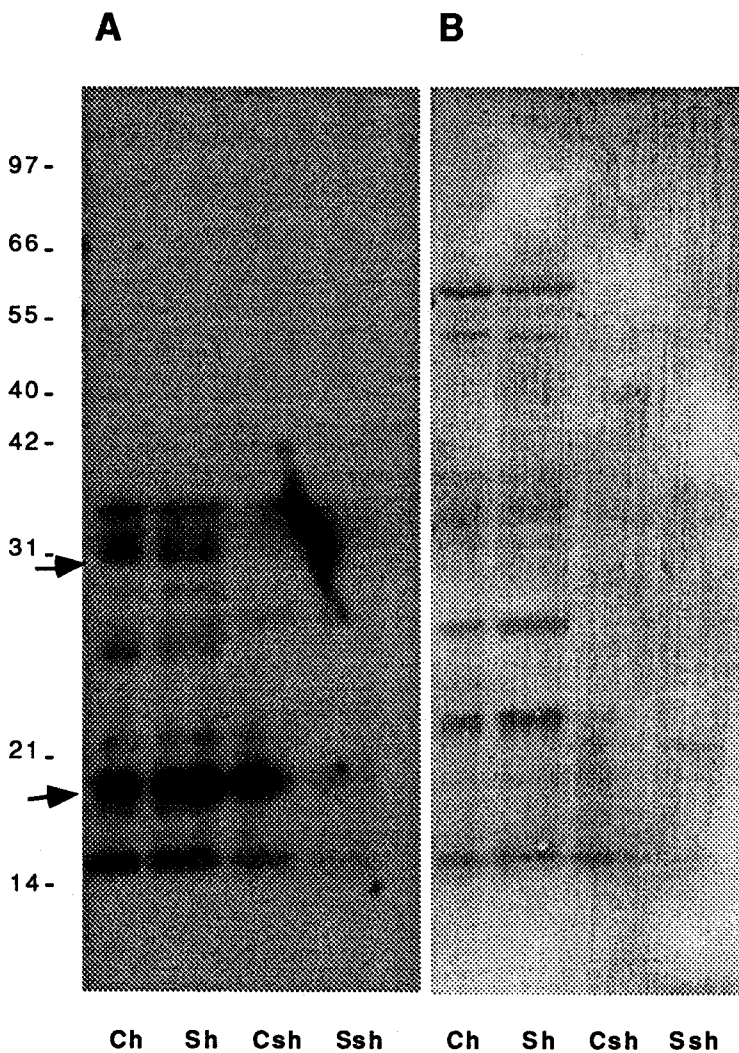


Figura 44: Comparación entre el patrón de proteínas unidas a la proteína TAS14 fosforilada y el patrón de proteínas transferidas en el filtro. A) Ensayo de interacción de la proteína TAS14 fosforilada con CKII y extractos protéicos de germinulas de 7 días crecidas en H₂O, (C), o en solución 10 g/L NaCl, (S). B) Tinción con Ponceau del filtro utilizado en el ensayo mostrado en la figura A. *Bandas no mayoritarias que coinciden con una señal de hibridación en la autorradiografía de la figura A.

DISCUSION

TRANSFORMACION CON EL GEN *tas14* EN ORIENTACION SENTIDO (PLANTAS *Tas14s*).

Niveles de expresión de los transformantes

Los niveles de expresión del gen *tas14* varían extremadamente en las plantas transgénicas *Tas14s*. Esta variabilidad que se observa en los experimentos de transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* se ha atribuido a diversas causas genéticas, aunque ninguna de ellas explica por completo el fenómeno. Algunas de las causas derivan del proceso de transformación: efecto de posición, número de copias y reorganizaciones del T-DNA. La integración del T-DNA en el genoma de la planta es al azar, por lo que la expresión de los genes introducidos puede verse afectada por el ADN adyacente de la planta (efecto de posición). El número de T-DNAs que se pueden integrar es variado y la correlación entre el número de copias y el nivel de expresión no está clara; algunos trabajos sugieren una relación positiva (Gendloff et al. 1990), otros negativa (Hobbs et al. 1990), o incluso ambas (Hobbs et al. 1993). La reorganización del T-DNA, (repeticiones, deleciones...), también puede influir en el nivel de expresión, aunque no siempre se ha observado una correlación directa entre el nivel de expresión y estas reorganizaciones (Derols et al. 1988). Otros factores que pueden causar esta variabilidad entre los transformantes, son los efectos epigenéticos en la Fo, el grado de metilación del ADN, así como el diferente estado fisiológico de los transformantes que puede conllevar diferencias en el patrón de expresión espacio-temporal (Jones et al. 1987; Williamson et al. 1989)

En el presente trabajo, no se ha encontrado ninguna relación entre los niveles de expresión y el número de copias de los transformantes. Por una parte plantas con una sola copia del gen presentan diferentes niveles de expresión (ej.: 816 y 815) y por otra los transformantes con más de una copia del gen presentan plantas con un nivel alto de expresión (81, 82, 824) o expresión nula (827, 828, 85).

Patrón de expresión del gen *tas14* en las plantas transgénicas *tas14s*.

El gen *tas14* se induce por estrés salino en raíces, tallos y hojas de *L. esculentum*, en las raíces los niveles de ARN son menores que en los otros tejidos, detectándose los niveles máximos en tallos (Godoy et al. 1990). El patrón de acumulación de ARN *tas14* en plantas transgénicas *tas14s* es similar al determinado en plantas de tomate tratadas con sal.

En las plantas *tas14s* el cDNA *tas14* está bajo la regulación del promotor constitutivo 35S (Lam y Chua 1990, Elliot et al. 1989). Los niveles de acumulación del ARN *tas14* en los diferentes órganos de las plantas transgénicas podrían reflejar algún mecanismo de regulación de la vida media del transcrito en los diferentes tejidos analizados.

Los niveles de proteína detectados en el tejido vegetativo de las plantas *Tas14s* están relacionados con los niveles de ARN en éstas, excepto en las raíces, en donde no se ha detectado proteína TAS14, ni siquiera en los transformantes que presentaban los niveles más altos de expresión. Comparando los niveles de ARN *tas14* en raíces de las plantas del grupo 1 (nivel más alto de expresión) con los niveles de ARN detectados en hojas de otros transformantes, la cantidad de ARN acumulada no parece ser la causa de la ausencia de proteína. En raíces de plantas de tomate se ha observado un fenómeno parecido; tras el tratamiento con sal durante 1, 3, 7 días se detecta acumulación de ARN, sin embargo la

proteína se expresa débil y transitoriamente durante el primer día de tratamiento (datos no mostrados). Estos resultados podrían indicar la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional del gen *tas14* en raíces de plantas de tomate y probablemente en las plantas transgénicas de tabaco.

El control postranscripcional de la expresión génica es un mecanismo general de regulación que se ha descrito en muchos organismos (revisado por Hershey 1991). Por ejemplo el ARNm de algunos genes de cloroplasto que codifican para proteínas implicadas en la fotosíntesis, se acumula en plantas sometidas a oscuridad, mientras que los productos de dichos genes no se detectan (Mullet 1988). La luz ejerce también un papel regulatorio positivo en la expresión de la proteína *dsp-22* de *C. plantagineum*. Este gen se induce por ABA y por estrés hídrico, sin embargo la proteína se acumula solo en plantas desecadas en presencia de luz (Bartles et al. 1992). En otro gen inducido por ABA, la osmotina, también se ha detectado un fenómeno de regulación postranscripcional. El ARNm se acumula en hojas de tabaco tratadas con ABA, TMV o heridas, sin embargo la proteína no se acumula. En las plantas tratadas con NaCl si se acumula la proteína ,probablemente la estabilidad de la osmotina dependa de los inductores (LaRosa et al., 1992).

Se ha descrito un caso similar al de la proteína TAS14 para una dehidrina de guisante (Robertson y Chandler 1994). Esta proteína no se acumula en radículas de germinulas sometidas a estrés hídrico, aunque los niveles de ARNm son comparables a los de otros órganos donde si se acumula esta dehidrina. Estos autores sugieren que este fenómeno se debe a una mayor disminución de la tasa de síntesis de proteínas en radículas con respecto a la observada en otras partes de las germinulas sometidas a desecación. La proteína TAS14 si se acumula en las radículas de plántulas tratadas con sal, y los niveles de proteína comienzan a disminuir al cabo de 7 días de tratamiento , probablemente debido al estado fisiológico derivado del estrés impuesto (Godoy-Luna et al. 1994). La pérdida de la acumulación de la proteína TAS14 en raíces de plantas adultas contrasta con la abundancia de este polipéptido en radículas tratadas con sal. Se ha descrito un fenómeno similar para una proteína lea del grupo 3, HVA1 (Hong et al. 1992). Esta proteína se acumula en germinulas de 3 días tratadas con sal, sin embargo la inducción disminuye en las hojas de plántulas de 7 días de edad. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de regulación traducional dependiente del estado de desarrollo y específico de órgano.

Las regiones 5' y 3' no codificantes de un gen juegan a veces un papel importante en los mecanismos de regulación génica. El gen de la nitrato reductasa (NR) de tabaco está regulado por luz tanto a nivel transcripcional y traducional. Curiosamente las plantas transgénicas NR acumulan el ARNm correspondiente tanto en condiciones de luz como oscuridad, debido a la regulación por el promotor constitutivo 35S; sin embargo los niveles de la proteína si están regulados por luz. Los autores sugieren que esta regulación traducional pueda deberse a la presencia de secuencias de la región 3' no codificante del gen introducida en estas plantas transgénicas (Vincentz y Caboche, 1991). Es posible que la región 3' no codificante del gen *tas14* esté implicada en estos mecanismos de control de la expresión.

Fenotipos de las plantas *tas14s*

Entre las plantas *tas14s* se encontró un número considerable (9 de 17) de plantas transgénicas cuyo fenotipo floral difería del de las plantas sin transformar. Este resultado sugería que el gen *tas14* podría expresarse durante el desarrollo floral de *L. esculentum*.

Algunos mecanismos del desarrollo floral conllevan desecación y señales capaces de inducir este gen. En este trabajo se ha detectado la expresión del gen *tas14* en flores de *L. esculentum* y del gen homólogo a *tas14* en tabaco, *tas14(tab.)*, en flores de *N. tabacum*. Además, en nuestro laboratorio se han confirmado estos resultados en experimentos de expresión del gen de la glucuronidasa bajo el promotor del gen *tas14*.

Las diferencias morfológicas referentes al tamaño de la flor y la longitud del pistilo, manifestadas en las plantas del grupo 1, 2 y 3, podrían deberse a pequeñas alteraciones en los niveles de expresión de este gen. La expresión del gen *tas14* durante el desarrollo floral y la observación de fenotipos similares entre transformantes independientes podrían apoyar esta hipótesis. Sin embargo, como los fenotipos presentados por estas plantas no se transmiten mendelianamente no es posible afirmar que se deban exclusivamente al gen introducido.

Es difícil explicar el origen del fenotipo presentado por los transformantes 827 y 828, del grupo 5, (flores aberrantes). Estas plantas, aunque tienen integrada más de una copia del cDNA *tas14* no expresan constitutivamente este gen. Probablemente haya tenido lugar un efecto de inactivación génica debido a la existencia de varias copias, de hecho se ha descrito que la inserción de copias múltiples de un gen conduce con frecuencia a la pérdida de expresión de algunas o todas las copias del transgen (Matzke et al. 1989) (Assaad et al. 1993).

Las flores de estas plantas transformantes presentan un patrón de expresión del gen *tas14* (*tab.*), diferente al de las flores de plantas sin transformar. Estos resultados, inicialmente sugirieron la existencia de un mecanismo de cosupresión del gen *tas14* (*tab.*).

Cuando se introduce en una planta un gen que contiene secuencias homólogas a las de un gen endógeno, a veces, la expresión de ambos genes se despareja. Este fenómeno de silenciamiento coordinado se conoce por el nombre de cosupresión. Se han descrito muchos casos, (Revisado por Flavell. 1994), por ejemplo la cosupresión del gen de la chalcona sintetasa (CHS) y de la dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) en flores de plantas transgénicas de petunia (Napoli et al. 1990), (van der Krol et al. 1990). Estos genes codifican para enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de los pigmentos antocianinas, y se expresan activamente en flores de petunia. Las flores de algunas plantas transgénicas son blancas o presentan algunos sectores blancos. Esta pérdida de pigmentación se ha correlacionado con una reducción de los niveles de ARN de los genes introducidos y los endógenos.

Los mecanismos de cosupresión dependen de la existencia de secuencias homólogas. En algunas ocasiones la utilización de secuencias truncadas es suficiente para reducir la expresión del correspondiente gen endógeno (Smith et al. 1990, gen de la poligalactorunidasa en frutos de tomate).

Se han propuesto algunas hipótesis que podrían explicar estos fenómenos de inactivación génica: 1) Las interacciones entre secuencias homólogas, como híbridos u otras estructuras más complejas, podrían conllevar estados de cromatina inactiva (intercambio de proteínas, mayor grado de condensación, susceptibilidad de metilación); 2) La competición entre los genes por factores no difusibles podrían causar modificaciones de las tasas de transcripción, maduración del ARNm y transporte, reduciéndose los niveles de expresión de estos genes; otras hipótesis se basan en procesos de degradación del ARN : 3) La síntesis de ARN antisentidos y la formación de duplex con el ARNm que serían posteriormente degradados; 4) O bien una degradación del ARN inespecífica debido a la acumulación de niveles altos de mensajero. (Revisado por Flavell 1994)

Esta hipotética supresión génica no está generalizada, ya que el gen *tas14(tab.)* se acumula en tejido vegetativo de estas plantas tratadas con sal (datos no mostrados). Solamente se pudo fecundar manualmente una de las plantas (828) y entre las 10 plantas de la F1 no se observó ningún fenotipo similar al de la Fo. No obstante, a veces los fenómenos de cosupresión y trans-inactivación de genes están sometidos a control del desarrollo. Algunas plantas de petunia donde ha tenido lugar un fenómeno de cosupresión del gen CHS, presentan ocasionalmente algunas inflorescencias con flores púrpura o con sectores púrpura. Estos cambios demuestran que el fenómeno de silenciamiento es reversible y que puede estar sujeto al control del desarrollo. Por otra parte las flores de plantas de la misma progenie varían en el color, por lo que estos cambios reflejan diferencias en la actividad del transgen (Jorgensen 1990). También se ha descrito que algunos fenómenos de supresión génica pueden no tener lugar después de la segregación de los loci. Por ejemplo algunas plantas transformadas con los genes B-1-3 glucanasa (Carvalho et al. 1992) y con una quitinasa básica de tabaco (Neuhaus et al. 1991) no expresan los genes introducidos en el estado homocigoto.

Por último, cómo los dos transformantes independientes presentan el mismo fenotipo, no se puede descartar algún efecto de las concentraciones de la proteína TAS14 en estas flores.

Por otra parte, se realizó una búsqueda bibliográfica para encontrar fenotipos, previamente descritos, semejantes a los presentados por las plantas *Tas14s*. Se encontraron semejanzas con el fenotipo presentado por mutantes de tabaco que presentan modificaciones del ADN mitocondrial (Kofer et al. 1991). Así por ejemplo las flores de las plantas del grupo 1 y 2, presentan la corola pequeña y el pistilo sobresaliente igual que el cultivar andro-estéril *Nta(und)S*, y las flores del grupo 5, presentan los pétalos de la corola fusionados solo en la base igual que las flores de las plantas androestériles del cultivar *Nta(sua)S*. Pese a esta similitud, las modificaciones del ADN mitocondrial, no parecen ser la causa de los fenotipos observados, al menos en las plantas del grupo 5, pues no se heredan en la progenie.

Análisis funcional de las plantas transgénicas *tas14s*.

Se han realizado diferentes estudios de respuesta a estrés salino-hídrico con las plantas transgénicas *tas14s*.

Una de ellos ha sido el estudio de la respuesta a choque salino de plantas adultas crecidas en cultivo hidropónico. En estos ensayos no se ha detectado una mayor tolerancia en las plantas transgénicas. Esto puede deberse a varias razones: 1) Los ensayos realizados o los parámetros observados no reflejen pequeñas diferencias en la respuesta de estas plantas; 2) El gen *tas14* no sea esencial en la respuesta al estrés salino ensayado ó los niveles de proteína TAS14 en los transformantes no sean lo suficientemente altos como para observar una mayor tolerancia frente al estrés impuesto.

También se han realizado ensayos en los que se ha estudiado la respuesta de las plantas transgénicas a un periodo prolongado de estrés salino. El parámetro medido ha sido la capacidad de germinación de las semillas en medio con NaCl. Uno de los efectos del estrés salino en la germinación es el retraso de la imbibición (Torres-Schumann et al 1989). Como el gen *tas14* se expresa en semillas, en estos estudios se ha intentado valorar si la

sobreexpresión del gen Tas14 podría conferir una mayor tolerancia en este estadio de desarrollo. Los resultados obtenidos indican que excepto en el transformante (8-1), no existen diferencias significativas en la capacidad de germinación en medio salino entre las plantas transgénicas y las plantas sin transformar. En estos ensayos se han utilizado líneas de tabaco que no son puras, detectándose pequeñas variaciones en la respuesta a estrés salino. Como el estrés salino conlleva entre otros, un componente de estrés hídrico, también se analizó la respuesta de las plantas a desecación. Los resultados obtenidos en los experimentos con plantas adultas y semillas confirman una mayor tolerancia en plantas de la progenie del transformante 81.

Solo se ha encontrado una planta transgénica que presenta una mayor tolerancia al estrés salino. Los estudios de los niveles de acumulación de proteína correspondientes a los ensayos de germinación en medio salino, parecen indicar que la mayor tolerancia de estas semillas está asociada a un nivel mayor de proteína TAS14. Estudiando el patrón de proteínas en estas germinulas mediante electroforesis monodimensional y tinción por Coomassie, se ha observado la acumulación de un polipéptido de 27KDa. Este polipéptido podría ser importante en la respuesta observada.

Sin embargo, la progenie de la F2 de estas plantas no manifiesta el mismo grado de tolerancia, probablemente debido a una segregación de las copias introducidas en esta planta. Como solo se ha encontrado una planta transgénica que presenta una mayor tolerancia al estrés salino, no es posible concluir que este efecto sea debido a la sobreexpresión del gen tas14. Por una parte este transformante es el que presenta los niveles de expresión más altos del gen tas14, pero por otra parte el patrón de respuesta no es estable en la progenie.

Los experimentos de transformación de plantas de tabaco con un gen homólogo a tas14 (pcC6-19) y otros genes inducidos por desecación en *Craterostigma plantagineum* (Iturriaga et al 1992), sugieren que la sobreexpresión de estos genes no es suficiente para conferir mayor tolerancia al estrés hídrico. En estos estudios se tomó la permeabilidad de la membrana como función del grado de tolerancia de los transformantes a desecación. No se pudieron observar diferencias entre las plantas transgénicas y las plantas sin transformar, por lo que estos autores concluyen que quizás sea necesaria la expresión simultánea de varios genes para mejorar la tolerancia, o bien que los genes introducidos sean necesarios pero no suficientes para la osmoprotección. Esta última hipótesis estaría apoyada por los resultados de los estudios comparativos de especies que difieren en la tolerancia. A partir de éstos, no se ha podido establecer la ausencia/presencia de proteínas tipo dehidrinas y Lea como la causa de las diferentes respuestas observadas (Bradford et al 1992, Still et al. 1994, Ooms et al. 1993, Finch-Savage W.E. et al. 1994). Aunque si se ha establecido una correlación de la acumulación de proteínas Lea del grupo 3 en tejidos tolerantes a la desecación (Ried et al 1993), o una correlación entre la disminución de dehidrinas con la pérdida de tolerancia a la desecación en semillas de soja (Blackman et al. 1991). Sin embargo, a pesar de estas correlaciones, hasta el momento no existen pruebas definitivas que atribuyan un papel esencial a las proteínas tipo dehidrinas y Lea en la tolerancia a estrés hídrico salino.

Sin embargo si se ha podido correlacionar la tolerancia al estrés salino/hídrico con la síntesis de osmolitos. Las semillas de soja que son tolerantes a la desecación acumulan sacarosa, mientras que las semillas sensibles no acumulan este azúcar (Blackman et al. 1992); La sobreexpresión de la enzima manitol-1-fosfato deshidrogenasa, implicada en la

síntesis de manitol, conlleva la acumulación de este compuesto y confiere una mayor tolerancia al estrés salino en estas plantas transgénicas (Tarczynski et al 1993).

TRANSFORMACION CON EL GEN *tas14* EN ORIENTACION ANTISENTIDO (PLANTAS *tas14a*).

Niveles de expresión del gen *tas14* en las plantas *tas14a*

Artificialmente, mediante la introducción de genes antisentido (genes complementarios) se ha conseguido reducir la expresión de genes en diferentes organismos: bacterias, slime molds, mamíferos y plantas (Antisentido en plantas revisado por Van der Krol et al. 1988). La regulación de la expresión génica mediante ARN antisentido se descubrió originalmente como un fenómeno natural en procariotas (Revisado por Green et al. 1986; Simons, 1988). En los organismos eucariotas también se han descrito algunos casos, no obstante en este sistema no se conoce tan bien este fenómeno. ((dihidrofolato reductasa en ratón (Farnham et al. 1985); dopa descarboxilasa en *Drosophila* (Spencer et al. 1986), cadena pesada en miosina en pollo (Heywood et al. 1986); y α -amilasas en cebada (Rogers, 1988)).

El mecanismo de acción del gen antisentido parece ser la formación de un híbrido entre el ARNm y el ARN antisentido que posteriormente puede ser degradado, no obstante en algunos casos coexisten en las células ambos tipos de ARN. En bacterias, se han descrito proteínas que intervienen en la formación de estos híbridos. También se ha observado que una vez formado el híbrido de ARN éste es degradado por RNasas de ARN de doble cadena (dsRNAses). En eucariotas se han propuesto algunas proteínas que podrían mediar las interacciones entre estos ARNs, (ribonucleoproteína A, una helicasa de ARN, unwindasa) y se han identificado algunas dsRNAses, pero hasta el momento no se ha caracterizado su especificidad y función *in vivo* (Revisado por Nellen y Lichtenstein 1993).

En este trabajo no se ha observado reducción de los niveles del gen *tas14* en plantas de tabaco transformadas con el gen en orientación antisentido.

Se ha descrito que la expresión de los genes foráneos depende del efecto de posición. En las plantas transgénicas del gen antisentido CHS, se observan diferentes patrones de coloración en las flores. Las diferencias en el patrón de expresión entre los transformantes parece ser debida a las secuencias que flanquean al gen introducido (Van der Krol et al. 1990a). Por otra parte el número de copias también influye en el nivel de expresión del gen antisentido. Las plantas transgénicas con una copia del gen antisentido de la poligalactorunidasa presentan una reducción de la expresión de este enzima del 10%, y en las plantas homocigotas se alcanza un 99% de reducción (Smith et al. 1990b). En este trabajo, se han analizado transformantes con diferente número de copias, pero no se ha observado en ninguno de ellos una reducción de la expresión del gen *tas14*. También, siempre que ha sido posible se ha utilizado un número de plantas de la F1, relativamente alto, con el fin de incluir en los análisis plantas homocigotas.

La expresión del gen antisentido puede afectar tanto a nivel transcripcional como a nivel traducional. Se ha sugerido que el ARN antisentido, probablemente mediante la formación del híbrido ARNm/ARNA, puede interferir con los mecanismos de procesamiento nuclear del ARNm, transporte y traducción. Por ejemplo en plantas transgénicas del gen antisentido de la PG se ha observado una reducción de la actividad de

este enzima que no se correlaciona con los niveles de transcrito acumulado. (Sheehy et al. 1988). Por ello, además de analizar los niveles de ARN *tas14*, se han estudiado los niveles de acumulación de la proteína en plantas tratadas con sal. Pero tampoco se han encontrado diferencias significativas con respecto a la cantidad de proteína acumulada en plantas sin transformar sometidas a estrés salino.

Los niveles de ARN antisentido detectados en plantas *Tas14a* tratadas con sal son muy bajos si los comparamos con los niveles de ARNm de estas plantas. En principio podría argumentarse que estos niveles de ARN antisentido podrían ser insuficientes para inactivar el gen endogeno; sin embargo en algunos trabajos se ha demostrado que la interacción entre cantidades equimolares de los dos tipos de ARN no parece ser un requisito fundamental en el mecanismo de acción del gen antisentido (van der Krol et al. 1990).

Un factor importante en estos experimentos es la estabilidad del ARN antisentido. En algunos trabajos la estrategia del gen antisentido no ha funcionado debido a la inestabilidad del ARNa. En algunos casos este problema se ha solucionado integrando el gen antisentido en una región codificante de otro gen (Delauney et al. 1988). Se ha determinado que la estabilidad depende de la secuencia del ARNa, consiguiéndose distintos grados de estabilidad según los fragmentos de ARN utilizados (Van der Krol et al. 1990b) (Sandler et al. 1988) (Hall et al. 1993).

Aunque en las plantas *Tas14s* y *Tas14a* se ha introducido el cDNA *tas14* bajo el mismo promotor, los niveles de ARNs son mucho mayores que los de ARNa, pudiendo sugerir estos resultados que el ARN antisentido sea menos estable. En este trabajo se ha utilizado casi toda la zona codificante del gen *tas14*, no se descarta que se puedan obtener niveles de ARN mayores utilizando fragmentos distintos de la secuencia.

Mediante ensayos de southern-blot a baja estringencia se ha detectado la existencia de más de un gen relacionado con el gen *Tas14*. (datos no mostrados). El grado de homología existente entre el gen *Tas14* de tomate y sus homólogos en tabaco podría influir en la efectividad de la estrategia antisentido. En algunos casos mediante la introducción de un gen antisentido se ha conseguido bloquear casi por completo la expresión de todas las isoformas de un gen, (Smith et al. 1990 poligalactorunidasa en tomate), sin embargo en otras ocasiones, probablemente debido a diferencias de secuencia, no se ha podido inhibir la actividad de isoenzimas (Hall et al. 1993 pectina esterasa en tomate) (Harriman et al. 1991 pectina metilesterasa en tomate).

En nuestro laboratorio se están realizando nuevas construcciones con el cDNA *tas14* y con promotores 35S dobles, para transformar plantas de tabaco y tomate con el gen antisentido.

Fenotipo de las plantas *tas14a*

Entre las 40 plantas, obtenidas en dos experimentos de transformación independientes, sólo una planta presentó un fenotipo anómalo que se transmitía mendelianamente a su descendencia. Entre las plantas transgénicas del promotor de otro gen inducible por ABA y estrés salino, TSW12, se ha obtenido un fenotipo parecido. El hecho que transformando con el gen antisentido *tas14* solo se haya obtenido una planta con este fenotipo y que un fenotipo similar se haya obtenido al transformar plantas de tabaco con

un gen no relacionado con *tas14*, sugiere que estas anomalías se deban a la inactivación de genes implicados en el desarrollo floral.

Consultando la bibliografía, se ha encontrado un fenómeno similar en la progenie de otras plantas transgénicas (Broadhvest 1992). Estas plantas presentaban flores en las que se desarrollaba un pistilo en el ápice de las anteras. Esta mutación (appendix) podría responder a la desregulación de algún gen implicado en la especificidad de tejido, y estaría localizada solo en un grupo de células durante el desarrollo de la antera. En las flores de la planta mutante *tas14a* podría tener lugar un mecanismo similar, pues los pétalos sólo se desarrollan en algunas ramas de la inflorescencia, y solo a partir de algunas anteras de dichas flores.

LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA PROTEINA TAS14

Por microscopia electrónica se ha localizado la proteína TAS14 en el núcleo y en el citosol. Los análisis cuantitativos demuestran además que el número de partículas de oro es dos veces mayor en el núcleo que en el citosol.

Las proteínas de peso molecular menor a 40 -60 kDa pueden difundir de forma pasiva a través de los poros nucleares; no obstante aunque la proteína TAS14 tiene un peso molecular pequeño (13.9 kDa), este polipéptido presenta en su secuencia unos motivos semejantes a las señales bipartitas de localización nuclear de otras proteínas (Raikhel 1992). Añadiendo señales de localización nuclear a proteínas que se localizan en el citoplasma es posible dirigir el transporte de estos polipéptidos al núcleo. La tasa de este transporte aumenta cuando además se añaden secuencias de fosforilación (Rihs y Peters, 1989). En la secuencia de la proteína TAS14 se encuentran motivos de fosforilación por CKII que están situados entre las señales de localización nuclear, sería posible que el grado de fosforilación de la proteína TAS14 pueda regular su transporte al núcleo.

La localización de la proteína TAS14 en el citoplasma y en el núcleo concuerda con los resultados obtenidos con otras proteínas homólogas de otras especies. Mediante microscopia electrónica se han inmunolocalizado dehidrinas en el núcleo y en el citoplasma de embriones de maíz embebidos en ABA (Asgar et al.1994). La distribución de las dehidrinas en estos compartimentos celulares no es uniforme; estas proteínas se inmunolocalizan tanto en el núcleo como en el citoplasma de células del tejido epitelial y provascular del escutelo, mientras que en células del parenquima la localización es preferentemente nuclear. En los ejes embrionarios se ha determinado una localización citoplasmática, a excepción del coleoptilo donde la proteína está localizada preferentemente en el núcleo. La proteína RAB17, dehidrina de maíz homóloga a TAS14, se ha localizado por microscopia óptica y mediante fraccionamiento subcelular en el núcleo y citoplasma de embriones de maíz (Goday 1994). La proteína RAB17 se localiza preferentemente en el núcleo de células del escutelo y de la epidermis, y en el citoplasma de células de tejidos foliares y radiculares del embrión. A otras proteínas homólogas a TAS14 se les ha asignado una localización citoplasmática: RAB21 en hojas de arroz tratadas con ABA, mediante fraccionamiento subcelular (Mundy y Chua 1988); DSP6 en hojas desecadas de *Craterostigma plantagineum*, mediante microscopia electrónica (Schneider 1993); y CAP85 en hipocótilos y hojas de espinaca aclimatadas al frío, mediante fraccionamiento subcelular (Neven 1993).

Las diferencias en los resultados de inmunolocalización subcelular de estas proteínas podrían ser el reflejo de una distribución de las dehidrinas dependiente o específica de

tejido. Así mismo, el grado de fosforilación de estas proteínas podría determinar su patrón de localización. La proteína RAB17 es la proteína mas fosforilada entre las proteínas de embriones maduros de maiz, se localiza en fracciones citoplasmáticas y nucleares de estas células, pero las formas mas fosforiladas se presentan en las fracciones del citoplasma.

FOSFORILACION DE LA PROTEINA TAS14

Los experimentos *in vitro* realizados en el presente trabajo demuestran que la CKII y proteína Kinasa dependiente de AMPcíclico fosforilan la proteína TAS14. La fosforilación por CKII, ha sido previamente descrita para el gen homologo RAB17 de maiz (Plana et al.1991), pero ésta es la primera vez que se describe la fosforilación de una dehidrina por otra quinasa. La proteína TAS14 podría ser fosforilada por diferentes quinastas dependiendo de factores como: las condiciones ambientales, el estado de desarrollo de la planta, el tipo de estrés y probablemente según el tejido de que se trate. Las distintas formas fosforiladas podrían tener una función diferente. Resultados recientes con RAB17 indican que la interacción de esta proteína con NLS depende del grado de fosforilación, solo la forma fosforilada es capaz de unirse específicamente a estas señales de localización nuclear (Godoy et al. 1994).

INTERACCIONES DE LA PROTEINA TAS14 CON MACROMOLECULAS

Las proteínas dehidrinas presentan un motivo conservado de 15 aas rico en Lys, el cual a excepción de la proteína LEA D-11, está repetido una o varias veces en el extremo carboxilo de estas proteínas. Mediante diferentes algoritmos se ha deducido una estructura de α -hélice para estas secuencias conservadas. Se ha analizado la distribución de cargas en las hipotéticas hélices observándose que los residuos básicos, ácidos e hidrofóbicos se distribuirían en estas hélices de forma característica, resultando hélices con un marcado carácter anfipático. Los aminoácidos hidrofóbicos quedarían agrupados en un sector de la hélice, mientras que los cargados se distribuirían en el resto de la hélice manteniendo una clara separación de cargas (Godoy et al. 1990).

Como estas secuencias están tan conservadas entre proteínas dehidrinas de diferentes especies se ha sugerido que deben ser importantes para la función de estas proteínas. Se han predicho hélices de este tipo para otras proteínas tipo Lea y se ha sugerido que este tipo de hélices podrían interactuar por sus caras apolares para dar lugar a uniones intra o intermoleculares, posibilitando en este último caso la formación de estructuras de orden superior (Dure et al. 1989). La asimetría de estas hélices podría permitir la interacción de las dehidrinas con otras moléculas: 1) las áreas cargadas de la hélice podrían interactuar con regiones cargadas de las membranas o ácidos nucleicos cargados negativamente; 2) las regiones no polares podrían interactuar formando un núcleo hidrofóbico, o bien alinearse e interactuar con la bicapa lipídica de la membrana; 3) la α hélice podría servir para excluir solutos de macromoléculas (Close 1993).

Estudio de la interacción TAS14-TAS14

En este trabajo se han utilizado diferentes técnicas para determinar el estado de agregación de la proteína TAS14: cromatografía de afinidad, ensayos con agentes de crosslinking y cromatografía de filtración. Los resultados obtenidos no permiten concluir si la proteína TAS14 se encuentra como monómero o bien como estructuras más complejas.

Mediante cromatografía de filtración se ha determinado un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, este resultado es independiente de que la proteína estuviera fosforilada (29,5) o sin fosforilar (32.05). Este valor se aleja del esperado para el monómero (13) y es superior al del dímero. Estos resultados son difíciles de interpretar, por una parte podrían indicar que la proteína se encuentra como dímero; pero por otra parte es posible que la proteína TAS14 no migre de forma proporcional a su peso molecular en la matriz de Sephacril. De hecho, se ha descrito que la proteína TAS14 y otras proteínas homólogas presentan una movilidad en geles de acrilamida diferente a la correspondiente a su peso molecular (Godoy y Luna 1994) (Mundy and Chua 1988.).

En los estudios de interacción por cromatografía de afinidad no se ha detectado la interacción de la proteína TAS14 consigo misma. Incubando extractos marcados en condiciones en las que se acumula la proteína TAS14 (ABA y NaCl), con columnas de sepharosa -GST-TAS14 no se ha detectado la interacción de TAS14 con la proteína expresada en bacterias.

Tampoco han detectado interacciones intermoleculares de la proteína TAS14 mediante ensayos de crosslinking con el agente DMP. No obstante, estos últimos datos no constituyen un resultado determinante, es posible que el compuesto utilizado no se adecúe al tipo de interacciones que deseamos reforzar. Para el estudio de la estructura de algunas moléculas mediante reacciones de cross-linking ha sido necesaria una estrategia de ensayo-error (Cooney et al. 1993). En este caso sería interesante continuar estos experimentos con otros agentes químicos con diferente espectro de acción.

Los experimentos de cross-linking utilizando el reactivo EDC, han permitido detectar alteraciones pequeñas (2kDa) en la movilidad de la proteína TAS14. Este compuesto es un agente de entrecruzamiento que requiere un contacto directo entre los residuos que activa. El mecanismo de acción se basa en la reacción del EDC con un grupo carboxilo de la proteína formando un 0-acilisourea inestable que es capaz de reaccionar con un grupo amino que se encuentre próximo. La alteración del peso molecular podría deberse a la formación de puentes entre el Glu6-Lys9 y la Lys7 y el Glu10. La formación de estos enlaces se ha deducido a partir de predicciones de estructura en la proteína Lea D-11 de algodón y se ha sugerido que estas uniones podrían contribuir a la estabilización de la posible hélice (Dure et al. 1993).

Los experimentos de cromatografía de filtración realizados con una proteína de maíz homóloga a TAS14 demuestran la existencia de complejos de esta proteína de 42kDa (Close et al. 1993). Para la purificación de esta proteína se han utilizado columnas de Fenil

superosa para la cromatografía de interacción hidrofóbica. La unión de la dehidrina a esta matriz podría establecerse a través de las zonas hidrofóbicas de las hélices anfipáticas de la proteína. Mediante estudios de dicroísmo circular se ha determinado que el 13% de la dehidrina de maíz presenta una estructura de α -hélice (C. Frieden, comunicación personal en Close et al. 1993). Estos resultados apoyarían las predicciones de estructura de α -hélices para estas proteínas (Dure et al. 1991).

Las diferencias entre los resultados de cromatografía de filtración obtenidos con la dehidrina de maíz y los obtenidos en este trabajo pueden ser debidas a la utilización de proteínas diferentes, dehidrina nativa de maíz y proteína expresada en *E. coli*, respectivamente, así como a la diferente fuerza iónica utilizada en estos ensayos. Es posible que la dehidrina de maíz presente un grado de fosforilación diferente al de la proteína TAS14 obtenida en bacterias y fosforilada *in vitro*, y que estas modificaciones postraduccionales confieran un estado de agregación diferente.

Aunque la mayoría de los experimentos realizados no parecen indicar la existencia de complejos intermoleculares, recientemente estudios de la movilidad de la proteína TAS14, purificada como GST-TAS14 en bacterias, en geles nativos con un gradiente de acrilamida, demuestran la existencia de un complejo de aproximadamente 40 kDa (datos no mostrados).

Estos experimentos se han realizado *in vitro* y por tanto es arriesgado extrapolar que el estado de agregación de la proteína *in vivo* sea similar. En nuestro laboratorio mediante el uso de la técnica del doble híbrido no se ha detectado interacción *in vivo* de la proteína TAS14 consigo misma.

Estudios de la unión de la proteína TAS14 a ADN

La proteína TAS14 se ha inmunolocalizado en el citoplasma y en el núcleo, localizándose en regiones transcripcionalmente activas: nucleolo y eucromatina. Estos resultados condujeron a estudiar la posible interacción de TAS14 con ADN. Para ello se utilizaron dos estrategias diferentes: 1) ensayos cíclicos de retardación del ADN y amplificación del ADN retrasado; 2) estudios de retardación de la proteína. La primera de ellas requiere una unión de la proteína a secuencias específicas de ADN, mientras que en la segunda se contempla la posibilidad de que la unión tenga lugar con secuencias de ADN menos representadas, o cuya especificidad no sea importante. Los resultados negativos obtenidos en estos experimentos permiten concluir que la proteína TAS14 no se une directamente a ADN. No obstante, es posible que esta proteína interactúe indirectamente con ADN, mediante la unión con otras proteínas que interactúan directamente con ADN estabilizándolas.

Interacción de TAS14 con otras proteínas

Utilizando diferentes estrategias, se ha observado la interacción, *in vitro*, de la proteína TAS14 con otras proteínas de tomate. Los resultados obtenidos difieren según las técnicas utilizadas, debido en parte a las limitaciones y condiciones inherentes a éstas.

La técnica de cromatografía de afinidad ha sido muy utilizada, no sólo para la purificación de proteínas mediante afinidad por un ligando inmovilizado en una columna, sino también para detectar interacciones entre moléculas. En este trabajo se ha usado la proteína GST-TAS14 producida en bacterias para determinar las interacciones con extractos de proteínas marcadas *in vivo*, técnica originalmente utilizada por Kaelin et al. 1991, y que actualmente se emplea en muchos estudios. Mediante esta técnica hemos detectado consistentemente la unión de la proteína GST-TAS14 con polipéptidos de peso molecular comprendido entre 40-45 kDa. Estas proteínas se sintetizan en células de tomate de diferentes tejidos (germímulas, hojas y flores) y de forma constitutiva, pues se han detectado en tejidos marcados en diferentes condiciones (H₂O, sal, manitol y ABA). No se conoce la identidad de estos polipéptidos, no obstante los resultados obtenidos en los ensayos de cromatografía de afinidad con germímulas tratadas con 100 g/L de NaCl, parecen indicar que estas proteínas deben jugar un papel importante en la célula pues se traducen y son estables en condiciones en las que la síntesis de proteína y el metabolismo en general están considerablemente afectados.

Las uniones detectadas parecen ser específicas de la proteína TAS14, pues no se detectan estas proteínas cuando se sustituye TAS14 por la proteína GST.

Otra técnica utilizada ha sido la coimmunoprecipitación, con la que no se han obtenido resultados satisfactorios. Los problemas encontrados pueden ser debido a que las interacciones que tienen lugar no sean lo suficientemente fuertes o a que la cantidad de antígeno TAS14 no sea suficiente para detectar estas posibles uniones. La coimmunoprecipitación de otras proteínas con TAS14 se ha conseguido añadiendo a los extractos notables cantidades (mg) de GST-TAS14. En los experimentos se han detectado dos proteínas de peso molecular aparente de 45kDa y 18 kDa, y que estaban presentes tanto en extractos de germímulas marcadas en presencia de ABA como en H₂O. La proteína de 45 kDa podría ser una de las proteínas detectadas por cromatografía de afinidad y que se detectan también en tejido tratado y sin tratar. No obstante, el peso molecular de estas proteínas es difícil de estimar debido a la difusión de las bandas. Su peso molecular oscila entre 40-45kDa en todos los ensayos, y 43,6 kDa en el ensayo con 100g/L NaCl.

Otra estrategia utilizada ha sido la técnica de interacción con proteínas transferidas a filtro (overlay) (Soutar, A.K. et al.); (Lohman et al.). La proteína TAS14 marcada con ³²P mediante reacción de fosforilación con CKII e incubada con extractos de proteína de germímulas de 4 días, interacciona con polipéptidos de peso molecular aproximado de 42 kDa, 31kDa y 18kDa. De nuevo, es tentativo sugerir que este polipeptido de 42kDa sea el mismo que el detectado por cromatografía de afinidad y por coimmunoprecipitación. Es interesante destacar que mediante coimmunoprecipitación también se detectó un polipeptido de 18kDa que podría corresponder al detectado por overlay.

La coincidencia de estos polipéptidos es puramente hipotética, pudiendo tratarse de proteínas diferentes. De hecho, por cromatografía de afinidad y por coimmunoprecipitación se están analizando proteínas de nueva síntesis, mientras que en la transferencia a filtro de extractos proteicos totales y posterior incubación con TAS14 se analizan proteínas que se sintetizan y acumulan tras un tratamiento determinado. Por ello, la coincidencia de los polipéptidos de 40-45 kDa exigiría que estos polipéptidos se sintetizaran y acumularan a niveles que permitieran detectarlos mediante estas técnicas. Esta hipótesis podría extra

apoyado por los experimentos de afinidad en germinulas tratadas con 100 g/L. Sin embargo no no es probable que los polipéptidos de 18 kDa detectados por overlay y coimmunoprecipitación resulten ser el mismo polipéptido.

La identificación de estos polipéptidos podría aportar gran información acerca de la función de la proteína TAS14. Hasta el momento la única función *in vitro* probada para proteínas homólogas a TAS14 ha sido la unión *in vitro* de la proteína RAB17 con secuencias específicas de localización nuclear (Goday et al. 1994). Los resultados obtenidos en este trabajo con la proteína TAS14 no son incompatibles con los obtenidos con la proteína RAB17, sino que responderían a una estrategia diferente de estudio.

Por una parte, la técnica de cromatografía de afinidad que hemos utilizado presenta restricciones derivadas fundamentalmente del hecho de utilizar polipéptidos de nueva síntesis: el marcaje con la mezcla de metionina-cisteína radioactiva, implica una limitación en la detección de proteínas que no sean ricas en estos aminoácidos; así mismo, la tasa de síntesis y degradación de las proteínas podría influir ya que se podrían excluir interacciones de proteínas cuya síntesis tiene lugar a niveles bajos para su detección, como podrían ser ciertos factores nucleares. Por otra parte, se han utilizado extractos totales de proteína, en los que además el patrón de polipéptidos obtenidos es en cierta medida reflejo del tampón utilizado en la extracción, pudiendo existir proteínas no solubles que interaccionaran con TAS14. Por ello es razonable pensar que no se hayan podido detectar un patrón de unión complejo correspondiente a las proteínas con secuencias nucleares, como cabría esperar según los resultados obtenidos con la proteína RAB17. No obstante, los experimentos de cromatografía de afinidad con proteína fosforilada indican que el grado de fosforilación de la proteína TAS14 no afecta en las uniones con otros polipéptidos. Estos resultados podrían indicar que la unión detectada es de tipo diferente a la observada con la proteína RAB17, o bien que la proteína TAS14 expresada en bacterias y fosforilada *in vitro* con CKII presente un grado de fosforilación diferente al de la proteína *in vivo*.

Alberto, F., Machín, J., y Aragües, R. (1983). Razones y distribución espacial de la salinidad en los suelos y aguas superficiales de la Cuenca del Ebro. Congreso "El sistema integrado del Ebro". 10pp.

Alcazar, A., Martín, E., López-Fajardo, J., y Salinas, M. (1988). An improved purification procedure and properties of casein kinaseII from brain. *Neurochem Res.* 13: 829-836.

Andrews, P. (1965). The gel behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96, 595-606.

Arora, R., Wisniewski, M.E. y Davis, G. (1993) 60 kD Polypeptide in cold acclimated bark tissue of peach is heat-stable and related to dehydrin family of proteins. *Plant Physiology* 102 (1SUPPL):84.

Asghar,R., Fenton, R.D., DeMason, D.A. y T.J. Close (1994). Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleuron dehydrin. *Protoplasma* 177: 87-94.

Assaad, F.F., Tucker, K.L. y Signer, E.R. (1993). Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 22: 1067-1085.

Baker, J., Steele, C. y DureIII, L. (1988). Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11: 277-291.

Bartels, D., Engelhardt, K., Roncarati, R., Scheneider, K., Rotter, M. y Salamini, F. (1991). An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein. *The EMBO Journal* vol. 10 no. 5 1037-1043.

Bartels, D., Hanke, C., Scheider, K., Michel, D. y Salamini, F. (1992). A desiccation-related *Elip*-like gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA. *The EMBO Journal* vol.11, no.8 pp. 2771-2778.

Bartels, D., Alexander, R., Schneider, K., Elster, R., Velasco R., Alamillo, J., Bianchi, G., Nelson, D. y Salamini, F.(1993). Desiccation-Related Gene Products Analyzed in a Resurrection Plant and in Barley Embryos. *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*, T.J. Close and E.A. Bray, eds. , published by the American Society of Plant Physiologists.p.119-127.

Bensadoun, A. y Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem.* 26, 241-250.

Berkel, J., Salamini, F. y Gebhardt (1994). Transcripts Accumulating during cold Storage of Potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers Are Sequence Related to Stress-Responsive Genes. *Plant Physiol.* 104: 445-452.

Binzel, M.L., Hess, F.D., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. (1988). Intracellular Compartmentation of Ions in Salt Adapted Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 86, 607-614.

Blackman, S.A., Wettlaufer, S.H., Obendorf, R.L. y Leopold, A.C. (1991). Maturation Proteins Associated with Desiccation Tolerance in Soybean. *Plant Physiol.* 96, 868-874.

Bolivar, F., y Blackman, K. (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 68:245.

Bostock, R.M. y Quatrano, R.S. (1992). Regulation of Em Gene Expression in Rice. *Plant Physiol.* 98, 1356-1363.

Bradford, K.J., y Chandler, P.M. (1992). expression of "Dehydrin-Like" Proteins in Embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza sativa* during Dehydration. *Plant Physiol.* 99, 488-494.

Bray, E.A.(1993). Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol.*103: 1035-1040.

Broadhvest, J., Daigle, N., Martin, M., haughn, G.W. y Bernier, F. (1992). Appendix: a novel type of homeotic mutation affecting floral morphology. *The plant Journal.* 2(6), 991-997.

Bullock, W.O., Fernández, J.M. y Short, J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.

De Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., Van Montagu, M., Inzé, D. y Castresana, C. (1992). Suppression of b-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *The EMBO Journal* vol.11 no.7 pp. 2595-2602.

Casas, A.M., Nelson, D.E., Raghothama, K.G., Paino D'Úrzo, M., Singh, N.K., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M. (1992). Expression of Osmotin-Like Genes in the Halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant Physiol.* 99, 329-337.

Chandler, P.M. y Robertson, M. (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Ann. Rev. Plant. Physiol. PlanT Mol.Biol.* 45, 113-141.

Chen, Z., Fu, H., Liu, D., Chang, P.F.L., Narasimhan, M., ferl, R., Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A.(1994). A NaCl-regulated plant gene encoding a brain protein homolog that activates ADP ribosyltransferase and inhibits protein Kinase C. *The Plant Journal* 6(5), 729-740.

Chou, P.Y. y Fasman, G.D. (1974). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47, 45-148.

Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., den Bulcke, M.V., Bauw, G. y Van Montagu, M. (1990) Characterization of a Rice Gene Showing Organ-Specific Expression in Response to Salt Stress and Drought. *The Plant Cell*, Vol. 2, 19-27.

Close, T.J., Fenton, R.D. y Moonan, F. (1993). A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Molecular Biology* 23: 279-286.

Close, T.J. and Lammers, P.J. (1993). An osmotic Stress Protein of Cyanobacteria Is Immunologically Related to Plant Dehydrins. *Plant Physiol.* 101: 773-779.

Close, T.J., Kortt, A.A. y Chandler, P.M. (1989). A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Molecular Biology* 13: 95-108.

Close, T.J. (1993). Dehydrins: Case History of a Family of Plant Desiccation Proteins. *Cryobiology* 30, 234-235.

Close, T.J., Fenton, R.D., Yang, A., Asghar, R., DeMason, D.A., Crone, D.E., Meyer, N.C., y Moonan, F. (1993). Dehydrin: The Protein. *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*, T.J. Close and E.A. Bray, eds. , published by the American Society of Plant Physiologists. p.104-118.

Cohen, A. y 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.

Cohen, A., Plant, A.L., Moses, M.S., y Bray, E. (1991). Organ-Specific and Environmentally Regulated Expression of Two Abscisic Acid-Induced Genes of Tomato. *Plant. Physiol.* 97, 1367-1374.

Cooney, A.J., Tsai, S.Y. y Tsai, M.-G. (1993). Biochemical characterization of transcription factors. *Transcription factors: A practical approach.* ed. Latchman, D.S. IRL PRESS, Oxford University Press. p.48-77.

Creelman, R.A., Mason, H.S., Bensen, R.J., Boyer, J.S. y Mullet, J.E. (1990). Water Deficit and Abscisic Acid cause Differential Inhibition of Shoot versus Root Growth in Soybean Seedlings. *Plant Physiol.* 92, 205-214.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Leslie, S.B. y Fisk, E. (1993). Mechanism of Stabilization of Dry Biomolecules in Anhydrobiotic Organisms. *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*, T.J. Close and E.A. Bray, eds. , published by the American Society of Plant Physiologists. p.11-20.

Curry, J., Morris, C.F. y Walker-Simmons, M.K. (1991). Sequence analysis of a cDNA encoding a Group 3 LEA mRNA inducible by ABA or dehydration stress in wheat. *Plant Molecular Biology* 16: 1073-1076.

Curry, J. y Walker-Simmons, M.K. (1993). Unusual sequence of group 3 LEA(II) mRNA inducible by dehydration stress in wheat. *Plant Molecular Biology* 21: 907-912.

Cushman, J.C., Meyer, G., Michalowski, C.b., Schmitt, J.M. y Bohnert, H.J. (1989). Salt Stress Leads to Differential Expression of Two Isogenes of Phosphoenolpyruvate Carboxylase during Crassulacean Acid metabolism Induction in the Common Ice Plant. *The Plant Cell*, Vol.1, 715-725.

Delanuey, A.J., tabaeizadeh, Z. y Vrma, D.P.S. (1988). A stable bifunctional antisense transcript inhibiting gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4300-4304.

Deroles, S.C.y Gardner, R.C. (1988) Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 11: 365-377.

Dhindsa, R.S. (1991). Drought Stress, Enzymes of Glutathione Metabolism, Oxidation Injury, and Protein Synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.* 95, 648-651.

Dingwall, C., Robbins, J., Dilworth, S.M., Roberts, B. y Richardson, W.D. (1988). The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV40 large T-antigen. *J.Cell Biol.* 107: 841-849.

Dingwall, C., Laskey, R.A. (1991). Nuclear targeting sequences- a consensus?. *Trens Biochem. Sci.* 16: 478-481.

Dix, P.J. (1993). The role of mutant cell lines in studies on environmental stress tolerance: an assessment. *The Plant Journal* 3(2), 309-313.

Downing, W.L., mauxion, F., Fauvarque, M.O., Reviron, M.P., de Vienne, D., Vartanian, N. y Giraudat, J. (1992). A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *The Plant Journal* 2(5), 685-693.

Dure, L., III, Greenway, S. y Galau, G.A. (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. XIV. Changing mRNA populations as shown by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis. *Biochemistry* 20: 4162.

Dure, L.(1993). The Lea Proteins of Higher plants. Control of plant gene expression. ed. Verma, D.P.S. CRC Press. pp.:325-336.

Dure III, L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal* 3(3), 363-369.

Dure III, L. (1993). Structural Motifs in Lea Proteins. *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*, Timothy j., Close and Elizabeth A. Bray, eds., published by The American Society of Plant Physiologists. p. 91-103.

Elliott, R.C., Dickey, L.F., White, M.J. y Thomson, W.F. (1989). *Plant Cell*, 1, 691-698.

Epstein, E., Norlyn, J.D., Rush, D.W., Kingsburry, R.W., Kelley, D.B., Cunningham, G.A. y Wrona, A.F. (1980). Saline culture of crops: ageetic approach. *Science* 210, 399-404.

Farnham, P.J., Abrahams, J.M. y Schimke, R.T. (1985). Opposite strand RNAs from the 5' flanking region of the mouse dihydrofolate reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3978-3982.

Finch-Savage, W.E., Pramanik, S.K., y Bewley, J.D. (1994). The expression of dehydrin proteins in desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of temperate trees. *Planta* 193: 478-485

Finkelstein, R.R. (1994). Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *The Plant Journal* 5(6), 765-771.

Flavell, R. (1994). Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vo. 91. pp. 3490-3496.

Flower et al. 1986.

Galau, G.A., Hughes, D.W. y Dure III, L. (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology* 7: 155-170.

Galau, G.A., Wang, H.Y.-C., y Hughes, D.W. (1993). Cotton *Lea5* and *Lea14* Encode Atypical Late Embryogenesis-Abundant Proteins. *Plant. Physiol.* 101: 695-696.

Galau, G.A. y Close, T.J. (1992) Sequences of the Cotton Group 2 LEA/RAB/Dehydrin Proteins Encoded by *Lea3* cDNAs. *Plant Physiol.* 98, 1523-1525.

Galvez, A., Gulick, P.J. y Dvorak, J. (1993). Characterization of the Early Stages of Genetic Salt-Stress Responses in Salt-Tolerant *Lophopyrum elongatum*, Salt-Sensitive Wheat, and Their Amphiploid. *Plant Physiol.* 103: 257-265.

Garnier, J., Osguthorpe, D.J. y Robson, B. (1978). Analysis of the Accuracy and Implications of Simple Methods for Predicting the Secondary Structure of Globular Proteins. *J.Mol. Biol.* 120.97-120.

Gaxiola, R., Larriñoa, F., Villalba, J.M. y Serrano, R. (1992) A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *The EMBO Journal* vol.11 no.9 pp 3157-3164.

Gendloff, E.H., Bowen, B., y Buchholz, W.G. (1990). Quantitation of chloramphenicol acetyl transferase in transgenic tobacco plants by ELISA and correlation with gene copy number. *Plant Molecular Biology* 14: 575-583.

Gilmour, S.J., y Tomashow, M.F. (1991). Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 17: 1233-1240.

Gilmour, S.J., Artus, N.N., y Thomashow, M.F. (1992). cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 18: 13-21.

Godoy, A., Jensen, A.B., Culiáñez, F.,A., Abà, M.M., Figueras, M., Serratosa, J., Torrent, M., y Pagés, M. (1994). The Maize Abscisic Acid-Responsive Protein Rab17 Is Located in the Nucleus and Interacts with Nuclear Localization Signals. *The Plant Cell*, Vol.6, 351-360.

Godoy, A., Sánchez-Martínez, D., Gómez, J., Puigdomènech, P. y Pagés, M. (1988). Gene Expression in Developing *Zea mays* Embryos: Regulation by Abscisic Acid of a Highly Phosphorylated 23-25 kD Group of Proteins. *Plant Physiol.* 88, 564-569.

Godoy, J.A., Pardo, J.M. y Pintor-Toro, J.A. (1990). A tomato cDNA inducible by salt stress and abscisic acid: nucleotide sequence and expression pattern. *Plant Molecular Biology* 15: 695-705.

Godoy, J.A.*, Luna, R.*, Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R.M. y Pintor-Toro, J.A. (1994) Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Molecular Biology* 26: 1921-1934.

Gough, J. y Murray, M. (1983). *J.Mol.Biol.* 166, 1-19.

Green, P.J., Pines, O. y Inouye, M (1986). The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 569-597.

Guerrero, F.D., Jones, J.T. y Mullet, J.E. (1990). Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Molecular Biology* 15: 11-26.

Gulick, P.J. y Dvorák, J. (1992). Coordinate gene Response to Salt stress in *Lophopyrum elongatum*. *Plant Physiol.* 100, 1384-1388.

Guo, W., Ward, R.W. y Thomashow, M.F. (1992). Characterization of a Cold-Regulated Wheat Gene Related to Arabidopsis cor47. *Plant Physiol.* 100, 915-922.

M.G. Hale and D.M. Orcutt *The Physiology of plants under stress.* John Wiley & Sons, Inc. 1987.

Hall, L.N., Tucker, G.A., Smith, C.J.S., Watson, C.F., Seymour, G.B., Bundick, Y., Boniwell, J.M., Fletcher, J.D., Ray, J.A., Schuch, W., Bird, C. y Grierson, D. (1993). Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. *The Plant Journal* 3(1), 121-129.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 577-580.

Harriman, R.W., Tieman, D.M. y Handa, A.K. (1991). Molecular cloning of tomato pectin methylesterase gene and its expression in Rutgers, Ripening Inhibitor, Nonripening, and Never Ripe tomato fruits. *Plant Physiol.* 97, 80-87.

Herrin, D.L. y Schmidt, G.W. (1988). Rapid, reversible staining of Northern blots prior to hybridization. *BioTechniques* 6, 196-200.

Hershey, J.W. B. (1991). *Annu. Rev. Biochem.* 60, 715-755.

Hetherington, A.M. y Quatrano, R. (1991). Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytol.* 119, 9-32.

Heywood, S.M. (1986) tc-RNA as naturally occurring antisense RNA in eukaryotes. *Nucleic Acids. Res.* 14, 6771-6772.

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. y Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separated of vir- and T- region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, Vol. 303 p.179-180.

Holland, D., Hayyim, G.B., Faltin, Z., Camoin, L., Strosberg, A.D. y Eshdat, Y. (1993). Molecular characterization of salt-stress-associated protein in citrus: protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidases. *Plant Molecular Biology* 21: 923-927

Homström, K.-O., Welin, B., Mandal, A., Kristiansdottir, I., Teeri, T.H., Lamark, T., Strom, A.R., y 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. *The Plant Journal.*6(5), 749-758.

Hong, B., Barg, R. y Ho, T.H.D. (1992). Developmental and organ-specific expression of an ABA-and stress-induced protein in barley. *Plant Molecular Biology* 18:663-674.

Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. y Fraley, R.T. (1985). A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science* Vol. 227, pp. 1229-1231.

Iraki, N.M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. y 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.

Iturriaga, G., Schneider, K., salamini, F. y Bartels, D. (1992). Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Molecular biology* 20: 555-558.

Jones, J.B., Jr. (1982). Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *J. Plant Nutrition* 5, 1003-1030.

Jones, J.G.D., Gilbert, D.E., Grady, k.L. y Jorgensen, R.A. (1987). T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol. Gen. Genetics* 204: 383-396.

De Jong, A.J., Ed. Schmidt, D.L. y de Vries, S.C. (1993). Early events in higher-plant *Plant Molecular Biology* 22: 367-377.

Kaelin, W.G., Pallas, D.C., DeCaprio, J.A., Kaye, F.J. y Livingston, D.M. (1991). Identification of Cellular Proteins That Can Interact Specifically with the T/E1A-Binding Region of the Retinoblastoma Gene Product. *Cell.* Vol.64, 521-532.

Kahn, T.L., Fender, S.E., Bray, E.A., y O'Connell, M.A. (1993). Characterization of Expression of Drought- and Abscisic Acid-Regulated Tomato Genes in the Drought-Resistant Species *Lycopersicon pennellii*. *Plant. Physiol.* 103: 597-605.

Kalderon, D., Richardson, W.D., Markhan, A.F., y Smith, A.E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simians virus 40 large T antigen. *Nature* 311: 33-38.

King, G.J., Turner, V.A. , Hussey, C.E., Syrkin, E. y Lee, S. M. (1988) Isolation and characterization of a tomato cDNA clone which codes for a salt-induced protein. *Plant Molecular Biology* 10: 401-412. (pNP24, 8)% homología a la taumatina, osmotina)...

Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. , Kamada, H. y Harada, H. (1993). cDNA cloning of ECP40, an embryogenic-cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 21: 1053-1068.

Kiyosue, T., Beetham, J.k., pinot, f., Hammock, B.D., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* cDNA for a soluble epoxide hydrolase gene that is inducible by auxin and water stress. *The Plant Journal* 6(2), 259-269.

Kofer, W., Gimelius, K. y Bonnett, H.T. (1991). Modifications of Mitochondrial DNA Cause Changes in Floral Development in Homeotic-like Mutants of Tobacco. *The Plant Cell*. Vol.3, 759-769.

Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H. , Wallroth, M. y Goldberg, R.B. (1990). Different Temporal and Spatial gene Expression Patterns Occur during Anther development. *The Plant Cell*. Vol.2, 1201-1224.

Konishi, Y. 1988. A highly reliable prediction of protein secondary structure. Protein structure-function relationship. Z.H. Zaidi, editor. Elsevier Science Publishers B.V.

Kononowicz, A.K., Raghobama, K.G., Casa, A.M., Reuveni, M., Watad, A.E.A., Liu, D., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. (1993). Osmotin: Regulation of Gene Expression and Function. *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*, T.J. Close and E.A. Bray, eds. , published by the American Society of Plant Physiologists. pp.144-158.

Van der Krol. A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N.M. y Stuitje, A.R. (1990). Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. *The Plant Cell*. Vol. 2, 291-299.

Van der Krol, A.R., Mol, J.N.M. y Stuitje, A.R. (1988). Antisense genes in plants: an overview. *Gene*, 72, 45-50.

Van der Krol, A.R., Mur, L.A., De Lange, P., Gerarts, A.G.M., Mol, J.N.M., y Stuitje, A.R (1990a). Antisense chalcone synthase genes in petunia: Visualization of variable transgene expression. *Mol. Gen. Genetics* 220: 204-212.

Van der Krol, A.R., Mur L.A., De Lange, P., Mol, J.N.M. y Stuitje, A.R. (1990b). Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Molecular Biology* 14: 475-466.

Kurkela, S. y Franck, M. (1990). Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible Arabidopsis gene. *Plant Molecular Biology* 15: 137-144.

Laemli, E.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lam, E. y Chua, N.H. (1990). *Science*, 248, 471-474.

Lang, V. y Palva, T. (1992). The expression of a rab-related gene, rab 18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Molecular Biology* 20: 951-962.

Lang, V., Mäntylä, Welin, B., Sundberg, B. y Palva, T. (1994) Alterations in Water Status, Endogenous Abscisic Acid Content, and Expression of rab18 Gene during the Development of Freezing Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104: 1341-1349.

- Lauchi, A. y Epstein, E. (1990).** Plant responses to saline and sodic conditions. *Agricultural Salinity Assessment and Management*. p.113-137. ed. Tanji, K.K. pub. American Society of Civil Engineers, New York.
- Leone, A., Costa, A., Tucci, M. y Grillo, S. (1994).** Comparative Analysis of Short- and Long-Term Changes in Gene Expression Caused by Low Water Potential in Potato (*Solanum tuberosum*) Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiol.* 106:703-712.
- Lohmann, S.M., De Camilli, P. y Walter, U. (1988).** *Methods Enzymol.* 159, 183-193.
- Maztke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J. y Matzke, A.J.M. (1989)** *The EMBO Journal*. 8, 643-649.
- McCue, K.F. y Hanson, A.D. (1992).** Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Molecular Biology* 18: 1-11.
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A. y Pardo, J.M. (1994).** The Protein Phosphatase Calcineurin Is Essential for NaCl Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No.12, pp. 8792-8796.
- Meurs, C., Basra, A., Karssen, C.M. y van Loon, L.C. (1992).** Role of Abscisic Acid in the Induction of Desiccation Tolerance in Developing Seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*(1992)98, 1484-1493.
- Meyer, G. , Schmitt, J.M. y Bohnert, H.J. (1990).** Direct screening of a small genome: Estimation of the magnitude of plant gene expression changes during adaptation to high salt. *Mol. Gen. Genet.* 224: 347-356.
- Mittler, R. y Zilinskas (1994)** Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal* 5(3), 397-405.
- Mubarack., M. y Rowland, L.J. (1994).** Identification of Dehydrin-Like Proteins Responsive to Chilling in Floral Buds of Blueberry (*vaccinium*, section *Cyanococcus*). *Plant Physiol.* 104: 1439-1447.
- Mullet, J.E.(1988).** *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 39, 475-502.
- Mundy, J.M. y Chua, N.H. (1988).** Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *The EMBO Journal* vo.7 no.8 pp 2279-2286.
- Munns, R. (1993).** Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* 16, 15-24.
- Muralitharan, M.S., Van Steveninck, R.F.M. y Chandler, S.F. (1990).** Growth characteristics and ion contents of non-selected and salt-selected callus lines of highbush

blueberry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars Blue Crop and Denise Blue. *Plant Cell Rep.* 9, 151-155.

Murashige, Y. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15, 473-97.

Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y. y Nishida, I. (1992). Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* 356, 710-713.

Murgía, J.R., Bellés, J.M. y Serrano, R. (1995). A salt-Sensitive 3'(2'),5'-Biphosphate Nucleotidase Involved in Sulfate Activation. *Science* Vol. 267.p. 232-234.

Murray, M.G. y Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc. Acids. Res.* 8, 4321-4325.

Narasimhan, M.L., Binzel, M.L., Perez-Prat, E., Chen, Z., Nelson, D.E., Singh, N.K., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M. (1991). NaCl Regulation of Tonoplast ATPase 70-Kilodalton Subunit mRNA in Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 97, 562-568.

Nellen, W. y Lichtenstein, C. (1993). What makes an mRNA antisense-itive? *TIBS* 18, p.419-423.

Neuhaus, J.M., Ahl-Goy, P., Hinz, U., Flores, S. y Meins, F. (1991). High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibilit of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Molecular Biology* 16: 141-151.

Neven, L.G., Haskell, D.w., Hofig, A., Li, Q.-B., y Guy, C.L. (1993). Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Molecular Biology* 21: 291-305.

Nishikawa, K. y Ooi, T. (1986). Amino acid sequence homology applied to the prediction of protein secondary structures, and joint prediction with existing methods. *Biochemica et Biophysica Acta* 871 45-54.

Nordin, K., Heino, P. y Palva, T. (1991). Separate signal pathways regulate the expression of a low -temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Molecular Biology* 16: 1061-1071.

Ooms, J.J.J., León-Kloosterziel, K.M., Bartels, D., Koorneef, M. y Karssen, C.M. (1993). Acquisition of desiccation Tolerance and longevity in Seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 102: 1185-1191.

Pearson , R.B., Mitchelhill, K.I. y Kemp, B.E. (1993). Studies of protein kinase/phosfatse specificity using synthetic peptides. *Protein Phosphorylation: Apractical Approach.* ed. Hardier, D.G. IRL PRESS, Oxford University Press.p.265-291.

- Perez-Prat, E., Narasimhan, M.L., binzel, M.L., Botella, M.A., Chen, Z., Valpuesta, V., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M. (1992).** Induction of a Putative Ca²⁺-ATPase mRNA in NaCl-Adapted Cells. *Plant Physiol.* 100, 1471-1478.
- Perozzi, G. y Prakash, S. (1986).** RAD7 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Transcripts, nucleotide sequence analysis, and functional relationship between RAD7 and RAD23 gene products. *Mol. Cell. Biol.* 6:1497-1507.
- Pla, M., Gómez, J., Goday, A. y Pagés, M. (1991).** Regulation of the abscisic acid-responsive gene *rab28* in maize viviparous mutants. *Mol. Gen. Genet.* 230:394-400.
- Plana, M., Itarte, E., Eritja, R., Goday, A. Pagés, M. y Martínez, M.C. (1991).** Phosphorylation of Maize RAB-17 Protein by Casein Kinase 2. *The Journal of Biological Chemistry.* Vo. 266, No 33, pp 22510-22514.
- Plant, A.L., Cohen, A. y Bray, E.A. (1991).** Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and ABA-induced gene of tomato. *Plant Physiol* 97:900-906.
- Piatkowski, D., Schneider, K., Salamini, F. y Bartels, D. (1990).** Characterization of Five Abscisic Acid-Responsive cDNA Clones Isolated from the Desiccation-Tolerant Plant *Cratogeomys plantagineum* and Their Relationship to Other Water-Stress Genes. *Plant Physiol.* 94: 1682-1688
- Raikhel, N. (1992).** Nuclear targeting in plants. *Plant Physiol* 100: 1627-1632.
- Rao, A.H., karunasree, B. y Reddy, A.R. (1993).** Water Stress-Responsive 23 kDa Polypeptide from Rice Seedlings is Boiling stable and is Related to the RAB16 Family of Proteins. *J. Plant Physiol.* Vol. 142. pp. 88-93.
- Reuveni, M., Bennett, A.B., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. (1990)** Enhanced H⁺ Transport Capacity and ATP Hydrolysis Activity of the Tonoplast H⁺-ATPase after NaCl Adaptation. *Plant Physiol.* 94, 524-530.
- Ried, J.L. y Walker-Simmons, R. (1993).** Group 3 Late Embryogenesis Abundant Proteins in Desiccation-Tolerant Seedlings of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 102: 125-131.
- Rihs, H.P., Jans, D.A., Fan, H. y Peters, R. (1991).** The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.* 10: 633-639.
- Robertson, M y Chandler, P.M. (1992).** Pea dehydrins: identification, characterisation and expression. *Plant Molecular Biology* 19: 1031-1044.
- Roberts, J.K., DeSimone, N.A., Lingle, W.L., y Dure III, L. (1993).** Cellular Concentrations and Uniformity of Cell-Type Accumulation of Two *Lea* Proteins in Cotton Embryos. *The Plant Cell*, Vol.5, 769-780.

Robertson, M. y Chandler, P.M. (1994). A dehydrin cognate protein from pea (*Pisum sativum* L.) with an atypical pattern of expression. *Plant Molecular Biology* 26: 805-816.

Robertson, A.J., Ishikawa, M., Gusta, L.V., y mackenzie, S.L. (1994). Abscisic Acid-Induced Heat Tolerance in *Bromus inermis* Leyss Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiol.* 105: 181-190.

Rogers, J.(1988). RNA complementary to α -amilases mRNA in Barley. *Plant Mol. Biol.* 11: 125-138.

Roth, J. (1983). Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin sections. *J. Histochem Cytochem* 31: 897-999.

LaRosa, P.C., Chen, ZZZ., Nelson, D.E., Singh, N.K., Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A. (1992). Osmotin Gene Expression is Posttranscriptionally Regulated. *Plant Physiol.* 100, 409-415.

LaRosa, P.C., Singh, N.K. y Bressan, R. (1989) Stable NaCl Tolerance of Tobacco Cells Is Associated with Enhanced Accumulation of Osmotin. *Plant Physiol.* 91, 855-861.

Rouse, D., Gehring, A. y Parish, R.W. (1992). Structure and sequence of a dehydrin-like gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 19: 531-532.

Saiki, R.K. (1990) Amplification of genomic DNA. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications.* Academic Press, Inc. p.: 13-21.

Saleki, R., Young, P.G. y Lefebvre, D.D. (1993). Mutants of *Arabidopsis thaliana* Capable of Germination under Saline Conditions. *Plant Physiol.* 101: 839-845.

Sambrook, J., Fritsh, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sandler, S.J., Stayton, M., Townsend, J.A., Ralston, M.L., Bedbrook, J.R. y Dunsmuir, P.(1988). Inhibition of gene expression in transfected plants by antisense RNA. *Plant Mol. Biol.* 11, 301-310.

Sánchez-Martínez, D., Puigdomènech, P. y Pagés, M.(1986) Regulation of Gene Expression in Developing *Zea mays* Embryos. *Plant Physiol.* 82, 543-549.

Saradhi, P.P. y Alia.(1993). Loss in the Mitochondrial Electron Transport is the Prime Cause for Proline Accumulation During Environmental Stresses. *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*, T.J. Close and E.A. Bray, eds. , published by the American Society of Plant Physiologists.(Posters Abstracts).

- Schneider, K., Wells, B., Schmelzer, E., Salamini, F. y Bartels, D. (1993).** desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 189: 120-131.
- Sczabolcs, I. (1989).** Salt-affected soils. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Sengstag, C. y Hinnen, A. (1987).** The sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* gene PHO2 codes for a regulatory protein with unusual aminoacid composition. *Nucl. Acid. Res.* 15:233-246.
- Sheehy, R.E., Kramer, M., y Hiatt, W.R. (1988).** Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:8805-8809.
- Skriver, K. y Mundy, J. (1990).** Gene Expression in Response to Abscisic Acid and Osmotic Stress. *The Plant Cell.* Vol. 2, 503-512.
- Simons, R.W. (1988).** Naturally occurring antisense RNA control: a brief review. *Gene* 72, 35-44.
- Singht, N.K., Handa, A.K., Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A. (1985).** Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79, 126-137.
- Smith, S. Watson, C.F., Bird, C.R., Schuch, W. y Grierson, D. (1990a).** Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 224: 477-481.
- Smith, C.J.S., Colin, F.W., Morris, P.C., Bird, C.R., Seymour, G.B., Gray, J.E., Arnold, C., Tucker, G.A., Schuch, W., Harding, S. y Grierson, D. (1990b).** Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Molecular Biology* 14: 369-379.
- Soutar, A.K. y Wade, D.P (1989).** Ligand Blotting. Protein function: a practical approach. ed. Creighton, T.E. IRL PRESS, Oxford University Press.p.55-76.
- Spencer, C.A., Gietz, R.D. y Hodgetts, R.B(1986).** Overlapping transcription units in the dopa decarboxylase region of *Drosophila*. *Nature* 322, 279-281.
- Spollen, W.G. y Nelson, C.J. (1994)** Response of Fructan to Water Deficit in Growing Leaves of Tall Fescue. *Plant Physiol.* 106: 329-336.
- Still, D.W., Kovach, D.A. y Bradford, K.J. (1994).** Development of Desiccation Tolerance during Embryogenesis in Rice (*Oryza sativa*) and Wild Rice (*Zizania palustris*). *Plant Physiol.* 104: 431-438.

Suhayda, C.G., Giannini, J.L., Briskin, D.P. y Shannon, M. (1990). Electrostatic Changes in *Lycopersicon esculentum* Root Plasma membrane Resulting from Salt Stress. *Plant Physiol.* 93, 471-478.

Sumayarti, S., Negrutiu, I y Jacobs, M. (1992). Characterization and regeneration of salt and water mutants from protoplast culture of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viriani). *Theor. Appl. Genet.* 83, 613-619.

Tanji, K.K. (1990). Nature and extent of agricultural salinity. *Agricultural Salinity Assessment and Management.* p.1-17. ed. Tanji, K.K. pub. American Society of Civil Engineers, New York.

Tarczynski, M.C., Jensen, R.G. y Bohnert, H.J. (1992). Expression of a bacterial *mtlD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* Vol.89, pp. 2600-2604.

Tarczynski, M.C., Jensen, R.G.y Bohnert, H.J.(1993).Stress Protection of Transgenic Tobacco by Production of the Osmolyte Mannitol. *Science.*Vol.259.508-510.

Takahashi, R., Joshee, N. y Kitagawa, Y. (1994). Induction of chilling resistance by water stress, and cDNA sequence analysis and expression of water stress-regulated genes in rice. *Plant Molecular Biology* 26: 339-352.

Terras, F.R., Goderis, I.J., Van Leuven, F., Venderleyden, J., Cammue, B.P.A. y 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.

Thomas, J.C. y Bohnert, H.J. (1993). Salt Stress Perception and Plant growth Regulators in the Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* 103: 1299-1304.

Torres-Schumann, S., Godoy, J.A. y Pintor-Toro, J. (199). A probable phospholipid transfer gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Molecular Biology.*

Towin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.

Velasco, R., Salamini, F. y Bartels, D. (1994). Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 26: 541-546.

Vernon, D.M. y Bohnert, J. (1992). A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *The EMBO Journal*, vol. 11 no.6 pp. 2077-2085.

Villardell, J., Goday, A., Freire, M.A., Torrent, M., Martínez, M.C., Torné, J.M. y Pagés, M. (1990). Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB17 in maize. *Plant Molecular Biology* 14: 423-432.

Vincentz, M. y Caboche, M.(1991). Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *The EMBO Journal* vol. 10 no.5, pp. 1027-1035.

Wadsworth, G.J., Redinbaugh, M.G. y Scandalios, J.G. (1988). A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. *Anal. Biochem.* 172, 279-283.

Watad, A-E. A., Reuveni, M., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. (1991) Enhanced Net K⁺ Uptake of NaCl-Adapted Cells. *Plant Physiol.* 95, 1265-1269.

Welin, B., Olson, A., Nylander, y Palva, T. (1994). Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*.

Weretilnyk, E.A. y hanson, A.D. (1990). Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 2745-2749.

Wilhem, K.S. y Tomashow, M.F. (1993). *Arabidopsis thaliana* cor 15b, an apparent homologue of cor15a, is strongly responsive to cold and ABA, but not drought. *Plant Molecular Biology* 23: 1073-1077.

Wilhelmsen, K.C., Eggleton, K. y Temin, H.M (1984). Nucleic acid sequences of the oncogene *v-rel* in reticuloendotheliosis virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene *c-rel*. *J. Virol* 52: 172-182.

Winicov, I. y Button, J.D. (1991). Accumulation of photosynthesis gene transcripts in response to sodium chloride by salt-tolerant alfalfa cells. *Planta* 183: 478-483.

Winicov, I. (1993). Enhanced Gene Expression in Salt Tolerance of Alfalfa Cell Lines and Regenerated Plants. *Control of plant gene expression.* ed. Verma, D.P.S. CRC Press. pp.:301-310.

Wolfrain, L.A., Langis, R. Tyson, H. y Dhmdsa, R.S. (1993). cDNA Sequence, Expression, and Transcript Stability of a Cold Acclimation-Specific Gene, *cas18*, of Alfalfa (*medicago falcata*) Cells. *Plant Physiol.* 101: 1275-1282.

Wong, C., Ko, S. y Woo, S. (1983). Regeneration of rice plantlets on NaCl-stressed medium by anther culture. *Bot. Bull. Acad. Science* 24, 59-64.

K. Yamaguchi-Shinozaki, J. Mundy y N.-H. Chua..1989. Four tightly linked *rab* genes are differentially expressed in rice. *Plant Molecular Biology* 14: 29-39.(*rab16 A-B-C-D*)

Yen, H.E., Edwards, G.E. y Grimes, H.D. (1994). Characterization of a Salt-Responsive 24-Kilodalton Glycoprotein in *Mesembryanthemum crystallinum* Plant Physiol. 105:1179-1187.

Zeevaart, J.A.D. y Creelman, R.A. (1988). Metabolism and Physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39: 439-473.

Zhang, X-H., Moloney, M.M. y Chinnappa, C.C. (1993). Nucleotide Sequence of a cDNA Clone Encoding a Dehydrin-Like protein from *Stellaria longipes*. Plant Physiol. 103: 1029-1030.

Zhu, B., Chen, T.H.H. y Li, P.H. (1993). Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during the induction of freezing tolerance in *Solanum commersonii*. Plant Molecular Biology 21: 729-735

Zhu, J.-K., Shi, J., Singh, U., Wyatt, S.E., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. y Carpita, N.C. (1993). Enrichment of vitronectin- and fibronectin-like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. The Plant Journal 3(5), 637-646.

Zhu, J.-K., Damsz, B., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. (1994). A Higher Plant Extracellular Vitronectin-like Adhesion Protein Is Related to the Translational Elongation Factor-1a. The Plant Cell, Vol.6, 393-404.

Zakut-Houri, R., Bienz-Tadmor, Givol, D. y Oren, M. (1990). Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. EMBO J. 4: 1251-1255.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por sus señores miembros en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. ROSA MARÍA LUNA VARGO

titulada "Estudio sobre la función del fenómeno inducible por estrés oxidativo y su relación en la cooperación esolentum"

acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE

Sevilla, 13 de JULIO 1990

El Vocal,

EL PRESIDENTE

El Vocal,

El Secretario,

El Vocal,

El Doctorado,

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672107