

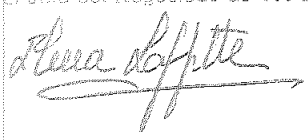
TD  
299

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE GENETICA

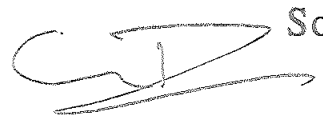
UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

En la registrada esta Tesis Doctoral  
número 229 número 31 del libro  
Sevilla, 1993

El Jefe del Negociado de Tesis,

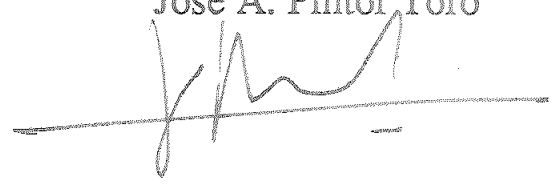


Análisis molecular del estrés salino en  
tomate: cambios en la expresión génica y  
caracterización del gen *tsw12*



Tesis Doctoral  
Sonia Torres Schumann  
Sevilla, 1993

Director:  
José A. Pintor Toro



TD  
299

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo; a mi Director de Tesis, el Dr. José Antonio Pintor Toro, por todo lo que he aprendido gracias a él durante el tiempo que he estado en el laboratorio. También deseo agradecer su colaboración a las siguientes personas:

Dr. Antonio Troncoso, Director de este Centro; Dr. Ian Sussex, Dr. M. Delseny, Dres. Antonio Gonzalez y Santiago Castanys, Dra. Carmen Mazuelos, Dr. Teodoro Marañón, Dr. Ignacio Palmero, D. Eduardo Gómez, D. Carlos Parra, Dr. Josep Casadesús, Dres. Carmen Osuna y Regla Bustos, Dres. Javier Moreno y Rosa María Rodrigo, Dr. Cesáreo Sáez, y muy especialmente a José Antonio Godoy y a mis compañeros de laboratorio durante este tiempo, cuya ayuda ha sido esencial.

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Biología Vegetal del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC, con la ayuda de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador de la Junta de Andalucía.

R. 11714



# INDICE

## INTRODUCCION

1. Agricultura y salinidad 2
2. Fisiológicos de la tolerancia a salinidad 3
  - 2.1 Plantas halófitas 4
  - 2.2 Plantas glicófitas 4
3. El ácido abscísico induce cambios en la fisiología y en la expresión génica de las plantas 5
  - 3.1 Relación entre ABA, salinidad y otros tipos de estrés 5
4. Cambios en la expresión génica inducibles por estrés hídrico y salino 6
  - 4.1 Análisis de patrones bidimensionales 6
  - 4.2 Osmotina 6
  - 4.3 Genes Lea 7
  - 4.4 Otros genes inducidos por estrés salino y desecación en especies cultivadas 8
  - 4.5 Genes inducidos por estrés salino en especies halófitas o adaptadas a desecación 9
5. La respuesta a estrés está controlada por varias rutas de inducción independiente 10
6. Papel de los lípidos en la respuesta a estrés salino 12

## MATERIAL Y METODOS

1. REACTIVOS 15
  - 1.1 Productos químicos 15
  - 1.2 Productos radioactivos 15
  - 1.3 Enzimas 15
  - 1.4 Kits 15
  - 1.5 Anticuerpos 152
2. MATERIAL BIOLÓGICO
  - 2.1 Material vegetal 15

2.1.1	Esterilización de semillas	15
2.1.2	Cultivo hidropónico	16
2.2	Bacterias	16
2.3	Bacteriófagos	17
2.3.1	Propagación de los bacteriófagos sobre las bacterias hospedadoras POP13	17
2.4	Vectores	17
3.	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	17
3.1	Marcaje <i>in vivo</i> de proteínas con <sup>35</sup> S-metionina	17
3.2	Cuantificación de proteínas	17
3.3	Cuantificación de la radioactividad incorporada proteína	18
3.4.1	Tinción con azul de Coomassie	18
3.4.2	Fluorografía	2
3.5	Electroforesis bidimensional	19
3.5.1	Extracción de proteínas	19
3.5.2	Primera dimensión	19
3.5.3	Segunda dimensión	20
3.6	Electroforesis monodimensional	21
	para resolver proteínas de pequeño tamaño	21
2.6.1	Extracción de proteínas	21
4.	AISLAMIENTO DE CLONES A PARTIR DE UNA CLONOTECA DE cDNA	22
4.1	Transferencia de DNA de bacteriófagos a membranas de nitrocelulosa	23
4.2	Procesamiento de las membranas	23
4.3	Preparación de sondas radioactivas de cDNA	23
4.4	Hibridación	23
4.5	Selección de mRNAa expresados diferencialmente	24
5.	MANIPULACION DE DNA	24
5.1	Purificación de plásmidos bacterianos	24
5.2	Purificación de DNA de fagos	25
5.3	Electroforesis de DNA en geles de agarosa	25
5.4	Obtención de fragmentos de DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión	26
5.5	Digestión de DNA con enzimas de restricción	26
5.6	Defosforilación de los extremos 5'	26
5.7	Ligación de moléculas de DNA	26
5.8	Transformación de bacterias	26



6. SECUENCIACION	27
6.1 Aislamiento de DNA monocatenario	27
6.2 Reacciones de secuenciación	28
6.3 Resolución en geles de acrilamida	92
6.4 Tratamiento informático de las secuencias	30
7. ANALISIS SOUTHERN	2
7.1 Extracción de DNA de plantas	31
7.2 Digestión de DNA, electroforesis y transferencia a membrana	31
7.3 Marcaje de las sondas de DNA por <i>random primer</i>	32
7.4 Hibridación	32
8. ANALISIS NORTHERN	33
8.1 Obtención de RNA	33
8.2 Extracción de RNA de semillas	34
8.3 Cuantificación de RNA en solución	34
8.4 Electroforesis de RNA	34
8.5 Cuantificación densitométrica y normalización de señales de hibridación	35
9. OBTENCION DE ANTICUERPOS	35
9.1 Expresión heteróloga en bacterias	35
9.2 Inmunización de conejos	36
9.3 Procesamiento del suero	37
9.4 Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato amónico	
9.5 Purificación de anticuerpos por afinidad	37
9.6 Substracción de anticuerpo anti $\beta$ -galactosidasa	37
9.7 Purificación por afinidad de anticuerpos por antígeno unido a soporte sólido	2
10. ANALISIS WESTERN	38
10.1 Transferencia de proteínas a membrana	38
10.2 Inmunodetección con anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina	39
10.3 Inmunodetección con anticuerpos conjugados a peroxidasa	39
11. INMUNOLOCALIZACION EN SECCIONES INCLUIDAS EN PARAFINA	40
12. INMUNOLOCALIZACION EN CRIOSECCIONES	41
13. INMUNOLOCALIZACION EN	

## IMPRESIONES DE TEJIDOS SOBRE NITROCELULOSA 41

- 13.1 Impresiones de tejidos en membranas de nitrocelulosa 41
- 13.2 Incubación con anticuerpos 42

## RESULTADOS 2

1. Cambios en los patrones de proteínas marcadas  
*in vivo* en respuesta a NaCl y/o ácido abscísico 44
  - 1.1 Proteínas básicas inducidas en la fase 1 de germinación 45
  - 1.2 Proteínas básicas inducidas en la fase 2/3 de germinación 48
  - 1.3 Proteínas ácidas inducidas en la fase 1 de germinación 50
  - 1.4 Proteínas ácidas inducidas en la fase 2 y 3 de germinación 51
  - 1.5 Proteínas inducidas por choque salino 54
2. Aislamiento de clones de cDNA inducidos por NaCl y ABA 56
3. Secuencia de nucleótidos del clon TSW12 57
4. Comparación de TSW12 con otras secuencias 59
5. Southern genómico de TSW12 62
6. Expresión en plantas adultas  
del mRNA correspondiente al clon TSW12 63
  - 6.1 Efecto del tratamiento con NaCl 63
  - 6.2 Efecto de otros tratamientos 64
7. Cinética de acumulación  
del mRNA TSW12 durante la germinación 67
8. Acumulación del mRNA TSW12  
en plántulas sometidas a distintos tratamientos 67
9. Expresión de una proteína  
de fusión  $\beta$ -galactosidasa/Tsw12 en bacterias 68
10. Obtención de anticuerpos  
policlonales contra la proteína de fusión 70
11. Purificación por afinidad de anticuerpos  
específicos contra la proteína TSW12 72
12. Acumulación de la proteína Tsw12 en plantas adultas de tomate 73
  - 12.1 Cinética de acumulación  
de la proteína Tsw12 por tratamiento con NaCl 73
  - 12.2 Efectos de otros tratamiento 75
13. Acumulación de la proteína Tsw12 en plántulas 75
14. Inmunolocalización de la proteína Tsw12 77

## DISCUSION

1. Respuesta de plántulas de tomate a NaCl: cambios en los  
patrones bidimensionales de proteínas de nueva síntesis 82

2. Caracterización del gen <i>tsw12</i>	85
2.1 Aislamiento del clon TSW12	85
2.2 Análisis de la secuencia TSW12	85
2.3 Análisis Southern: existe una copia única de <i>tsw12</i> en el genoma	88
2.4 Patrón de expresión del mRNA TSW12	88
2.5 Patrón de expresión de la proteína Tsw12	91
2.6 Inmunolocalización de Tsw12	92

CONCLUSIONES 96

BIBLIOGRAFIA 98

Abreviaturas 111

# INTRODUCCION

---

## 1. AGRICULTURA Y SALINIDAD

Las plantas responden a condiciones ambientales adversas con importantes cambios metabólicos y morfológicos. Estas condiciones adversas pueden ser de tipo biótico, como el ataque por agentes patógenos, o de tipo abiótico como temperaturas extremas, déficit de agua, anoxia o altas concentraciones de sales o metales pesados. Frente a estas condiciones adversas, de las que no pueden escapar, las plantas presentan respuestas adaptativas que contribuyen a mantener el buen funcionamiento del organismo a lo largo de su ciclo vital.

El estrés salino es uno de los principales factores que limita la distribución geográfica y la productividad de las plantas; constituye un problema agronómico grave y progresivo, de gran repercusión económica. Los suelos salinos son típicos de las zonas costeras y de las regiones áridas y semiáridas del planeta, donde las altas tasas de evaporación provocan un incremento progresivo de la concentración de sales del suelo. El problema se agrava en estas regiones por la necesidad de regar el suelo para su aprovechamiento agrícola, ya que con el agua de riego se aportan iones que finalmente quedan retenidos en el suelo. El problema es especialmente grave en zonas costeras, donde la sobreexplotación de los acuíferos provoca la intrusión de agua salada de origen marino. Por tanto, es necesario minimizar el número de riegos y la cantidad de agua empleada, que deberá ser baja en contenido iónico.

La extensión global de los suelos afectados por la salinidad se ha estimado entre 400 y 950 millones de hectáreas; de los 230 millones de hectáreas irrigadas, una tercera parte se encuentra afectada de salinización excesiva (Epstein *et al.*, 1980; Szabolcs, 1989).

Gran parte de la Península Ibérica está sometida a una prolongada sequía estival que le confiere carácter semiárido, lo que conlleva que la superficie afectada por la salinización en España sea considerable, estimándose en 840.000 ha en 1983 (Alberto *et al.*, 1983). Dado el carácter progresivo del problema, la extensión de terrenos salinizados debe estar actualmente muy por encima de estas cifras. Los suelos más afectados se localizan en la zona noreste, especialmente en las provincias de Zaragoza, Huesca, Lérida y Navarra, y en la zona sur, en las marismas del valle del Guadalquivir. Existen además puntos dispersos en Palencia, Ciudad Real, Toledo, Badajoz, Alicante, Murcia y Almería (Ayers *et al.*, 1960).

Es pues de enorme interés la obtención de variedades de cultivo capaces de proporcionar buenos rendimientos en suelos con altas concentraciones de iones. Por métodos de mejora clásica no se ha obtenido ninguna variedad

comercial seleccionada específicamente para tolerancia a salinidad (Rush y Epstein, 1981). Una de las dificultades para esta selección es la carencia de marcadores de tolerancia reconocibles en etapas tempranas del ciclo vital (Epstein y Rains, 1987).

Hasta el momento, los intentos de seleccionar plantas más tolerantes a la salinidad a partir de cultivos celulares han tenido un éxito muy limitado (Stavarek y Rains, 1984). Existen problemas importantes aún por solucionar, como la dificultad de regeneración de numerosas especies y la aparición de una gran variabilidad en los caracteres no relacionados con el seleccionado. La regeneración a partir de cultivos celulares da lugar a una población heterogénea de plántulas, que pueden presentar caracteres indeseables, como por ejemplo la esterilidad (Wong *et al.*, 1983). Sin embargo, existen en la naturaleza, dentro de las especies sensibles, variedades que presentan diferentes grados de tolerancia a la sal; esta variabilidad genética podría ser una fuente de genes potencialmente manipulables y transferibles a otras especies mediante ingeniería genética (Rains *et al.*, 1980). Actualmente, se cuenta con la metodología necesaria para obtener plantas transgénicas (revisado por Potrykus, 1991), y para la clonación de genes. Los principales factores limitantes son el aislamiento de genes específicos que tengan la capacidad de mejorar la tolerancia a sal y, como se mencionó anteriormente, la dificultad de regenerar algunas especies, fundamentalmente las monocotiledóneas.

## 2. FISILOGIA DE LA TOLERANCIA A SALINIDAD

Las plantas cultivadas en presencia de altas concentraciones de sal muestran una serie de síntomas muy variados que van desde la reducción de la tasa de crecimiento vegetativo hasta la muerte. Los problemas a los que se enfrentan las plantas en suelos salinos son fundamentalmente:

- (1) El bajo potencial hídrico del suelo, que trae consigo una pérdida inicial de turgencia.
- (2) La presencia de altas concentraciones de iones, tóxicos para la maquinaria enzimática celular.
- (3) Las deficiencias nutricionales, ocasionadas por el exceso de determinados iones frente a otros iones esenciales.

Las estrategias para paliar estos problemas consistirían bien en absorber iones para contrarrestar el bajo potencial hídrico del medio, lo que causaría problemas de toxicidad iónica, o bien en excluirlos activamente, con el riesgo de sufrir déficit hídrico. Las especies vegetales han adoptado diferentes estrategias fisiológicas para superar el estrés salino; dependiendo de su grado de tolerancia se clasifican en halófitas, plantas de hábitats salinos, y en glicófitas, plantas sensibles a sal.



## 2.1 Plantas halófitas

La principal adaptación de las plantas de hábitat salino consiste en la absorción de iones y su compartimentación en la vacuola. Para contrarrestar la diferencia de potencial osmótico entre el citoplasma y la vacuola, la célula sintetiza solutos orgánicos no tóxicos de bajo peso molecular y los acumula en el citoplasma. Aunque la síntesis de estos solutos (glicina, prolina, betaínaglicina, sorbitol y otros) constituye un coste energético importante, sólo es necesario equilibrar la pequeña parte del volumen celular correspondiente al citoplasma.

Otras adaptaciones frecuentes en las especies halófitas son de tipo morfológico:

(1) Hojas de menor tamaño, menor número de estomas por unidad de superficie, recubrimiento con pelos y engrosamiento de la cutícula; todo ello encaminado a evitar la pérdida de agua.

(2) Un mayor desarrollo del sistema radicular frente al sistema foliar, para favorecer la extracción de agua de las zonas menos salinas.

(3) Suculencia del tallo y de las hojas para diluir la concentración de iones.

(4) Aparición de glándulas especializadas en la excreción de sal.

## 2.2 Plantas glicófitas

La mayoría de las especies cultivadas son en mayor o menor grado sensibles a la sal. Las plantas glicófitas evitan la toxicidad iónica, regulando la absorción neta y el transporte de iones (revisado por Greenway y Munns, 1980). Esto implica:

(1) Una alta selectividad en la absorción de iones, que ocurre en primer lugar en la membrana citoplasmática de las células radiculares. Las membranas sufren daños en presencia de altas concentraciones iónicas (Leopold y Willing, 1981); mediante cambios en la composición lipídica de la membrana se consigue aumentar su estabilidad. De este modo, la entrada de iones en la célula se lleva a cabo mediante transportadores específicos. Los transportadores de potasio, exhaustivamente estudiados, tienen gran afinidad por iones  $K^+$  y no se inhiben por concentraciones relativamente elevadas de iones  $Na^+$ . El rango de concentraciones de iones  $Na^+$  en el que se mantiene la especificidad, y por tanto la funcionalidad, de este transportador varía de unas especies a otras y está correlacionado con la tolerancia a sal de las mismas. La selectividad en la absorción de iones se complementa con la extrusión activa de iones  $Na^+$ , que se realiza mediante intercambio con iones  $K^+$ . El intercambio está acoplado a una bomba de protones dependiente de ATP (Jeschke, 1984).

(2) Síntesis de solutos orgánicos, necesarios para el ajuste osmótico del citoplasma. Estas moléculas suelen ser azúcares (sorbitol, sacarosa), aminoácidos o derivados de éstos (betaínaglicina, betaina, prolina) (Gorham *et al.*, 1985). Este mecanismo es energéticamente menos eficiente que el de las plantas halófitas, ya que supone la osmoregulación de la célula completa, incluyendo la vacuola; por este motivo, el gasto de productos fotosintéticos es mucho mayor. Se ha sugerido que estos solutos podrían tener, además, un efecto

protector sobre las enzimas, evitando su inactivación por las altas concentraciones iónicas (Paleg *et al.*, 1985).

(3) La compartimentación o exclusión activa de los iones absorbidos:

a) En algunas especies se ha descrito la existencia de compartimentación de iones  $\text{Na}^+$  en la vacuola (Binzel *et al.*, 1988).

b) La redistribución de iones a distintos órganos como raíces, hojas viejas, peciolo, tallos o traqueidas es otra forma de compartimentación de iones, en este caso a nivel de planta completa. La finalidad de este proceso sería paliar el daño en hojas jóvenes, fotosintéticamente activas, y en tejidos meristemáticos.

c) El transporte activo de iones  $\text{Na}^+$  desde las hojas a través del floema hasta las raíces, donde son extruídos al medio (Jacoby, 1979).

### 3. EL ACIDO ABSCISICO INDUCE CAMBIOS EN LA FISIOLOGIA Y EN LA EXPRESION GENICA DE LAS PLANTAS

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal presente en todas las plantas superiores y en algunas algas y hongos fitopatógenos. El ABA está implicado en múltiples procesos fisiológicos durante el ciclo vital de la planta, como la abscisión de frutos y hojas, la dormancia de yemas y semillas, el cierre de estomas, el crecimiento de raíces, el geotropismo, la maduración de frutos y la senescencia.

El ABA juega un papel importante en la respuesta de las plantas a diversos tipos de estrés ambiental, especialmente desecación, salinidad y frío. En estas condiciones el nivel interno de ABA aumenta espectacularmente y como consecuencia de este aumento se inducen cambios en la fisiología y en la expresión génica de las plantas. Algunos de estos cambios en la expresión génica se producen también cuando las plantas se tratan exógenamente con ácido abscísico. El hecho de que el tratamiento con ABA aumente la tolerancia de plantas y suspensiones celulares al estrés salino e hídrico y a las bajas temperaturas, indica que los cambios inducidos por ABA están estrechamente correlacionados con este aumento de tolerancia (Lalk y Dörffling, 1985; Chen y Gusta, 1983; Orr *et al.*, 1986; LaRosa *et al.*, 1985).

#### 3.1 Relación entre ABA, salinidad y otros tipos de estrés

Las respuestas de las plantas a diversos tipos de estrés ambiental están estrechamente relacionadas, ya que diferentes condiciones ambientales tienen algunos efectos similares sobre las plantas; así, por ejemplo, hojas sometidas a heladas sufren déficit hídrico porque parte del agua forma cristales de hielo; es decir, la tolerancia al frío requeriría tolerancia a estrés hídrico. Por tanto, es lógico pensar que las respuestas de las plantas a diferentes condiciones adversas comparten mecanismos moleculares. De hecho, plantas sometidas a estrés hídrico presentan mayor tolerancia a las bajas temperaturas (Cloutier y Siminovitch 1983). Se han descrito un gran número de genes que responden a más de un tipo de estrés, como por ejemplo el gen *kin2* de *Arabidopsis thaliana* o el gen *HSP70* de maíz:



i) El gen *kin2* de *Arabidopsis thaliana* codifica un polipéptido que presenta una gran similitud con una proteína anticongelante de peces. Este gen es inducible por bajas temperaturas, por ABA y por estrés hídrico y salino (Kurkela y Borg-Franck, 1992).

ii) En mesocótilos de maíz, el gen *HSP70* se induce rápidamente cuando se someten las plántulas a estrés hídrico, se tratan con ABA o se producen heridas (Heikkila *et al.*, 1984). La proteína codificada por este gen tiene similitud con la proteína de choque térmico *HSP70* de *Drosophila*.

Recientemente se ha descrito por primera vez la implicación del ABA en la respuesta a otro tipo de estrés, la anoxia. En este caso, pretratamientos con ABA confieren también mayor tolerancia del maíz a condiciones de anoxia. Como demuestran los estudios realizados por Hwang y VanToai (1992), este efecto se debe, al menos en parte, a la síntesis de nuevas proteínas inducidas por ABA.

#### 4. CAMBIOS EN LA EXPRESION GENICA INDUCIBLES POR ESTRES HIDRICO Y SALINO

La posibilidad de que los cambios en la expresión génica producidos por el ABA estén relacionados con el aumento de tolerancia de las plantas al estrés salino, hídrico y a las bajas temperaturas, ha traído consigo un gran interés por conocer los mecanismos moleculares de estas respuestas.

##### 4.1 Análisis de patrones bidimensionales

Los primeros datos sobre los cambios en la expresión génica en respuesta a estrés se obtuvieron por comparación de los patrones monodimensionales de proteínas de líneas celulares de tabaco adaptadas al NaCl con los de líneas no adaptadas (Ericson y Alfinito, 1984). Se observaron proteínas de 32 y 20 kDa más abundantes en las células adaptadas y una de 26 kDa que parecía ser exclusiva de estas células. Desde entonces, se han publicado una serie de trabajos en los que se analizan patrones electroforéticos mono- y bidimensionales de proteínas de nueva síntesis o de productos de traducción *in vitro* de plantas o cultivos celulares de distintas especies sometidas a estrés salino (Singh *et al.*, 1985; Hurkinan y Tanaka, 1987; Gulik y Dvorak, 1987; Ramagopal, 1987). El mismo tipo de análisis se ha usado para la identificación de polipéptidos inducidos por estrés osmótico y desecación en hojas de cebada (Dasgupta y Bewley, 1984), tomate (Bray, 1988 y 1990), guisante (Guerrero y Mullet, 1988) y colza (Vartanian *et al.*, 1987). Estos resultados muestran cambios específicos en la expresión génica asociados a estrés salino y desecación.

##### 4.2 Osmotina

La osmotina es una de las proteínas inducibles por sal más estudiadas. Fue originalmente descrita como una proteína de 26 kDa que se acumula en líneas

celulares de tabaco adaptadas a concentraciones de NaCl próximas a las de agua de mar (Singh *et al.*, 1985). La osmotina se acumula en cuerpos de inclusión vacuolares en células adaptadas a NaCl. Las secuencias de las proteínas del gen de la osmotina (Singh *et al.*, 1989) muestran homología con la taumatina, un inhibidor de  $\alpha$ -amilasa/tripsina de maíz y una proteína PR (*pathogenesis related*) inducida por el virus del mosaico del tabaco; estas proteínas están implicadas en las reacciones de defensa de las plantas frente a patógenos. El RNA mensajero de la osmotina se induce por una serie de señales hormonales y ambientales (ABA, salinidad, desecación, herida, etileno e infección con virus del mosaico de tabaco) en cultivos celulares y en plantas de tabaco; sin embargo, para que la proteína llegue a acumularse es necesaria la presencia de estrés hídrico o de etileno; el mecanismo de esta regulación post-transcripcional no es conocido (LaRosa *et al.*, 1992). En plantas de tomate existe una proteína de 24 kDa cuya secuencia es homóloga a la de osmotina de tabaco. Esta proteína, denominada NP24, se acumula en raíces de plantas tratadas con NaCl (King *et al.*, 1988). La regulación del promotor del gen de la osmotina se ha estudiado en plantas transgénicas de tabaco, transformadas con este promotor fusionado al gen de la  $\beta$ -glucoronidasa (GUS). El análisis histoquímico muestra que la actividad GUS se localiza en los granos de polen maduro y en el pericarpio del fruto. En plantas aclimatadas a NaCl la actividad de este promotor es muy alta en tejidos específicos de todos los órganos de la planta. En raíces, la actividad GUS está presente en las zonas de elongación, en epidermis y parénquima del cortex; en tallos, se localiza sobre todo en la epidermis y, además, en el parénquima del xilema; en hojas, en las células parenquimáticas del xilema y, sobre todo, en la punta de las hojas (Kononowicz *et al.*, 1992).

#### 4.3 Genes *Lea*

Los embriones de las plantas deben soportar un fuerte grado de desecación. Si bien la base molecular de la capacidad de sobrevivir en estado de desecación no se conoce, parece ser que los genes tipo *Lea* (*Late embryogenesis abundant*) juegan un papel importante en esta tolerancia. En plantas creciendo en ausencia de estrés, los mRNAs de genes *Lea* se encuentran exclusivamente en el embrión, y alcanzan el nivel máximo de acumulación inmediatamente antes de su desecación final; sin embargo, un número considerable de genes inducidos por estrés hídrico o salino en tejidos vegetativos corresponde a genes *Lea*. Algunos de los genes que también se inducen por estrés osmótico o desecación en tejidos vegetativos son *Em* de trigo (Marcotte *et al.*, 1988), *RAB21* de arroz (Mundy y Chua, 1988), *RAB17* de maíz (Vilardell *et al.*, 1990), dehidrinas de cebadas (Close *et al.*, 1989), *pLEA76* (Harada *et al.*, 1989) y *TAS14* de tomate (Godoy *et al.*, 1990). El mensajero *TAS14*, aislado en nuestro laboratorio, es inducido por estrés salino o tratamiento con ABA en raíces, tallos y hojas de plantas adultas; *TAS14* no responde a las bajas temperaturas ni cuando se producen heridas a la planta. Aunque la función de estas proteínas es aún desconocida, se ha sugerido, a partir del análisis de sus estructuras secundarias, que podrían estabilizar proteínas y estructuras celulares en condiciones de déficit hídrico (Baker *et al.*, 1988). El análisis de los promotores de los genes *Em* de trigo y *RAB21* de arroz ha permitido identificar elementos que responden a ABA (Marcotte *et al.*, 1989; Mundy *et al.*, 1990).

#### 4.4 Otros genes inducidos por estrés salino y desecación en especies cultivadas

En maíz se ha aislado un gen, pMAH9, inducible por ABA y por herida en hojas. La proteína codificada por pMAH9 es rica en residuos glicina y contiene los dominios característicos de las proteínas que unen RNA (Mortenson y Dreyfuss, 1989).

Se han aislado tres clones de cDNA (7a, 15a y 26g) en plántulas de guisante sometidas a deshidratación (Guerrero *et al.*, 1990). El mRNA 7a, presente en raíces de plantas no tratadas, se induce en la parte aérea de plantas por deshidratación, choque térmico y, levemente, por ABA. La secuencia del polipéptido codificado por el clon 7a presenta seis dominios transmembrana; este mismo número de motivos transmembrana aparece en las proteínas que forman los canales iónicos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ó Ca<sup>2+</sup>; el extremo carboxiterminal de la proteína correspondiente a este clon es homólogo a la nodulina-26 de soja, una proteína de la membrana peribacteroidal. Los niveles de mRNA 15a y 26g aumentan en la parte aérea de las plántulas en respuesta a estrés hídrico. La secuencia del polipéptido codificado por el clon 15a muestra homología con cistein-proteasas y la correspondiente al clon 26g con aldehído deshidrogenasas. La transcripción de estos mensajeros se induce durante los primeros 30 minutos de tratamiento, previamente al aumento detectable de ABA endógeno en las hojas deshidratadas. Al igual que otros mRNAs de inducción rápida por estrés hídrico, 15a y 26g no se inducen por la adición exógena de ABA. Dado que los aumentos de ABA dependen de cambios en la transcripción de genes, los mensajeros 15a y 26g podrían estar implicados en estos procesos que inducen la acumulación de ABA por desecación.

El gen *BnD22* de *Brassica napus* que codifica una proteína de 22 kDa se induce por aclimatación a sequía, salinidad o por tratamiento con ácido abscísico (Downing *et al.*, 1992). A diferencia de otros estudios a nivel molecular, que han analizado las respuestas a corto plazo (horas), estos autores han intentado mimetizar los periodos prolongados de estrés a los que pueden estar sometidos los cultivos. Tras dos semanas de aclimatación a sequía o salinidad, las plantas muestran cambios morfológicos (morfogénesis alterada de raíces y cambios en hojas: senescencia acelerada de hojas viejas y coloración azulada de hojas jóvenes debido al acúmulo de ceras epidérmicas), así como cambios en los patrones bidimensionales de proteínas, entre los que destaca el aumento de intensidad de la proteína *BnD22*. Esta proteína tiene homología con la familia de inhibidores de proteasas de Kunitz, aunque difiere en su patrón de expresión. Downing *et al.* sugieren que esta proteína protegería frente a las proteasas endógenas, cuya actividad aumenta durante el proceso de senescencia acelerada que se observa en hojas. El gen *BnD22*, a diferencia de los anteriormente descritos, se induce por ABA y estrés hídrico sólo en tejido vegetativo. En semillas no se detecta su expresión.

Recientemente ha aumentado el interés por el aislamiento de los genes involucrados en la ruta de síntesis de moléculas osmorreguladoras, como prolina y betaína. El gen que codifica la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), último enzima de la ruta biosintética de betaína, se ha clonado en

espinaca (Weretilnyk *et al.*, 1990) y remolacha (McCue y Hanson, 1992). Los trabajos realizados con este gen indican que en condiciones de estrés salino, la acumulación de betaína en hojas de remolacha y espinaca se correlaciona con el incremento de la actividad BADH y del nivel de mRNA de este gen.

Mediante una estrategia original, Gaxiola *et al.* (1992) han aislado un gen de plantas implicado en la respuesta a condiciones salinas. Basándose en que levaduras y plantas comparten mecanismos básicos de transporte de iones, estos autores han utilizado como modelo *Saccaromyces cerevisiae*. Las células de *Saccaromyces cerevisiae* se transformaron con una genoteca construida en un plásmido multicopia. Utilizando como medio de selección un medio de cultivo con alto contenido en NaCl, se aislaron transformantes resistentes que debían su tolerancia a la sobreexpresión del gen *HALI*. Este gen codifica una proteína de 32 kDa y su secuencia no presenta homología con las secuencias recogidas en las bases de datos. El gen *HALI* está conservado en plantas y se induce por NaCl y ABA. *HALI* parece estar implicado específicamente en tolerancia al ion Na<sup>+</sup>. Las células que sobreexpresan *HALI* acumulan más K<sup>+</sup> en presencia de altas concentraciones de NaCl, ésto contribuye a mantener una relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> intracelular por debajo de los valores descritos como tóxicos; hay que tener en cuenta que en levaduras el ion Na<sup>+</sup> resulta tóxico solamente cuando la relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> supera cierto valor (Camacho *et al.*, 1981). Estos resultados concuerdan con los previamente descritos sobre la correlación existente entre la mayor incorporación de K<sup>+</sup> y la tolerancia a sal en cultivos celulares de tabaco (Watad *et al.*, 1990) y tomate (Rush y Epstein, 1981). Hasta el momento este es el único gen descrito que se induce por estrés salino pero no por estrés osmótico, indicando que su inducción se debe a efectos iónicos.

#### 4.5 Genes inducidos por estrés salino en especies halófitas o adaptadas a desecación

La especie tolerante a sal *Lophopyrum elongatum*, filogenéticamente relacionada con variedades cultivadas de trigo, se ha estudiado por su utilidad como fuente potencial de genes para obtener variedades de trigo más tolerantes a estrés salino. Recientemente se han aislado 11 genes de esta especie, utilizando como criterio su alto nivel de expresión en raíces sometidas durante 6 horas a estrés salino. De estos 11 genes, el único que presenta similitud con secuencias conocidas es *ESI18*, que es homólogo a genes tipo Lea, (*RAB21* de arroz, *D11* de algodón y dehidrasas de cebada). Los genes aislados se inducen por NaCl y su expresión es transitoria. Los niveles de acumulación máximos ocurren entre 2 y 24 horas después del inicio del tratamiento, por lo que se les ha denominado genes *ESI* (*early salt stress induced*) (Gulick y Dvorák, 1992).

En la familia Aizoaceae existen especies halófitas facultativas que presentan metabolismo CAM en respuesta a déficit hídrico; entre ellas, la especie mejor estudiada es *Mesembryanthemum crystallinum*. El cambio a metabolismo CAM implica la inducción de mRNAs que codifican las enzimas involucradas en la fijación nocturna de CO<sub>2</sub> y la síntesis de malato y otros ácidos de 4 carbonos. (Ostrem *et al.*, 1990). La actividad enzimática fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), que es clave en esta ruta, es 40 veces mayor en hojas

estresadas. Este aumento de actividad esta correlacionado con un mayor nivel de transcripción del gen *Ppchl* que codifica esta enzima (Cushman *et al.*, 1989). Recientemente se han caracterizado los factores que median la activación de la transcripción de *Ppchl* y las secuencias en *cis* que interaccionan con estos factores (Cushman y Bohnert, 1992). El cambio a metabolismo CAM es una estrategia de adaptación a largo plazo; se detecta en la planta después de 1 ó 2 semanas en condiciones salinas.

En *Mesembryanthemum crystallinum* se ha aislado también un gen de inducción temprana, *Imt1*, que codifica una enzima responsable de la síntesis del polialcohol cíclico pinitol a partir del *myo*-insitol (Vernon y Bohnert, 1992). Este alcohol que también está presente en otras especies de plantas, bacterias y algas tolerantes a sal, tiene un papel osmorregulador similar al de la prolina y betaína

La planta de resurrección *Craterostigma plantagineum* es un modelo muy apropiado para estudiar la respuesta, a nivel molecular, al estrés hídrico. Puede llegar a perder hasta el 99% de su contenido en agua y ser viable después de su rehidratación. El proceso de desecación va acompañado de la inducción de un grupo de mRNAs específicos. Algunos de estos genes presentan homología con genes *Lea*; esto indica que los embriones de plantas superiores y las plantas de resurrección comparten al menos algunos mecanismos de resistencia a desecación. *dsp-22* es otro gen de *Craterostigma plantagineum* inducible por desecación; codifica una proteína de 22 kDa que se localiza en cloroplastos. El gen *dsp-22* presenta homología con proteínas *Elip* (*early light inducible protein*) que se inducen al pasar la planta de la oscuridad a la luz (Bartels *et al.*, 1992).

## 5. LA RESPUESTA A ESTRES ESTA CONTROLADA POR VARIAS RUTAS DE INDUCCION INDEPENDIENTES

Los numerosos datos acerca de la inducción de genes por condiciones de estrés y por la adición de ABA, así como los obtenidos con plantas mutantes en el metabolismo de esta hormona, permiten analizar el papel del ABA en la respuesta global a salinidad.

El gen *lti 140* de *Arabidosis thaliana* codifica una proteína de 140 kDa que no presenta homología con proteínas conocidas y es inducible por tratamiento con ABA, estrés hídrico y por frío (Nordin *et al.*, 1991). El nivel máximo de mRNA se alcanza tras 9 horas de exposición de la planta a bajas temperaturas. Se ha estudiado la inducción de este gen en mutantes de *Arabidosis thaliana* deficientes en la síntesis de ABA (*aba-1*) e insensibles a ABA (*abi-1*). Cuando los mutantes *aba-1* y *abi-1* se someten a bajas temperaturas, se observa inducción del mensajero a niveles similares a los observados en plantas silvestres; estos datos indican que la inducción de *lti 140* por bajas temperaturas es independiente de la inducción por ABA. Los datos obtenidos mediante tratamientos con fluridona, un inhibidor de ABA, apoyan estos resultados. El hecho de que las bajas temperaturas y la adición simultánea de ABA no tengan

un efecto acumulativo sobre el nivel de inducción de *lti 140* indicaría que existen elementos comunes en las dos vías de inducción. En plantas que no sintetizan o son insensibles a ABA, el mensajero *lti140* se induce por estrés hídrico, si bien el nivel de acumulación es ligeramente inferior al detectado en plantas silvestres sometidas a las mismas condiciones. Este mensajero se detecta en estos mutantes, aunque no aumente el nivel endógeno de ABA, sugiriendo que la inducción de *lti 140* por estrés hídrico está mediada sólo parcialmente por ABA. En conjunto, estos datos indicarían que la inducción del gen *lti 140* está controlada por tres rutas independientes pero convergentes, como se esquematiza en la figura 1 (Nordin *et al.*, 1991).

Las rutas de inducción descritas por Nordin *et al.* (1991) no son extrapolables a todos los genes relacionados con el estrés hídrico descritos hasta la fecha. Existen grandes diferencias en cuanto a su inducibilidad por estrés hídrico/salino y por ABA. La hipótesis más probable es que el conjunto de genes asociados al estrés hídrico/salino estén sometidos a distintos circuitos regulatorios que los inducidos por ABA. Se compara a continuación la respuesta de algunos genes al estrés hídrico/salino y al ABA.

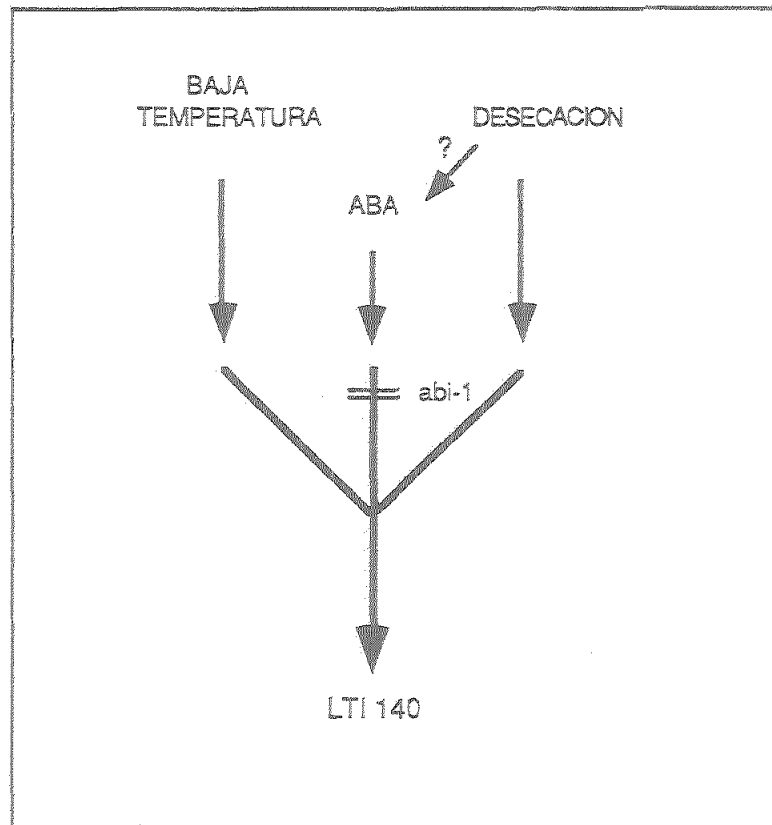


Figura 1. Representación esquemática de las rutas de inducción del gen *lti 140*, según Nordin *et al.*, 1991.

i) La comparación de los patrones bidimensionales de proteínas del mutante *flacca* de tomate (deficiente en síntesis de ABA) y del tipo silvestre,

muestra que las proteínas inducibles por estrés hídrico se sintetizan también en el mutante, aunque a niveles más bajos, indicando que la mediación de ABA no es necesaria para su inducción; sin embargo, a diferencia del gen *lri 140*, la inducción de otras proteínas, presentes en estos patrones, es estrictamente dependiente de ABA. Recientemente se han aislado y caracterizado tres genes de tomate que presentan esta dependencia de ABA (Cohen y Bray, 1990).

ii) En *Mesembryanthemum crystallinum* se ha comparado el efecto de tratamientos con NaCl, ABA y citoquininas sobre el nivel de acumulación de prolina y de PEPC, dos parámetros asociados a la respuesta adaptativa a estrés salino (Thomas *et al.*, 1992). En esta especie no es necesario el aumento del nivel endógeno de ABA para que la planta acumule prolina y PEPC.

iii) Espelund *et al.*, (1992) describen la caracterización de tres cDNAs de cebada, tipo LEA, que responden diferencialmente a ABA, manitol, estrés salino y frío.

Estos estudios apoyan la hipótesis de que no existe una ruta común, mediada por ABA, de las respuestas a distintos tipos de estrés, sino varias vías independientes de transducción de señal.

## 6. PAPEL DE LOS LIPIDOS EN LA RESPUESTA A ESTRES SALINO

El gen TSW12 que se describe en este trabajo codifica una proteína que tiene gran semejanza con proteínas transferentes de lípidos. Aunque la función *in vivo* de estas proteínas no se conoce, se ha creído conveniente mencionar los resultados más significativos sobre el papel de los lípidos en plantas sometidas a estrés salino/hídrico y bajas temperaturas.

Los lípidos son componentes esenciales de las membranas. La selectividad en la absorción de iones por las células de la raíz o la capacidad de acumularlos en el interior de la vacuola dependen en gran medida de propiedades físicas de las membranas, como ya se ha mencionado. Además, la actividad de las proteínas de membrana depende en gran parte del microambiente lipídico en el que se encuentran. Por tanto, la composición lipídica de los distintos tipos de membranas celulares está estrictamente regulada, siendo uno de los factores condicionantes la concentración iónica del medio.

Además de su papel como componentes fundamentales de las membranas, los lípidos llevan a cabo gran variedad de funciones importantes en las plantas. Por ejemplo, pueden funcionar como sustancias de reserva de las semillas, como componentes de las cubiertas protectoras de cera, suberina o cutina e incluso como moléculas transductoras de señales, (por ejemplo, en el caso del fosfatidil inositol bifosfato, PIP<sub>2</sub>) (Einspahr *et al.*, 1989).

El papel de los lípidos en la respuesta a estrés salino apenas se ha estudiado; muchos de los datos que se tienen acerca de la influencia de los lípidos en la tolerancia a sal se basan en estudios realizados *in vitro* con membranas de distinta composición lipídica. En cambio, es bien conocida la

correlación entre la sensibilidad a frío de distintas especies y el grado de saturación de los ácidos grasos de la membrana. Recientemente se ha conseguido aumentar la tolerancia a sal de plantas transgénicas de tabaco transformadas con el gen glicerol-3 fosfato aciltransferasa; este gen codifica una enzima del cloroplasto que determina el nivel de insaturación de los ácidos grasos del fosfatidilglicerol (Murata *et al.*, 1992)

La manifestación ultraestructural más clara de las células vegetales tras ser sometidas a estrés salino es la formación de vesículas e invaginaciones de la membrana citoplasmática y del retículo endoplasmático, con lo que se consigue aumentar la superficie y regular más eficientemente el flujo de iones en la célula.

La composición cuantitativa y cualitativa de esteroides libres, típicos de la membrana citoplasmática y del tonoplasto, incide en la estabilidad y en la permeabilidad de la membrana. Los esteroides presentes en las membranas de la mitocondria y del núcleo suelen estar esterificados y no estabilizan la membrana. Las membranas reducen su permeabilidad al aumentar su contenido de esteroides (Grünwald, 1968). En correlación con estos datos, un nivel alto de esteroides en las membranas de tejidos vegetativos parece contribuir a la tolerancia a sal en plantas. En variedades de pomelo que difieren en su tolerancia a sal, el contenido de esteroides libres es mínimo en la variedad menos resistente (Kuiper, 1968). Observaciones similares se han hecho en estudios comparativos de otras especies (pomelo, judía, cebada y remolacha) (Stuiver *et al.*, 1978). Del estudio realizado por Grünwald (1968) sobre el papel de los esteroides en la permeabilidad e integridad de la membrana se concluye que el colesterol y el estigmasterol son las moléculas más efectivas en mantener la estabilidad de la membrana, mientras que el sitosterol tiene menor capacidad estabilizadora. En variedades de Citrus que difieren en su tolerancia a sal se ha observado que la relación sitosterol/estigmasterol disminuye en condiciones salinas, siendo este efecto más acusado en las variedades más tolerantes (Douglas y Walker, 1983). Estos datos indican claramente que la regulación en el metabolismo de los esteroides es crítica en la permeabilidad de las membranas.

Los fosfolípidos, como fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol o fosfatidiletanolamina son el principal componente lipídico de la membrana. En medio acuoso, estas moléculas forman espontáneamente bicapas que son impermeables a moléculas polares debido a la relación entre el tamaño de sus grupos polares y de sus colas apolares. Los glucolípidos, sin embargo, se organizan en cilindros hexagonales con las cabezas polares dirigidas hacia el interior, formando estructuras mucho más accesibles al paso de iones. El nivel de fosfolípidos en los tejidos de algunas especies aumenta significativamente en condiciones salinas (Chetal *et al.*, 1980); también se ha observado que el grado de insaturación de los ácidos grasos que esterifican los fosfolípidos disminuye en presencia de altas concentraciones de sal (Stuiver *et al.*, 1981). Sin embargo, estos cambios en la composición de fosfolípidos no son, en general, muy notables. En contraste con los fosfolípidos, el contenido en glucolípidos se reduce drásticamente en condiciones salinas; estos cambios podrían contribuir de forma considerable al control de la permeabilidad de la membrana, al disminuir el número de estructuras permeables a iones (Müller y Santarius, 1978; Harzallah-Shkiri *et al.*, 1982).



# MATERIAL Y METODOS

---

## 1. REACTIVOS

### 1.1 Productos químicos

En general, se han utilizado reactivos procedentes de las firmas Merck (Darmstadt, RFA), Sigma Chemical Co. (St. Louis, EEUU), Serva (Heidelberg, RFA) y Panreac (Barcelona, España).

### 1.2 Productos radioactivos

L-[<sup>35</sup>S]-metionina (>800 Ci/nmol) y <sup>32</sup>P<sub>04</sub><sup>3-</sup> de New England Nuclear.  
[α-<sup>32</sup>P]dCTP (3.000 Ci/nmol) y [α-<sup>35</sup>S]dATPαS (>600 Ci/nmol) de Amersham.

### 1.3 Enzimas

En general, las enzimas utilizadas procedían de las firmas Boheringer Mannheim GmbH, Promega Biotech y Pharmacia.

### 1.4 Kits

Kit marcaje radioactivo de DNA: Boheringer Mannheim GmbH. Kit secuenciación: Boheringer Mannheim GmbH.

### 1.5 Anticuerpos

Como anticuerpos secundarios se utilizaron: Anti Rabbit IgG HRP Conjugate (Amersham) y Anti Rabbit IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate (Sigma).

## 2. MATERIAL BIOLÓGICO.

### 2.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) var. Rutgers-Marglobe, de Semillas Batlle S.A., Barcelona.

#### 2.1.1 Esterilización de semillas

Previamente a la germinación, la superficie de las semillas se esterilizó mediante lavados sucesivos en etanol 96% (30 s), en hipoclorito sódico 2% (20 minutos), y finalmente en agua destilada estéril. Tras 24 horas de imbibición en agua las semillas se colocaron sobre papel de filtro autoclavado y saturado con agua destilada estéril y se incubaron a 25°C en la oscuridad.

### 2.1.2 Cultivo hidropónico

Plántulas con cotiledones expandidos se colocaron en fiambreras con las raíces sumergidas en solución nutritiva de Hoagland II (Jones, 1982), diluida a la mitad, y se cultivaron en cámaras con luz y humedad controladas, bajo un régimen de 16 horas de luz y 8 de oscuridad con temperaturas de 25°C y 18°C, respectivamente.

#### Solución nutritiva de Hoagland II

Macronutrientes: 1 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 6 mM  $\text{KNO}_3$ , 4 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ .

Micronutrientes: 46.25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 9.15  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.76  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.32  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.11  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

Solución de hierro: 10 ppm Sequestrene® (Ciba Geigy).

### 2.2 Bacterias

Las estirpes de *Escherichia coli* NM522 y XL1-Blue se usaron indistintamente para la transformación con plásmidos y la multiplicación de éstos. POP13 se usó como hospedador del fago lambda NM1149. POP2136 se usó para la propagación de los plásmidos de la serie pEX y para la síntesis termoinducida de proteínas de fusión.

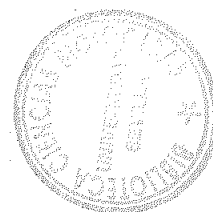
Las bacterias se cultivaron en medio LB. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos, el medio se suplementó con 100 mg/L de ampicilina. Las estirpes de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo y sus genotipos se muestran en la tabla 1.

#### Medio LB

10 g/L bactotripton, 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L NaCl.

Estirpe	Genotipo	Referencia
NM522	<i>D(lac-proAB), thi, hsdD5, supE, [F', proAB, lacIqZDM15], l-</i>	Gough y Murray, 1983
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacIqZDM15, Tn10 (tetR)]</i> .	Bullock et al., 1987.
POP13	<i>lyc7</i>	Murray, 1983
POP2136	Derivada de MM294 ( <i>F-</i> , <i>endA</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR</i> ) por integración del fragmento Bgl II de 2.4 kb del bacteriófago lambda, que lleva el alelo <i>C1857</i> en el cromosoma	Raibaud, 1985.

Tabla 1. Relación de estirpes de *Escherichia coli* usadas en este trabajo.



## 2.3 Bacteriófagos

### 2.3.1 Propagación de los bacteriófagos $\lambda$ NM1149 sobre las bacterias hospedadoras POP13

1. Inocular una colonia en medio LB suplementado con 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 0.2% maltosa y cultivar durante la noche a 37°C. A la mañana siguiente, se mide la DO<sub>600</sub> del cultivo, las células se sedimentan por centrifugación (1000 g, 4°C) y se resuspenden en 10 mM MgSO<sub>4</sub> (4°C) a una concentración de 10<sup>10</sup> células/ml. Las células se almacenan a 4°C durante 1 semana como máximo. Para obtener calvas sobre medio sólido, se mezclan 30  $\mu$ l de las células preparadas para infección con la suspensión de fagos, se incuba la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente, se mezclan con 3-4 ml de agarosa de cobertera a 42°C y se extiende sobre una caja Petri conteniendo medio LB suplementado con 10 mM MgSO<sub>4</sub>. La caja se incuba a 37°C durante la noche o hasta que las calvas alcancen el tamaño deseado.

#### Agarosa de cobertera

10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.6% agarosa.

## 2.3 Vectores

El bacteriófago lambda NM1149 (Murray, 1983) se usó para la construcción de la clonoteca de cDNA. Los plásmidos pGEM7+ (Promega Biotech) y pBluescript II SK (+) y (-) (Stratagene Cloning Systems) se usaron para la clonación y secuenciación de los fragmentos de cDNA seleccionados. El plásmido pEX1 (Boehringer) se usó para la expresión heteróloga de proteínas en bacterias.

## 3. ANALISIS DE PROTEINAS

Los estudios de proteínas han consistido esencialmente en el análisis por electroforesis bidimensional de extractos complejos de proteínas, frías y marcadas con L-[<sup>35</sup>S]-metionina.

### 3.1 Marcaje *in vivo* de proteínas con L-[<sup>35</sup>S]-metionina

Para estudiar los cambios en la síntesis proteica, las proteínas de nueva síntesis se marcaron con <sup>35</sup>S mediante incubación con L-[<sup>35</sup>S]-metionina (>800 Ci/mmol). Para el marcaje de germinulas, grupos de 6-12 germinulas en el mismo estadio de desarrollo se colocan en una caja de Petri con las radículas sumergidas en 100  $\mu$ l de solución de tratamiento conteniendo 200 mCi/ml de L-[<sup>35</sup>S]-metionina y se incuban en la oscuridad a 25°C durante 2 horas. Transcurrido el periodo de marcaje las radículas se lavan en agua, se sumergen en N<sub>2</sub> líquido y se guardan a -80°C.

### 3.2 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras analizadas por electroforesis mono- o bidimensional se determinó en el tampón de electroforesis correspondiente, siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Bensadoun y Weinstein (1976).

1. A partir de un *stock* de BSA en el tampón de extracción correspondiente (1mg/ml), se prepara una serie de tubos que contienen de 5 a 50  $\mu$ g de BSA/tubo para construir la curva patrón.
2. Añadir 5  $\mu$ l de cada muestra a un tubo eppendorf.
3. Llevar a 0.6 ml de volumen final con H<sub>2</sub>O.
4. Añadir 5  $\mu$ l de 2% deoxicolato sódico. Agitar e incubar 15 minutos (t.a.).
5. Añadir 200  $\mu$ l de 24 % TCA, agitar y centrifugar (6500 rpm, 30 minutos, t.a. en microcentrífuga de mesa).
6. Retirar completamente el sobrenadante.
7. Resuspender el precipitado con agitación fuerte en 1.4 ml de reactivo D.
8. Añadir 100  $\mu$ l de reactivo Folin-Ciocalteus (Merck) diluído 1:1 en H<sub>2</sub>O.
9. Leer a DO<sub>660</sub>.

#### REACTIVO C

CO <sub>3</sub> Na	20 g
Tartrato NaK 2%	10 ml
NaOH 16N	6.2 ml

Disolver en primer lugar el CO<sub>3</sub>Na en 900 ml de H<sub>2</sub>O. Añadir los demás componentes y completar hasta 1 L.

#### REACTIVO D

Añadir 0.5 ml de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O al 1.4% por cada 50 ml de reactivo C. Preparar inmediatamente antes de la cuantificación.

### 3.3 Cuantificación de la radioactividad incorporada a proteína

La radioactividad incorporada a proteína presente en los extractos fue estimada como sigue. A 3  $\mu$ l de extracto se le añade 1 ml de TCA 10% (4°C) y la mezcla se incuba durante 15 minutos en hielo, seguido de 15 minutos a 100°C. La mezcla se filtra a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C), el filtro se lava tres veces con 5 ml de TCA 5% y una vez con 5 ml etanol absoluto. Una vez seco, el filtro se incluye en un vial de conteo, se añaden 10 ml de líquido de centelleo (ReadyProt, Beckman) y se leen las cuentas por minuto en un contador de centelleo líquido.

### 3.4 Sistemas de detección de proteínas

Las proteínas separadas en los geles mono o bidimensionales fueron detectadas por tinción con Azul de Coomassie o, en el caso de extractos marcados radioactivamente, mediante fluorografía y autorradiografía.

3.4.1 Tinción con Azul de Coomassie.; Inmediatamente después de la electroforesis, los geles se incuban durante 30 minutos en una solución de Azul de Coomassie al 0.05% en 50% metanol, 10% ácido acético. Posteriormente, se destiñen en 40% metanol, 10% ácido acético hasta que el fondo pierde el color azul.

3.4.2 Fluorografía.; Para la detección de proteínas marcadas con <sup>35</sup>S, los geles se fluorografiaron por el método descrito por Bonner y Laskey (1974). Los geles se incuban dos en DMSO (20 minutos), en 12% PPO disuelto en DMSO (3 horas) y H<sub>2</sub>O (15 minutos). Finalmente, los geles se secan a 60°C al vacío en un secador de geles y se exponen en contacto con una película radiográfica a -80°C.

### 3.5 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Para la separación de proteínas por electroforesis bidimensional se siguió el método de O'Farrel (1975) con las modificaciones descritas por Rodrigo Bravo (Bravo, 1984). En el gel de primera dimensión las proteínas se sitúan en función de su carga neta en un gel de acrilamida cilíndrico. Para ello, se extraen las proteínas en presencia de un detergente no iónico. La separación de proteínas de punto isoeléctrico ácido (en el rango de 4-7) se realiza mediante isoelectroenfoque (IEF); las proteínas de punto isoeléctrico entre 7 y 9 se resuelven mediante NEpHGE (electroforesis de gradiente de pH no equilibrado). En la electroforesis de segunda dimensión las proteínas se separan en función de su peso molecular en un gel de acrilamida/SDS.

#### 3.5.1 Extracción de proteínas

1. Pulverizar el material biológico en N<sub>2</sub> líquido mediante presión con una varilla de vidrio en un tubo eppendorf.
2. Añadir tampón de lisis y agitar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Retirar el material insoluble mediante centrifugación.
4. El extracto puede conservarse a -80°C hasta realizar la electroforesis.

#### 3.5.2 Electroforesis de primera dimensión

##### GELES IEF

1. Polimerizar la mezcla del gel en tubos de cristal de 1.5 mm de diámetro interior y 18 cm de longitud, dejando 3 cm del tubo sin llenar.
2. Añadir a la parte superior del gel polimerizado 10 µl de tampón de lisis y 10 µl de tampón de recubrimiento sin que se mezclen. Completar hasta el borde del tubo con 20 mM NaOH.
3. Llenar la cámara superior del equipo de electroforesis con 20 mM NaOH desgaseada previamente y conectar el electrodo negativo. Llenar la cámara inferior con 10 mM PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub> y conectar el electrodo positivo.
4. Precorrer el gel aplicando:
  - 200 V durante 15 minutos.
  - 300 V durante 30 minutos.
  - 400 V durante 60 minutos.
5. Retirar las soluciones de la parte superior del gel, lavar con H<sub>2</sub>O, cargar la muestra y añadir de nuevo 10 µl de tampón de recubrimiento y de NaOH 20 mM.
6. Aplicar 400 V durante 16 horas.
7. Extraer los geles de los tubos, incubarlos en tampón de equilibrado durante 10 minutos. Se pueden almacenar a -80°C hasta correr la segunda dimensión.

##### GELES NEpHGE

1. Polimerizar la mezcla del gel correspondiente en los tubos.
2. Añadir a la parte superior del gel polimerizado la muestra y 10 µl de tampón de recubrimiento sin que se mezclen. Completar hasta el borde del tubo con 10 mM PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub>.
3. Invertir los electrolitos y electrodos respecto al isoelectroenfoque: llenar la cámara superior del equipo de electroforesis con 10 mM PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub> desgaseado previamente y conectar el electrodo positivo. Llenar la cámara inferior con 20 mM NaOH y conectar el electrodo negativo.

4. Correr el gel, manteniendolo a 15°C, aplicando:

- 100 V durante 15 minutos.
- 200 V durante 15 minutos.
- 300 V durante 15 minutos.
- 400 V durante 4 horas y 15 minutos.

5. Extraer los geles de los tubos y proceder igual que con los geles IEF.

Tampón de lisis

- 9.8 M urea
- 2% (p/v) NP-40
- 2% anfólitos pH 7-9
- 100 mM DTT

Tampón de recubrimiento

- 8 M urea
- 5% (p/v) NP-40
- 1% anfólitos pH 7-9
- 5% 2-mercaptoetanol

Mezcla de geles

	<u>Gel IEF (10 ml)</u>	<u>Gel NEpHGE (10 ml)</u>
Urea (g)	5.5	5.5
Solución <i>stock</i> acrilamida (ml)	1.3	1.3
10% NP-40 (ml)	2.0	2.0
H <sub>2</sub> O (ml)	1.7	2.0
Anfólitos pH 5-7 (ml)	0.12	-
Anfólitos pH 3-10 (ml)	0.24	-
Anfólitos pH 7-9 (ml)	-	0.25
Anfólitos pH 8-9.5 (ml)	-	0.25
TEMED (μl)	7	10.5
10% persulfatoamónico (μl)	10	15

Solución *stock* de acrilamida (1ª dimensión)

- 28.38% acrilamida (Bio-rad)
- 1.62% bis-acrilamida

Tampón de equilibrado

- 0.06 M Tris-HCl pH 6.8
- 2% SDS
- 5% 2-mercaptoetanol
- 10% glicerol

**3.5.3 Electroforesis de segunda dimensión**

1. Dejar polimerizar la mezcla del gel de separación (160 x 160 x 1.5 mm).
2. Sobre este gel, verter la mezcla de gel de empaquetamiento (20 x 160 x 1.5 mm) y polimerizar.
3. Colocar el gel de la primera dimensión (IEF o NEpHGE) y aplicar 14 mA/gel, refrigerando a 12°C.

4. Parar la electroforesis cuando el azul de bromofenol alcanza el borde del gel.

Gel de separación 15% (50 ml)

Stock de acrilamida 2 <sup>a</sup> dimensión	25 ml
SDS 10%	0.5 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	12.5 ml
H <sub>2</sub> O	11.75 ml
TEMED	10 µl
10% APS	0.25 µl

Gel de empacquetamiento 4% (10 ml)

Stock de acrilamida 2 <sup>a</sup> dimensión	1.33 ml
SDS 10%	100 µl
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	2.5 ml
H <sub>2</sub> O	6.1 ml
TEMED	10 µl
10% APS	50 µl

Stock acrilamida 2<sup>a</sup> dimensión

30% acrilamida  
0.15% bisacrilamida

Tampón de electroforesis 5x

Tris 30.3 g/l  
Glicina 144 g/l  
Llevar a 0.1% SDS al diluir a tampón 1x.

### 3.6. ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL PARA PROTEINAS DE BAJO PESO MOLECULAR

Se siguió el protocolo de Schägger *et al.* (1987), que incluye la utilización de tricina en lugar de glicina como ión catódico, permitiendo la resolución de proteínas de bajo peso molecular en geles con un porcentaje de acrilamida relativamente bajo. La separación de proteínas es óptima en el rango de 1 a 70 kDa.

#### 3.6.1 Extracción de proteínas

1. Añadir el tampón de muestra al material triturado en presencia de N<sub>2</sub> líquido e incubar 30 minutos a 40°C con agitación ocasional.
2. Retirar el material insoluble por centrifugación.
3. Guardar el extracto a -20°C. Calentar a 40°C antes de cargar la muestra.

En muestras ricas en pigmentos (tallos y hojas), éstos pueden interferir en la electroforésis, por lo que se retiran previamente siguiendo el protocolo de Daivernal (1986).

1. Añadir una solución de 10% TCA, 0.07% β-mercaptoetanol en acetona al material triturado en presencia de N<sub>2</sub> líquido e incubar a -20°C durante 45 min.
2. Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 min.



3. Resuspender el precipitado con 0.07%  $\beta$ -mercaptoetanol en acetona e incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante una hora.
4. Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 min. Repetir los pasos 4 y 5 dos veces.
5. Secar el precipitado al vacío y resuspender en el tampón de muestra. Continuar la extracción en el tampón de muestra.

Tampón de muestra

Glicerol	12% (p/v)
SDS	4%
Tris-HCl, pH 6.8	50 mM
$\beta$ -mercaptoetanol	2% (v/v)
Azul Coomassie	0.05%

Gel de separación 16% (15 ml)

Stock acrilamida	5 ml
3M Tris, pH 8.45	5 ml
Glicerol	2 g
SDS 10%	150 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	hasta 15 ml
10% APS	50 $\mu\text{l}$
TEMED	5 $\mu\text{l}$

Gel de empaquetamiento 3.8 % (6.25 ml)

Stock acrilamida	0.5 ml
3M Tris, pH 8.45	1.55 ml
SDS 10%	46.5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	4.15 ml
10% APS	50 $\mu\text{l}$
TEMED	5 $\mu\text{l}$

Solución Stock de acrilamida

Acrilamida	48%
Bisacrilamida	1.5%

Tampón catódico 5x

Tris	0.5 M
Tricina (Merck)	0.5 M
Llevar a 0.1% SDS al diluir a tampón 1x.	

Tampón anódico

Tris-HCl pH 8.9	0.5 M
-----------------	-------

Condiciones de electroforesis

Correr la electroforesis a 125 V, refrigerando a  $4^{\circ}\text{C}$  (geles de 5.7 x 8.3 cm). En el caso de geles de 18 x 18 cm, correr durante toda la noche a 12 mA.

**4. AISLAMIENTO DE CLONES A PARTIR DE UNA CLONOTECA DE cDNA**

Para el aislamiento de clones por hibridación diferencial se utilizó una clonoteca de cDNA consruída en el vector  $\lambda$  NM1149.

#### 4.1 Transferencia de DNA de bacteriófagos a membranas de nitrocelulosa

1. Los bacteriófagos recombinantes se siembran en cajas de Petri de 9 mm  $\varnothing$  a una densidad de 500-1000 ufp/caja.
2. Las calvas se dejan crecer a 37°C hasta que alcanzan 1 mm de diámetro y se incuban 15 minutos a 4°C para endurecer la agarosa.
3. Los fagos se transfieren a membranas de nitrocelulosa colocando una membrana sobre el césped celular, evitando que queden burbujas entre el filtro y el césped. Los bacteriofagos se dejan adsorber durante 3 minutos, durante los cuales, los filtros se perforan en varios sitios distribuidos asimétricamente por la caja; los sitios de perforación se señalan sobre la caja con puntos de tinta. Las perforaciones sobre el filtro y las marcas en la caja permitirán recolocar el filtro en la misma posición después de la autorradiografía. Después de la adsorción, los filtros se retiran con pinzas, evitando desprender la agarosa. La caja puede volver a ser utilizada para conseguir una segunda réplica.

#### 4.2 Procesamiento de las membranas

El DNA adsorbido sobre las membranas se desnaturaliza y fija *in situ* colocando la membrana sobre papel de filtro empapado en 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl durante 10 minutos. Posteriormente, la membrana se traslada a papel de filtro empapado en 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 3 M NaCl, para su neutralización. Una vez secadas al aire, las membranas son incubadas a 80°C durante 2 horas, con lo que el DNA queda fijado permanentemente a la membrana.

#### 4.3 Preparación de sondas radioactivas de cDNA

Para el escrutinio por hibridación diferencial, las membranas se hibridan con fragmentos radioactivos de cDNA sintetizados a partir de poblaciones complejas de RNA. La reacción de marcaje es similar a la de síntesis de la primera cadena de cDNA; sin embargo, en este caso la cantidad de isótopo usada es mayor y el cebado de la retrotranscriptasa se realiza con hexanucleótidos al azar. En un volumen final de 30 ml se mezclan: 0.2 mg de RNA poliadenilado, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dTTP, 0.01 mM dCTP, 50 mCi <sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol), 100 mg/ml poli-d(N)<sub>6</sub>, 100 mg/ml BSA, 200 U MMLV-RT (Gibco-BRL). La reacción se lleva a cabo a 37°C durante 1 hora y se para con 3 ml EDTA 0.5 M. Tras añadir 10 mg de DNA de esperma de salmón como carrier, el RNA se hidroliza con 35  $\mu$ l de NaOH 0.6 M incubando a 65°C durante 30 minutos. La mezcla se neutraliza con 10  $\mu$ l de ácido acético 2 M y se pasa por una columna de Sephadex G-50 tras llevar el volumen a 100  $\mu$ l con TE, para separar los nucleótidos no incorporados. La radioactividad incorporada se determina a partir de una alícuota del eluido.

#### 4.4 Hibridación

Las membranas con el DNA fijado se hibridan con la sonda de cDNA. En primer lugar las membranas se prehibridan para bloquear los lugares de fijación inespecífica de DNA en la membrana.

Esto se realiza incubando las membranas durante dos horas en solución de prehibridación a 68°C. Una vez concluida la prehibridación, se sustituye la solución de prehibridación por la solución de hibridación a la que se añade la sonda de cDNA, que previamente se desnaturaliza durante 10 minutos a 100°C y se pasa inmediatamente a hielo. La incubación con la sonda se realiza durante 18 horas a 68°C. Las incubaciones se realizaron en recipientes de plástico circulares de diámetro ligeramente mayor al de los filtros, cerrados herméticamente e incluidos a su vez en recipientes mayores que contenían papel de filtro empapado en agua; de esta forma se intentaba uniformizar la temperatura del primer recipiente, evitando condensaciones en la tapa. Los volúmenes de solución usados eran de 20 ml para cada 10 membranas, evitando siempre apilar más de 10 membranas en un mismo recipiente. Después de la hibridación, las membranas se lavan sucesivamente durante periodos de 20 minutos en SSPE 2x, 0.1% SDS; SSPE 1x, 0.1% SDS; y dos veces en SSPE 0.2x, 0.1% SDS. Todos los lavados se realizan a 68°C en volúmenes grandes (200-300 ml), evitando en todo momento que las membranas queden secas. Una vez lavadas, las membranas se secan al aire y se exponen a película radiográfica a -80°C con señales de tinta radioactiva que permitan la orientación de la película sobre los filtros.

#### Solución de prehibridación

SSC x6, 0.2% ficol 400, 0.2% PVP, 0.1% SDS. Inmediatamente antes de su uso se añade DNA de esperma de salmón, desnaturalizado por calor, a una concentración final de 100 µg/ml.

#### Solución de hibridación

SSC x3, 0.2% ficoll 400, 0.2% PVP, 0.1% SDS. El DNA de esperma de salmón se añade igual que a la solución de prehibridación.

#### 4.5 Selección de mRNAs expresados diferencialmente

La hibridación de réplicas de una misma caja con sondas de cDNA correspondientes a dos situaciones fisiológicas distintas permite el aislamiento de clones que se expresan diferencialmente, por comparación de la intensidad de señal radioactiva correspondiente a cada calva con una y otra sonda. Los clones que muestran una hibridación diferencial se seleccionan y se recomprueban. Para ello se aíslan las calvas correspondientes de las cajas aspirando con una pipeta Pasteur. El fago es eluido en 0.5 ml de tampón SM saturado con cloroformo y resembrado en caja a una densidad menor (100-200 ufp) y se repite la hibridación. Este proceso se repite hasta aislar un unico tipo de fago.

### 5. MANIPULACION DE DNA

#### 5.1 Purificación de plásmidos bacterianos

Básicamente se ha seguido el método de la lisis alcalina, descrito por Birboim y Doly (1979). A continuación se describe el procedimiento para volúmenes de 1.5 ml de cultivo. Las células en 1.5 ml de cultivo en fase estacionaria se recogen en un tubo eppendorf por centrifugación (14.000 rpm, 30 segundos en microcentrífuga). Una vez eliminado el sobrenadante completamente, se resuspende el sedimento en 100 µl de solución I y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.

A continuación se añaden 200  $\mu$ l de solución II, se mezcla por inversión y se incuba 5 minutos en hielo. Después, se añaden 150  $\mu$ l de 3 M acetato potásico pH 4.8, se mezcla en vortex y se incuba 5 minutos en hielo. La mezcla se centrifuga (14000 rpm, 5 minutos), el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se extrae con 1 volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1). Tras centrifugar durante 5 minutos, se le añade a la fase acuosa 1 volumen de isopropanol y la mezcla se centrifuga durante 2 minutos. El sedimento, conteniendo los plásmidos, se lava con etanol 70%, se seca al vacío y se resuspende en tampón TE conteniendo 20  $\mu$ g/ml de RNasa A.

Para preparaciones a mayor escala se sigue básicamente el mismo método, convenientemente escalado, con las siguientes modificaciones. La extracción orgánica previa a la precipitación con isopropanol es suprimida. El sedimento resultante de la precipitación se resuspende en 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM acetato sódico, se añade RNasa A a una concentración final de 20  $\mu$ g/ml y se incuba a 37°C durante 20 minutos. Se extrae entonces la mezcla dos veces con mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico, se transfiere la fase acuosa a otro tubo y se precipitan los ácidos nucleicos por adición de 2 volúmenes de etanol a -20°C. Tras centrifugar (10.000 rpm, 15 minutos), el sedimento se resuspende en agua destilada y se añade NaCl hasta 0.8 M y 1 volumen de 13% PEG. Tras incubarlo en hielo durante 2 horas, se centrifuga (8.000 rpm, 10 minutos). El sedimento resultante se lava con etanol absoluto y se resuspende en tampón TE.

#### Solución I

25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa, 5 mg/ml lisozima.

#### Solución II

0.2 M NaOH, 1% SDS. Se prepara inmediatamente antes de su uso.

### 5.2 Purificación de DNA de fagos.

Para preparaciones a pequeña escala se sigue el protocolo descrito por Chisholm (1989). 30  $\mu$ l de células, convenientemente preparadas para la infección (sección 2.2.1), son mezcladas con 10 y 100  $\mu$ l del eluido de una calva en 500  $\mu$ l de tampón SM. Tras incubarlo la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente, ésta se transfiere a 37 ml de medio LB con 10 mM sulfato magnésico y se incuba con agitación fuerte a 38°C durante la noche. Al cultivo donde se aprecia una lisis mas extensa se le añaden 100  $\mu$ l de cloroformo, se agita y se añade DNasa I a 50  $\mu$ g/ml y RNasa A a 50  $\mu$ g/ml. Tras incubarlo 30 minutos a 37°C se añade NaCl hasta 1 M y se centrifuga (7.000 rpm, 20 minutos). El sobrenadante se transfiere a otro tubo, se añade PEG a una concentración final del 10% y se incuba 1 hora en hielo. Después de centrifugar (7.000 rpm, 20 minutos), el sedimento se resuspende en 500  $\mu$ l de SM y se extrae con 500  $\mu$ l de cloroformo. A la fase acuosa se le añade EDTA hasta 20 mM, SDS hasta el 0.2% y 25  $\mu$ g proteínasa K y se incuba a 65°C durante 30 minutos. A continuación, se realiza una extracción con fenol y otra con cloroformo y el DNA se precipita finalmente de la fase acuosa por la adición de acetato amónico hasta 2 M y 1 volumen de isopropanol. Tras centrifugar (15 minutos, 14000 rpm en microcentrifuga) el sedimento se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en TE conteniendo 20  $\mu$ g/ml de RNasa A.

### 5.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA por tamaño se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE con 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio, utilizándose este mismo tampón como electrolito. A las muestras se les añade 10% de tampón de carga x10. La concentración de agarosa usada varía entre 0.5-2%, dependiendo del rango de tamaños a resolver.

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

#### 5.4 Obtención de fragmentos de DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión

Los fragmentos se resuelven en geles de agarosa de bajo punto de fusión (SeaPlaque®, FMC Products, Rockland, EE.UU). La banda a aislar se corta del gel y éste se funde calentando a 65°C durante 15 minutos. A la agarosa líquida se le añade el 10% del volumen de 3 M acetato sódico y se extrae dos veces con fenol saturado con 0.3 M acetato sódico y una vez con cloroformo. El DNA se precipita finalmente con dos volúmenes de etanol, se lava, se seca y se resuspende en TE.

#### 5.5 Digestión del DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción se realizaron 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 DNA se precipita de la fase acuosa por adición de acetato sódico hasta 0.3 M y 3 volúmenes de etanol e incubación a -80°C durante 20 minutos. Tras centrifugar (14000 rpm, 15 minutos en microcentrífuga), el sedimento se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en TE.

#### 5.6 Defosforilación de extremos 5'

Para evitar la religación de los plásmidos utilizados como vectores de clonación, se han eliminado los grupos fosfato en los extremos 5'.

Después de la digestión del plásmido con la enzima de restricción apropiada, la mezcla de digestión se lleva a pH 8.0 por la adición de 1/10 del volumen de TE x10 pH 8.0. A continuación se añade 1-2 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera y se incuba a 37°C durante 30 minutos. La mezcla se carga en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se aísla y purifica el DNA de la banda correspondiente al DNA defosforilado.

#### 5.7 Ligación de moléculas de DNA.

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

#### 5.8 Transformación de bacterias

El último paso de la clonación de fragmentos de DNA en plásmidos consiste en transformar un cultivo de células de *E. coli* con la mezcla de ligación. De esta forma se propagan plásmidos individualmente que después son analizados y seleccionados. Las bacterias portadoras del plásmido son seleccionadas sembrándolas en un medio con los antibióticos apropiados.

Se ha seguido el método descrito por Hanahan (1983). Las células competentes pueden ser congeladas y mantenidas a -80°C hasta su uso.

Con una colonia de la estirpe apropiada, se inoculan 5 ml de medio Y y se cultiva a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.3. Con este precultivo, se inoculan 100 ml de medio y, precalentado a 37°C, y se incuba con agitación vigorosa (300-350 rpm) hasta que la DO<sub>600</sub> es 0.48. En este momento, se pasa el cultivo a hielo y se recogen las células por centrifugación (2500 g, 7 minutos, 4°C). El sedimento se resuspende en 30 ml de solución TFB1 fría y se centrifuga como antes. Las células son finalmente resuspendidas con suavidad en 4 ml de solución TFB2 fría y dispensadas en alicuotas de 0.2 ml que se congelan a -80°C hasta su uso.

#### Solución TFB1

100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM acetato potásico, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol. El pH se ajusta con precisión a pH 5.8 con ácido acético 0.2 M. Se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C.

#### Solución TFB2

10 mM MOPS pH 7.0, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol. Se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C.

#### Medio Y

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

#### Mezcla de transformación.

A 200 ml de células competentes se les añaden, aproximadamente, 10 ng de DNA, en un volumen menor de 20 µl, y se mantienen 15 minutos en hielo, 5 minutos a 37°C y 15 minutos en hielo. A continuación, se añade 1 ml de medio LB, se incuba a 37°C durante 1 hora y se extiende en cajas Petri con el medio de selección apropiado.

## 6. SECUENCIACION

### 6.1 Aislamiento de DNA monocatenario

El plásmido pBluescript SK +/- puede ser empaquetado como DNA monocatenario en presencia de un fago auxiliar, ya que contiene la región IG del fago F1; esta región codifica todas las funciones en *cis* necesarias para la replicación y empaquetamiento del fago. En estirpes de *E. coli* que contienen el episoma F', el plásmido será secretado en forma monocatenaria al ser infectadas por el fago auxiliar. Es posible empaquetar bien la cadena codificante de la β-galactosidasa o la complementaria, utilizando el plásmido pSK(+) ó pSK(-).

1. Diluir un cultivo crecido en presencia de Tetraciclina y Ampicilina (concentraciones finales 50 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente) hasta llevarlo a DO<sub>600</sub> de 0.3 en medio 2xYT.
2. Añadir el fago auxiliar a multiplicidad 20:1 (considerando que 0.3 unidades de DO equivalen a  $2.5 \times 10^8$  células/ml) e incubar durante 6-8 horas a 37°C.
3. Centrifugar 2 veces 15 min., recuperando el sobrenadante.
3. Añadir al sobrenadante 1/4 PEG 20%, 3.5 M AcNH<sub>4</sub><sup>+</sup> pH 7.5 e incubar al menos 15 min. a temperatura ambiente.
4. Centrifugar 20 min y retirar completamente el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 0.3 ml de NaCl 1.2 M.
5. Extraer con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y repetir la extracción con cloroformo.
6. Precipitar la fase acuosa con 0.75 ml de etanol absoluto. Incubar durante 30 minutos a -20°C.

7. Centrifugar durante 5 minutos. Lavar con etanol al 70%.
8. Resuspender el precipitado en 30  $\mu$ l de TE y usar 3  $\mu$ l para cuantificar el DNA en gel de agarosa.

#### Medio 2x YT

Bactotripton	16 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	10 g/l

Ajustar el pH a 7.2-7.4

### 6.2 Reacciones de secuenciación

La determinación de secuencias de nucleótidos se realizó según el método de los dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). Estos análogos de nucleótidos interrumpen la reacción de polimerización del DNA. Utilizando como molde el DNA a secuenciar se sintetiza una población de moléculas de DNA de longitud variable debido a la incorporación aleatoria de dideoxinucleótidos. Idealmente habrá un número igual de cadenas terminadas en cada uno de los nucleótidos. La resolución simultánea en geles de acrilamida de las reacciones con cada uno de los cuatro análogos permite secuenciar el fragmento de DNA.

#### A. APAREAMIENTO DEL CEBADOR

Mezclar en un tubo eppendorf:

Cebador	1 $\mu$ l
Tampón de reacción	2 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O	hasta 10 $\mu$ l

Incubar a 65°C durante 2 min., dejar enfriar lentamente durante 30 min., hasta que la temperatura no exceda de 30°C. Poner en hielo hasta el siguiente paso.

#### B. REACCION DE MARCAJE

Diluir la mezcla de marcaje 5 veces en H<sub>2</sub>O.

Diluir la enzima Sequenase<sup>®</sup> 9 veces en tampón de dilución.

Añadir al DNA apareado con el cebador:

DIT 0.1 M	1.0 $\mu$ l
Mezcla de marcaje	2.0 $\mu$ l
[ <sup>35</sup> S] dATP	0.5 $\mu$ l
Sequenase <sup>®</sup>	2 $\mu$ l

Mezclar e incubar durante 2-5 minutos a temperatura ambiente.

#### C. REACCIONES DE TERMINACION

1. Pipetear 2.5  $\mu$ l de cada una de las mezclas de terminación ddGTP, ddATP, ddTTP y ddCTP a sendos tubos eppendorf, taparlos y precalentarlos a 37°C durante al menos 1 minuto.

2. Añadir 3.5  $\mu$ l de la reacción de marcaje a cada uno de los tubos con los ddNTPs y continuar la incubación a 37°C durante 3-5 minutos.
3. Añadir 4  $\mu$ l de la solución de parada a cada una de las reacciones de terminación y mezclar. En este punto es posible almacenar las reacciones a -20°C hasta cargarlas en el gel de acrilamida.
4. Cargar 2-3  $\mu$ l/pocillo de cada mezcla de reacción, incubada previamente a 75-80°C durante 2 minutos.

Oligonucleótidos cebadores (3ng/ $\mu$ l)

Cebador de secuenciación M13 directo

5'-GTTTTTCCCAGTCAACGAC-3'

Cebador de secuenciación M13 reverso

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Tampón de reacción 5x

200 mM Tris-HCl, pH 7.5

100 mM MgCl<sub>2</sub>

250 mM NaCl

Mezcla de marcaje 5x7.5  $\mu$ M dGTP7.5  $\mu$ M dCTP7.5  $\mu$ M dTTP

Sequenase® Versión 2.0 (United States Biochemical) Se trata de una T7 DNA polimerasa modificada.

Tampón de dilución de la enzima

10 mM Tris-HCl, pH 7.5

5 mM DTT

0.5 mg/ml BSA

[<sup>35</sup>S]dATP10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l, 1000 Ci/mmolMezclas de terminación

<u>ddGTP</u>	<u>ddATP</u>	<u>ddTTP</u>	<u>ddCTP</u>
80 $\mu$ M dGTP	80 $\mu$ M dGTP	80 $\mu$ M dGTP	80 $\mu$ M dGTP
80 $\mu$ M dATP	80 $\mu$ M dATP	80 $\mu$ M dATP	80 $\mu$ M dATP
80 $\mu$ M dTTP	80 $\mu$ M dTTP	80 $\mu$ M dTTP	80 $\mu$ M dTTP
80 $\mu$ M dCTP	80 $\mu$ M dCTP	80 $\mu$ M dCTP	80 $\mu$ M dCTP
8 $\mu$ M ddGTP	8 $\mu$ M ddATP	8 $\mu$ M ddTTP	8 $\mu$ M ddCTP
50 mM NaCl	50 mM NaCl	50 mM NaCl	50 mM NaCl

Solución de parada

95% formamida

20 mM EDTA

0.05% azul de bromofenol

0.05% xilen-cianol

## 6.3 Resolución en geles de acrilamida

La electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida al 4% y al 6%, de 20 x 55 cm de tamaño con un gradiente de 0.2 a 0.4 mm de grosor. La temperatura se uniformiza durante la electroforesis mediante una placa de aluminio del mismo tamaño que los cristales. Se utiliza tampón TBE 1x como electrolito.



## A. MEZCLA DEL GEL

	<u>Gel 4%</u>	<u>Gel 6%</u>
Urea (Bio-Rad)	20 g	20 g
TBE 10x	4ml	4 ml
Stock A/B	4 ml	4 ml
H <sub>2</sub> O	16 ml	14 ml
APS	200 µl	200µl

Disolver la mezcla a 40-45°C y completar hasta 40 ml de volumen final.

Filtrar con filtro Millipore de 45 µm de diámetro de poro.

Desgasear mediante aplicación de vacío.

Enfriar en hielo, añadir 25 µl de TEMED y agitar.

Una vez vertido en los cristales, dejar polimerizar el gel al menos 20 minutos.

TBE 10x

0.89 M Tris-Borato

0.89 M ácido bórico

20 mM EDTA

Stock A/B

Acrilamida 38% (p/v)

Bisacrilamida 2% (p/v)

## B. CONDICIONES DE ELECTROFORESIS

Precorrer el gel 10-15 minutos a 2500 V.

Cargar las muestras y correr a 2800 V.

Parar la electroforesis dependiendo de la zona de la secuencia que se va a leer. Se utilizan los colorantes (azul de bromofenol y xilen-cianol) como marcadores, que comigran con fragmentos de DNA de tamaños conocidos.

## C. TRATAMIENTO DEL GEL

Terminada la electroforesis, incubar los geles durante 15 minutos en una solución de ácido acético 10%.

Secar los geles en un secador de geles a 80°C durante 1 hora con vacío.

Exponer el gel a una película radiográfica (Agfa Curix®) a temperatura ambiente durante 12-24 horas.

## 6.4 Tratamiento informático de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se analizaron mediante los programas del Genetics Computer Group, University of Wisconsin (UWGCG) (Devereux *et al.*, 1984), ejecutados en un ordenador con sistema operativo VAX del Centro Informático Científico de Andalucía (CICA).

## 7. ANALISIS SOUTHERN

### 7.1 Extracción de DNA de plantas.

Para la extracción de DNA total de plantas se ha seguido 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 el CTAB es fácilmente eliminado aprovechando su solubilidad en etanol.

1. El material vegetal se lava brevemente con etanol 70%, se enjuaga con agua destilada, se congela en N<sub>2</sub> líquido y se guarda a -80°C hasta su uso.
2. Para la extracción el material se tritura bajo N<sub>2</sub> líquido hasta un polvo fino y se transfiere a tubos de centrifuga.
3. Se añaden 20 µl de 2-mercaptoetanol y 1 ml de tampón de extracción CTAB 2x, previamente calentado a 95°C, por cada gramo de material; se homogeniza rápidamente y se incuba a 56°C durante 20 minutos.
4. Una vez enfriado a temperatura ambiente, se añade 1 volumen de cloroformo-octanol (24:1) y se vuelca el tubo suavemente.
5. Tras centrifugar (8.000 g, 10 minutos, 20°C), se traspara la fase acuosa a un nuevo tubo y se añade 0.1 volúmenes de una solución 10% CTAB, 0.7 M NaCl.
6. Después de mezclar, se repite la extracción con cloroformo-octanol, traspasándose la fase acuosa a tubo Corex. A la nueva fase acuosa se le añade 1 volumen igual de tampón de precipitación CTAB x1, se mezcla y se incuba a temperatura ambiente al menos 30 minutos para que se forme el precipitado.
7. El precipitado se sedimenta por centrifugación (1.500 g, 10-15 minutos); el tiempo de centrifugación no debe prolongarse para evitar que el sedimento sea difícil de resuspender. El sobrenadante se desecha, dejando escurrir los restos sobre papel absorbente, y el precipitado se resuspende en 1 M NaCl, calentando a 56°C si fuera necesario. El DNA se precipita añadiendo 2 volúmenes de etanol e incubando 30 minutos a -80°C o durante la noche a -20°C. El DNA se sedimenta por centrifugación (8.000 g, 20 minutos), se lava 2 veces con 75% etanol y una vez con 85% etanol y se resuspende finalmente en agua destilada estéril.

#### Tampón de extracción CTAB x2

100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB. Se disuelve calentando, se autoclava y se guarda a temperatura ambiente.

#### Tampón de precipitación CTAB x1

50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% CTAB. Se prepara igual que la anterior.

### 7.2 Digestión del DNA, electroforesis y transferencia a membrana de nylon

El DNA genómico obtenido del modo descrito anteriormente fue digerido con *Eco* RI, *Hind* III, *Xba* I, y separado durante la noche en un gel de agarosa al 0.7%, con bromuro de etidio, obteniéndose un barrido continuo de DNA de distintos tamaños. Este DNA se transfirió a nylon en condiciones neutras:

1. Visualizar el DNA con luz UV y marcando la posición de los marcadores de peso molecular pinchando el gel con una aguja impregnada de tinta china.
2. Bañar el gel en 0.25 M HCl durante 15 min. a temperatura ambiente.

3. Pasar a una solución 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl durante 15 min. a temperatura ambiente.
4. Bañar en 20X SSC durante 15 min. a temperatura ambiente.
5. Colocar un puente de plástico sobre una cubeta llena de 20X SSC y cubrirlo con dos tiras de papel Whatman 3MM empapado en 20X SSC.
6. Situar el gel sobre el papel 3MM.
7. Cubrir el gel con una membrana de nylon Hybond-N (Amersham) del mismo tamaño que el gel.
8. Poner encima de la membrana tres piezas de 3MM del mismo tamaño que el gel y papel de filtro hasta formar un bloque de unos 10 cm.
9. Colocar encima un peso de unos 300g.
10. Dejar transferir 12-24 horas.
11. Retirar la membrana y dejar secar al aire unos minutos.
12. Fijar al vacío durante 2 horas a 80°C.

### 7.3 Marcaje de sondas de DNA por *random primer*.

Se siguió el método recomendado por el fabricante (Boehringer Mannheim).

1. Tomar 25 ng del DNA que se usará como sonda y desnaturalizarlo a 90°C, 10 min.
2. Pasar inmediatamente a hielo.
3. A ese tubo, añadir:
  - i) 1 µl de 0.5 mM ATP, GTP, TTP
  - ii) 2 µl de tampón de reacción (hexanucleótidos al azar)
  - iii) 3 µl de [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (10 µCi/µl)
  - iv) H<sub>2</sub>O hasta 19 µl
  - v) 1µl de Klenow (2 U/µl)
 Incubar a 37°C, 30 min.
4. Eliminar los nucleótidos no incorporados pasando la muestra por una columna de Sephadex G-50 de 1 ml, por centrifugación (1000 rpm, 2 min).
5. Comprobar el éxito del marcaje con el contador Geiger. Medir en contador de centélleo. La radioactividad utilizada en una hibridación es de 10-50 · 10<sup>6</sup> cpm.

### 7.4 Hibridación

Las hibridaciones se llevaron a cabo en bolsas de plástico (BRL) selladas por calor.

1. Prehibridar el filtro durante al menos 1 hora a 42°C en solución de hibridación.
2. Desnaturalizar el fragmento de DNA marcado en un baño a 95°C durante 10 minutos y pasarlo inmediatamente a hielo.
3. Sustituir la solución en la que se ha prehibridado por solución de hibridación a la que se le ha añadido la sonda previamente desnaturalizada.
4. Incubar durante 12-24 horas a 42°C en agitación.
5. Lavar el filtro durante 20 minutos en solución de lavado 1 a 65°C.
6. Lavar durante 20 minutos en solución de lavado 2 a 65°C monitorizando con un contador geiger. Repetir el lavado en caso necesario.
7. Envolver el filtro en plástico para mantenerlo húmedo y exponer a una película radiográfica con pantallas intensificadoras a -80°C.

Las hibridaciones a baja estringencia diferían de las descritas (alta estringencia) en que la solución de hibridación tenía formamida al 35% y en que los lavados se realizaban a temperatura ambiente.

Solución de hibridación

SDS	0.1 %
SSPE	5X
solución Denhardt	1X
DNA esperma de salmón	100 mg/mL
Formamida	50 %

Solución stock 20X SSPE (1L)

NaCl	174 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	27.6 g
EDTA	7.4 g

Solución stock 50X Denhardt

Ficoll	5 g
Poliivinilpirrolidona	5 g
BSA	5 g

Solución de lavado 1

2X SSPE  
1% SDS

Solución de lavado 2

0.2X SSPE  
0.1% SDS

**8. ANALISIS NORTHERN****8.1 Obtención del RNA**

El método seguido fue el descrito por Wadsworth (1989) con ligeras modificaciones:

1. Triturar el material en presencia de nitrógeno líquido hasta pulverizarlo.
2. Añadir buffer de extracción: 0.5 ml buffer/0.2 g muestra.
3. Agitar por vórtex 30 seg.
4. Añadir 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y agitarlo en vórtex.
5. Centrifugar a 9000 rpm, 4°C, 15 min. Pasar el sobrenadante a nuevos tubos.
6. Repetir la fenolización dos veces más.
7. Añadir 1 volumen de cloroformo.
8. Centrifugar en las mismas condiciones. Pasar el sobrenadante a nuevos tubos.
9. Añadir 1 volumen de CILi 6M.
10. Dejar precipitar a 4°C durante toda la noche.
11. Centrifugar a 9000 rpm, 4°C, 30-45 min. y descartar el sobrenadante.
12. Lavar en 3 M CILi.
13. Centrifugar en las mismas condiciones y retirar el sobrenadante.
14. Resuspender el precipitado en 400 µl de NaAc 0.3 M, pH 5.8. Calentar a 55°C durante 10 minutos para disolver el RNA. Pasar a tubo eppendorf.
15. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos.
16. Precipitar el sobrenadante con 1 ml de etanol absoluto, manteniendo a -80°C durante 15 minutos.
17. Centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos, secar el precipitado y resuspender en 50 µl de H<sub>2</sub>O a 55°C durante 10 minutos.
18. Guardar las muestras a -80°C hasta su análisis.

## 8.2 Extracción de RNA de semillas

Para extraer RNA de semillas se utilizó un método de purificación distinto que para el resto de material (Hall *et al.*, 1978), debido a que se eliminan con mayor eficacia contaminantes abundantes en las semillas.

1. Al material triturado en presencia de nitrógeno líquido, añadir tampón de homogenización (3 ml/g) precalentado a 100°C.
2. Añadir 0.5 mg/ml de proteinasa K.
3. Incubar durante 1 hora a 37°C.
4. Añadir KCl hasta una concentración final de 50 mM.
5. Transferir a tubo de centrifuga e incubar 15 minutos en hielo.
6. Centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C.
7. Añadir al sobrenadante LiCl hasta una concentración final de 2 M y dejar toda la noche a 4°C.
8. Centrifugar durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C y retirar el sobrenadante.
9. Lavar el precipitado con 5 ml de LiCl 2 M y resuspender en 2 ml de H<sub>2</sub>O.
10. Llevar a 0.3 M con NaCl y precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto.
11. Centrifugar a 10.000 rpm y lavar con etanol al 70%.
12. Centrifugar a 10.000 rpm, secar y resuspender en 50-100 µl de H<sub>2</sub>O.

### Tampón de homogenización

Tris-HCl, pH 9	0.2 M
NaCl	0.4 M
EGTA	25 mM
SDS	1%

## 8.3 Cuantificación de RNA en solución.

La concentración de RNA en soluciones se estima a partir de la absorbancia a 260 nm, asumiendo que 1 DO<sub>260</sub> equivale a 40 µg/ml RNA

## 8.4 Electroforesis de RNA

El RNA en tampón de muestra se separa por tamaño en un gel de agarosa-formamida en tampón de Northern. La transferencia a filtro de nylon se hace en condiciones neutras (20x SSC) de igual forma que en el caso del análisis Southern. El RNA transferido al filtro se fija por calor (80°C, al vacío) durante 2 horas. La transferencia se puede valorar tiñendo reversiblemente el filtro.

### Tinción de RNA fijado a filtros de nylon

1. Teñir con una solución 0.02% de azul de metileno en acetato sódico 0.3 M, pH 5.5 durante 3 min. como máximo.
2. Destañir en 1x SSPE 10-15 min. hasta observar las bandas.
3. Lavar con 0.2x SSPE, 1% SDS 15 min, inmediatamente antes de prehibridar.

El filtro se puede guardar a temperatura ambiente o bien, a largo plazo, a -80°C.

La hibridación, los lavados y la exposición del filtro se llevan a cabo de modo idéntico al descrito en el apartado de Análisis Southern.

### Tampón de muestra (para 4.5 µl de RNA)

Tampón de Northern 10x	2 µl
Formaldehído	3.5 µl
Formamida	10 µl

Calentar a 60-65°C durante 15 minutos y cargar en el gel.

### 8.5 Cuantificación densitométrica y normalización de las señales de hibridación

Para cuantificar las diferencias en los niveles de acumulación de mRNAs específicos en diferentes extractos de RNA total, se compararon las señales de hibridación con las de un gen de expresión constitutiva en tomate.

Los filtros de nylon a los que se había transferido RNA y que habían sido hibridados con una sonda específica, se rehibridaron con un fragmento de DNA correspondiente a un gen de rRNA de rábano (Delcasso-Tremousaygue *et al.*). Este gen está muy conservado en plantas y se expresa constitutivamente. Las señales de hibridación correspondientes a ambas sondas se cuantificaron mediante un videodensitómetro Bio-rad modelo 620 y los valores obtenidos para la sonda específica se hicieron relativos a los del gen ribosómico.

## 9. OBTENCION Y USO DE ANTICUERPOS.

### 9.1 Expresión heteróloga en bacterias.

Los vectores de clonación de la serie pEX están diseñados para la expresión termorregulada de fragmentos de DNA en bacterias. La clonación se efectúa en dianas situadas cerca del extremo carboxilo de la zona codificante del gen *lacZ*, de tal forma que el inserto quede en fase de lectura abierta. Para ello, existen tres versiones del vector que permiten clonar en diferentes fases de lectura. El resultado es un gen híbrido cuya traducción dará lugar a una proteína de fusión, constituida por la casi totalidad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, seguida del péptido resultante de la traducción del fragmento clonado. El gen híbrido queda bajo el control del promotor  $P_R$  del bacteriófago  $\lambda$ . El plásmido se introduce en una estirpe de *E. coli* que porta un alelo termosensible del represor del bacteriófago lambda en el cromosoma.

1. La bacteria portadora del plásmido recombinante se cultiva durante la noche a 30°C en 10 ml de medio LB con 50 mg/L de ampicilina. 8 ml de este cultivo se inoculan en 800 ml del mismo medio y se cultiva a 30°C hasta una densidad de  $7 \times 10^7$  células/ml ( $DO_{600} = 0.2$ ).
2. El cultivo se transfiere a un baño 42°C, continuándose la incubación durante 2 horas. Después de enfriar en hielo 10 minutos, el cultivo se centrifuga (2.000 g, 15 minutos).
3. Las células se resuspenden en 20 ml de una solución 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, y se centrifugan en las mismas condiciones. Se resuspenden a continuación en 8 ml de solución de lisis y se transfieren a un tubo de polipropileno de 15 ml, se añaden 2 ml de una solución 10 mg/ml de lisozima en agua y se incuba en hielo durante 15 minutos.
4. Transcurrido este tiempo se añaden 200  $\mu$ l de DNasa I a 10 mg/ml y 1 ml de  $MgCl_2$  1 M y se incuba en hielo otros 15 minutos. A continuación se añaden 6 ml de la mezcla de detergentes, se incuba 5 minutos en hielo y se centrifuga (7.000 rpm, 10 minutos). En el sedimento de esta centrifugación se encuentran los cuerpos de inclusión.
5. El sedimento se lava 3 veces con 10 ml de solución de guanidinio, resedimentando por centrifugación. Finalmente se homogeniza en solución de N-laurilsarcosina y se recupera por centrifugación.

6. La N-laurilsarcosina se lava resuspendiendo dos veces en 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Tras centrifugar, el sedimento es resuspendido en 3 ml de solución de solubilización, homogenizando suavemente si fuera necesario.

7. Tras añadir 1 ml de solución de diálisis I, se dializa durante la noche a 4°C frente a la misma solución. A la mañana siguiente, la muestra se dializa durante 2 horas frente a la solución de diálisis II, se separa en alícuotas, se congela en N<sub>2</sub> líquido y se guarda a -80°C.

#### Solución de lisis

15% sacarosa, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0.

#### Mezcla de detergentes

1% Tritón X-100, 0.5% deoxicolato, 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4.

#### Solución de guanidinio

1.75 M guanidinio HCl, 1 M NaCl, 1% Tritón X-100.

#### Solución de N-laurilsarcosina

1% N-laurilsarcosina, 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0.

#### Solución de solubilización

8 M urea, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA.

#### Solución de diálisis I

50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM CAPS-KOH pH 10.7.

#### Solución de diálisis II

50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0.

### 9.2 Inmunización de conejos

El proceso de inmunización se lleva a cabo con 2 conejos machos de 2 Kg de peso cada uno. Antes de iniciar la inmunización, se extrae sangre que será utilizada como suero preinmune en los experimentos. A continuación se inyectan 150 µg del extracto protéico, llevado a 250 µl con H<sub>2</sub>O destilada estéril y emulsionado con 250 µl de adyuvante de Freund completo. Las inyecciones se realizan subcutáneamente en 4 puntos distintos del animal. 3 semanas después de esta primera dosis se vuelve a inyectar la misma cantidad de extracto, esta vez emulsionado en adyuvante de Freund incompleto. Al cabo de 10 días se extraen 30 ml de sangre que son procesados como se describe a continuación. 3 semanas después de la segunda dosis se realiza una tercera en las mismas condiciones que la segunda, extrayéndose de nuevo sangre 10 días después.

### 9.3 Procesamiento del suero

La sangre se deja coagular durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se separa el coágulo de las paredes del tubo y se continua la incubación a 4°C durante la noche. El coágulo se retira y el resto se centrifuga (15.000 rpm, 15 minutos, 4°C).

### 9.4 Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato amónico

Al suero obtenido se le añaden 290 mg de sulfato amónico/ml, se agita durante 30 minutos a 4°C y se centrifuga (10.000 rpm, 10 minutos, 4°C). El sedimento se resuspende en el 50% del volumen original de PBS y se dializa frente al mismo tampón. A continuación se centrifuga (10.000 rpm, 10 minutos) para precipitar los agregados insolubles; el sobrenadante se distribuye en alícuotas y se guarda a -80°C. Una vez descongelado para su uso, se añade azida sódica hasta el 0.05% y se conserva a 4°C.

#### PBS 10X (Phosphate buffered saline)

NaCl 80 g/L, KCl 2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g/L. Ajustar a pH 7.2.

### 9.5 Purificación de anticuerpos por afinidad.

La purificación de anticuerpos específicos contra el fragmento foráneo de la proteína de fusión se realizó en dos etapas. Primeramente, los anticuerpos anti-β-galactosidasa fueron 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, mediante elución de filtros de nitrocelulosa.

### 9.6 Substracción de anticuerpos anti-β-galactosidasa

La Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma) se lava, se deja hinchar en 10 mM HCl y se mezcla con una solución de β-galactosidasa de *E. coli* (Sigma) en una proporción de 1 ml 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 (1000 g, 2 minutos). Se mide la DO<sub>280</sub> del sobrenadante para estimar la eficiencia del acoplamiento. El sedimento se resuspende en 1 volumen de solución 1 M etanolamina, 10 mM Tris-HCl 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 1 M glicina pH 2.8, registrándose la DO<sub>280</sub> del eluido. Una vez que ésta es cero, la columna se lava con 3-5 volúmenes de PBS y se aplica el antisuero. Se recogen fracciones en PBS, agrupándose y conservándose las que registran una DO<sub>280</sub> mayor de 0.5; este eluido es el suero libre de anticuerpos anti-β-galactosidasa. La columna se lava con solución BBS-Tween hasta que la DO<sub>280</sub> del efluente es cero y se reequilibra en PBS. Finalmente, los anticuerpos anti-β-galactosidasa se eluyen con 1 M glicina pH 2.8, recogiendo fracciones de 500 µl en tubos que contienen 25 µl de 1 M Tris. La columna se lava, se reequilibra en PBS conteniendo 0.05% azida sódica y se guarda a 4°C.

#### PBS 10X (Phosphate buffered saline)

NaCl 80 g/L, KCl 2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g/L. Ajustar a pH 7.2.



BBS-Tween

125 mM ácido bórico, 1M NaCl, 0.1% Tween-20. Ajustar a pH 8.3.

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

En primer lugar, se resuelven 700 µg de extracto enriquecido en proteína de fusión por electroforesis en un gel preparativo. Las proteínas se transfieren entonces a una membrana de nitrocelulosa tal como se describe más adelante (apartado 10.1). La membrana se tiñe con Ponceau S y se corta la banda correspondiente a la proteína de fusión. Tras bloquear los sitios de unión inespecífica de proteínas, 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, y se eluye el anticuerpo unido incubando durante 5 minutos en 1.5 ml de 0.2 M glicina pH 2.8, 0.2% gelatina. Tras retirar las tiras, se neutraliza inmediatamente la solución con 0.1 volúmenes de solución 1 M Tris base; se comprueba con papel indicador si el pH es neutro y se añaden 0.1 volúmenes de PBS x10 y azida sódica hasta 0.05%. La solución se guarda a 4°C.

PBS 10X (Phosphate buffered saline)

NaCl 80 g/L, KCl 2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g/L. Ajustar a pH 7.2.

Solución de bloqueo

3% BSA en PBS

## 10. ANALISIS 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 tamaño mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y transferidos a soportes sólidos; como soporte sólido se pueden utilizar filtros de nitrocelulosa. Recientemente se han desarrollado membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF, nombre comercial Immobilon, de la compañía Millipore), de mayor resistencia mecánica y que retienen más fuertemente las proteínas. La membrana se expone a los anticuerpos y, tras lavar los anticuerpos no unidos, éstos se detectan sobre el filtro. Los sistemas de detección incluyen anticuerpos anti-IgG, proteína A marcada con I<sup>125</sup> o conjugados a peroxidasa de rábano o a fosfatasa alcalina.

### 10.1 Transferencia de proteínas a membranas

La transferencia de proteínas a membranas se realizó en un aparato de tipo semi-seco de la firma comercial LKB.

Tras la electroforesis, el gel se equilibra en el tampón de transferencia incubándolo 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 9 papeles Whatman 3 MM del tamaño del gel a cada lado, empapados en tampón de transferencia. Se aplica un amperaje de 0.8 A/cm<sup>2</sup> de gel durante 90 minutos. Las proteínas transferidas se pueden visualizar en el filtro tiñéndolo durante 3 minutos en solución Ponceau S y destiñéndolo en 10 mM Tris pH 9.

Tampón de transferencia

39 mM glicina, 48 mM Tris base, 0.037% SDS, 20% metanol

Solución Ponceau S

0.5% Ponceau S en 1% ácido acético

**10.2 Inmunodetección con anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina**

1. Incubar la membrana en solución de bloqueo durante 30 minutos.
2. Incubar con el anticuerpo específico diluido en solución de bloqueo durante 2 horas
3. Lavar 4 veces durante 5 minutos en solución de bloqueo.
4. Incubar con el anticuerpo secundario (anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a fosfatasa alcalina, Sigma) diluido en la misma solución durante 2 horas.
5. Repetir los lavados del paso 3.
6. Para el revelado por reacción de la fosfatasa alcalina, la membrana se lava 2 veces más en 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y se incuba en 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 a 4°C en la 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, Trizma base 15 g/L. Llevar 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) por ml de dimetilformamida 70%. Se guarda a -20°C.

Solución BCIP

Se disuelven 50 mg de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma) por 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 MgCl<sub>2</sub>

**10.3 Inmunodetección con anticuerpos conjugados a peroxidasa**

1. Incubar la membrana en solución de bloqueo durante 30 minutos.
2. Lavar durante 15 minutos en TBS, 0.2% Tween-20, seguido de 3 lavados de 5 min en la misma solución.
3. Incubar con el anticuerpo específico diluido en solución de bloqueo durante 1 hora
4. Repetir los lavados del paso 2.

5. Incubar con el anticuerpo secundario (anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a peroxidasa, Amersham) diluido en la misma solución durante 1 hora.
6. Lavar durante 15 minutos en TBS, 0.2% Tween-20, seguido de 4 lavados de 5 min en la misma solución.
7. Para detectar la señal del anticuerpo mediante quimioluminiscencia catalizada por peroxidasa, mezclar cantidades iguales de los 2 reactivos (Amersham, ECL Western blotting reagents), preparando un volumen final de 0.125 ml/cm<sup>2</sup> de membrana. Añadir a la membrana e incubar durante 1 min.
8. Exponer inmediatamente a película radiográfica. El tiempo de exposición final varía entre 1 min. y 1 hora.

## 11. INMUNOLocalización EN SECCIONES INCLUIDAS EN PARAFINA

### 11.1 Fijación de tejidos e inclusión en parafina

1. La fijación de tejidos se realiza en 2% paraformaldehído, 0.4% glutaraldehído en tampón Na-PO<sub>4</sub> 0.1M pH 7.0-7.2 durante 4 horas en hielo, con aplicación ocasional de vacío.
2. Lavar 2 veces 5 min. en el mismo tampón fosfato en hielo.
3. Deshidratar en una serie de soluciones de etanol a concentraciones crecientes (30%-100%) durante 30 min. en cada paso, en hielo.
4. Transferir a mezclas de etanol:ter-butanol (3:1, 1:1 y 1:3) durante 30 min. a temperatura ambiente en cada paso, hasta ter-butanol 100%, durante 30 min. a 30°C.
5. Transferir a una solución de ter-butanol saturada con Paraplast Plus<sup>®</sup> a 30°C, incubar a 30°C durante 4-6 horas y a 42°C durante 30 minutos.
6. Transferir a ter-butanol saturado con Paraplast Plus<sup>®</sup> a 42°C, incubar a 42°C durante toda la noche y a 60°C durante 30 minutos.
7. Pasar a Paraplast Plus<sup>®</sup> a 60°C, durante 3-5 días, con dos cambios/día.
8. Guardar a 4°C.

### 11.2 Incubación con anticuerpos de secciones en parafina

A partir del material vegetal incluido en parafina, se cortaron con microtomo secciones de 10 µm que se fijaron a portas previamente gelatinizados con una solución de gelatina 0.1%, CrK(SO<sub>4</sub>)·12 H<sub>2</sub>O 0.02%.

1. Las secciones fijadas a portas se desparafinizan y rehidratan transfiriendo los portas a xilol, xilol:etanol 1:1 y a una serie de soluciones de etanol a concentraciones decrecientes (100%-50%), durante 5 min. en cada paso.
2. Pasar a agua y a TBS durante 5 min.
3. Añadir 100 µl de tampón de incubación sobre la sección e incubar 30-60 min. Todas las incubaciones se realizan en cámara húmeda, consistente en una placa de Petri con papel de filtro húmedo.
4. Incubar a 37°C con 40 µl de anticuerpo diluido en tampón de incubación 2 horas.
5. Lavar con tampón de lavado 3 veces 10 min.
6. Incubar 1-2 horas con 40 µl de anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina diluido en tampón de incubación.

7. Revelar realizando las mismas incubaciones descritas en el apartado 10.2, controlando con lupa binocular (máximo 30 min.), y parar con TE al aparecer la señal.

TBS 5X (Tris buffered saline)

NaCl 40 g/L , KCl 1g/L, Trizma base 15 g/L. Llevar a pH 8 con HCl.

Tampón de incubación

Leche desnatada comercial 2%, Tween-20 0.05% en TBS 1X

Tampón de lavado

Leche desnatada comercial 2%, Tween-20 0.005% en TBS 1X

## 12. INMUNOLOCALIZACION EN CRIOSECCIONES

Se fijaron trozos de tallos de aproximadamente 0.5 cm de grosor en 4% paraformaldehído en tampón de cacodilato 1X durante 15 min., aplicando vacío hasta que el tejido se hundía en el fijador. Mediante un criomicrotomo Kryomat 1703 mgw Lauda se cortaron secciones de 10  $\mu$ m.

Para la incubación con anticuerpos, los criocortes se manejaron por flotación en pocillos.

1. Bañar la criosección en 100  $\mu$ l de tampón de incubación 30-60 min.
2. Incubar con 40  $\mu$ l de anticuerpo diluído en tampón de incubación.
3. Lavar con tampón TBS 3 veces 10 min.
4. Incubar con 40  $\mu$ l de anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina diluído en tampón de incubación 1-2 horas.
5. Revelar realizando las mismas incubaciones descritas en el apartado 10.2, controlando con lupa binocular (máximo 30 min.), y parar con TE al aparecer la señal.

TBS 5X (Tris buffered saline)

NaCl 40 g/L , KCl 1g/L, Trizma base 15 g/L. Llevar a pH 8 con HCl.

Tampón de incubación

BSA 1% en TBS 1X

Tampón de cacodilato 1X

2.16 g NaCacodilato

0.05 g Cl<sub>2</sub>Ca

H<sub>2</sub>O hasta 100 ml, ajustando a pH 7.2 con HCl.

## 13. INMUNOLOCALIZACION EN IMPRESIONES DE TEJIDOS SOBRE NITROCELULOSA

### 13.1 Impresiones de tejidos sobre membranas de nitrocelulosa

Al presionar secciones de tejido sobre membranas de nitrocelulosa, las proteínas quedan retenidas por la nitrocelulosa; esta técnica permite obtener una reproducción de la distribución de proteínas solubles del tejido sobre la membrana de nitrocelulosa. La impresión se visualiza por tinción con colorantes como azul de toluidina o india ink y en ciertos tejidos puede llegar a distinguirse incluso el contorno de células individuales (Cassab y Varner, 1987).

Se utilizaron secciones de tallo de tomate imprimidas sobre membranas de nitrocelulosa para experimentos de inmunolocalización, siguiendo el protocolo descrito por Cassab y Varner (1987), con pequeños cambios según Ye y Varner (1991).

1. Pretratar la membrana de nitrocelulosa con 0.2 M  $\text{CaCl}_2$  durante 30 min y dejar secar al aire.
2. Colocar la membrana de nitrocelulosa sobre varias capas de papel Whatman 3MM.
3. Utilizar una cuchilla de afeitar nueva para cortar secciones de tejido (tallo) de 1 mm de grosor.
4. Transferir las secciones de tallo a la membrana de nitrocelulosa con pinzas y presionar uniformemente durante 15-20 segundos.
5. Retirar las secciones cuidadosamente para evitar que se formen imágenes dobles.

### 13. 2 Incubación con anticuerpos

La incubación con los anticuerpos de las membranas sobre las que se habían imprimido los tejidos se realizó siguiendo el protocolo descrito para el análisis *western*. La señal del anticuerpo se detecta mediante una reacción de quimioluminiscencia catalizada por peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario. Una vez obtenidas las imágenes sobre película radiográfica, se tiñen las impresiones sobre nitrocelulosa con azul de toluidina para visualizar las secciones y correlacionar la señal del anticuerpo con estructuras del tallo. La tinción se realizó con azul de toluidina 1% durante 1-2 minutos seguido de un lavado en agua corriente durante 1 min. Las secciones teñidas y las correspondientes señales del anticuerpo se visualizaron en una lupa Wild M3Z Komibistereo y se fotografiaron con una cámara Wild Leica MPS 52, asistida por un disparador automático Wild Leitz MPS46 Photoautomat acoplados a la lupa.

# RESULTADOS

---

### 1. Cambios en los patrones de proteínas marcadas *in vivo* en respuesta a NaCl y/o ácido abscísico en plántulas de tomate

Se han estudiado los cambios en la expresión génica inducidos por tratamientos con NaCl en plántulas de tomate. Estos cambios se han analizado comparando los patrones de proteínas de nueva síntesis marcadas *in vivo* con  $^{35}\text{S}$ -metionina resueltas mediante electroforesis bidimensional. Asimismo, se han estudiado las proteínas de nueva síntesis inducidas por la adición de ABA, dada la relación del ABA en la respuesta a NaCl.

En una primera etapa se cuantificó la inhibición de la germinación por distintas concentraciones de NaCl y por ABA (fig. 3). La mínima concentración de NaCl ensayada, 5 g/L, es suficiente para retrasar y disminuir el porcentaje de germinación respecto al de semillas germinando en agua. Este efecto aumenta a concentraciones crecientes; así por ejemplo, en presencia de 10 g/L de NaCl el porcentaje de germinación máximo (40% respecto al control) se alcanza tras 55 días, mientras que la germinación de semillas control se completa a los 3 días. En esta figura se muestra también el efecto inhibitorio de la adición exógena de 10  $\mu\text{M}$  ABA; se observa además que el efecto del tratamiento simultáneo con 5 g/L de NaCl y 10  $\mu\text{M}$  de ABA inhibe la germinación más eficientemente que el tratamiento con cualquiera de ellos por separado.

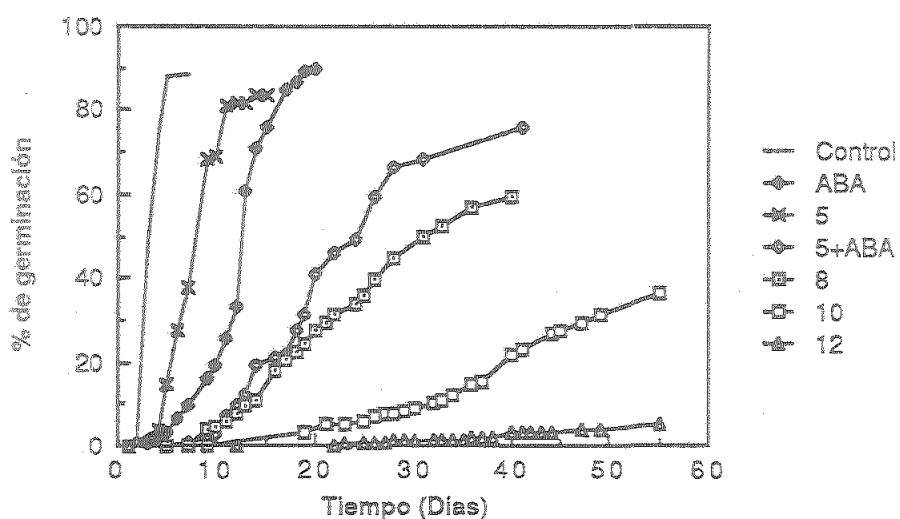


Figura 2. Cinética de germinación de semillas de tomate en distintos medios:  $\text{H}_2\text{O}$  (control), ABA 10  $\mu\text{M}$  (ABA), NaCl a concentraciones de 5g/L (5), 8 g/L (8) y 10 (10) 12 g/L (12) y en una solución NaCl 5 g/L, ABA 10  $\mu\text{M}$  (5+ABA).

El tratamiento con NaCl afecta también al desarrollo de las plántulas; solamente el 12% y el 3% de las semillas que habían iniciado la germinación en 8 g/L y en 10 g/L, respectivamente, continuaron su desarrollo hasta extender los cotiledones; en presencia de 12 g/L ninguna semilla alcanzó esta fase.

Por otra parte se compararon los patrones de proteínas sintetizadas *de novo* en plántulas durante la germinación en los siguientes medios:

- H<sub>2</sub>O
- NaCl 5 g/L
- NaCl 10 g/L
- ABA (10 μM)
- NaCl+ABA (NaCl 5 g/L y ABA 10 μM simultáneamente)

Los patrones de proteínas de plántulas se analizaron en varias etapas del desarrollo. Dado que la cinética de germinación varía drásticamente según los tratamientos, fue necesario definir distintas fases independientes del tiempo y fácilmente identificables:

Fase 1: Emerge de la semilla una radícula de 4 mm.

Fase 2: La radícula mide 15 mm y se observa el hipocótilo; los cotiledones permanecen aún en la testa.

Fase 3: La plántula ha extendido los cotiledones.

Las semillas se germinaban sometidas a los distintos tratamientos hasta que alcanzaban cada una de estas tres fases, momento en el que se incubaban en una solución con <sup>35</sup>S-metionina durante 2 horas; los extractos proteicos de las radículas de estas plántulas se resolvieron por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida; estos geles se fluorografiaron y expusieron a películas radiográficas a -80°C.

Al comparar estas diferentes etapas de germinación, se observó que los patrones electroforéticos de radículas correspondientes a las fases 2 y 3 son equivalentes entre sí, tanto en plántulas control como en plántulas sometidas a tratamientos. En cambio, la fase 1 muestra claras diferencias con estas etapas posteriores. Por tanto, los resultados correspondientes a las fase 2 y 3 se agrupan en un único apartado.

### 1.1 Proteínas básicas inducidas por ABA y/o NaCl en la fase 1 de germinación

Las proteínas de punto isoelectrico comprendido entre 7 y 9 se resolvieron mediante electroforesis en gradiente de pH no en equilibrio (NEpHGE). En la fig. 3 se observan las autorradiografías correspondientes a plántulas en fase de germinación 1 y en ella se indican los polipéptidos que se inducen en respuesta a los tratamientos. En las autorradiografías se señalan



únicamente aquellos cambios consistentes tras analizar los resultados de varios experimentos independientes.

#### *Polipéptido de 18 kDa*

En radículas de semillas germinadas en agua se observa un polipéptido de aproximadamente 18 kDa cuya síntesis aumenta en presencia de ABA. Tratamientos con 5 g/L de NaCl no afectan los niveles de este polipéptido; sin embargo, concentraciones de 10 g/L inducen la síntesis de este polipéptido a niveles comparables a los inducidos por ABA. Su inducción es máxima con el tratamiento de NaCl+ABA.

#### *Polipéptido de 17 kDa*

La síntesis de esta proteína, que no aparece en radículas control, se induce con 10 g/L de NaCl en el medio. La intensidad de la señal se correlaciona con la concentración de NaCl, ya que con 5 g/L el nivel de este polipéptido es menor que con 10 g/L (dato no mostrado). Esta proteína no se induce por ABA y, como puede observarse en la figura, no hay efecto cooperativo con el doble tratamiento (ABA+NaCl).

#### *Polipéptido de 16 kDa*

Este polipéptido no se detecta en plántulas control; la presencia de 5 g/L NaCl en el medio de germinación es suficiente para su inducción; su nivel de síntesis aumenta a concentraciones mayores de NaCl. El tratamiento con ABA induce también su síntesis, sin embargo, no se observa efecto cooperativo en el tratamiento con ABA + NaCl.

#### *Polipéptido de 13 kDa*

Este polipéptido, que no es detectable en plántulas control, se induce con tratamientos a partir de 10 g/L de NaCl; asimismo, es significativa su inducción con ABA. La acumulación máxima de esta proteína ocurre en el tratamiento con NaCl+ABA; en estas condiciones se detecta un segundo polipéptido, de peso molecular ligeramente inferior, e idéntico punto isoeléctrico que podría corresponder a una forma procesada del polipéptido de 13 kDa.

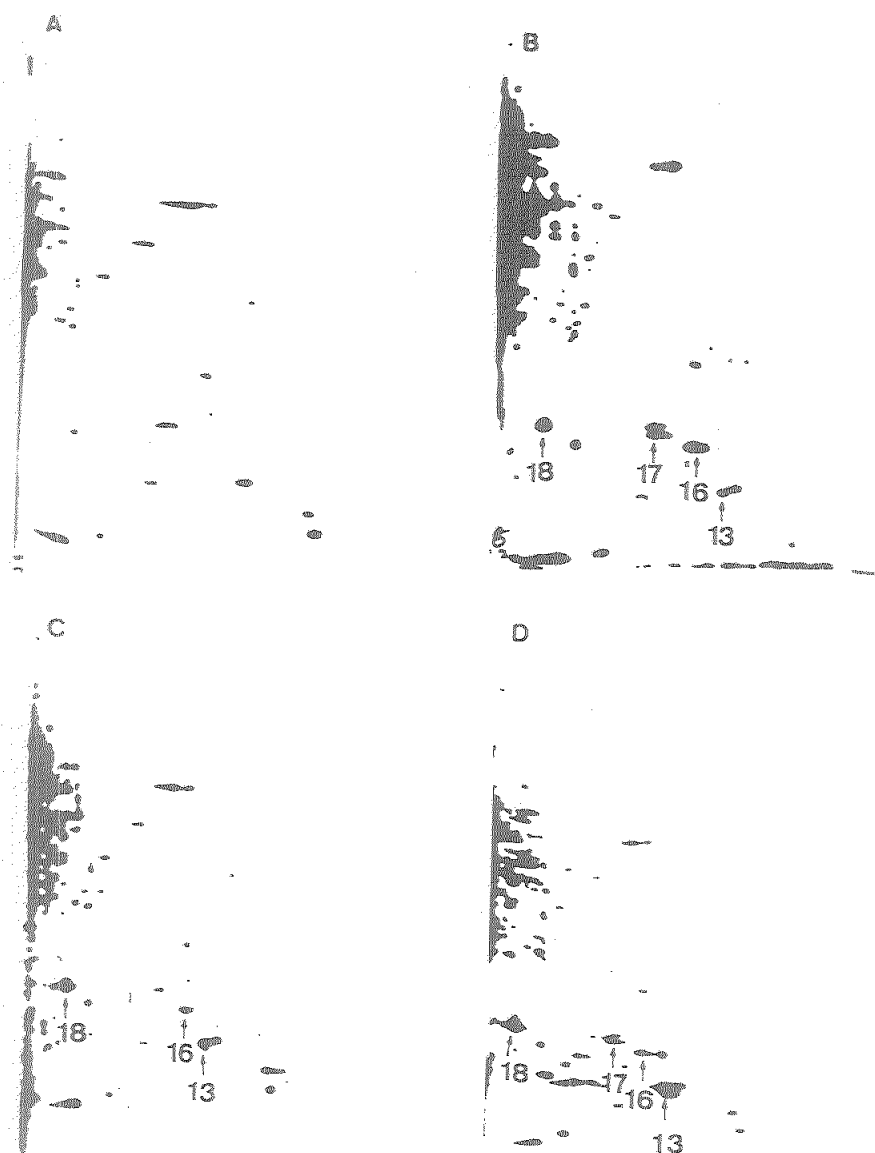


Figura 3. Patrones autorradiográficos de proteínas marcadas *in vivo* con  $^{35}\text{S}$ -metionina separadas mediante NEpHGE/SDS correspondientes a radículas de plántulas en fase de germinación 1 germinadas en agua (A), NaCl (B), ABA 10  $\mu\text{M}$  (C) y NaCl 5 g/L y ABA simultáneamente (D).

## 1.2 Proteínas básicas inducidas por ABA y/o NaCl en las fases 2 y 3 de germinación

La figura 4 muestra los patrones de proteínas de plántulas en fase 2 y 3 de germinación. Como se mencionó anteriormente, los patrones de proteínas en estas dos fases son idénticos, agrupándose los resultados en un sólo apartado. Algunas de las proteínas que se inducen en estas fases de germinación coinciden en movilidad con las observadas en fase 1.

### *Polipéptidos de 50 y 54 kDa*

En las fases 2 y 3 se observa la inducción por ABA y NaCl de un grupo de polipéptidos de 50 y 54 kDa. Cada grupo está constituido por dos polipéptidos del mismo peso molecular pero distinto punto isoeléctrico, por lo que podría tratarse en cada caso de formas modificadas del mismo polipéptido. Las señales correspondientes a estos polipéptidos aparecen con los mismos tratamientos y su intensidad es muy similar en cada caso. No se detectan en radículas control; sin embargo, se inducen con la menor concentración de NaCl ensayada (5 g/L, dato no mostrado). Los niveles aumentan con mayores concentraciones de NaCl y el nivel máximo de síntesis se alcanza con NaCl+ABA. Como en el caso del polipéptido de 12 kDa, estos polipéptidos se detectan exclusivamente en las fases 2 y 3 de germinación.

### *Polipéptido de 32.5 kDa*

Este polipéptido se detecta débilmente en radículas de plántulas control, y su síntesis se induce tanto por NaCl 10g/L como por ABA; en el tratamiento con NaCl+ABA se detectan niveles similares a los inducidos por ABA.

### *Polipéptido de 18 kDa*

El polipéptido de 18 kDa se induce por NaCl y por ABA en las tres fases de germinación analizadas; sin embargo, a diferencia de la fase 1, este polipéptido no está presente en plántulas control en la fase de germinación 2.

### *Polipéptido de 13 kDa*

En las fases 2 y 3, este polipéptido se induce sólo en el tratamiento con NaCl+ABA. En fase 1, este polipéptido se inducía tanto por ABA como por NaCl.

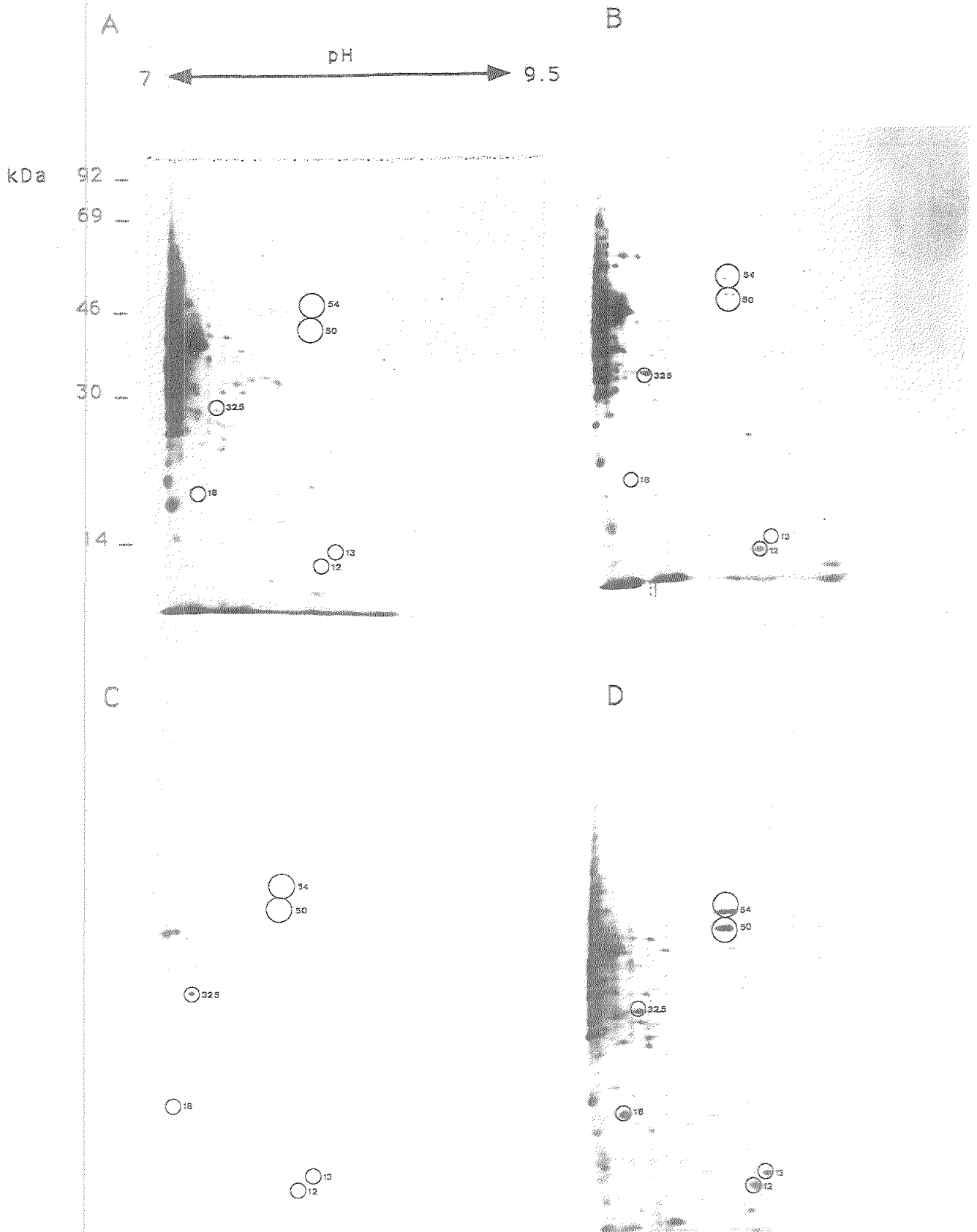


Figura 4. Patrones autorradiográficos de proteínas marcadas *in vivo* con  $^{35}\text{S}$ -metionina separadas mediante NEPhGE/SDS-PAGE correspondientes a radículas de plántulas en fase de germinación 2 germinadas en agua (A), ABA 10  $\mu\text{M}$  (B), NaCl 10 g/L (C) o NaCl 5 g/L y ABA 10  $\mu\text{M}$  simultáneamente (D). La posición de las proteínas inducidas se señala rodeándola con un círculo, indicando su peso molecular estimado.

*Polipéptido de 12 kDa*

En la figura 4 se señala un polipéptido de 12 kDa que se induce en plántulas que han alcanzado las fases 2 y 3 germinando en ABA. Esta señal no se detecta en plántulas en la misma fase germinadas en H<sub>2</sub>O o en NaCl 10 g/L. El nivel máximo de síntesis se detecta con el tratamiento NaCl+ABA. La síntesis de esta proteína ocurre exclusivamente en estas etapas avanzadas de la germinación, no observándose en la fase 1 con ninguno de los tratamientos ensayados.

En plántulas en fase 2 y 3 de germinación no se observan en ningún caso las señales correspondientes a los polipéptidos de 17 y 16 kDa inducibles durante la fase de germinación 1 por NaCl y/o ABA

Los datos referentes a los polipéptidos inducibles por estrés salino y ABA detectados mediante NEpHGE se muestran en la tabla 2.

P m (kDa)	Fase germ.	Condiciones de germinación			
		NaCl 5 g/L	NaCl 10 g/L	ABA 10 µM	NaCl+ ABA
50/54	2/3	+	+	+	+
27	1	-	-	-	+
32.5	2/3	-	+	+	+
18	1 y 2/3	-	+	+	+
17	1	-	+	-	+
16	1	+	+	+	+
13	1 y 2/3	-	+/-	+/-	+
12	2/3	-	+	+	+

Tabla 2. Proteínas de punto isoelectrico básico inducibles por NaCl y/o ABA. Se indican el peso molecular de estas proteínas, la fase de la germinación en que aparecen y los tratamientos que inducen su síntesis. En los casos que aparece más de un dato por casilla, estos se refieren a diferencias en la respuesta durante las tres fases de germinación estudiadas.

### 1.3 Proteínas ácidas inducidas por ABA y/o NaCl en la fase 1 de germinación

Se analizaron asimismo las proteínas de punto isoelectrico ácido inducibles por ABA y/o sal en radículas de plántulas en las fases de

germinación descritas. Los patrones bidimensionales de proteínas con puntos isoeléctricos comprendidos entre 4 y 7 se obtuvieron mediante isoelectroenfoque IEF/SDS-PAGE.

La fig. 5 muestra los patrones bidimensionales de plántulas en fase de germinación 1.

En esta fase de germinación es significativa la inducción de los polipéptidos de peso molecular 18.8, 18.6 y 16 kDa. El polipéptido de 18.8 kDa no se detecta en plántulas control, sin embargo su nivel de síntesis aumenta espectacularmente por ABA. No se induce por NaCl a ninguna de las concentraciones ensayadas. El polipéptido de 18.6 kDa presenta el mismo patrón de inducción, sin embargo la intensidad de su señal es mucho menor. Uno de los cambios más llamativos en los patrones electroforéticos es la aparición de un grupo de polipéptidos del mismo peso molecular, 16 kDa, y distinto punto isoeléctrico. Estos polipéptidos corresponden a formas fosforiladas de la proteína TAS14, que ha sido caracterizada en nuestro laboratorio (Godoy *et al.*, 1989). El polipéptido de mayor punto isoeléctrico correspondería a la proteína TAS14 no fosforilada.

En la fig. 5 se señalan también varios polipéptidos, de 50, 48, 44 y 42.5 kDa, detectables en plántulas control, cuya síntesis se intensifica con los tratamientos de 10 g/L NaCl y con NaCl+ABA.

#### 1.4 Proteínas ácidas inducidas en la fase 2 de germinación por ABA y/o NaCl

En plántulas en fase 2 de germinación (fig 6) el tratamiento con NaCl 10 g/L induce la síntesis de dos proteínas de 59 y 43.5 kDa que no aparecen o se detectan tenuemente en plántulas control. Estos polipéptidos se inducen por el tratamiento con ABA y con NaCl+ABA. Los polipéptidos de 54 y 32 kDa se inducen por NaCl 10 g/L y NaCl+ABA; sin embargo, no se observa un aumento de su síntesis en radículas germinadas en ABA. Un polipéptido de movilidad similar al de 54 kDa aparece de forma constitutiva en plántulas en fase 1 de germinación y no responde a ninguno de los tratamientos ensayados.

Por otra parte también se observa la inducción de un polipéptido de 18.6 kDa en radículas de plántulas tratadas con ABA o con NaCl+ABA. Este polipéptido también se induce por los mismos tratamientos en fase de germinación 1.

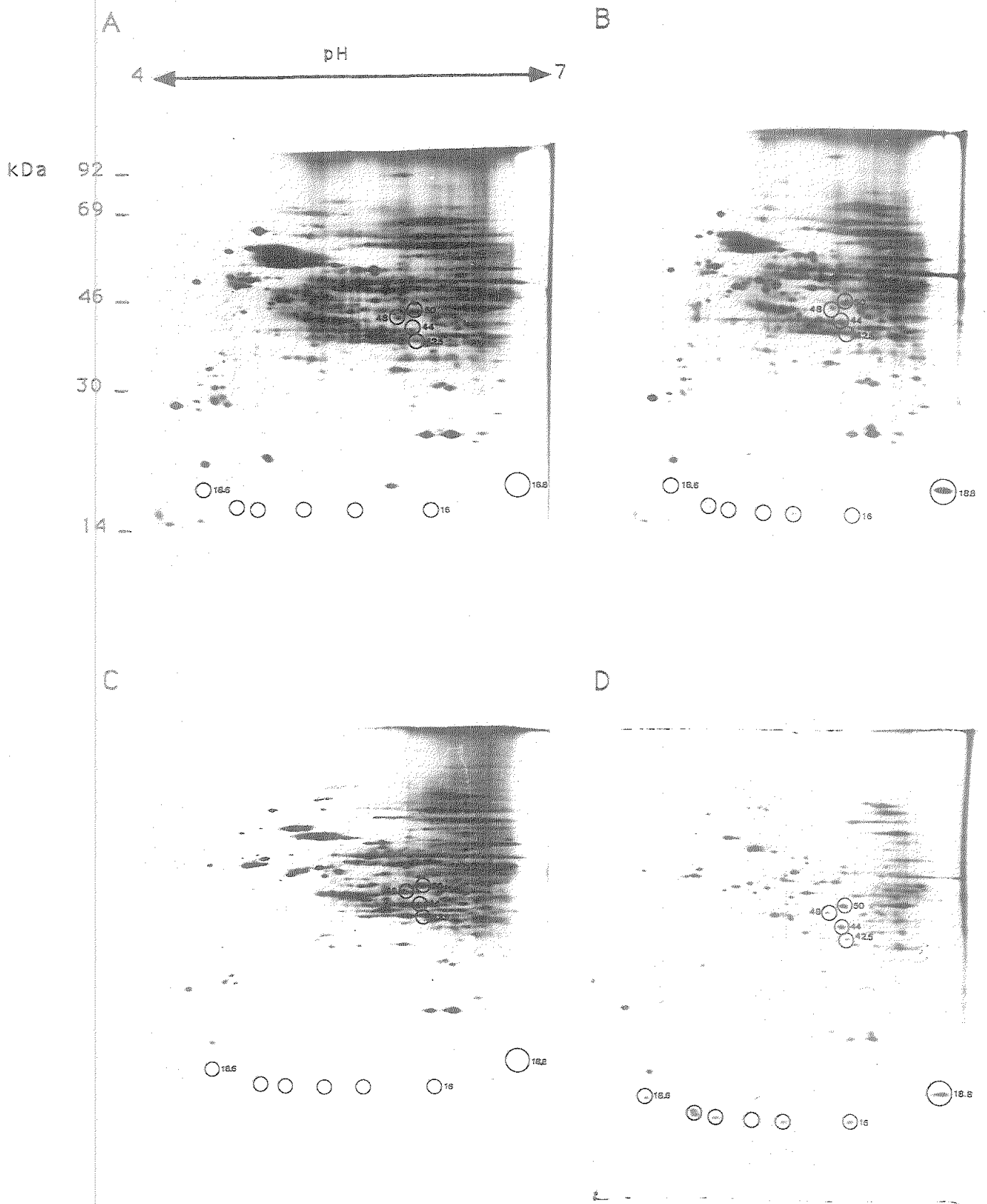


Figura 5. Patrones autorradiográficos de proteínas marcadas *in vivo* con  $^{35}\text{S}$ -metionina separadas mediante IEF/SDS-PAGE correspondientes a radículas de plántulas en fase de germinación 1 germinadas en agua (A), ABA 10  $\mu\text{M}$  (B), NaCl 10 g/L (C) o NaCl 5 g/L y ABA 10  $\mu\text{M}$  simultáneamente (D). La posición de las proteínas inducidas se señala rodeándola con un círculo, indicando su peso molecular estimado.

La inducción de la proteína TAS14 y sus formas fosforiladas es muy notable en plántulas en fase 2. Esta proteína se induce, al igual que en fase 1, por NaCl, ABA y NaCl+ABA; su máximo nivel de expresión se alcanza en plántulas sometidas al doble tratamiento.

En la tabla 3 se resumen los datos referentes a los polipéptidos inducibles por estrés salino y ABA detectados mediante IEF.

Pm (kDa)	Fase germ.	Condiciones de germinación			
		NaCl 5 g/L	NaCl 10 g/L	ABA 10 $\mu$ M	NaCl+ABA
59	2/3	-	+	+	+
54	1 y 2/3	-	+	-	+
50	1	-	+	-	+
48	1	+	+	+	+
44	1 y 2/3	-	+	+	+
43.5	2/3	-	+	+	+
42.5	1	-	+	+	+
32	2/3	-	+	-	+
18.8 <sub>1</sub>	1	-	-	+	+
18.8 <sub>2</sub>	2/3	-	-	+	+
18.6	1 y 2/3	-	-	+	+
16 (TAS14)	1 y 2/3	-	+	+	+

Tabla 3. Proteínas de punto Isoeléctrico básico inducibles por NaCl y/o ABA. Se indican el peso molecular de estas proteínas, la fase de la germinación en que aparecen y los tratamientos que inducen su síntesis.

Los patrones electroforéticos mostrados anteriormente corresponden a proteínas sintetizadas en la radícula durante las 2 últimas horas del tratamiento. Con el fin de determinar si se acumulan proteínas específicas durante los tratamientos realizados, se analizaron mediante electroforesis bidimensional los mismos extractos de proteínas, aunque éstas se detectaron mediante tinción con nitrato de plata (Blum *et al.*, 1987) (datos no mostrados). No se detectan diferencias apreciables entre los patrones de plántulas control y plántulas tratadas, a excepción del grupo de polipéptidos básicos de 50/54 kDa que se detectan en las fase avanzadas de germinación en plántulas tratadas. Este resultado sugiere que las proteínas diferenciales detectadas mediante marcaje



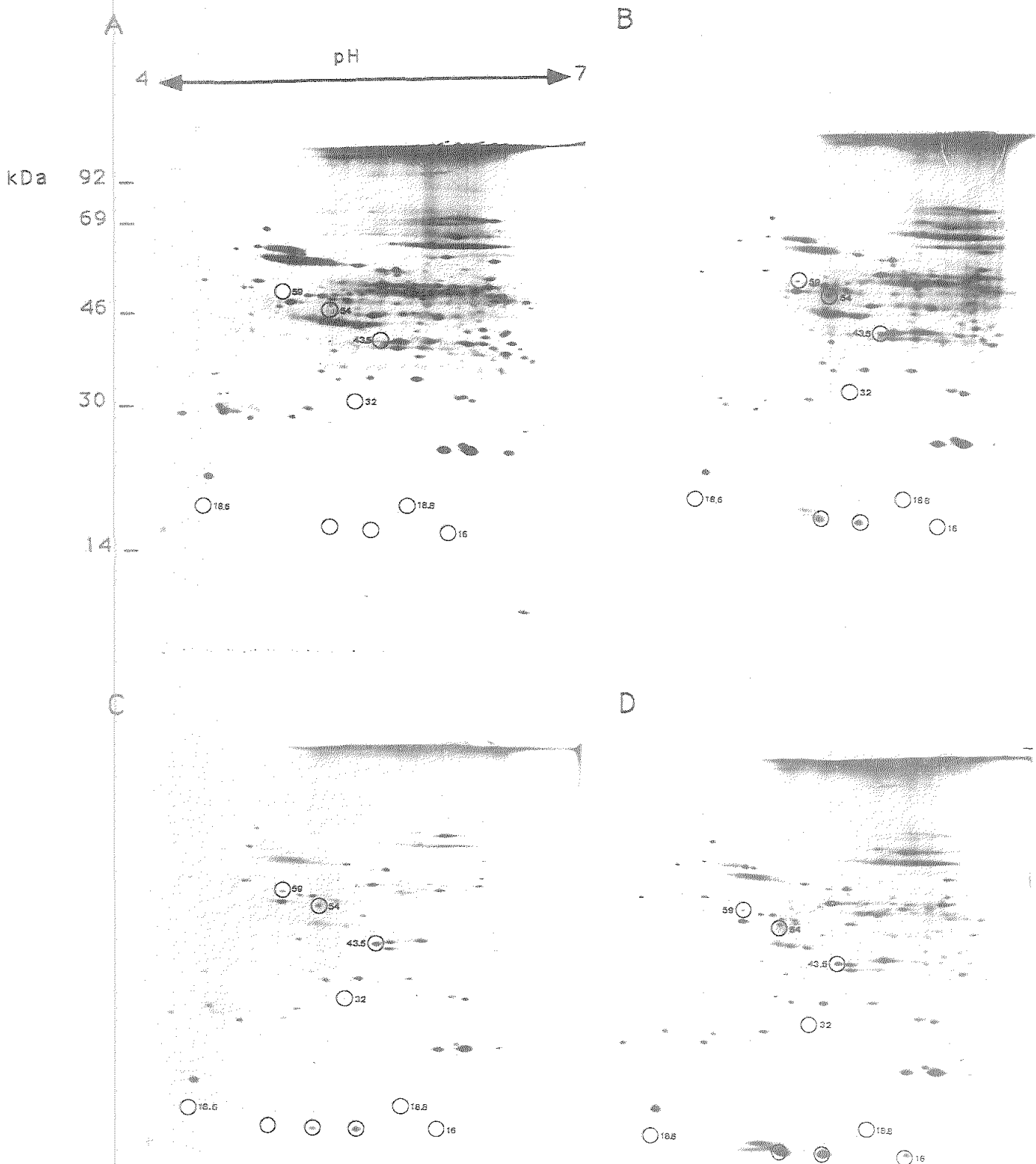
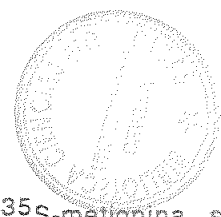


Figura 6. Patrones autorradiográficos de proteínas marcadas *in vivo* con  $^{35}\text{S}$ -metionina separadas mediante IEF/SDS-PAGE correspondientes a radículas de plántulas en fase de germinación 2 germinadas en agua (A), ABA 10  $\mu\text{M}$  (B), NaCl 10 g/L (C) o NaCl 5 g/L y ABA 10  $\mu\text{M}$  simultáneamente (D). La posición de las proteínas inducidas se señala rodeándola con un círculo, indicando su peso molecular estimado.



*in vivo* no son proteínas mayoritarias, sino que sus niveles de acumulación son bajos.

### 1.5 Proteínas básicas inducidas por choque salino

Los experimentos de choque salino se realizaron con plántulas germinadas en agua y que se encontraban en fase 2 de germinación. Las plántulas se incubaron en soluciones salinas durante 24 horas; durante las 2 últimas horas del choque, las plántulas se incubaron en presencia de  $^{35}\text{S}$ -metionina y se analizaron los patrones bidimensionales de los extractos proteicos de las radículas marcadas.

Los patrones bidimensionales de radículas expuestas a choque salino, resueltos mediante NEpHGE/SDS-PAGE, se muestran en la fig 7. Se realizaron tratamientos de 24 horas con soluciones NaCl 10 g/L (fig. 7C) y NaCl+ABA (fig 7D).

El tratamiento con NaCl 10 g/L induce las proteínas de 18, 17, 16, 50 y 54 kDa ya descritas. Es llamativo que las proteínas de 17 y 16 kD se induzcan en fase 2 por choque salino, mientras que durante la germinación en condiciones salininas aparecen exclusivamente en plántulas en fase 1.

El choque con NaCl+ABA induce la síntesis de los polipéptidos de 18, 50 y 54 kDa, y se detectan muy levemente los de 12 y 13 kDa.

Los polipéptidos, resueltos mediante IEF/SDS-PAGE, inducidos en plántulas sometidas a choques salinos se muestran en la fig. 7. Los tratamientos fueron los descritos anteriormente (10 g/L NaCl y NaCl +ABA durante 24 horas). En ambos casos se observa una inhibición de la síntesis de muchos de los polipéptidos característicos de radículas en fase 2.

El tratamiento con NaCl+ABA induce la síntesis de la proteína TAS 14; aparecen además varias proteínas cuya movilidad electroforética no coincide con la de ninguno de los polipéptido descritos como inducibles por sal o ABA a lo largo de la germinación.

Con el tratamiento de 10 g/L de NaCl se detecta tenuemente TAS14 y se induce la síntesis de un polipéptido de 48 kDa que también aparecen en plántulas en fase 1 durante la germinación en respuesta a sal o ABA. Esta proteína, al igual que ocurre con las proteínas ácidas de 17 y 16 kDa, es inducible por choque salino en fase 2, siendo características de la fase 1 durante la germinación en sal y ABA.

Las flechas señalan los polipéptidos que aparecen con tratamientos de choque salino y que no son detectables en las demás condiciones estudiadas.

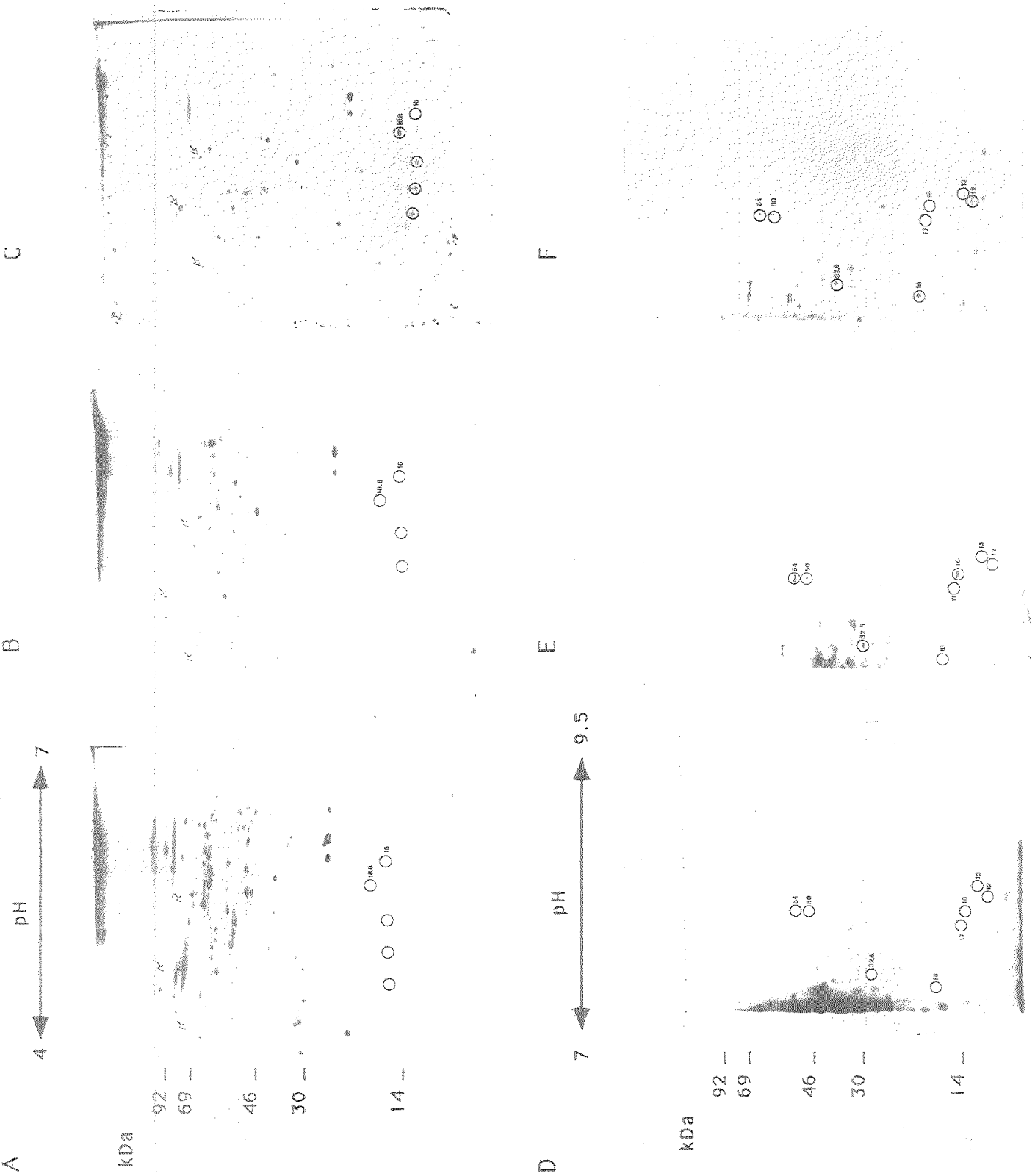


Figura 7. Patrones autorradiográficos de proteínas marcadas *in vivo* con  $^{35}\text{S}$ -metionina correspondientes a radículas de plántulas en fase de germinación 2, germinadas en agua (A), sometidas a choque durante 24 horas con 10 g/L NaCl (B) y con NaCl 5 g/L y ABA 10  $\mu\text{M}$  simultáneamente (C), resueltas por IEF/SDS-PAGE. Los paneles D, E y F corresponden a los mismos extractos, respectivamente, separados por NEPHGE/SDS-PAGE. Las flechas indican proteínas que aparecen exclusivamente por tratamientos de choque.

## 2. Aislamiento de clones de cDNA inducidos por NaCl y ABA

Con el objetivo de aislar y caracterizar genes de tomate inducibles por NaCl y/o ABA se analizó por hibridación diferencial una clonoteca de cDNA disponible en nuestro laboratorio (Godoy, J.A., Tesis doctoral), construída a partir de mRNA aislado de plántulas de tomate tratadas simultáneamente con ABA y NaCl.

Se analizaron 30.000 bacteriófagos recombinantes con sondas de cDNAs sintetizadas a partir de RNA poliadenilado de plántulas tratadas durante 24 horas con 10  $\mu$ M ABA y 5 g/L NaCl (sonda+) y RNA poliadenilado de plantas germinadas en agua (sonda -). Cada una de las sondas se hibridó con una réplica sobre filtro de nitrocelulosa de las placas de lisis, añadiendo igual número de cpm de cada sonda. Se seleccionaron cuatro fagos que mostraron mayor hibridación con la sonda (+) que con la (-). Estos fagos se purificaron y recomprobamos mediante sucesivos plaques e hibridaciones diferenciales. Se aislaron los insertos contenidos en cada uno de estos fagos mediante digestión con *Eco* RI y purificación en geles de agarosa de bajo punto de fusión. Finalmente, se comprobó que las diferencias en la intensidad de hibridación se correspondían realmente con diferencias en la expresión de estos genes en plántulas; para ello se extrajo RNA total de plántulas de tomate tratadas con 10  $\mu$ M ABA y 5 g/L NaCl y de plántulas germinadas en H<sub>2</sub>O. La acumulación del mRNA correspondiente a cada uno de los cuatro cDNAs aislados se determinó mediante análisis por *northern blot*. Se seleccionó uno de los clones, denominado TSW12, para su posterior caracterización. La fig 8 muestra que el mRNA TSW12 está presente en plántulas control, aunque su nivel de acumulación aumenta significativamente con el tratamiento descrito. El tamaño del RNA mensajero con el que hibrida la sonda TSW12 es de aproximadamente 700 nucleótidos. Sin embargo, el inserto aislado del fago era de sólo 200 pares de bases. Este tamaño tan reducido correspondía a un clon incompleto; por este motivo se analizó de nuevo la clonoteca utilizando el inserto de 200 pb como sonda, obteniendo así 8 nuevos clones. Entre estos clones, una vez purificados, se seleccionó finalmente el que contenía el inserto de mayor tamaño (670 pb), que, como posteriormente se comprobó, contenía la secuencia completa de la zona codificante. El resultado del *northern* con este nuevo inserto fué idéntico al obtenido con el fragmento de 200 pb.

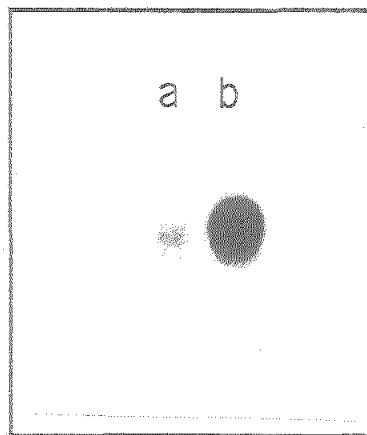


Figura 8. Hibridación de RNA total de plántulas control (a) y plántulas tratadas durante 24 horas con 10  $\mu$ M ABA y 5 g/L NaCl (b) con la sonda TSW12.

### 3. Secuencia de nucleótidos del clon TSW 12

Una vez comprobado que el fago purificado contenía un cDNA que se expresaba diferencialmente en respuesta a sal, se subclonó este fragmento *Eco* RI-*Eco* RI en el plásmido pBluescript II SK(+). En primer lugar se hizo un mapa de restricción del cDNA. Entre las enzimas para las que este cDNA tiene diana se encuentra *Bam*HI, que corta al inserto asimétricamente. Este dato se utilizó para determinar la orientación del inserto respecto al sitio de clonaje múltiple del vector. Se seleccionaron transformantes con el cDNA en las dos orientaciones posibles dentro del vector, se obtuvo DNA de cadena sencilla (correspondiente a la cadena +) de ambos plásmidos y se secuenciaron. La secuencia se leyó desde cada extremo hasta solapar. En la fig. 9 se muestra un esquema de la posición de las dianas para algunos enzimas de restricción en el cDNA. La existencia de una diana *Pvu* II en la mitad del clon permitió subclonar los fragmentos *Eco* RI-*Pvu* II y *Pvu* II-*Eco* RI en pBluescript II SK(-) digerido con *Eco* RI y *Sma* I; de este modo se secuenció la cadena complementaria a la ya secuenciada.

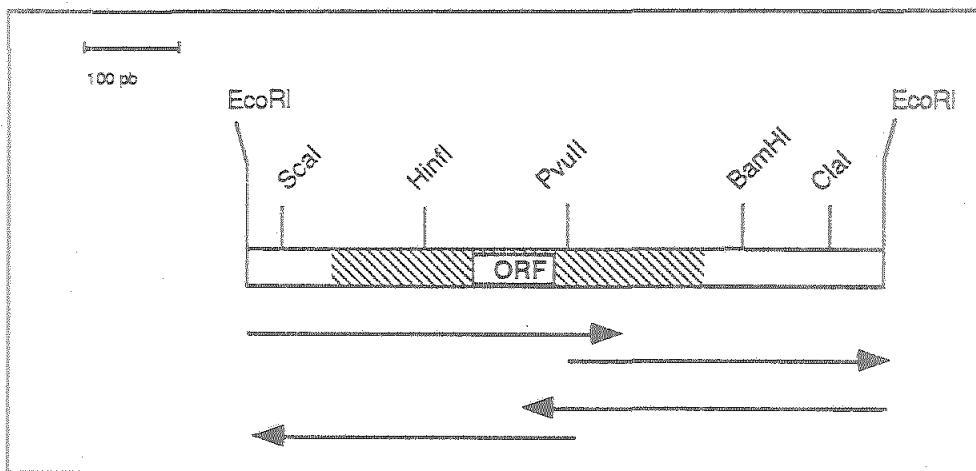


Figura 9. Mapa de restricción del clon TSW12 y estrategia de secuenciación empleada.

La fig. 10 muestra la secuencia nucleotídica del clon TSW12, que contiene una fase de lectura abierta de 114 aminoácidos. El polipéptido codificado tiene un peso molecular de 11.590 Da. A continuación del codón de inicio hay una zona de 23 aminoácidos, en su mayoría hidrofóbicos, que presenta las características propias de un péptido señal (von Heijne, 1983). El peso de la proteína, excluyendo este péptido señal, es de 9.090 Da. La secuencia de la proteína TSW12 madura tiene un alto contenido (24%) en alanina+glicina y una proporción de 10:3 de residuos básicos frente a residuos ácidos; esta composición se ve reflejada en el valor del punto isoelectrico deducido (8.85). Los aminoácidos fenilalanina, glutamina, histidina, metionina y triptófano están ausentes en la proteína madura. En la figura 11, el perfil de hidrofobicidad (Kyte y Doolite) muestra la presencia de una región hidrofóbica en la zona central de la secuencia, entre los residuos 59 y 72, rodeada por dominios hidrofóbicos. La zona de mayor hidrofobicidad se localiza en el extremo amino-terminal, coincidiendo con la secuencia del péptido señal.

1 TTTT TTTT TTTT TTTT TAGCTTGAAAGAGTACTA

30 TTTTCATCATACTATACTCTTTACTATAATATTATCCTCTCTATTTTTTCATTATCATTAAC

90 AAT ATG GAA ATG GTT AGC AAA ATT GCA TGC TTT GTT CTT TTG TGC  
Met Glu Met Val Ser Lys Ile Ala Cys Phe Val Leu Leu Cys

135 ATG GTA GTG GTT GCA CCC CAT GCA GAG GCA TTA ACT TGT GGT CAA  
Met Val Val Val Ala Pro His Ala Glu Ala Leu Thr Cys Gly Gln

180 GTT ACT GCT GGC TTG GCT CCT TGC CTC CCT TAT CTT CAA GGC CGT  
Val Thr Ala Gly Leu Ala Pro Cys Leu Pro Tyr Leu Gln Gly Arg

225 GGC CCT CTA GGA GGC TGT TGT GGT GGT GTT AAG AAT CTG TTG GGT  
Gly Pro Leu Gly Gly Cys Cys Gly Gly Val Lys Asn Leu Leu Gly

270 TCA GCC AAG ACT ACC GCG GAT CGA AAG ACA GCA TGC ACT TGC TTG  
Ser Ala Lys Thr Thr Ala Asp Arg Lys Thr Ala Cys Thr Cys Leu

315 AAA TCA GCT GCT AAT GCT ATA AAG GGA ATT GAT TTG AAC AAA GCT  
Lys Ser Ala Ala Asn Ala Ile Lys Gly Ile Asp Leu Asn Lys Ala

360 GCT GGT ATT CCT AGT GTT TGT AAA GTT AAC ATT CCT TAC AAG ATC  
Ala Gly Ile Pro Ser Val Cys Lys Val Asn Ile Pro Tyr Lys Ile

405 AGC CCC TCC ACT GAC TGC TCC ACG GTT CAG TAAAGTTGATCATCAGAATA  
Ser Pro Ser Thr Asp Cys Ser Thr Val Gln

455 TGGAACCATTTGAGGAGAAGTTATAAGAATAAGATGAATGGAGTGTGATCCTGCTTATGG

515 ATCCATTAGTTATATGTTGTGTTTGTGTCTTTTTGTTTCTTTTTTCGTTTTGTCTTTTG

575 GGGGTCTTGTATCGAACTTCACTATCGATGGATTGTATTACTTTAATCCAATCTTGATA

635 ATATATATCTATCTTTTTTAGTAAAAA

Figura 10. Secuencia nucleotídica del cDNA TSW12 y secuencia de aminoácidos de su fase de lectura abierta. La secuencia subrayada corresponde al posible péptido señal.

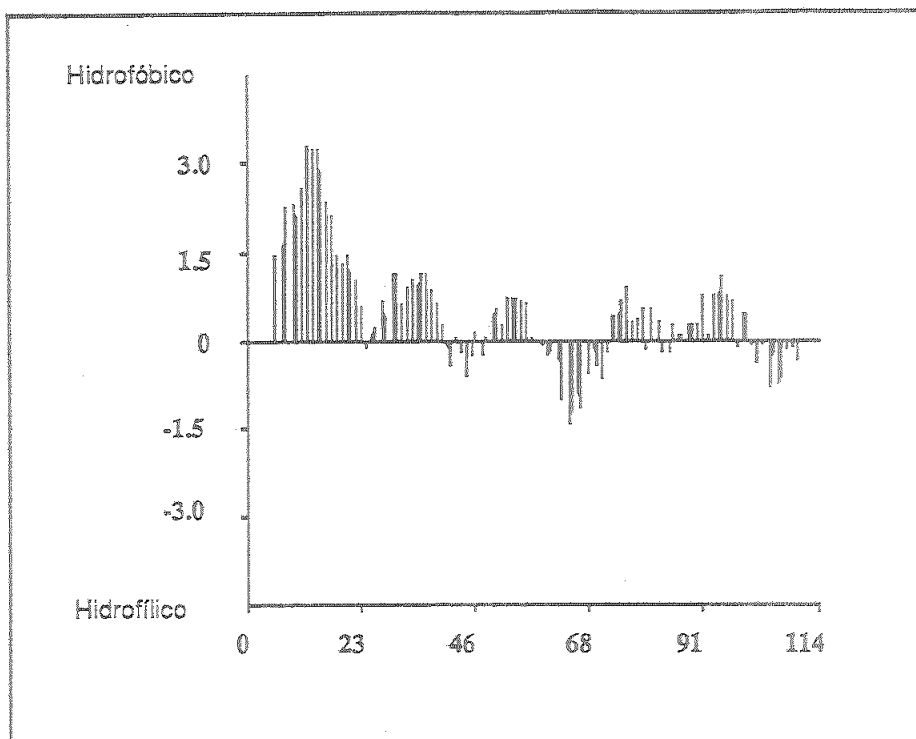


Figura 11. Perfil de hidrofobicidad de la proteína Tsw12, según el algoritmo de Kyte-Doolittle (1982).

Secuencia	Especie	Referencia
LTPs	Espinaca	Bernhard <i>et al.</i> , 1990
LTPm	Maiz	Tchang <i>et al.</i> , 1989
LTPc	Cebada	Mundy y Rogers, 1986
PAPI	Arroz	Yu <i>et al.</i> , 1988
PAPI	<i>Eleusine coracana</i>	Campos y Richardson, 1990
LTPt	Trigo	Simorre <i>et al.</i> , 1991
LTP isoformas A, B y C	Ricino	Takishima <i>et al.</i> , 1991
EP2	Zanahoria	Sterk <i>et al.</i> , 1991
Ltp1	Tabaco	Fleming <i>et al.</i> , 1992

Tabla 4. Relación de secuencias que muestran similitudes significativas con Tsw12.

La secuencia de nucleótidos de TSW 12 está recogida en la base de datos EMBL, Genebank y DDBJ con el número de acceso X 56040.

#### 4. Comparación de TSW12 con otras secuencias

Al comparar la secuencia de la proteína Tsw12 con las secuencias disponibles en bases de datos (EMBL, Genebank, SwissProt) se encontraron varias con las que Tsw12 presenta homologías significativas. Estas secuencias corresponden a proteínas de plantas que transfieren lípidos (lipid transfer proteins, LTP) (tabla 4). Estas proteínas son LTP de espinaca, maíz, arroz, cebada, *Eleusine coracana* (indian finger millet), trigo, zanahoria y ricino. En





Se analizaron las predicciones de estructuras secundarias para Tsw12 utilizando los algoritmos de Chou y Fasman (1974) y Garnier *et al.* (1978), aplicando los programas PEPLOT y PEPTIDESTRUCTURE, del Genet. Comp. Group de la Universidad de Wisconsin. El porcentaje de aciertos de estos algoritmos es únicamente del 50-60%; sin embargo, en los casos en que las predicciones de los distintos algoritmos coinciden, y cuando, además, los resultados obtenidos son coincidentes en proteínas homólogas, el porcentaje de acierto llega a ser del 70-90% (Nishikawa y Ooi, 1986). Este es el caso de la proteína Tsw12, en la que habría tanto zonas en hoja plegada- $\beta$  como en conformación de  $\alpha$ -hélice; las zonas en hoja plegada- $\beta$  van desde la posición 15 a la 20 y de la 32 a la 39, separadas entre sí por una zona de giro. Una tercera zona en hoja plegada- $\beta$  estaría próxima al extremo carboxiterminal, entre los residuos 70 y 81. Las regiones comprendidas entre los residuos 1 y 5 y entre los residuos 52 y 61 se dispondría en  $\alpha$ -hélice.

Entre las proteínas con las que Tsw12 muestra similitud se encuentra una proteína de tomate, *le 16*, que se induce por sequía (Plant *et al.*, 1991). El porcentaje de similitud con Tsw12 es del 62 %. Al comparar estas proteínas (fig. 13) se observa una zona extremadamente similar (91%), desde la posición 1 a 59 de la proteína madura; a partir de la posición 60 la similitud es del 8 %. Sin embargo, al comparar los cDNAs correspondientes se mantiene la homología a lo largo de toda la zona codificante. Se observa que en el nucleótido 271 de *le 16* hay un cambio de fase de lectura respecto a Tsw12 por ausencia de un nucleótido. Al leer el extremo 3' del cDNA *le 16*, a partir de la posición 271 con una fase de lectura distinta, el polipéptido deducido presenta una similitud del 75% con el extremo carboxiterminal de Tsw12, a partir de la posición 60. Esta discrepancia sugiere que el clon *le 16* ha podido alterarse durante el proceso de clonaje. La secuencia de TSW12 está corroborada con la de un clon homólogo de menor tamaño, citado anteriormente.

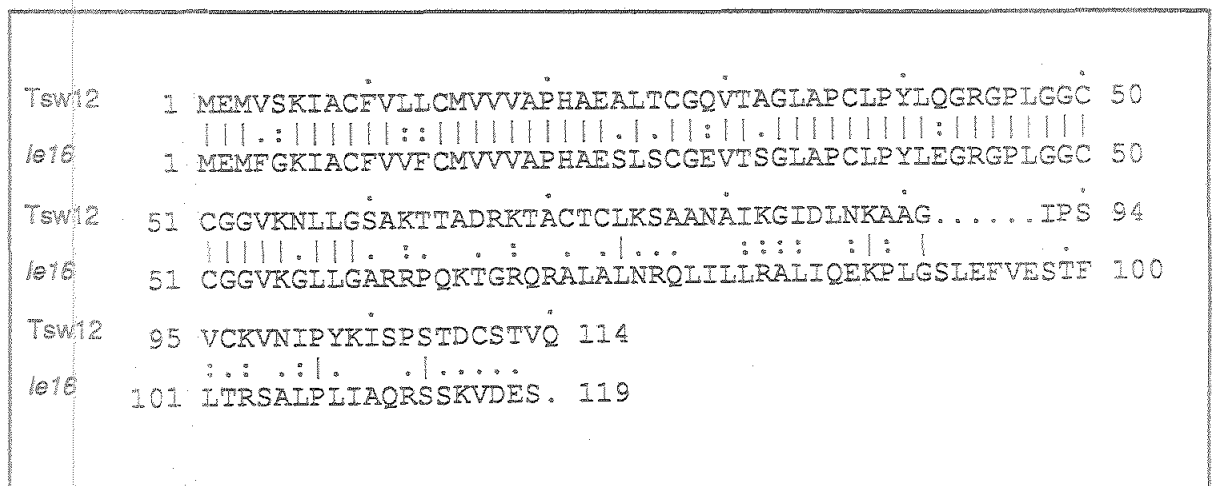


Fig. 13. Alineamiento de la proteína Tsw12 con la proteína *le16*.

## 5. Southern genómico de TSW12

Para determinar el número de copias del gen *tsw12* en el genoma y la existencia de otros genes de secuencia similar, se realizaron hibridaciones del cDNA TSW12 con DNA genómico de tomate en condiciones de alta y baja estringencia. Se digirieron fracciones de 10 µg de DNA con varias enzimas, se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa y se transfirieron a membrana de nylon. Las muestras se prepararon por duplicado, y cada una de las réplicas de la membrana se incubó en las condiciones de hibridación y lavado fijadas.

La estringencia de hibridación se puede ajustar alterando factores que afectan la estabilidad de los híbridos. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de híbridos DNA:DNA viene dada por la ecuación:

$$T_m = 81 + 16.6(\log M) + 0.4 (\%G + C) - 0.6 (\% \text{ formamida}) - 600/n - 1(\%d),$$

siendo  $M$  la molaridad del ión monovalente de la solución de hibridación,  $G+C$  el porcentaje de residuos guanina y citosina de la sonda de DNA,  $n$  su tamaño en pb y  $d$  el porcentaje de disparidad entre las cadenas de DNA (Meinkoth, 1984).

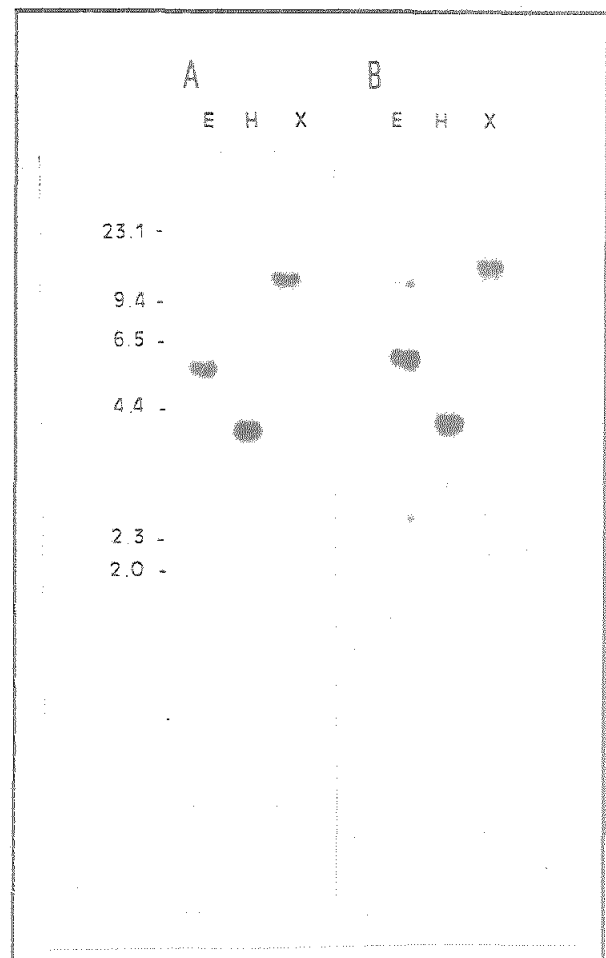


Figura 14. Análisis Southern de DNA total de tomate digerido con *EcoRI* (E), *HindIII* (H) y *Xba I* (X), en condiciones de alta (A) y baja (B) estringencia, utilizando como sonda el inserto TSW12. Los marcadores de tamaño, en Kpb, corresponden a DNA de fago lambda digerido con *HindIII*.

La hibridación del DNA genómico con la sonda TSW12 en condiciones de alta estringencia se llevó a cabo como se describe en Material y Métodos (0.75 M NaCl, 50% formamida) y a la temperatura de 42°C ( $T_m - 21$ ), parámetros estándar para detectar fragmentos 100-95% homólogos. La hibridación en condiciones más permisivas se realizó a 32°C ( $T_m - 31$ ) en la misma solución; estas condiciones son apropiadas para detectar fragmentos de DNA con homología del 85-90%, ya que, como indica la ecuación, por cada disminución de homología del 1% la  $T_m$  desciende aproximadamente 1°C.

Como muestra la figura 14, en condiciones de alta estringencia (fig. 14 A) se detecta una sola banda con las enzimas probadas; este resultado sugiere que existe un solo gen por genoma haploide, aunque no se puede descartar la existencia de varias copias en los fragmentos detectados. En condiciones de baja estringencia (fig. 14 B) se observan una serie de bandas de menor intensidad, correspondientes a otros genes con homología a TSW12.

## 6. Expresión en plantas adultas del RNA mensajero correspondiente al clon TSW12

### 6.1 Efecto del tratamiento con NaCl

Mediante análisis por *northern blot* se estudiaron los niveles de acumulación del mRNA TSW12 en plantas de tomate en distintas fases de su desarrollo y en plantas sometidas a diferentes tratamientos.

En primer lugar se estudió si el mensajero TSW12, aislado de una clonoteca de plántulas de ocho días de edad, estaba presente en plantas adultas de tomate. Se utilizaron plantas con 6 ó 7 hojas formadas, cultivadas hidropónicamente en medio Hoagland al 50%, bajo ciclos de 16 horas diarias de luz y 25°C/20°C de temperatura día/noche. Se aisló RNA total de plantas no tratadas y de plantas tratadas con 10 g/L de NaCl, que se añadió al medio nutritivo. Al finalizar el tratamiento el material se congeló en nitrógeno líquido, recogiendo por separado raíces, tallos y folíolos de hojas; en la fracción de tallos se incluyeron también los peciolo. Las muestras de RNA separadas por tamaños mediante electroforesis en gel de agarosa, se transfirieron a membranas de nylon. La presencia del mensajero TSW12 se determinó por hibridación del cDNA TSW12 con el RNA fijado al filtro.

La figura 15 muestra la cinética de inducción del mRNA correspondiente a TSW12 en plantas adultas tratadas con 10 g/L NaCl. El mRNA TSW12 no se detecta en ningún órgano de plantas control. Tras 6 horas de tratamiento con NaCl, TSW12 se detecta en tallos; el nivel máximo de expresión se alcanza tras 24 horas de tratamiento y se mantiene durante el tercer y séptimo día de tratamiento. En tallos de plantas que han permanecido durante 30 días en presencia de sal, el mRNA TSW 12 está aun presente, aunque no en el grado máximo de acumulación. El tiempo de exposición de las autorradiografías correspondientes a hojas y raíces de la figura 15 es cinco veces superior a las de tallos; en las hojas de estas plantas, el mRNA TSW12 se detecta únicamente tras

esta sobreexposición del filtro. En ningún caso se detecta mRNA TSW12 en raíces.

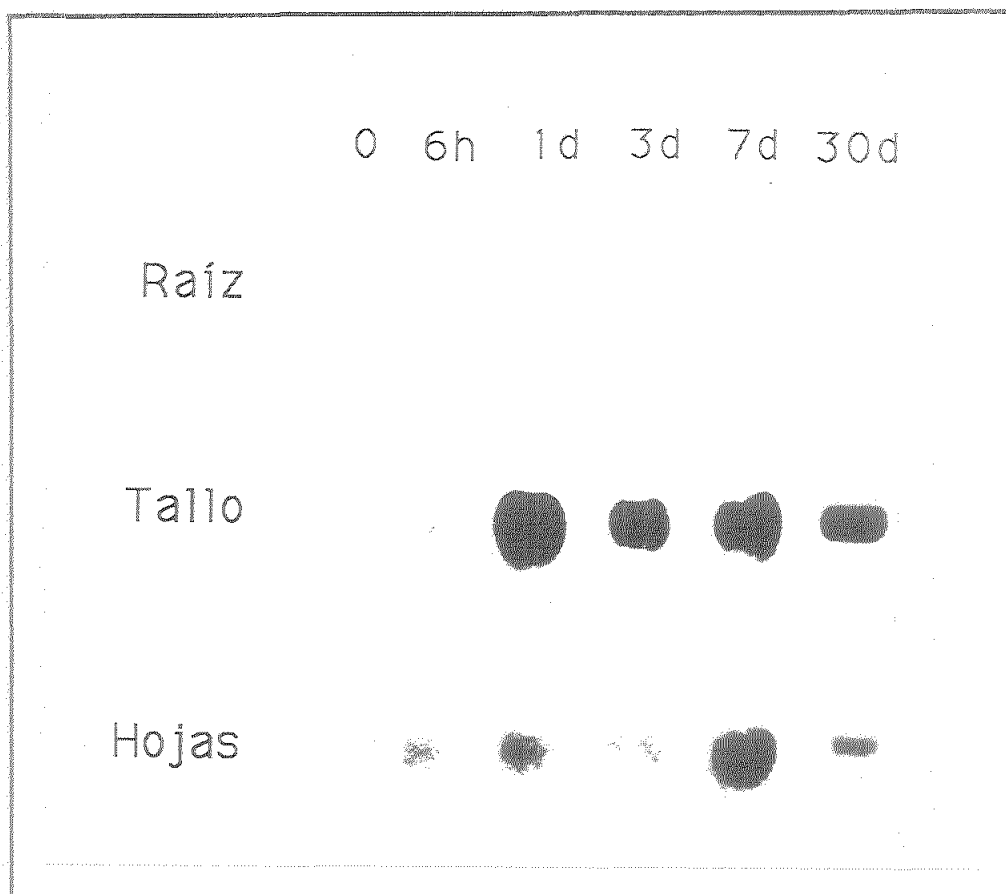


Figura 15. Análisis por *northern blot* de RNA total de raíz, tallo y hojas de plantas de tomate cultivadas hidropónicamente, utilizando como sonda el inserto TSW12. Los distintos carriles corresponden a plantas control (0) y tratadas con NaCl a concentración final de 10 g/L durante el tiempo indicado: 6 horas, 1, 3, 7 ó 30 días. El tiempo de exposición de las autorradiografías correspondientes a raíz y hojas fué cinco veces superior a los correspondientes a tallo.

Para delimitar más exactamente la localización del mensajero TSW12 se analizó por separado tallos y peciolos de plantas tratadas con sal durante 24 horas. Como muestra la figura 16, el mRNA se expresa tanto en tallos como en peciolos, si bien, en éstos el nivel de acumulación es ligeramente mayor.

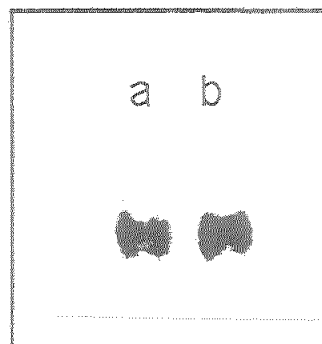
## 6.2 Efecto de otros tratamientos

Se estudió de forma análoga la respuesta del gen TSW12 al estrés osmótico (manitol 300 mM), térmico (40°C, 6 horas), daño mecánico (24 horas) y tratamiento con distintas hormonas (ABA, bencilaminopurina(BAP) y ácido giberélico (GA), 20  $\mu$ M).

Los tratamientos con manitol, bencilaminopurina, ácido giberélico y ABA se realizaron por adición de éstos al medio de cultivo, recogiendo las

plantas 24 horas después. El manitol es un polisacárido no metabolizable por las plantas; la concentración aplicada es aproximadamente equiosmolar a NaCl 10 g/L, por lo que las plantas tratadas con manitol sufren un estrés osmótico comparable al de plantas tratadas con NaCl 10g/L. La figura 17 muestra que TSW12 se induce por manitol 300mM aunque el nivel de acumulación es menor que el inducido por NaCl 10 g/L. El ABA, a la concentración ensayada, 10  $\mu$ M, induce débilmente la expresión de TSW12; no se detecta mRNA TSW12 en los tratamientos con GA y BAP (datos no mostrados).

Figura 16. An  
RNA total de  
plantas de tor  
durante 24 h  
TSW12.



El tratamiento de herida se realizó sobre las hojas, aplicando varias pinzas de diálisis en hojas jóvenes y viejas, dejándolas presionadas durante 24 horas. Varias hojas más se pinzaban 4 horas antes de recoger las plantas. Se utilizaron este tipo de pinzas para evitar la desecación durante el tratamiento. La expresión de TSW12 se induce también por herida. El nivel de acumulación de mRNA TSW12 en plantas heridas es similar al inducido por manitol.

El patrón de acumulación de TSW12 inducido por estos tratamientos es similar al inducido por NaCl, es decir, el mRNA TSW12 no se detecta en raíz y se acumula preferentemente en tallo; en hojas, únicamente se detecta tras prolongar el tiempo de exposición de la autorradiografía.

El choque térmico se aplicó calentando el medio de cultivo a 40°C y manteniendo la planta durante 6 horas a 40°C en la cámara de cultivo, sin alterar las condiciones descritas de luz y humedad. Este tratamiento induce TSW12 muy débilmente en hojas y tallos de *Tsw12*; aunque su acumulación en hojas es menor que en tallos, se observa menor diferencia entre la señal de hibridación en ambos órganos que con otros tratamientos.

El efecto de otras sales sobre la inducción del gen TSW 12 se comparó con los niveles de acumulación obtenidos con 10 g/L (171 mM) NaCl, manteniendo constante la concentración de iones Cl<sup>-</sup> o Na<sup>+</sup>.

Se realizaron tratamientos de 24 horas con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 85 mM y con KCl 171 mM. Como se observa en la figura 18, existen diferencias en la intensidad de la señal de hibridación. La inducción de TSW12 es máxima con el tratamiento con NaCl y mínima con el tratamiento con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

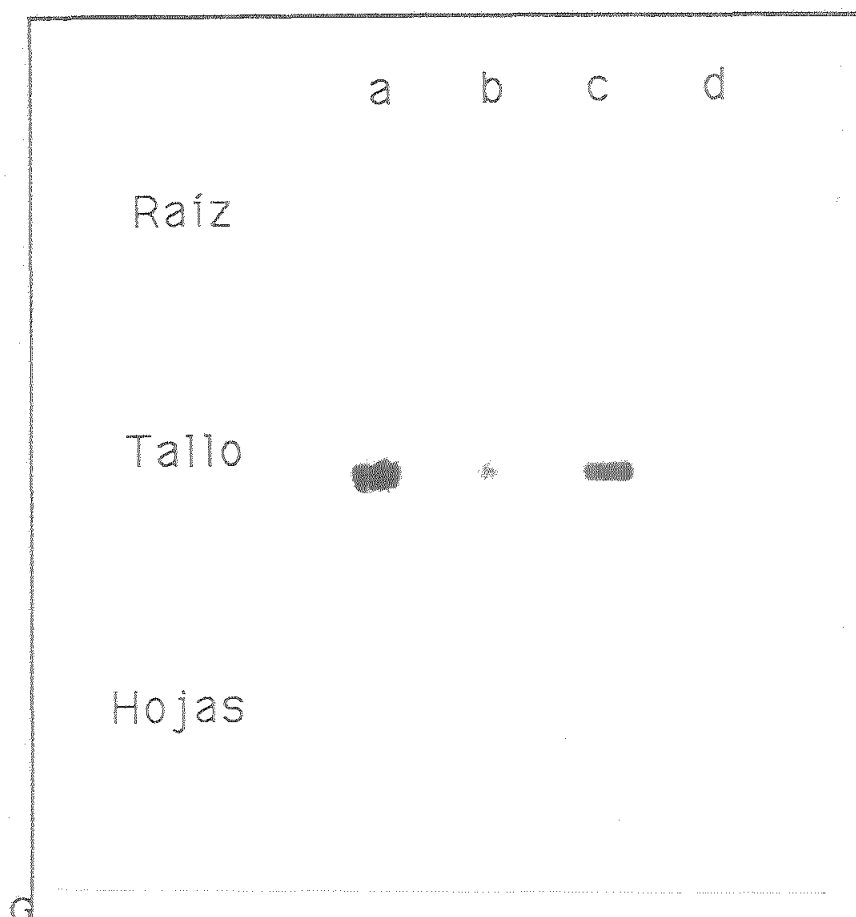


Figura 17. Análisis por *northern blot* de RNA total de raíz, tallo y hojas de plantas de tomate cultivadas hidropónicamente tratadas con manitol 300mM (a), ABA 10  $\mu$ M (b) o herida (c) durante 24 horas e incubadas a 40°C durante 6 horas (d), utilizando como sonda TSW12. Los filtros correspondientes a raíz y hojas se expusieron 5 veces más tiempo a la película que los correspondientes a tallos.

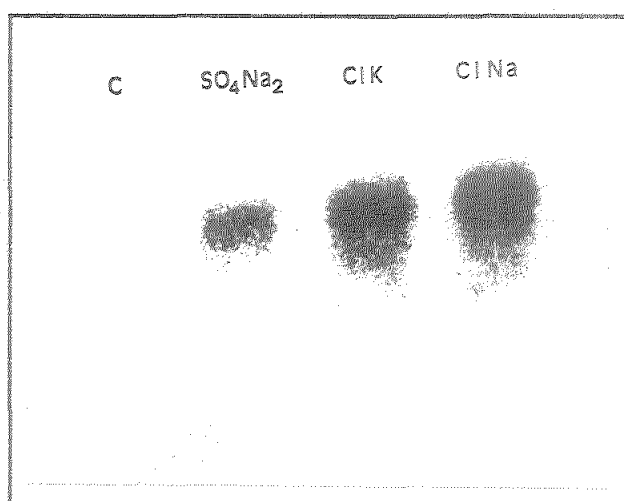


Figura 18. Hibridación de la sonda TSW12 con RNA total de tallos de plantas de tomate tratadas con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 85 mM, KCl 171 mM ó NaCl 171 mM durante 24 horas.

## 7. Cinética de acumulación del mRNA TSW12 durante la germinación

Aunque el mRNA TSW12 no se detecta en plantas adultas no tratadas, sin embargo esta presente en plántulas de 8 días de edad no tratadas (fig. 8); para estudiar la expresión del gen *tsw12* durante el desarrollo de las plantas, se germinaron semillas en medio Hoagland II diluído al 50% y se seleccionaron plántulas en diferentes fases de germinación: a) semillas embebidas durante 24 horas en agua, b) plántulas de 4 mm de longitud total, c) plántulas con radículas de 15 mm de longitud, d) germínulas con cotiledones expandidos y e) plántulas con la primera hoja formada. (Las edades aproximadas de estas plántulas son, respectivamente, 3, 5, 8 y 18 días). Se aisló RNA total y se determinaron los niveles de mRNA TSW12 mediante análisis *northern*. Como se observa en la figura 20, este mensajero está ausente en semillas embebidas y se detecta muy débilmente en plántulas con una hoja formada tras sobreexposición del filtro. El mRNA TSW12 comienza a detectarse en semillas de 4 mm de longitud, y el máximo de inducción ocurre en semillas de 15 mm, donde la señal es al menos 20 veces más intensa que en el caso de plántulas con cotiledones expandidos.

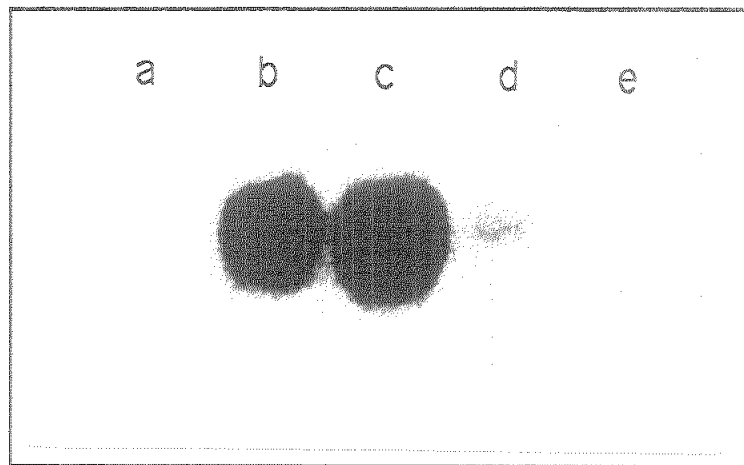


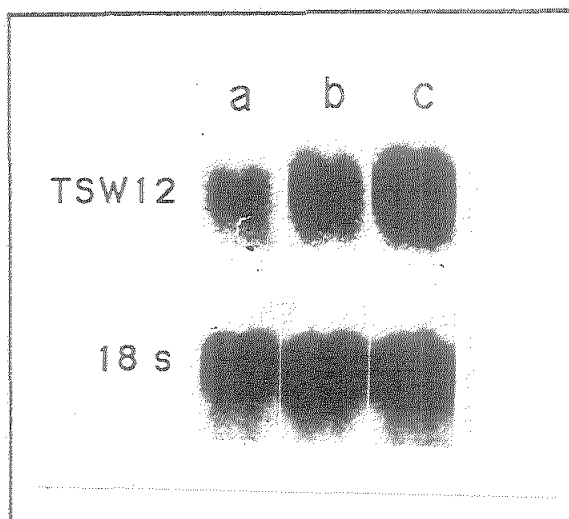
Figura 19. Análisis por *northern blot* de RNA total de semillas embebidas durante 24 horas en agua (a), plántulas de 4 mm (b), plántulas con radículas de 15 mm (c), plántulas con cotiledones expandidos (d) y plántulas con la primera hoja formada (e).

## 8. Acumulación del mRNA TSW12 en plántulas sometidas a distintos tratamientos

Se determinó el nivel de acumulación del mRNA TSW12 en plántulas de tomate de 8 días de edad tratadas con NaCl 10 g/L o sometidas a choque térmico. La figura 20 muestra que, si bien el mRNA TSW12 se acumula en plántulas no tratadas, el nivel de expresión aumenta con el tratamiento con 10 g/L de NaCl

durante 24 horas y con el choque térmico de 37 °C durante 6 horas. La inducción del mRNA TSW12 por choque térmico es ligeramente mayor que por NaCl.

Figura 20. Análisis por *northern blot* de RNA total de plántulas de tomate de 7 días de edad germinadas en agua (a), tratadas con NaCl 10 g/L durante 24 horas (b) o incubadas durante 6 horas a 37°C (c). Se muestra la hibridación con una sonda de DNA correspondiente a un gen de rRNA 18s de rábano usada para normalizar la cantidad de RNA en los carriles.



#### 9. Expresión de una proteína de fusión $\beta$ -galactosidasa/Tsw12 en *Escherichia coli*

Para la obtención de anticuerpos contra la proteína Tsw12 se obtuvo en cantidad suficiente esta proteína mediante su expresión en bacterias. Para ello se hizo una fusión en fase del cDNA TSW12 con el gen *lacZ*, en un plásmido de la serie pEX. Las 3 versiones de éste plásmido permiten clonar fragmentos de DNA en cada una de las fases de lectura posibles, obteniéndose proteínas de fusión a  $\beta$ -galactosidasa. La síntesis de la proteína de fusión está bajo el control de un represor *cI* termosensible, permitiendo la transcripción sólo a temperaturas altas (42°C).

El cDNA TSW12, clonado en el plásmido pBluescript II SK(+), se digirió con la enzima de restricción PvuII, que corta una sola vez en el cDNA (nucleótido 321) y con la enzima PstI que corta en el sitio de clonaje múltiple del plásmido. Se purificó el fragmento Pvu II-Pst I de 345 pb, que incluye la región codificante de los 37 aminoácidos carboxiterminales de la proteína, y se ligó con el plásmido pEX1, digerido con *Sma* I y *Pst* I y defosforilado, tal como se muestra en el esquema de la fig. 21. El incremento del peso molecular de la proteína híbrida respecto al de la  $\beta$ -galactosidasa, deducido a partir de sus secuencias, es de 2.4 kDa.

Una vez que se comprobó la construcción mediante análisis por enzimas de restricción, se transformó la estirpe POP2136 con el plásmido pEX1/TSW12 y se indujo la superproducción de la proteína híbrida incubando el cultivo a 42°C. Se obtuvieron los extractos proteicos totales de este cultivo y de cultivos portadores de pEX1 incubados a 30°C y a 42°C.



En la figura 22 se muestran estos extractos resueltos en un gel de acrilamida y teñido con azul de Coomassie. En el extracto de bacterias portadoras de pEX1 incubadas a 42°C se observa la acumulación de un polipéptido de 121.3 kDa que no está presente en los extractos de las mismas células cultivadas a 30°C. Las bacterias portadoras del plásmido recombinante pEX1/TSW12 acumulan una proteína mayoritaria de 124.3 kDa.

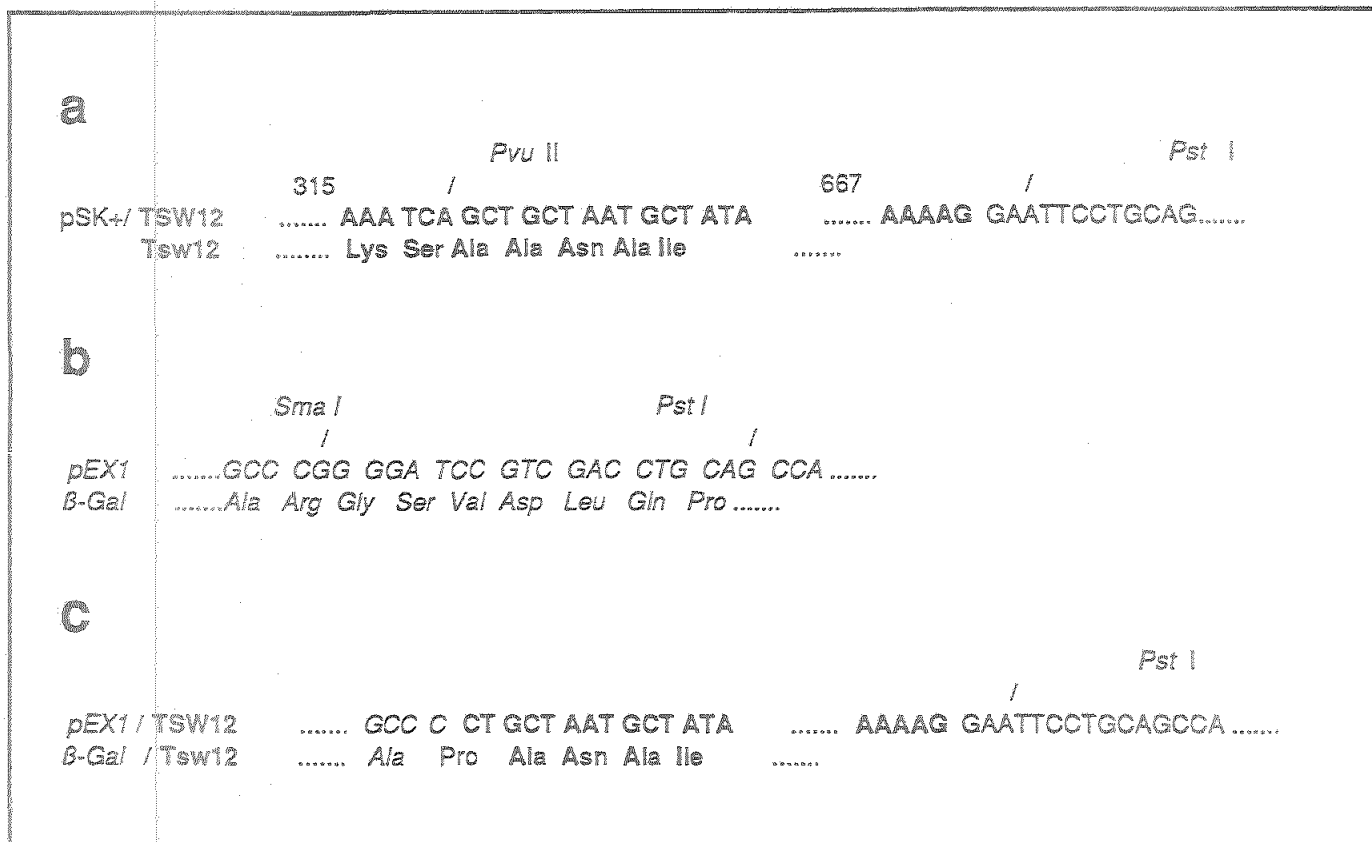
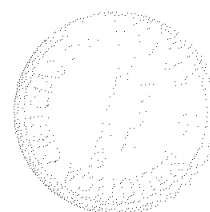


Figura 21. Esquema de la construcción de la proteína de fusión β-galactosidasa/Tsw12 (c), a partir del cDNA TSW12 clonado en el plásmido pSK<sup>+</sup> (a) y del vector pEX1 (b). La secuencia de TSW12 se consigna en negrita y la de pEX1 en cursiva.

Las proteínas de fusión con β-galactosidasa son poco solubles, y cuando se sobreexpresan tienden a agregarse en cuerpos de inclusión, lo que permite una purificación parcial de estas proteínas.(Stanley y Luzio, 1984). De esta manera, a partir de un cultivo a mayor escala, se purificó parcialmente la proteína de fusión β-Gal/TSW12.



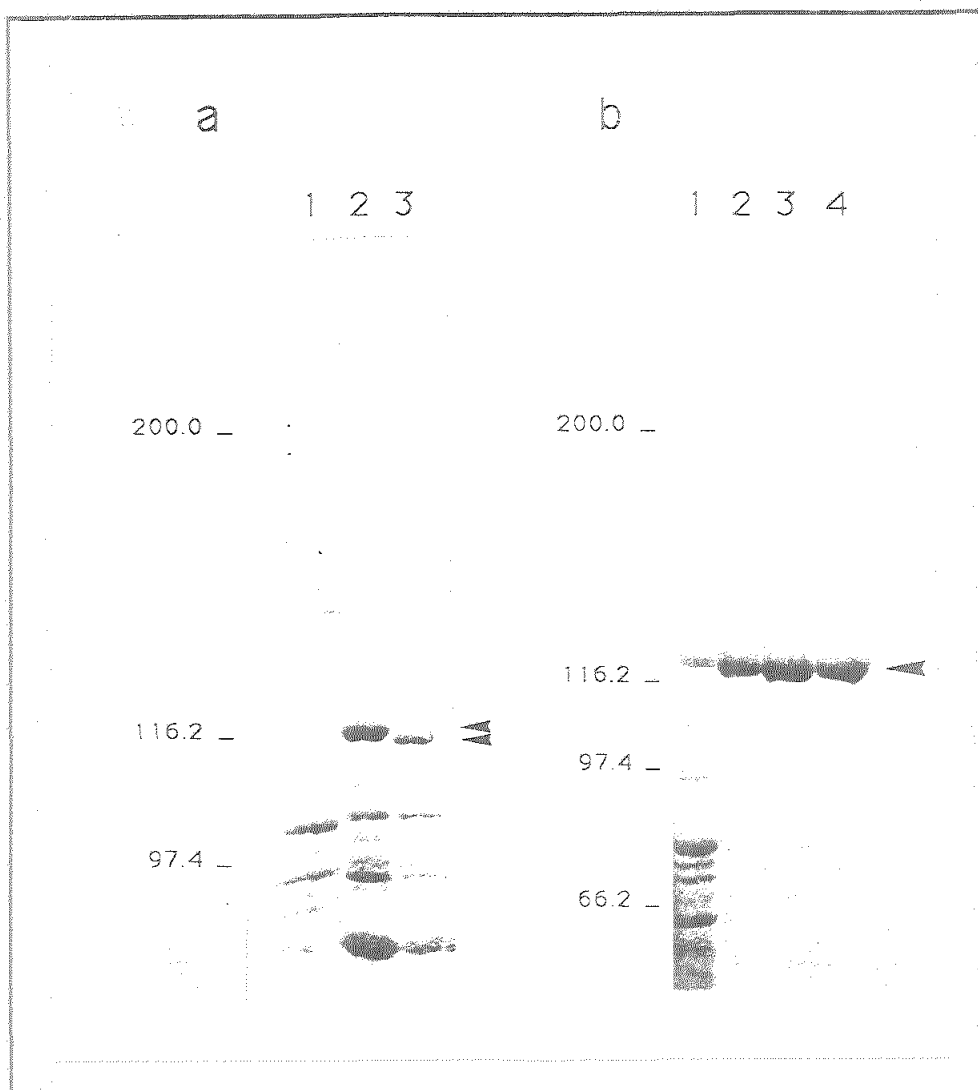


Figura 22. A. Gel de poliacrilamida (5%) -SDS teñido con azul de Coomassie donde se han resuelto extractos totales de proteínas de bacterias portadoras de pEX1 cultivadas a 30°C (1), bacterias portadoras del plásmido recombinante pEX1/TSW12 cultivadas a 42°C durante 2 horas (2) y bacterias portadoras del plásmido pEX1 cultivadas a 42°C durante 2 horas (3). B. Gel de poliacrilamida (7%) -SDS teñido con azul de Coomassie donde se han resuelto cantidades crecientes de extracto enriquecido en proteína de fusión (2-4), frente al extracto total de bacterias portadoras del plásmido recombinante (1). Las flechas señalan la posición de la  $\beta$ -galactosidasa y la proteína de fusión  $\beta$ -galactosidasa/TSW12

### 10. Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína de fusión

Para obtener anticuerpos contra la proteína Tsw12 se inmunizaron dos conejos por inyección subcutánea del extracto enriquecido en proteína de

fusión. Se inyectaron dos dosis de 150 µg de proteína emulsionadas en el adyuvante de Freund correspondiente, con un intervalo de 3 semanas entre ambas. Se extrajeron aproximadamente 20 ml de sangre 10 días después de aplicar la segunda dosis. Se purificó la fracción de inmunoglobulinas G de este antisuero por precipitación con sulfato amónico, a continuación se resuspendió en PBS y se dializó frente al mismo tampón durante 12 horas.

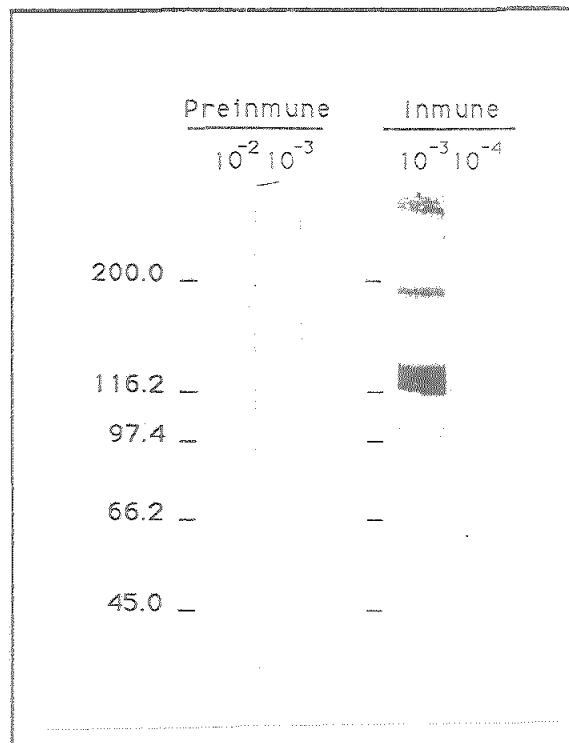


Figura 23. Incubación de extractos enriquecidos en proteína de fusión con suero inmune o preinmune.

La siguiente etapa consistió en titular los anticuerpos específicos contra la proteína de fusión. Para ello, se resolvieron por electroforesis 5 µg de extracto enriquecido en proteína de fusión en un minigel preparativo de acrilamida y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa. El filtro se cortó en tiras verticales de 0,5 cm de anchura, y se incubó con distintas diluciones de los sueros inmune y preinmune. El título del suero 1 resultó mayor que el del suero 2. En la figura 23 se muestra que diluciones de hasta 10.000 veces del suero 1 reaccionan con la proteína de fusión; también se observan reacciones con otras proteínas presentes en el extracto. Diluciones de 100 veces del suero preinmune no reaccionan con ninguna proteína del extracto.

## 11. Purificación por afinidad de anticuerpos específicos contra la proteína Tsw12

Para estudiar la acumulación de la proteína Tsw12 en plantas de tomate se purificaron por afinidad los anticuerpos que reconocen específicamente esta proteína.

El antígeno inyectado al conejo fue un extracto enriquecido en la proteína de fusión en el que están presentes otras proteínas, como se observa en la fig. 22. La respuesta inmune se producirá frente a este conjunto de proteínas y frente a otros antígenos no controlados. Así, la fracción de IgG obtenida a partir del suero del conejo inmunizado es una mezcla compleja de anticuerpos, a partir de la cual se purificaron aquellos que reconocen específicamente a Tsw12.

Como antígeno para la purificación por afinidad se utilizó la proteína de fusión, más abundante y fácil de obtener que la proteína Tsw12 presente en plantas tratadas. Ya que los anticuerpos anti- $\beta$ -galactosidasa reconocen la proteína de fusión, los anticuerpos monoespecíficos contra Tsw12 se purificaron en dos etapas: en la primera, los anticuerpos anti- $\beta$ -galactosidasa se separaron del suero mediante cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa 4B-  $\beta$ -galactosidasa; en la segunda etapa, el extracto enriquecido en la proteína de fusión se resolvió en un gel de poliacrilamida y se transfirió a una membrana de PVDF. La banda correspondiente a la proteína de fusión se recortó e incubó con el suero libre de anti- $\beta$ -galactosidasa obtenido previamente. Los anticuerpos específicos para el fragmento Tsw12 de la proteína de fusión, se eluyeron del filtro con un tampón de pH ácido. Este eluido se neutralizó inmediatamente para preservar la actividad de los anticuerpos.

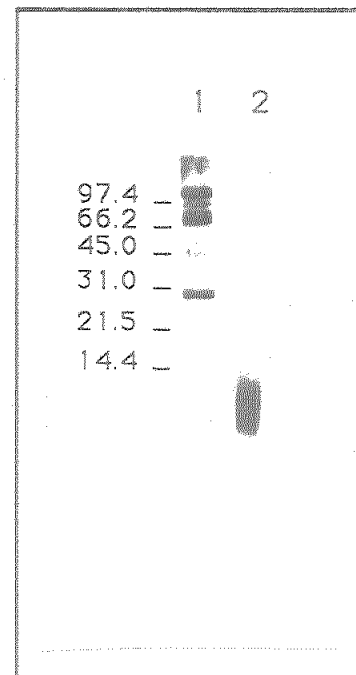


Figura 24. Análisis de los anticuerpos obtenidos por cromatografía de afinidad. Extractos proteicos de tallos de plantas tratadas durante 7 días con 10 g/L de NaCl transferidos a filtro e incubados con suero inmune libre de anticuerpos anti- $\beta$ -galactosidasa y anti-Tsw12 (1) y con anticuerpos específicos anti-TSW12 (2).

Para comprobar la funcionalidad y especificidad del anticuerpo purificado, éste se ensayó frente a extractos de tallos de plantas tratadas durante 7 días con NaCl 10g/L. La figura 24 muestra el resultado de la incubación con los anticuerpos específicos y con el suero libre de anticuerpos anti- $\beta$ -galactosidasa y anti-Tsw12. En el extracto de proteínas de tallos de plantas tratadas con sal, los anticuerpos específicos reconocen una banda que tiene el peso molecular esperado (9 kDa), mientras que el suero carente de anticuerpos anti  $\beta$ -galactosidasa y anti-Tsw12 reconoce numerosas bandas correspondientes a proteínas distintas a Tsw12.

## 12. ACUMULACION DE LA PROTEINA TSW 12 EN PLANTAS ADULTAS DE TOMATE

Los niveles de acumulación relativos de la proteína Tsw12 se determinaron en plantas de tomate cultivadas hidropónicamente sometidas a distintos tratamientos. Las proteínas de hojas, raíces y tallos por separado, se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de PVDF. Esta membrana se incubó con una solución que contenía el anticuerpo purificado, seguida de una incubación con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa. La señal del anticuerpo se reveló mediante una reacción de quimioluminiscencia catalizada por peroxidasa y detectada sobre película radiográfica.

### 12.1 Cinética de acumulación de la proteína Tsw12 en plantas tratadas con NaCl.

En los siguientes experimentos se analizó la acumulación de Tsw12 en plantas cultivadas en presencia de 10 g/L NaCl durante distintos intervalos de tiempo, comprendidos entre 6 horas y 30 días. En plantas control, cultivadas en ausencia de sal, los anticuerpos no reconocieron ninguna proteína en raíces, tallos ni hojas (figura 25).

En los extractos de tallos de plantas tratadas con NaCl durante 6 ó 24 horas no se detecta ninguna banda; sin embargo, en extractos de tallos de plantas cultivadas 3 días en presencia de sal los anticuerpos reaccionan con una proteína de aproximadamente 9 kDa, que coincide con el peso molecular de Tsw12. La intensidad de la banda reconocida por los anticuerpos en tallos es mayor tras 7 días de tratamiento y se mantiene incluso cuando la planta permanece 30 días en presencia de 10 g/L de NaCl. En una repetición de este experimento, utilizando un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina, (datos no mostrados) se observa que la banda detectada en tallos de plantas tratadas durante 3, 7 y 30 días con NaCl se compone en realidad de dos bandas que por su peso molecular (11 y 9 kDa) parecen corresponder a la forma no procesada y a la madura de Tsw12. En extractos de hojas la banda de 9 kDa correspondiente a la proteína Tsw12 sólo se detectó al cabo de 30 días de tratamiento.

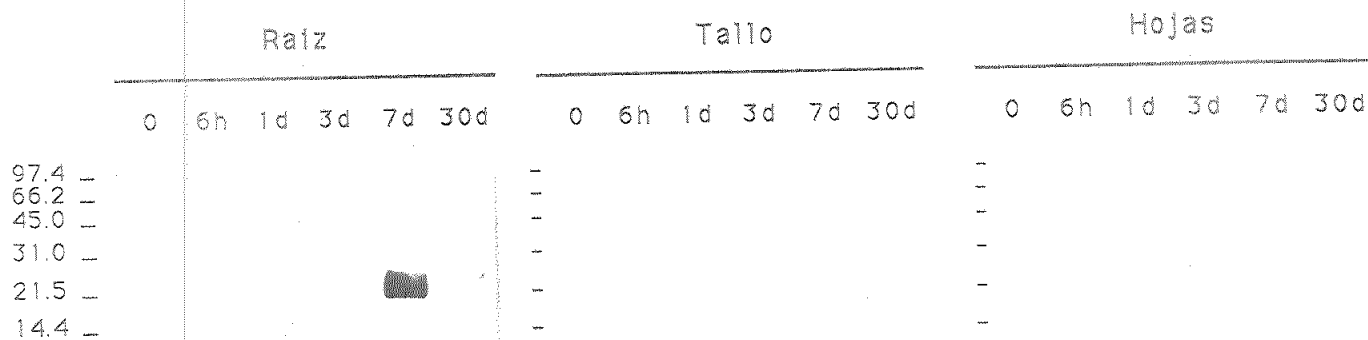
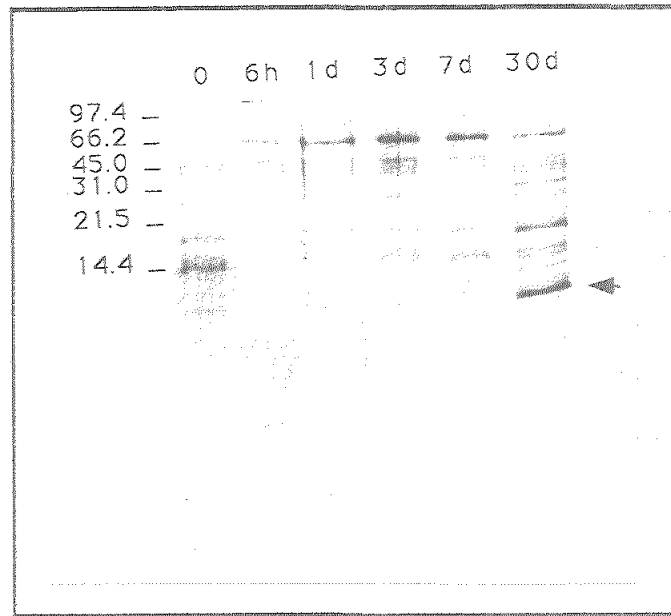


Figura 25. Análisis de extractos de proteínas totales de raíz, tallo y hojas de plantas de tomate cultivadas hidropónicamente, transferidos a filtro e incubados con anticuerpos específicos contra TSW12. Los distintos carriles corresponden a plantas control (0) y tratadas con 10 g/L NaCl durante 6 horas, 1, 3, 7 ó 30 días.

En el filtro correspondiente a proteínas de raíz, los anticuerpos reconocen una proteína de aproximadamente 23 kDa. Esta proteína se detecta en raíz de plantas tratadas con sal durante 7 días, y muy débilmente en plantas tratadas 30 días. El peso molecular de esta banda no coincide con el correspondiente a Tsw12; además, como ya se ha descrito, en todos los casos el mRNA correspondiente a Tsw12 está ausente en raíces. Este resultado parece indicar que una proteína inmunológicamente relacionada con Tsw12 se expresa específicamente en raíces. El RNA mensajero correspondiente a esta proteína no se detectó mediante experimentos de Northern a baja estringencia, utilizando como sonda el cDNA TSW12.

Mediante tinción con azul de Coomassie de geles de acrilamida en los que se resolvieron extractos de raíces, tallos y hojas de plantas control y plantas tratadas, se observa una banda correspondiente al peso molecular de Tsw12 que aparece únicamente en tallos de plantas tratadas con sal 30 días (fig. 26). Al superponer el gel con el filtro al que se transfirieron las proteínas, la banda detectada por los anticuerpos específicos coincide exactamente con la detectada con azul de Coomassie. Estos resultados indican que la proteína Tsw12 se acumula en tallos durante el tratamiento, alcanzando niveles detectables por tinción con azul de Coomassie al cabo de 30 días. La sensibilidad de esta tinción es de 0.3 - 1 µg por banda; teniendo en cuenta que la cantidad de proteína cargada fue de 25 µg, y que se trata de una banda prominente, Tsw12 constituiría más del 1.2 % de la proteína total.

Figura 26. Extractos de proteínas de tallos, resueltos en gel de poliacrilamida-S<sup>D</sup> teñidos con azul de Co. Las muestras corresponden a tallos de plantas no tratadas o plantas tratadas con NaCl durante el tiempo.



## 12.2 Efecto de otros tratamientos

La acumulación de la proteína TSW12 se determinó en plantas sometidas a los tratamientos que inducen la expresión del mRNA TSW12: 300 mM manitol, 10  $\mu$ M ABA, daño mecánico y choque térmico. La duración de estos tratamientos fue de 24 horas, excepto la del choque térmico que fue de 6 horas.

Como muestra la figura 27, los tratamientos realizados no inducen la proteína TSW12 en tallos ni en hojas; sin embargo, en raíces se detecta claramente la proteína de 23 kDa, anteriormente mencionada. Todos los tratamientos, a excepción del ABA, inducen esta proteína.

Los patrones de acumulación de Tsw12 y de la proteína inmunológicamente relacionada difieren notablemente, tanto en distribución espacial como en la inducción por estímulos específicos, mientras Tsw12 se detecta en tallos a partir del tercer día de tratamiento con NaCl, la proteína de 23 kDa es específica de raíz y responde con mayor rapidez a manitol, herida o choque térmico que a NaCl.

## 13. ACUMULACION DE LA PROTEINA TSW 12 EN PLANTULAS

En el experimento siguiente se determinaron los niveles relativos de acumulación de la proteína Tsw12 en plántulas de tomate. Se pasaron plántulas de 8 días de edad, germinadas en agua, a una solución de NaCl (10 g/l) durante

24 horas o se incubaron a 37°C durante 6 horas, manteniéndolas en oscuridad en todos los casos. En la figura 28 se observa que en plántulas no tratadas se detecta la banda correspondiente al polipéptido Tsw12. Comparando el nivel de acumulación de la proteína en plántulas tratadas, se observa que aumenta tras 24 horas en presencia de NaCl, mientras que tras el choque térmico no son detectables diferencias significativas de intensidad respecto a plántulas control.

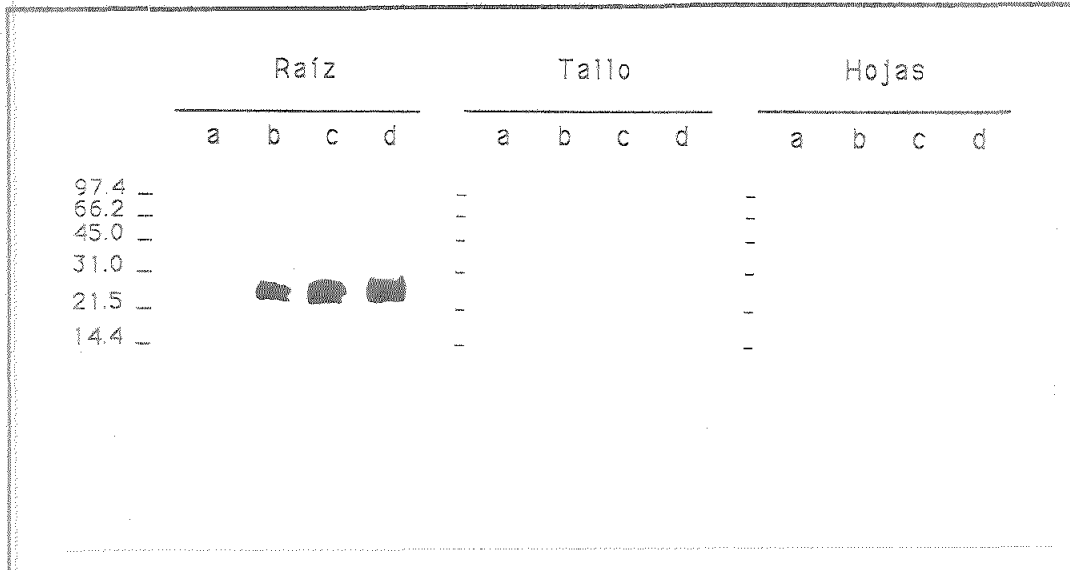
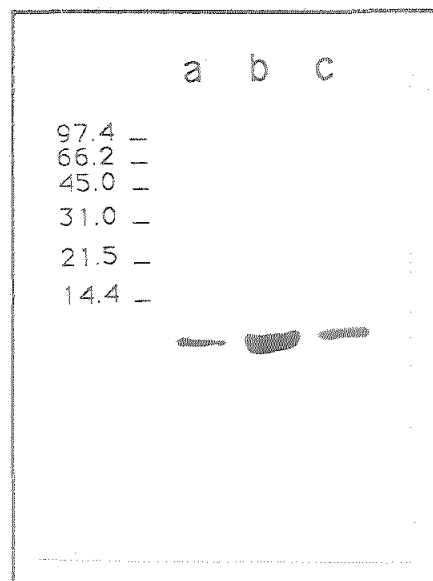


Figura 27. Análisis *western* de extractos de proteínas totales de raíz, tallo y hojas de plantas de tomate cultivadas hidropónicamente, utilizando anticuerpos específicos contra Tsw12. Los distintos carriles corresponden a plantas tratadas con ABA 10  $\mu$ M (a), manitol 300 mM (b) y herida (c) durante 24 horas y sometidas a choque térmico (40°C) durante 6 horas(d).

Figura 28. Análisis *western* de extractos de proteínas totales de plántulas no tratadas (a), tratadas durante 24 horas con 10 g/L de NaCl (b) y sometidas a choque térmico (40°C) durante 6 horas(c).





#### 14. INMUNOLocalización DE LA PROTEINA TSW12

El conocimiento de la localización de una proteína tanto a nivel de tejido como subcelular aporta información muy valiosa que puede contribuir a desvelar su función. Con este fin se estudió la localización de Tsw12 mediante técnicas inmunohistoquímicas, utilizando los anticuerpos específicos purificados.

Se incluyeron en parafina tallos y peciolo de plantas control y de plantas tratadas durante siete días con NaCl; estos tejidos se escogieron dada la especificidad espacial de expresión de Tsw12 en plantas tratadas). Los experimentos de inmunolocalización en secciones de tallos se realizaron según el protocolo descrito en Material y Métodos, introduciendo además de una serie de variantes en cuanto a tiempos de incubación, concentraciones de anticuerpos y de detergentes, y realizando paralelamente controles positivos (incubación con anticuerpos que reaccionan con antígenos de localización conocida). En ningún caso fue posible detectar señal debida a reacción de los anticuerpos anti-Tsw12 sobre las secciones. Estos resultados negativos indujeron a pensar que los epitopos de Tsw12 reconocidos por los anticuerpos podían haberse modificado durante la fijación o inclusión. Se ha descrito que digestiones parciales con proteasas pueden desenmascarar los epitopos alterados (Ormerod e Imrie, 1988). Con este objetivo, se trataron las secciones con tripsina (0.1% tripsina, 0.1% CaCl<sub>2</sub> en 20 mM Tris pH 7.8) previamente a la incubación con anticuerpos; sin embargo, tras este tratamiento, no se detectó reacción de los anticuerpos.

A la vista de estos resultados se procedió a localizar la proteína sobre criosecciones del mismo material vegetal (tallos y peciolo de plantas control y de plantas tratadas durante siete días con NaCl), por ser una técnica menos agresiva que la de inclusión en parafina, preservando mejor las propiedades antigénicas de las proteínas; sin embargo, siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos, tampoco en este caso se observó señal alguna.

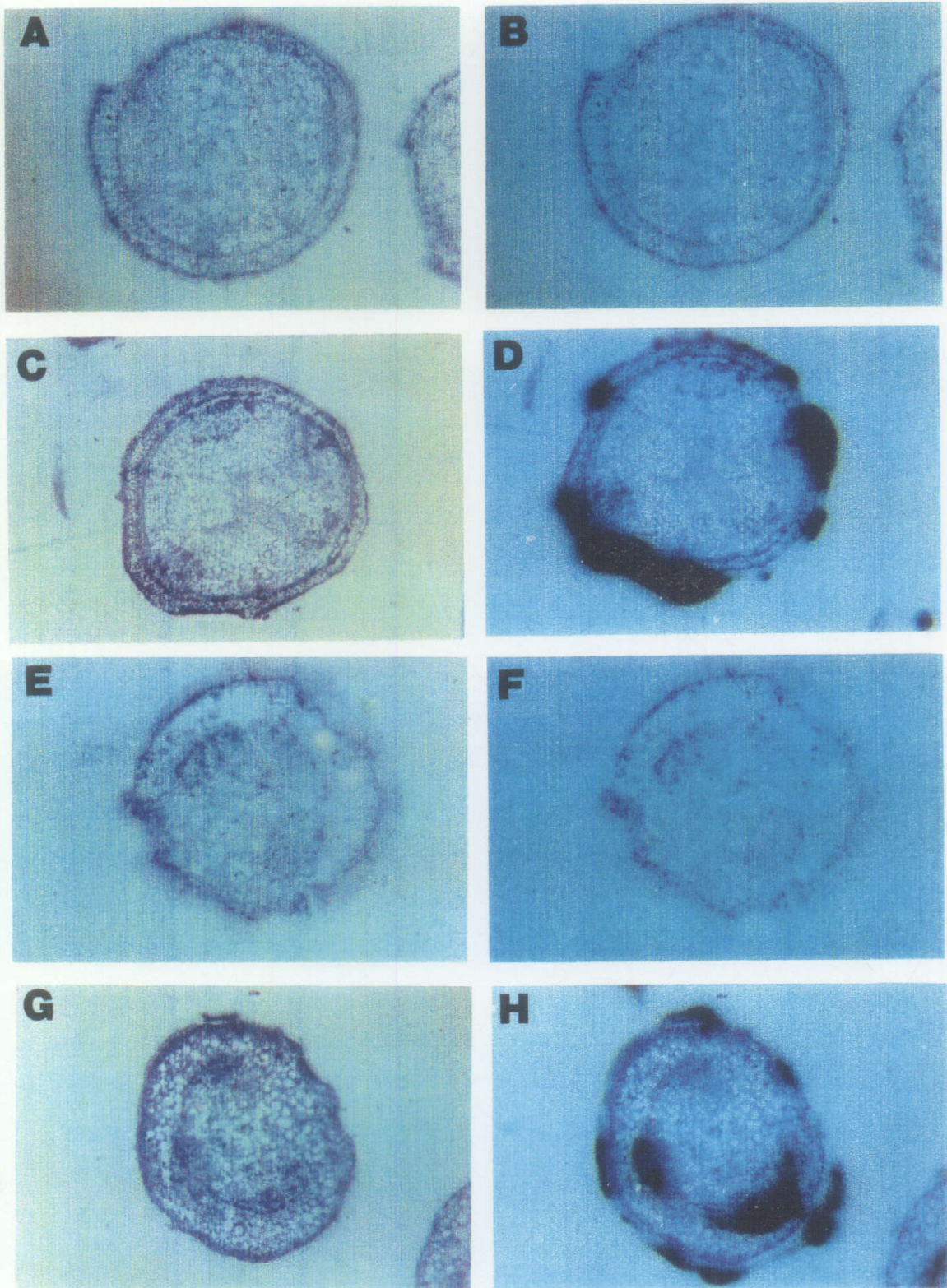
Finalmente se utilizaron cortes de tejido imprimidos sobre nitrocelulosa. El principio de la impresión de tejidos (*tissue printing*) se basa en que al presionar la sección de un tejido sobre una membrana de nitrocelulosa, las proteínas quedan adsorbidas a la membrana, dejando una imagen estable y fiel de la superficie del corte, mientras que no se retienen RNA, sales ni muchas otras moléculas pequeñas (Cassab y Varner, 1987). Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina, que dió señal sobre la membrana de nitrocelulosa; sin embargo, los pigmentos de la planta, retenidos también en la membrana, adquirieron durante las sucesivas incubaciones tonalidades similares a las del producto de reacción de la fosfatasa alcalina, dificultando la identificación de la señal debida al anticuerpo; por ello se repitió el experimento utilizando un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, cuya señal se puede registrar sobre película radiográfica. La peroxidasa cataliza la

oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno, emitiendo luz. En la fig. 29 se muestran las impresiones sobre nitrocelulosa de tallos y peciolos de plantas adultas control y de plantas tratadas con 10 g/L NaCl durante 30 días. Por un lado se muestran las impresiones teñidas con azul de toluidina, que permite visualizar la disposición de los tejidos del corte, y por otro lado la señal de los anticuerpos superpuestas sobre estas impresiones (A,C,E,G y B,D,F,H, respectivamente).

Se observa que en tallos y peciolos de plantas tratadas aparece señal en dos zonas:

- la señal externa corresponde a la epidermis,
- la señal interna aparece en tejido vascular.

En secciones de plantas control imprimidas sobre la misma membrana que las de plantas tratadas no se detecta reacción de los anticuerpos. La señal externa, muy intensa, aparece de forma discontinua en el contorno de tallos y peciolos y se localiza en la epidermis. La discontinuidad de la señal podría deberse bien a que el tejido se ha imprimido de manera no uniforme, lo que es poco probable, y/o a que las diferencias de intensidad de señal se correlacionen con los engrosamientos del anillo vascular proximos a la epidermis, que se observan en la tinción.

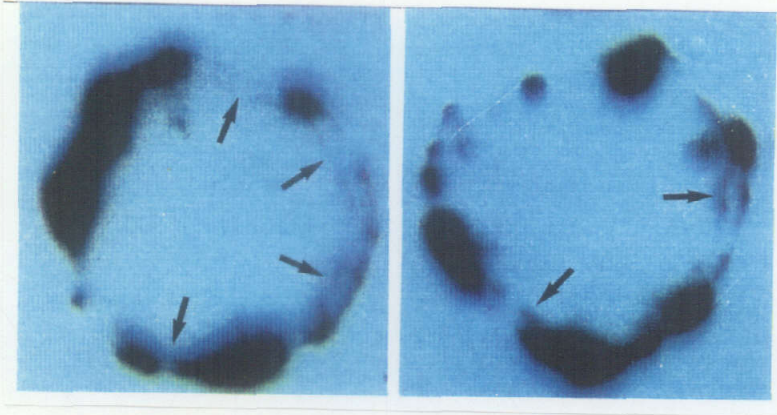


**Figura 30.** Impresiones sobre nitrocelulosa de tallos (A y B) y peciolas (E y F) de plantas adultas control y de tallos (C y D) y peciolas (G y H) de plantas que crecieron en medio nutritivo con NaCl a concentración final de 10 g/L durante 30 días. Las fotografías de la derecha (A, C, E y G) corresponden a las impresiones teñidas con azul de toluidina, las de la izquierda (B, D, F y H) muestran la superposición de éstas y de la película donde se registra la reacción de los anticuerpos anti-TSW12.



La señal interna, asociada a la zona del tejido vascular, aparece en peciolo siguiendo la característica disposición en herradura del tejido vascular propio de peciolo y es mucho más intensa que en tallo, especialmente en las zonas donde este tejido está más desarrollado (fig. 30 H).

En tallos, la reacción de los anticuerpos en tejido vascular forma un anillo muy tenue, como se observa más claramente en la fig. 31, donde se muestra solamente la señal del anticuerpo sobre la película en secciones de tallos.



**Figura 31.** Señal del anticuerpo específico contra TSW12 sobre tallos de plantas tratadas con NaCl 10 g/L durante 30 días. Las flechas señalan la señal interna, correspondiente a la zona vascular.

## **DISCUSSION**

---

## I. Respuesta de plántulas de tomate a NaCl: cambios en los patrones bidimensionales de proteínas de nueva síntesis

La presencia de NaCl en el medio afecta severamente la germinación y el desarrollo de plántulas de tomate; el retraso en la germinación y la disminución del porcentaje de semillas germinadas en medios con distintas concentraciones de sal y/o ABA queda reflejado en la fig. 2.

Los cambios de expresión génica en plántulas germinadas en presencia de NaCl y/o ABA se han estudiado mediante electroforesis bidimensional de las proteínas marcadas *in vivo* con  $^{35}\text{S}$ -Metionina. En este tipo de experimentos, en los que se comparan cambios de expresión génica en distintas etapas del desarrollo y en condiciones adversas para la planta, fue necesario tipificar las distintas fases de la germinación que se estudiaban con el fin de obtener patrones proteicos comparables. Las condiciones salinas retrasan el crecimiento de la planta y por tanto, el parámetro tiempo no es adecuado para definir el estado de desarrollo. Los parámetros escogidos fueron el tamaño de la plántula o de la radícula y la expansión de cotiledones. Se estudiaron 3 fases de la germinación que correspondían a plántulas de 4 mm, radículas de 15 mm y plántulas con los cotiledones extendidos. Los resultados obtenidos en las dos fases más avanzadas fueron idénticos, por lo que se hace referencia a resultados en la fase de germinación temprana (plántulas de 4 mm de longitud) y en la fase avanzada (plántulas con radículas de 15 mm hasta plántulas con los cotiledones extendidos).

La presencia de NaCl en el medio induce la expresión de genes específicos en radículas de plántulas de tomate durante la germinación. Los tratamientos con NaCl y/o ABA no alteran globalmente el patrón de proteínas de nueva síntesis, a diferencia del choque térmico, que lo altera drásticamente (Key *et al.*, 1981). Los patrones generales se mantienen también con otros tipos de estrés, como desecación (Bray, 1988 y 1990) o bajas temperaturas (Guy y Haskell, 1987).

En general los tratamientos con NaCl y/o ABA incrementan el nivel de síntesis de proteínas presentes en condiciones control. Sin embargo, también traen consigo algunos cambios cualitativos, como por ejemplo la inducción por NaCl y ABA del polipéptido básico de 16 kDa en la etapa inicial de germinación y la inducción, en todas las fases analizadas, del polipéptido TAS14. Como se muestra en las tablas 2 y 3, la concentración mínima de NaCl requerida para la inducción de la síntesis de las proteínas descritas varía para cada una de ellas; en general el tratamiento con 5 g/L es insuficiente para detectar la mayoría de los cambios inducibles por sal, que aparecen a partir de 8 g/L NaCl.

La respuesta al estrés hídrico/salino en tomate mediante marcaje *in vivo* de proteínas se ha estudiado fundamentalmente en dos sistemas: en cultivos celulares adaptados a salinidad (Ben-Hayyim *et al.*, 1989) y en hojas de plantas adultas de tomate sometidas a desecación (Bray, 1988 y 1990). En cultivos

celulares adaptados a condiciones salinas durante tiempos prolongados (6 meses), el cambio más significativo descrito es la inducción de una proteína de 27 kDa y punto isoelectrico aproximado de 6. Ninguna de las proteínas detectadas en radículas de plántulas germinadas en presencia de sal presenta estas características. Las proteínas más prominentes detectadas en hojas de tomate sometidas a estrés hídrico durante 8 horas tienen pesos moleculares comprendidos entre 16 y 17 kDa y puntos isoelectricos entre 4 y 5.5. Estas características coinciden con las del polipéptido TAS14, descrito en nuestro trabajo. Otros polipéptidos adicionales inducidos por desecación en hojas de tomate no parecen coincidir con los observados en radículas de plántulas durante la germinación en medios salinos.

Los niveles endógenos de ABA aumentan notablemente en plantas sometidas a estrés hídrico y salino; este hecho, descrito en numerosas especies como por ejemplo tomate (Bray, 1990), espinaca, judía, (Zeevaert y Creelman, 1988) maíz y trigo (Austin *et al.*, 1981), ha llevado a proponer al ABA como mediador de la respuesta a estrés. Sin embargo, experimentos más recientes realizados con mutantes insensibles a ABA o con inhibidores de la biosíntesis de ABA (Nordin *et al.*, 1990) han puesto de manifiesto que genes específicos se inducen por estrés hídrico sin la participación del ABA, sugiriendo la existencia de rutas de transducción de señales independientes de ABA. En el presente trabajo se describen dos grupos de polipéptidos, uno de ellos inducido específicamente por NaCl, y otro inducido por aplicación exógena de ABA; la mayoría de los polipéptidos inducidos por NaCl y por ABA coinciden; sin embargo, el análisis de patrones bidimensionales muestra claramente que la síntesis de algunos polipéptidos aumenta específicamente por tratamientos con NaCl y no con ABA, como por ejemplo la proteína básica de 17 kDa, que se induce por NaCl en la etapa inicial de germinación, y las proteínas ácidas de 54 y 32 kDa en fases de germinación avanzadas. Asimismo, varias de las proteínas inducidas por 10  $\mu$ M ABA difieren en las concentraciones de NaCl necesarias para su inducción; así por ejemplo, las proteínas básicas de 16 y 13 kDa inducibles por ABA en la fase de germinación temprana se detectan a partir de 5 y de 10 g/L NaCl, respectivamente. Estos resultados indican que la síntesis de estas proteínas no depende exclusivamente de la concentración intracelular de ABA, sino que otros factores celulares adicionales condicionan estos cambios de expresión génica. Por tanto, aunque el ABA interviene en la respuesta a estrés salino, no sería sin embargo el único mediador en la respuesta a estrés salino.

Algunas de las proteínas inducidas por los distintos tratamientos se sintetizan activamente durante las tres fases estudiadas (tablas 2 y 3), como las proteínas básicas de 18 y 13 kDa o la proteína TAS14; sin embargo, la mayoría se inducen exclusivamente en la etapa temprana o en la tardía.

Una vez determinadas las proteínas inducidas durante la germinación en medios salinos, se analizaron las inducidas por choques salinos en plántulas con radículas de 15 mm de longitud. Como resultado de este tratamiento, se observa la inducción de varias proteínas, algunas de ellas coincidentes con las detectadas durante la germinación en medios con NaCl y/o ABA, como TAS 14, la proteína ácida de 18 kDa, y prácticamente todas las proteínas básicas, a excepción de la de 27 kDa; entre estos polipéptidos, inducidos por choque salino aplicados en fase avanzada de germinación, se encuentran proteínas que en experimentos de germinación aparecen exclusivamente en la fase temprana, concretamente las proteínas básicas de 16 y 17 kDa; este resultado indica que estas proteínas no son específicas de una etapa determinada del desarrollo, sino que su cinética de aparición corresponde a los momentos iniciales en que la

plántula se enfrenta a las condiciones salinas, independientemente de la etapa de desarrollo de la plántula. Sin embargo, existen también proteínas que se detectan exclusivamente en respuesta a choque salino, señaladas con flechas en la fig. 7. Estas diferencias en la respuesta pueden atribuirse a que las semillas que germinan en medios salinos están en un estado fisiológico diferente al de plántulas germinadas en agua que se enfrentan, debido a un choque salino, a un cambio brusco en su medio. Estas diferencias fisiológicas se ven apoyada por observaciones realizadas en células de tabaco, donde se describe que los polipéptidos mayoritarios asociados a adaptación a sal no coinciden con las proteínas inducidas por choque salino (Singh *et al.*, 1985).

Estos resultados indicarían que durante el periodo de estrés se sintetizan sucesivamente una serie de polipéptidos específicos, algunos de ellos requeridos mientras las condiciones adversas están presentes, y otros aparentemente necesarios sólo en la etapa inicial o bien de aparición transitoria. Por tanto, el análisis de proteínas en un momento concreto del tratamiento, o bien en un órgano determinado, permite sólo una visión parcial del conjunto de polipéptidos implicados en la respuesta a salinidad. El estudio de genes concretos, como el gen TSW12, confirma la especificidad temporal y espacial de su expresión por estrés salino.

Los polipéptidos inducidos por estos tratamientos y detectados mediante marcaje *in vivo* con  $^{35}\text{S}$ -Metionina no se acumulan lo suficiente como para ser visualizados mediante tinción con plata. Este resultado parece indicar que estos polipéptidos no son componentes estructurales de la célula sino que más bien serían componentes con función enzimática o reguladora.

El análisis de proteínas marcadas *in vivo* no permite deducir si los cambios inducidos por NaCl y/o ABA se deben a la inducción de la transcripción de estos genes, a cambios de la estabilidad o de la eficiencia de traducción de sus mRNAs, o bien a variaciones en las tasas de degradación de las proteínas. Para tratar de delimitar estas posibilidades, se analizaron los patrones de traducción *in vitro* de RNA total de plántulas germinadas en los medios descritos (datos no mostrados). Los patrones de los productos de traducción *in vitro* de plántulas control difieren notablemente de los patrones de proteínas marcadas *in vivo*. Este resultado indica que algunas de las proteínas observadas sufren modificaciones post-traduccionales que alteran su punto isoeléctrico y/o su peso molecular, de modo que no es posible relacionar los polipéptidos marcados *in vivo* con los obtenidos por traducción *in vitro*. En los patrones bidimensionales de plántulas marcadas con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato (datos no mostrados) se observan numerosas señales correspondientes a proteínas fosforiladas, lo que indica que al menos la fosforilación es una modificación post-traducciona frecuente.

En los patrones bidimensionales de los productos de traducción *in vitro*, el número de diferencias entre plántulas control y plántulas germinadas en NaCl y/o ABA es menor que el observado al analizar las proteínas marcadas *in vivo*. Por tanto, algunos de los cambios observados por marcaje *in vivo* podrían deberse a fenómenos de regulación post-transcripcional. La regulación post-transcripcional en respuesta a estrés se ha descrito en otros sistemas, como por ejemplo en tubérculos de patata, donde existe traducción selectiva de mensajeros inducidos por condiciones de hipoxia o herida (Butler *et al.*, 1990). En estas condiciones se inhibe la traducción de mensajeros presentes antes del inicio del estrés y se traducen predominantemente los



mensajeros específicos inducidos por hipoxia o por herida; las proteínas codificadas por los mRNA inducidos por estrés son difícilmente detectables mediante traducción *in vitro* del RNA total, ya que únicamente constituyen una pequeña fracción de la población de mRNAs existentes. Otro ejemplo de regulación post-transcripcional, descrito recientemente (LaRosa *et al.*, 1992) es el de la proteína osmotina, inducida por NaCl y/o ABA; el mRNA de la osmotina se acumula en respuesta a ABA, estrés osmótico, herida, infección con el virus del mosaico del tabaco y etileno; sin embargo, para la acumulación de la proteína osmotina se requiere la presencia de estrés osmótico, existiendo además un desfase de tres días entre la inducción del mensajero y la acumulación de la proteína detectable mediante *western blot*.

## 2. CARACTERIZACION DEL GEN *tsw12*

### 2.1 Aislamiento del clon TSW12

Tras la primera etapa del trabajo, en la que se determinaron cambios de la expresión génica inducidos por choques salinos y por tratamientos prolongados con NaCl, se trató de identificar y caracterizar un gen individual implicado en la respuesta a estrés salino en tomate. Existen dos tipos de enfoque para tratar de estudiar la respuesta a condiciones ambientales adversas a nivel molecular: por un lado, estudiar la expresión de genes que codifican proteínas conocidas de las que se asume que intervengan en esta respuesta, por otro, caracterizar genes de función desconocida que se inducen en condiciones de estrés, y cuyo estudio puede revelar mecanismos hasta entonces desconocidos.

En este trabajo se describe el aislamiento por hibridación diferencial de un clon de cDNA de tomate inducible por estrés salino. Para ello se analizó una clonoteca de cDNA procedente de plántulas tratadas con 10  $\mu$ M ABA y 5 g/L NaCl; este tratamiento es el que induce cambios más claros en los patrones electroforéticos analizados. Entre los clones aislados se seleccionó uno de ellos, denominado TSW12, que presentaba hibridación diferencial, confirmada posteriormente por análisis *northern*.

### 2.2 Análisis de la secuencia de TSW12

El clon TSW12 contiene un cDNA completo de 667 nucleótidos con una una fase de lectura abierta de 342 nucleótidos. El peso molecular de la proteína deducida a partir de la secuencia nucleotídica es de 11.59 kDa. A partir del codón de inicio ATG hay una zona de 23 aminoácidos con las características de un péptido señal. La comparación de la secuencia de la proteína deducida con las bases de datos muestra la existencia de un alto grado de similitud con proteínas transferentes de lípidos de plantas.

Se han aislado proteínas con actividad de transferencia de lípidos de bacterias, hongos, levaduras y mamíferos. En mamíferos se han detectado dos clases de LTPs: un grupo de ellas son proteínas ácidas de peso molecular entre 20 y 30 kDa, que presentan especificidad de sustrato y que transfieren fosfatidilcolina (PC-TPs), fosfatidilinositol (PI-TPs) u otros fosfolípidos. Otro

grupo de proteínas, proteínas transferentes de lípidos no específicas (nsLTP), de peso molecular entre 9 y 15 kDa y punto isoelectrico básico, transfieren *in vitro* distintos fosfolípidos y galactolípidos.

En plantas sólo se han detectado, hasta el momento, LTPs no específicas, grupo al que pertenece también la proteína Tsw12. Las LTPs no específicas de plantas son polipéptidos básicos de 90 a 93 aminoácidos con una homología entre ellas que oscila entre el 30% y el 70%, conservándose en todos los casos la posición de las 8 cisteínas presentes en sus secuencias, a excepción de un cambio de una de estas cisteínas por glutamina en la LTP de *Eleusine coracana*. También están muy conservadas dos regiones comprendidas entre los residuos 54 y 58 y entre el 43 y el 45; esta última región corresponde a la zona de máxima hidrofiliidad. De hecho, existe una secuencia consenso a la que se ajustan todas las secuencias de LTPs de plantas conocidas hasta el momento. Estos motivos conservados en las LTPs de plantas no se mantienen en las LTPs no específicas de mamíferos que tienen un peso molecular mayor y contienen un sólo residuo de cisteína.

El análisis de dominios característicos, realizado mediante el programa PROSITE, muestra los siguientes resultados para la proteína Tsw12:

- i) sitio de fosforilación por caseína quinasa 2 (CKII).
- ii) sitio de fosforilación por proteína quinasa C (PKII).
- iii) sitios de miristilación.

La existencia de dos sitios de fosforilación posibilita un grado superior de regulación de la función de Tsw12. Además de la transcripción/traducción diferencial, demostrada por *northern* y *western blots*, Tsw12 podría modificarse post-traduccionalmente modulando su actividad biológica por distintos mensajes intracelulares. Es improbable que Tsw12 se miristile, ya que es necesario que el extremo amino de la proteína sea una glicina y, dado que los posibles sitios de miristilación mencionados corresponden a regiones internas que se ajustan a la secuencia consenso, sería necesario que TSW12 sufriera procesamientos adicionales.

Las predicciones de estructuras secundarias y zonas anfipáticas de las LTPs de cebada, maíz, espinaca y ricino, analizadas por Madrid y Wettstein 1991, resultan ser similares.

Se ha analizado la existencia de zonas anfipáticas en la secuencia de Tsw12 según Eisenberg (1984), mediante el programa DNA Strider<sup>TM</sup> 1.0 (Service de Biochemie-Institut de Recherche Fondamentale, Commissariat a l'Energie Atomique Francia); teniendo en cuenta que los ángulos entre aminoácidos consecutivos en una  $\alpha$ -hélice y en una hoja plegada- $\beta$  son, respectivamente,  $100^\circ$  y  $180^\circ$ , se calcularon los momentos hidrofóbicos de la proteína para estos ángulos mediante el algoritmo de Eisenberg. Se identificaron dos zonas anfipáticas para la conformación en hoja plegada- $\beta$  y una zona anfipática para aminoácidos dispuestos en  $\alpha$ -hélice. La posición de dos de las hojas plegadas- $\beta$  predichas (descritas en Resultados) coinciden con la de las dos zonas anfipáticas calculadas para  $180^\circ$ ; esto indicaría que las zonas en hoja plegada- $\beta$  entre los residuos 15 y 20 y entre los residuos 70 y 81 constituirían estructuras anfipáticas. La probabilidad de que la predicción de una estructura secundaria sea correcta aumenta cuando dicha zona es anfipática (Eisenberg, 1984). Asimismo, la zona comprendida entre los residuos 52 y 63, para la que se predice

disposición en  $\alpha$ -hélice, coincide con la zona de carácter anfipático calculada para 100°.

Madrid y Wettstein (1991) han propuesto un modelo estructural para LTPs de plantas, al que se podría ajustar también la proteína Tsw12. Según este modelo, las zonas en  $\alpha$ -hélice y en hoja plegada  $\beta$  formarían una estructura anfipática con un "bolsillo" interior hidrofóbico con el que interaccionaría el lípido; la longitud de las  $\alpha$ -hélices y de las hojas plegadas- $\beta$  descritas en este modelo (13 y 6 residuos, respectivamente) corresponde a la longitud de ácidos grasos de 16 a 18 carbonos; las zonas hidrofílicas de estas estructuras anfipáticas, que constituirían la cara externa del "bolsillo", estarían localizadas en la superficie de la proteína, de modo que tanto la proteína como el complejo lípido-proteína serían solubles.

Hasta el momento no ha sido posible asignar una función fisiológica a las LTPs tanto específicas como no específicas, a excepción de la LTP específica para fosfatidil-inositol de levaduras. Esta proteína, codificada por el gen *SEC14*, es necesaria para el transporte de proteínas de secreción a través del complejo de Golgi (Bankaitis *et al.*, 1990). Su función sería mantener la relación adecuada de fosfatidilinositol/fosfatidilcolina para el funcionamiento de este orgánulo (Cleves *et al.*, 1991); por tanto, la función *in vivo* de PI-TP está restringida al complejo de Golgi, sin participar en el flujo general de fosfatidilinositol en la célula.

El péptido señal hidrofóbico, típico de las proteínas de secreción, provocaría la entrada de la proteína Tsw12 en el retículo endoplásmico y su procesamiento cotraduccional, dando lugar a un polipéptido de aproximadamente 9 kDa. En este compartimento tendría lugar la formación de los cuatro puentes disulfuro entre las ocho cisteínas conservadas y otras posibles modificaciones postraduccionales. La existencia del péptido señal excluye la posibilidad de encontrar a la proteína Tsw12 libre en el citoplasma. TSW12 entraría en la ruta de proteínas de secreción, cuyo flujo está dirigido a través del sistema de endomembranas en dirección al exterior de la célula. La retención de proteínas en los distintos compartimentos está dirigida por la existencia de señales de retención. Las específicas en plantas para la retención en el retículo endoplásmico son los tetrapéptidos KDEL y HDEL en posición carboxiterminal; estas señales son muy similares en mamíferos y levaduras (revisado por Bednarek y Raikhel, 1992). En TSW12 y LTP homólogas, esta señal está ausente, por lo que el destino de estas proteínas estaría en sitios más avanzados de la ruta de secreción.

Considerando la existencia del péptido señal de secreción en las LTPs, se han propuesto funciones alternativas a la de transferencia intracelular de lípidos a través del citoplasma, propuesta inicialmente (Kader, 1990). Según Madrid y Wettstein (1991), estas proteínas transferirían lípidos en el interior del sistema de endomembranas de la célula. Otros autores les asignan un papel crítico en el transporte de lípidos y moléculas apolares al exterior de las células que las expresan (Sterk *et al.*, 1991); esta última hipótesis se apoya en que células de aleurona de cebada (Mundy y Rogers, 1986) y cultivos celulares embrionarios de zanahoria excretan al medio proteínas LTPs homólogas a Tsw12 (Sterk *et al.*, 1991). De hecho, la proteína de zanahoria EP2, homóloga a TSW12, se detecta en la fracción correspondiente a paredes celulares de embriones somáticos de zanahoria. Sterk *et al.* proponen que las moléculas transferidas por estas proteínas podrían ser los monómeros que dan lugar a la

cutina, polímero insoluble que recubre la parte aérea de las plantas superiores y una de cuyas funciones es evitar la pérdida de agua. Los monómeros de cutina son ácidos grasos modificados de 16 a 18 carbonos; el mecanismo por el que alcanzan la cara externa de la pared celular se desconoce.

### 2.3 Análisis Southern del gen *tsw12* en el genomio de tomate

El gen *tsw12* se expresa durante la germinación; sin embargo, también se induce en la planta adulta por distintas condiciones ambientales adversas; por tanto es interesante conocer si la planta cuenta con varios genes *tsw12* que respondan a situaciones ambientales o de desarrollo específicas o es un mismo gen el que responde a distintas condiciones. Esta posibilidad se analizó mediante hibridación del cDNA TSW12 con DNA total de tomate.

El análisis *Southern* muestra la hibridación del cDNA TSW12 con un único fragmento de restricción de DNA de tomate, con cualquiera de las enzimas probadas. Este resultado indica que existe un único gen *tsw12* por genomio haploide, aunque no puede descartarse la existencia de varias copias del gen contenidas en el fragmento HindIII-HindIII de 3.7 kb (fig 14). Utilizando condiciones de baja estringencia de hibridación se detecta una serie de bandas adicionales más débiles que corresponden a otros genes de homología débil.

En varias especies se ha descrito la existencia de un sólo gen LTP, como en espinaca (Bernhard *et al.*, 1991) y zanahoria (Stern *et al.*, 1991). En cebada se detectan además otras bandas de menor intensidad (Skriver *et al.*, 92). En tabaco, los experimentos de *Southern blot* genómico indican la existencia de dos genes LTP; una de las bandas detectadas corresponde a un posible pseudogen truncado, cuya secuencia presenta homología con una zona 3' del gen funcional; también se detectan bandas débiles correspondientes a genes de menor homología (Fleming *et al.*, 92). En otras especies se han descrito distintas formas de LTPs, así en ricino se han secuenciado cuatro isoformas de LTP que deben estar codificadas por una familia multigénica, si bien no se han publicado datos de hibridación con DNA genómico para esta especie (Tsuboi *et al.*, 1991). En maíz, se detectan varias bandas de distinta intensidad correspondientes a una familia multigénica. En esta especie, se han descrito dos formas proteicas codificadas por uno mismo gen, originadas por maduración alternativa de intrones (Arondel *et al.*, 1991).

### 2.4 Patrón de expresión del mRNA TSW12

La acumulación de mensajero del gen *tsw12* se ha estudiado mediante análisis *northern* en plántulas y en distintos órganos de plantas adultas de tomate sometidas a diversos tratamientos. Este análisis ha permitido determinar que la regulación de la expresión del gen TSW12 es compleja.

Al seguir la acumulación del mensajero en el curso de la germinación en condiciones control, éste no aparece en semillas embebidas durante 24 horas en agua; se observa acumulación del mRNA a partir de que la radícula emerge de la semilla alcanzándose el máximo cuando la longitud de la radícula es de 15 mm; en plántulas con los cotiledones extendidos apenas se detecta el mRNA TSW12. La expresión de Tsw12 está restringida a esta etapa de la germinación; a partir de ella el gen deja de transcribirse en plantas en

condiciones control (solución nutritiva Hoagland al 50% y condiciones de luz, temperatura y humedad descritas en Material y Métodos). El papel de la proteína Tsw12 durante el desarrollo es incierto; su inducción podría estar relacionada con la síntesis activa de membranas y una alta actividad en el metabolismo de lípidos requerido en estas etapas iniciales del desarrollo en las que el crecimiento de la planta es muy activo.

Plántulas que están en la etapa de germinación en que expresan el gen *tsw12*, tratadas con NaCl o sometidas a choque térmico aumentan sus niveles basales del mRNA TSW12. Estos resultados indican que la expresión de *tsw12* está regulada durante el desarrollo, que factores externos ambientales inducen su expresión y que el efecto producido por estas señales específicas es aditivo. Hasta el momento, TSW12 es el único gen correspondiente a una LTP que se induce por factores ambientales.

El mRNA TSW12 no se detecta en hojas, tallos ni raíces de plantas adultas control. Sin embargo, está presente en tallos de plantas tratadas durante seis horas con NaCl. A partir de 24 horas de tratamiento el nivel de acumulación se estabiliza y se mantiene durante el tiempo estudiado (7 días). En plantas que han permanecido durante 30 días en tratamiento con sal se sigue transcribiendo este mRNA, aunque el nivel de acumulación es ligeramente menor. En plantas sometidas a estrés salino, el mensajero TSW12 muestra una distribución espacial característica, acumulándose preferentemente en tallos de plantas tratadas; no se detecta en raíces y es necesario sobreexponer el filtro para detectarlo en hojas. Este patrón de expresión, que debe estar relacionado con la función de TSW12 en plantas sometidas a estrés salino, indica que existe una regulación espacial de la expresión de *tsw12*, que confiere a este mensajero especificidad de órgano. El hecho de que se detecte exclusivamente en condiciones de estrés, indica que *tsw12* no juega un papel significativo en tejidos vegetativos de plantas no tratadas.

El patrón de expresión de TSW12 difiere notablemente del observado en otras especies; así, el mRNA correspondiente a LTP de espinaca (Bernhard *et al.*, 1991), tabaco (Fleming *et al.*, 1992) y ricino (Tsuboi, *et al.*, 1991) se detecta en la parte aérea de plantas cultivadas en condiciones control. En espinaca el nivel de este mensajero es muy alto comparado con el nivel de transcripción de la actina.

El hecho de que la expresión diferencial del mRNA TSW12 por tratamiento con NaCl sea mucho más acusada en plantas adultas que en germinulas y que TSW12 se exprese preferencialmente en el tallo está en concordancia con los resultados obtenidos al analizar los patrones bidimensionales de proteínas; según éstos, en un momento determinado del tratamiento se detecta sólo parte de las proteínas inducibles por sal o ABA. Es de esperar, por tanto, que dependiendo del tipo de tratamiento y de la edad o del órgano de la planta se detecten algunos genes no detectados en otras condiciones y viceversa.

La respuesta del gen *tsw12* al estrés osmótico se estudió añadiendo al medio de cultivo manitol a concentración aproximadamente equiosmolar a la de los tratamientos con NaCl, tratándose de emular el componente osmótico del estrés salino y disociarlo del componente iónico. El resultado obtenido indica que el estrés osmótico, uno de los tres componentes principales del estrés salino, induce la expresión de TSW12 con el mismo patrón espacial que el NaCl; aunque el nivel de acumulación, cuantificado por densitometría, es

aproximadamente 10 veces menor. Este resultado sugiere que otros componentes adicionales, presentes en el estrés salino, son los principales inductores de este gen.

Manteniendo las mismas concentraciones de iones  $\text{Na}^+$  ó  $\text{Cl}^-$  que las aportadas por el NaCl, se determinaron los niveles de inducción de TSW12 en plantas tratadas con las sales  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y KCl. El mensajero TSW12 se induce tras el tratamiento con cualesquiera de estas dos sales, aunque el nivel de acumulación es menor que con NaCl. El efecto del  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  es menos acusado que el del KCl. En discos de cotiledones de soja se ha determinado la toxicidad de distintas sales y compuestos no iónicos según el daño producido en la membrana plasmática; éste se ha cuantificado en función de la concentración de solutos liberados al medio (Leopold y Willing, 1984). Los niveles de acumulación de TSW12 en plantas tratadas con las sales mencionadas anteriormente están correlacionados con su grado de toxicidad. Estos resultados sugieren que la toxicidad es el componente del estrés salino con mayor efecto sobre la expresión de TSW12, si bien el componente osmótico es suficiente para su expresión. Aunque existe un paralelismo entre el grado de inducción del mRNA TSW12 y el daño sufrido por las membranas, no se puede establecer una relación causal entre ambos fenómenos.

La expresión de TSW12 se induce también por adición exógena de ABA al medio de cultivo. Como ya se ha indicado, el ácido abscísico actúa como intermediario en un gran número de situaciones de estrés, induciendo genes que responden a NaCl, bajas temperaturas y desecación. Tsw12 sería por tanto un nuevo gen inducido por ABA y, en general, por estrés. Sin embargo, es interesante comparar la respuesta de TSW12 con la del gen TAS14, mencionado previamente y caracterizado en nuestro laboratorio. Las condiciones experimentales para TAS14 y TSW12 fueron idénticas (variedad y edad de las plantas, condiciones de cultivo y tratamientos aplicados). El mensajero TAS 14 es inducido por sal y por ABA en todos los órganos analizados (raíz, tallo, hoja); en tallos el nivel de inducción de TAS14 por ABA es significativo, si bien menor al obtenido por NaCl. Sin embargo, la inducibilidad de TSW12 por ABA es comparativamente mucho menor que la de TAS14, siendo los niveles de ambos genes comparables en presencia de NaCl. Estos dos genes presentan, a niveles intracelulares de ABA constantes, una respuesta diferencial a NaCl y ABA. Estos resultados confirman junto con otros descritos previamente, que existen factores adicionales al ABA que intervienen en la respuesta al estrés salino.

El gen *tsw12* se induce también por herida. Con este tratamiento se mantiene la especificidad espacial de la expresión del gen *tsw12*. El posible efecto de desecación al producir la herida se minimizó en este tratamiento al llevarlo a cabo mediante presión con pinzas de diálisis, como se describe en Material y Métodos. El hecho de que este gen se induzca preferentemente en el tallo, a pesar de que la herida se produjo en hojas, implica la existencia de señales entre ambos órganos. La inducción sistémica de genes por herida ha sido revisada por Bowles (1990); la naturaleza bioquímica de las señales entre los distintos órganos no se conoce con exactitud y existe actualmente controversia sobre este aspecto; la hipótesis más reciente (Wildon *et al.*, 1992), propone que la transmisión de señales se realiza mediante despolarizaciones de membrana a lo largo de la planta.

El choque térmico induce débilmente la expresión de Tsw12 en plantas adultas; con este tratamiento, se detectan niveles similares de mRNA en tallos y en hojas. La inducción del gen *tsw12* por choque térmico podría estar

relacionada con las alteraciones en la membrana producidas por calor. Del mismo modo que la inducción de TSW12 podría estar relacionada con la biogénesis activa de membranas, como en la germinación, o cuando se producen daños por toxicidad iónica, la proteína Tsw12 puede ser requerida al producirse alteraciones de la membrana por altas temperaturas.

## 2.5 Patrón de expresión de la proteína Tsw12

La acumulación de la proteína Tsw12 se ha estudiado mediante *western blot*, utilizando un anticuerpo purificado por afinidad a partir de suero de conejo inmunizado con la proteína de fusión  $\beta$ -galactosidasa/Tsw12.

Analizando la acumulación de la proteína Tsw12 en plantas adultas sometidas a tratamientos con NaCl de distinta duración, se detecta en tallos una banda tenue, correspondiente a un polipéptido del tamaño esperado (9 kDa), en plantas tratadas durante 3 días; tratamientos más prolongados inducen un mayor nivel de acumulación en tallos, detectándose bandas de intensidad creciente tras 7 y 30 días con NaCl. La banda correspondiente a Tsw12 aparece débilmente en hojas de plantas tratadas durante 30 días. En plantas control, Tsw12 no se detecta. La cinética de acumulación de Tsw 12 está desfasada respecto a la de su mensajero, que se induce en las primeras seis horas de tratamiento. Este resultado sugiere la existencia de regulación post-transcripcional. La cinética de expresión de la proteína Tsw12 es similar a la de la proteína osmotina, en cuanto al desfase entre inducción del mensajero y aparición de proteína, que es detectable por *western blot* varios días más tarde que su mensajero (LaRosa *et al.*, 1992).

El análisis de proteínas, mediante electroforesis monodimensional y tinción con azul de Coomassie, de plantas control y tratadas con 10 g/ L muestra la existencia de una proteína abundante exclusivamente en tallos de plantas tratadas durante 30 días, que coincide en peso molecular con Tsw12 y es reconocida por los anticuerpos contra Tsw12. La acumulación de Tsw12 no es una respuesta transitoria al estrés salino, ya que tanto el mRNA TSW12 como la proteína Tsw12 están presentes mientras dura el estrés; este resultado sugiere que la proteína Tsw12 está relacionada con la aclimatación de plantas de tomate a condiciones salinas.

Es interesante destacar que el anticuerpo específico contra Tsw12 reconoce una proteína de 23 kDa de peso molecular en raíces de plantas tratadas. Esta proteína se induce por NaCl y presenta una cinética de aparición distinta a Tsw12; se detecta exclusivamente tras 7 días de tratamiento, y no se observa tras 30 días. Además, se induce por tratamientos de 24 horas con manitol o herida y tras choque térmico durante 6 horas. Este patrón de expresión difiere notablemente del de Tsw12, tanto en la localización de la proteína, en los factores ambientales que la inducen así como en su cinética de aparición. Dado que los experimentos de *western blot* se han realizado con anticuerpos policlonales purificados por afinidad, la proteína reconocida debe estar inmunológicamente relacionada y presentar epitopos reconocibles por anticuerpos anti-Tsw12. Los resultados obtenidos por *Southern* a baja estringencia confirman la existencia de genes relacionados con *tsw12*. Sin embargo, en condiciones de baja estringencia no se han detectado mRNAs adicionales en *northern* de RNA de raíces de plantas tratadas con manitol o sometidas a choque térmico. El peso molecular de esta proteína es similar al descrito para proteínas LTPs específicas. Es interesante señalar que entre la



secuencia de aminoácidos de Tsw12 y la correspondiente a la proteína de hígado humano transferente de éster de colesterol existen secuencias cortas similares, siendo el porcentaje de similitud entre ambas proteínas del 36%; por tanto no se puede descartar la existencia de una LTP con especificidad de sustrato, específica de raíz y reconocible por algunos de los anticuerpos anti-Tsw12.

En plántulas de ocho días de edad germinadas en agua se detecta un nivel basal de proteína Tsw12, resultado que está de acuerdo con los obtenidos por *northern blot*. El aumento del nivel de Tsw12 en respuesta a sal respecto al de plántulas control se detecta por *western blot* tras 24 horas de tratamiento; sin embargo, no se observa el desfase entre transcripción y traducción existente en plantas adultas. La aplicación de un choque térmico de 6 horas a plántulas induce notablemente el mensajero TSW12, sin embargo no trae consigo aumento del nivel basal de la proteína Tsw12; este resultado puede deberse bien a que la duración del tratamiento es demasiado corta para que pueda detectarse un aumento del nivel de la proteína Tsw12, bien que exista en plántulas regulación post-transcripcional del mensajero TSW12 en condiciones de choque térmico o bien que la maquinaria de traducción esté afectada por el calor y la síntesis de proteínas esté ralentizada.

## 2.6 INMUNOLocalIZACION DE TSW12

Los intentos de inmunolocalización en secciones incluidas en parafina y en criocortes resultaron infructuosos. Las condiciones de fijación y los tratamientos prolongados a altas temperaturas que conlleva la inclusión en parafina pueden destruir, en algunos casos, los determinantes antigénicos de proteínas de la muestra. Estos inconvenientes trataron de obviarse seccionando el tejido mediante criomicrotomo, empleando condiciones suaves de fijación. Sin embargo, las nuevas condiciones resultaron también ser inadecuadas. Es posible que estas condiciones, aunque suaves, afectaran la antigenicidad de Tsw12 o, más probablemente, que la fijación no fuera suficiente y la proteína Tsw12 se perdiera en las sucesivas incubaciones. No hay que descartar que la concentración de Tsw12 haya podido ser un factor limitante en las muestras analizadas. Las plantas empleadas en los cortes de parafina y los criocortes recibieron tratamiento con sal durante 7 días; aunque tras este tratamiento se detecta una banda intensa mediante *western blot*, el nivel máximo de acumulación se detecta tras 30 días de tratamiento con NaCl, alcanzando niveles detectables mediante tinción con azul de Coomassie.

Finalmente, mediante la aplicación de la técnica de *tissue-printing* a plantas tratadas durante 30 días con 10 g/l de NaCl, ha sido posible determinar que Tsw12 se localiza en epidermis de tallos y peciolo y que está también asociada al tejido vascular. Los datos obtenidos no permiten precisar en qué tipo de células se localiza Tsw12. Los datos obtenidos por inmunolocalización concuerdan con los obtenidos por *northern* y *western blot*, ya que la proteína Tsw12 se localiza tanto en tallos como peciolo de plantas tratadas y no se detecta en plantas control. La localización mediante impresión de tejidos permite afirmar que se trata de una proteína soluble. Utilizando esta técnica, se ha seguido cronológicamente la localización de proteínas de pared durante la diferenciación de tejidos en tallos de soja (Ye y Varner, 1991); en estos experimentos, la no detección de estas proteínas a partir de cierta etapa del desarrollo se ha interpretado como una disminución de la solubilidad de estas proteínas al crearse uniones *in muro*. La solubilidad de Tsw12 y su localización



en la capa externa de tallos y peciolos pueden explicar en parte las dificultades de inmunolocalización con los métodos anteriormente mencionados.

Esta localización muestra cierta similitud con el patrón de acumulación de otra proteína inducible por NaCl, la osmotina. En plantas transgénicas de tabaco, transformadas con el promotor de la osmotina fusionado al gen de la  $\beta$ -glucoronidasa (GUS), la actividad GUS está restringida a tejidos muy concretos (granos de polen maduro y pericarpo del fruto). En plantas transgénicas tratadas con NaCl, la actividad de este promotor, muy alta en todos los órganos de la planta, se localiza en tallos y principalmente en la epidermis.

La localización de Tsw12 también presenta coincidencias con la descrita para LTPs de maíz (Sossountzov *et al.*, 1991) y zanahoria (Sterk *et al.*, 1991). En maíz se expresa durante la embriogénesis y la germinación, localizándose en la epidermis del coleoptilo y en epidermis de hojas en formación. En zanahoria, esta proteína es secretada al medio en cultivos celulares embriogénicos y su expresión está restringida a fases tempranas de órganos y tejidos en formación, como por ejemplo el meristemo apical, primordios foliares y primeras fases del desarrollo de inflorescencias. En todos estos casos, el mRNA se localiza en la epidermis de estas estructuras. La función propuesta por Sterk *et al.*, teniendo en cuenta que la proteína se secreta, es la de transportar moléculas apolares al exterior de la célula, en concreto, monómeros precursores de cutina. Es decir, la LTP de zanahoria estaría implicada en la formación de la cutícula característica de partes aéreas en plantas y que una de sus funciones principales es evitar la pérdida excesiva de agua. La función de la capa de cutina en el embrión sería la de protegerlo frente a las enzimas hidrolíticas presentes en el endospermo. La posible inducción de la LTP de zanahoria por estrés salino/osmótico no ha sido investigada por estos autores.

Es interesante tener en cuenta esta hipótesis con respecto a Tsw12. La cutícula es una capa de cutina ausente en raíces; este órgano presenta una cubierta protectora de suberina. La cutícula tiene un grosor variable en distintas plantas y generalmente aparece engrosada en plantas sometidas a estrés hídrico (Fahn, 1970; Downing *et al.*, 1992). Al igual que la LTP de zanahoria, Tsw12 se expresa en la capa celular externa, es decir, en la epidermis; Tsw12 podría intervenir en el engrosamiento de la capa protectora de cutina que minimizaría las pérdidas de agua; esta hipótesis está en concordancia con la ausencia del mRNA y de la proteína Tsw12 en raíces, donde no existe cutícula. La expresión preferente en tallo frente a hojas podría deberse a los cambios en la composición de la cutícula que ocurren durante el desarrollo de la hoja (Heide-Jørgesen, 1991). Por tanto, monómeros de cutina de estructura o composición diferentes requerirían probablemente proteínas transferentes distintas a Tsw12.

En la respuesta a estrés hídrico también intervienen proteínas de pared celular, entre ellas el grupo de las GRP (proteínas ricas en glicina). En tomate estas proteínas, inducibles por herida, están reguladas también por ABA y por desecación (Showalter *et al.*, 1992). La inducibilidad de las GRP tanto por estrés hídrico como por herida ha llevado a proponer que su deposición en el tejido vascular puede tener la función de sellar posibles puntos de entrada de patógenos, impedir la pérdida de agua por evaporación o reforzar el tejido vascular con el fin de mantener turgencia. Tsw12 es también inducible por herida, y su posible función de transferir monómeros de cutina al exterior de las células de la epidermis y del sistema vascular apoyaría esta hipótesis. Se ha descrito también que en respuesta a ataque por patógenos se produce

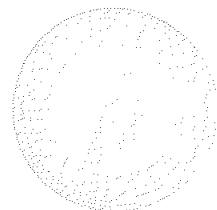
engrosamiento en las capas protectoras externas de cutina y lignina (Kolattakudy, 1986). La función de TSW12 explicaría que su expresión se requiera en condiciones determinadas, concretamente durante las fases iniciales de la germinación, en situaciones de estrés osmótico o salino, daño por herida o choque térmico. Sin embargo, para conocer exactamente la función o funciones que desempeña Tsw12 en la planta es necesario disponer de más información, especialmente de tipo fisiológico, bioquímico y celular. Sería de gran interés conocer su localización subcelular, su capacidad de transferir ácidos grasos precursores de cutina y la relación, si existe, entre su expresión y el engrosamiento de la cutina en plantas sometidas a estrés salino. El análisis funcional de plantas transgénicas que sobreexpresen el gen TSW12 y de plantas transgénicas con la expresión de TSW12 bloqueada ayudará a esclarecer el papel que juega este gen en las plantas.

# CONCLUSIONES

---

## CONCLUSIONES

1. En plántulas de tomate germinadas en medio salino se inducen proteínas específicas.
2. Muchos de los polipéptidos inducibles por sal en plántulas de tomate son también inducibles por ácido abscísico; sin embargo, existen proteínas que responden específicamente a cada tratamiento.
3. Se ha aislado un clon de cDNA de tomate, denominado TSW12, correspondiente a un mRNA inducible por estrés salino. Este mensajero se detecta principalmente en tallos y peciolo de plantas tratadas con cloruro sódico.
4. La secuencia de TSW12 presenta gran homología con genes de plantas que codifican proteínas de transferencia de lípidos.
5. La expresión del RNA mensajero TSW12 está regulada temporalmente, induciéndose durante la germinación en plantas no tratadas.
6. Los niveles de acumulación de la proteína Tsw12 aumentan con la duración del tratamiento salino, llegando a ser una proteína mayoritaria tras tratamientos prolongados.
7. La proteína Tsw12 se localiza en la epidermis y en el tejido vascular de tallos y peciolo de plantas tratadas con sal.



## **BIBLIOGRAFIA**

---

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" 10-14

Arondel, V., Tchang, F., Baillet, B., Vignols, F., Grellet, F., Delseny, M., Kader, J. C. y Puigdomenech, P. (1990) Multiple mRNA coding for phospholipid-transfer protein from *Zea mays* arise from alternative splicing. *Gene* 99, 133-136

Austin R. B., Henson, I.E. y Quarrie, S. A. (1982) Abscisic acid and drought resistance in weath, millet and rice. En "Drought Resistance in crops with emphasis on rice" M. R. Vega, (ed.) Los Baños, Filipinas, International Rice Research Institute. 171-180

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seideman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1987) Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, New York.

Ayers, A.D., Vázquez, N., de la Rubia, A., Blasco, E. y Samplon, S. (1960) Saline and sodic soils of Spain. *Soil Science* 90, 133-138

Bailey, B.A., Taylor, R., Dean, J.F.D. y Anderson, J.D. (1991) Ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase is translocated through the xylem of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi Plants. *Plant Physiol.* 97, 1181-1186

Baker, J., Steele, C. y Dure, L. III (1988) Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* 11, 277-291

Bandziulis, R.J., Swanson, M.S., Dreyfuss, G. (1989) RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev.* 3, 431-437

Bankaitis, V. A. Aitken, J. R., Cleves, A. E. y Dowhan, W. (1990) An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* 347, 561-562

Bartels, D., Hanke, Ch., Schneider, K., Michel, D. y Salamini F. (1992) A desiccation-related *Elip*-like gene from the resurrection plant *Cratogeomys plantagineum* is regulated by light and ABA. *EMBO J.* 11, (8) 2771-2778

Bednarek, S. Y. y Raikhel, N. V. (1992) Intracellular trafficking of secretory proteins. *Plant Mol. Biol.* 29, 133-150

Ben-Hayyim, G., Vaadia, Y. y Williams, B.G. (1989) Proteins associated with salt adaptation in citrus and tomato cells: involvement of 26kDa polypeptides. *Physiol. Plant.* 77, 332-340

- Bensadoun, A, y Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem.* 70, 241-250
- Bernhard, W.R. y Somerville, C.R. (1989) Coidentity of putative amylase inhibitors from barley and finger millet with phospholipid transfer proteins inferred from amino acid sequence homology. *Arch. Biochem. Biophys.* 269, 695-697
- Bernhard, W.R., Thoma, S., Botella, J. y Somerville, C.R. (1991) Isolation of cDNA clone for spinach lipid transfer protein and evidence that the protein is synthesized by the secretory pathway. *Plant Physiol.* 95, 164-170
- Binzel, M.L., Hasegawa, P.M., Rhodes, D., Handa, S., Handa, A.K. y Bressan, R.A. (1987) Solute accumulation of tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiol.* 84, 1408-1415
- 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
- Birnboim, H.C. y Doly, J.A. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acid Res.* 7, 301-354
- Blum, H., Beier, H. y Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 83-93
- Bonner, W.M. y Laskey, R.A. (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88
- Bouillon, P., Drischel, C., Vergnolle, C., Duranton, H. y Kader, J.C. (1987) The primary structure of spinach-leaf phospholipid-transfer protein. *Eur. J. Biochem.* 166, 387-391
- Bowles, D.J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *A. Rev. Biochem.* 59, 873-907
- Bravo, R. (1984) Two-dimensional gel electrophoresis: a guide for the beginner. En "Two-dimensional gel electrophoresis of proteins", Celis, J.E. y Bravo, R. (ed). Academic Press, New York. 3-36
- Bray, E.A. (1988) Drought- and ABA-induced changes in polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiol.* 88, 1210-1214
- Bray, E.A. (1990) Drought- stress-induced polypeptide accumulation in tomato leaves. *Plant, Cell and Env.* 13, 531-538
- Breu, V., Guerbette, F., Kader, J.-C., Kannangara, C., Svensson, B. y von Wettstein-Knowles, B. (1989) A 10 kd barley basic protein transfer phosphatidylcholine from liposomes to mitochondrias. *Carlsberg Res. Commun.* 54, 81-84

- 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
- Burnette, W.H. (1981) Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *A. Anal. Biochem.* 112, 195-203
- Butler, W., Cook, L. y Vayda, M.E. (1990) Hypoxic stress inhibits multiple aspects of the potato tuber wound response. *Plant Physiol.* 93, 265-270
- Camacho, M., Ramos, J. y Rodríguez-Navarro, A. (1981) *Current Microbiol.* 6, 295-299
- Campos, F.A.P. y Richardson, M. (1984) The complete amino acid sequence of the  $\alpha$ -amylase inhibitor I-2 from seeds of ragi (Indian finger millet, *Eleusine coracana* Gaertn.). *FEBS Lett.* 167, 221-225
- Cassab, G.I. y Varner, J.E. (1987) Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seedcoat by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *J. Cell Biol.* 105, 2581-2588
- Chen, H.H. y Gusta, L.V. (1983) Abscisic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. *Plant physiol.* 73, 71-75
- Chetal, S. Wagle, D.S. y Nainawatee, H.S. (1980) Phospholipid changes in wheat and barley leaves under water stress. *Phytochemistry* 19, 1393-1395
- Chisholm, D. (1989). A convenient moderate-scale procedure for obtaining DNA from bacteriophage lambda. *BioTechniques* 7, 21-23
- 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
- Cleves, A. E., McGee, T. P., Whitters, E. A., Champion, K. M., Aitken, J. R., Dowhan, W., Goebel, M. y Bankaitis, V. A. (1991) Mutations in the CDP-choline pathway for phospholipid biosynthesis bypass the requirement for an essential phospholipid transfer protein. *Cell* 64, 789-800
- 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 Mol. Biol.* 13, 95-108
- Cloutier, Y. y Siminovitch, D. (1982) Correlation between cold- and drought-induced frost hardness in winter wheat and rye varieties. *Plant Physiol.* 69, 256-258
- 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. y Bray, E. A. (1992) Nucleotide sequence of an ABA-induced tomato gene that is expressed in wilted vegetative organs and developing seeds. *Plant Mol. Biol.* 18, 411-413



- Cushman, C.J. y Bohnert, H.J. (1992) Salt stress alters A/T-rich DNA-binding factor interactions within the phosphoenolpyruvate carboxylase promoter from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Mol. Biol.* 20, 411-424
- 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. *Plant Cell* 1, 715-725
- Czarnecka, E., Edelman, L., Schöffl, F. y Key, J.L. (1984) Comparative analysis of physical stress responses in soybean seedlings using cloned heat shock cDNAs. *Plant Mol. Biol.* 3, 45-58
- Daivernal, C. (1986) *Electrophoresis*, 7, 52-54
- Dasgupta, J. y Bewley, J.D. (1984) Variations in protein synthesis in different regions of greening leaves of barley seedlings and effects of imposed water stress. *J. Exp. Bot.* 35, 1450-1459
- Delcasso-Tremousaygue, D., Grellet, F., Panabieres, F., Ananiev, E.D. y Delseny, M. (1988) Structural and transcriptional characterization of the external spacer of a ribosomal RNA nuclear gene from a higher plant. *Eur. J. Biochem.* 172, 277-291
- Dente, L., Sollazzo, M., Baldari, C., Cesareni, G. y Cortese, R. (1985) The pEMBL family of single-stranded vectors. En "DNA Cloning" Vol. I. Glover, D.M. (ed.) IRL Press Limited. 101-107
- Devereux, J., Haeberli, P. y Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12, 387-395.
- Douglas, T.J. y Walker, R.R. (1983) 4-desmethylsterol composition of citrus rootstocks of different salt exclusion capacity. *Physiol. Plant.* 58, 69-74
- 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. *Plant. J.* 2, (5) 685-693
- Durè III, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.H.D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., y Sung, Z.R. (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12, 475-486
- Einspahr, K.J., Peeler, T.P y Thompson, G.A., Jr. (1989) Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate phospholipase C and phosphomonoesterase in *Dunaliella salina* membranes. *Plant Physiol.* 90, 1115-1120
- Eisenberg, D., Weiss, R. y Terwillinger, T. C. (1984) The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 140-144
- Epstein, E. y Rains, D.W. (1987) Advances in salt tolerance. *Plant and Soil* 99, 17-29

- Epstein, E., Norlyn, J.D., Rush, D.W., Kingsbury, R.W., Kelley, D.B., Cunningham, G.A. y Wrona, A.F. (1980) Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* 210, 399-404
- Ericson, M. y Alfinito, S.H. (1984) Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. *Plant Physiol.* 74, 506-509
- Espelund, M., Sæbøe-Larssen, S., Hughes, D.W., Galau, G.A., Larsen, F. y Jakobsen, K.S. (1992) Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. *Plant J.* 2, (2), 241-252
- Fahn, A. (1974) Anatomía vegetal, capítulo 10. H., Blume (ed.) Madrid
- Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6
- Fleming, A.J., Mandel, T., Hofman, S., Sterk, P., de Vries, S.C. y Kuhlemeier, C. (1992) Expression pattern of a tobacco lipid transfer protein gene within the shoot apex. *Plant J.* 2, (6), 855-862
- 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., de Larrinoa, I.F., Villalba, J.M., y Serrano, R. (1992) A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* 11, 3157-3164
- Godoy, J.A., Pardo, J.M. y Pintor-Toro JA. (1990) A tomato cDNA inducible by salt stress and abscisic acid: nucleotide sequence and expression pattern. *Plant Mol. Biol.* 15, 695-705
- Gomez, J., Sanchez-Martinez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomenech, P. y Pagés, M. (1988) A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* 334, 262-264
- Gorham, J., Win-Jones, R.G. y McDonell, E. (1985) Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and Soil* 89, 15-40
- Gough, J. y Murray, M. (1983). *J. Mol. Biol.* 166, 1-19
- Grenway, H. y Munns, R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 149-190
- Grünwald, C. (1968) Effects of sterols on the permeability of alcohol-treated red beet tissue. *Plant Physiol.* 43, 484-488
- Guerrero, F.D. y Mullet, J.E. (1988) Reduction of turgor induces rapid changes in leaf translatable RNA. *Plant Physiol.* 88, 401-408

- 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 Mol. Biol.* 15, 11-26
- Gulick, P.J. y Dvorák, J. (1992) Coordinate gene response to salt stress in *Lophopyrum elongatum*. *Plant Physiol.* 100, 1384-1388
- Gulik, P. y Dvorak, J. (1987) Gene induction and repression by salt treatment in roots of the salinity-sensitive Chinese spring wheat and the salinity-tolerant Chinese spring x *Elytrigia elongata* amphiploid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 99-103
- Guy C. L. y Haskell, D. (1987) Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol.* 84, 872-878
- Hall, T.C., Ma, Y., Buchbinder, U., Pyne, J.W., Sun, S.M. y Bliss, F.A. (1978) Messenger RNA for G1 protein of French bean seeds: Cell-free translation and product characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, (7), 3169-3200
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580
- Harada, J.J., DeLisle, A.J., Baden, C.S. y Crouch, M. (1989) Unusual sequence of an abscisic-acid inducible mRNA which accumulates late in *Brassica napus* seed development. *Plant Mol. Biol.* 12, 395-401
- Harrington, H.M. y Alm, D.M. (1988) Interaction of heat and salt shock in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 88, 618-625
- Harzallah-Shkiri, F., Guillot-Salomon, T. y Signol, M. (1982) En J.F.G.M. Wintermans y P.J.C. Kuiper, eds., *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 57-63
- Heide-Jørgensen, H.-S. (1991) Cuticle development and ultrastructure: evidence for a procuticle of high osmium affinity. *Planta*, 183, 511-519
- Heikkilä, J.J., Papp, J.E.T., Schultz, G.A. y Bewley, J.D. (1984) Induction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyls by water stress, abscisic acid, and wounding. *Plant Physiol.* 76, 270-274
- Herrin, D.L. y Schmidt, G.W. (1988) Rapid, reversible staining of Northern blots prior to hybridization. *BioTechniques* 6, 196-200
- Hirayama, O. y Mihara, M. (1987) Characterization of membrane lipids of higher plants differing in salt-tolerance. *Agric. Biol. Chem.* 51, 3215-3221
- Hong, B., Barg, R. y Ho, T.D. (1992) Developmental and organ-specific expression of an ABA- and stress-induced protein in barley. *Plant Mol. Biol.* 18, 663-674
- Hurkman, W.J. y Tanaka, C.K. (1987) The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiol.* 83, 517-524

- Hwang, S.-Y. y VanToai, T. T. (1991) Abscisic acid induces anaerobiosis tolerance in corn. *Plant Physiol.* 97, 593-597
- Jacoby, B. (1979) Sodium recirculation and loss from *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Bot.* 43, 741-744
- Jeschke, W.D. (1984)  $K^+$ - $Na^+$  exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations and salt tolerance. En "Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement", Staples, R.C. y Toenniessen, G.A., eds. Wiley International, New York
- Jones, J.B., Jr. (1982). Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *J. Plant Nutrition* 5, 1003-1030.
- Kader JC. (1990) Intracellular transfer of phospholipids, galactolipids, and fatty acids in plant cells. In: Hilderson HJ (ed.) *Subcellular Biochemistry*, Plenum Publishing Corporation 69-111
- Key, J.L., Lin, C.Y. y Chen, Y.M. (1981) Heat shock proteins in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3526-3530
- King, G.J., Turner, V.A., Hussey, C.E., Wurtele, E.S., y Lee, S.M. (1988) Isolation and characterization of a tomato cDNA clone which codes for a salt-induced protein. *Plant Mol. Biol.* 10, 401-412
- Kolattakudy, P. E. (1987) Lipid-derived defense polymers and waxes and their role in plant-microbe interaction. En "The biochemistry of plants", Stumpf, P. K. y Conn, E. E. (eds.) vol. 9. Academic Press
- 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. *Plant Cell* 2, 1211-1224
- Kononowicz, A.K., Nelson, D.E., Sing, N.K., Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A. (1992) Regulation of the osmotin gene promoter. *Plant Cell* 4, 513-524
- Kuiper, P.J.C. (1968) Lipids in grape roots in relation to chloride transport. *Plant Physiol.* 43, 1367-1371
- Kuiper, P.J.C. (1984) Environmental changes and lipid metabolism of higher plants. *Physiol. Plant.* 64, 118-122
- Kuiper, P.J.C. (1984) Functioning of plant cell membranes under saline conditions: membrane lipid composition and ATPases. En: "Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement." Staples RC, Toenniessen GH (eds.) John Wiley & Sons, Canada, 77-91
- Kurkela, S. y Borg-Franck, M. (1992) Structure and expression of *kin2*, one of two cold- and ABA- induced genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* 19, 689-692
- Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 6
- Lalk, I. y Dörffling, K. (1985). Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. *Physiol. Plant.* 63: 287-292
- LaRosa, P.C., Handa, A.K., Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A. (1985) Abscisic acid accelerates the adaptation of cultured tobacco cells to salt. *Plant Physiol.* 79, 138-142
- LaRosa, P.Ch., Chen, Z., 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
- Leah, R. y Mundy, J. (1989) The bifunctional  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor of barley: nucleotide sequence and patterns of seed-specific expression. *Plant Mol. Biol.* 12, 673-682
- Leopold, A.C., Wiling, R.P. (1984) Evidence for toxicity effects of salt on membranes. In: Staples RC, Toenniessen GH (eds.) *Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement*, John Wiley & Sons, Canada. 77-91
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Madrid, S.M. y von Wettstein, D. (1991) Reconciling contradictory notions on lipid transfer proteins in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 29, (6), 705-711
- Mardotte, W.R., Bayley, C.C. y Quatrano, R.S. (1988) Regulation of a wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts. *Nature* 335, 454-457
- McCue, K.F. y Hanson, A.D. (1992) Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant. Mol. Biol.* 18, 1-11
- Meinkoth, J. y Wahl, G. (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138, 267-284
- Mortenson, E. y Dreyfuss, G. (1989) RNP in maize protein. *Nature* 337, 312
- Müller, M. y Santarius, K.A. (1978) Changes in chloroplast membrane lipids during adaptation of barley to extreme salinity. *Plant Physiol.* 62, 326-329
- Mundy, J. y Chua, N.-H. (1988) Abscisic acid and water stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7, 2279-2286
- Mundy, J. y Rogers, J. C. (1986) Selective expression of a probable amylase/protease inhibitor in barley aleurone cells: comparison to the barley amylase/subtilisin inhibitor. *Planta* 169, 51-63

- Mundy, J., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Chua, N.-H. (1990) Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *rab* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 406-410
- 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
- Murray, M.G. y Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acids Res. 8, 4321-4325
- Murray, N.E. (1983) Phage lambda and molecular cloning. En "Lambda II", R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl y R.A. Weissberg (eds.) Cold Spring Harbour, NY. Cold Spring Harbour Laboratory, NY. 395-442
- Nishikawa, K y Ooi, T. (1986) Amino acid sequence homology applied to the prediction of protein secondary structures, and joint prediction with existing methods. Biochem. Biophys. Acta 871, 45-54
- Nordin, K., Heino, P. y Palva, E.T. (1991) Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant. Mol. Biol. 16, 1061-1071
- O'Farrel, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021
- Olmsted, J.B. (1986) Analysis of cytoskeletal structures using blot-purified monospecific antibodies. Methods in Enzymology, 134, 467-472
- Ormerod, M.G. e Imrie, S.F. (1988) Immunohistochemistry, en "Light microscopy in biology: a practical approach". Lacey, A.J. (ed.) IRL Press, Oxford University Press
- Orr, W., Keller, W.A. y Singh, J. (1986). Induction of freezing tolerance in an embryogenic cell suspension culture of *Brassica napus* by abscisic acid at room temperature. J. Plant Physiol. 126, 23-32
- Ostrem, J.A., Vernon, D.M. y Bohnert, H.J. (1990) Increased expression of a gene coding for NAD:glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase during the transition from C3 photosynthesis to crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. J. Biol. Chem. 265, 3497-3502
- Paleg, L.G., Stewart, G.R. y Starr, R. (1985) The effects of compatible solutes on proteins. Plant and Soil 89, 83-94
- Paternak, D. (1987) Salt tolerance and crop production -a comprehensive approach. Ann. Rev. Phytopathol. 25, 271-291
- Plant, A. L., Cohen, A., Moses, M. S. y Bray, E. A. (1991) Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and abscisic acid-induced gene of tomato. Plant Physiol. 97, 900-906
- Potrykus, I. (1991) Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 205-255

- Rains, D.W., Valentine, R. C. y Holländer A. (1980) Genetic engineering of osmoregulation. Plenum Press, New York
- Ramagopal, S. (1987). Differential mRNA transcription during salinity stress in barley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 94-98.
- Rush, D.W. y Epstein, E. (1981) Breeding and selection for salt tolerance by the incorporation of wild germplasm into a domestic tomato. J. Am. Soc. Hort. Sci. 106, 699-704
- Rush, D.W. y Epstein, E. (1981) Comparative studies on the sodium, potassium and chloride relations on a wild halophytic and a domestic salt-sensitive tomato species. Plant Physiol. 68, 1308-1313
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F. y Peterson, G.B. (1982) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 162, 729-773
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166, 368-379
- Schwartz-Sommer, Z., Gierl, A., Cuypers, H., Peterson, P.A. y Saedler, H. (1985) Plant transposable elements generate the DNA sequence diversity needed in evolution. EMBO J. 4, 591-597
- Showalter, A.M., Butt, A.D. y Kim, S. (1992) Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. Plant Mol. Biol. 19, 205-215
- Simorre, J. P., Caille, A., Marion, D. y Ptak, M. (1991) Biochemistry 30, 11600-11608
- Singh, N.K., Bracker, C.E., Hasegawa, P.M., Handa, A.K., Buckel, S., Hermodson, M.A., Pfankoch, E., Regnier, F.E. y Bressan, R.A. (1987) Characterization of osmotin: a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. Plant Physiol. 85, 529-536
- Singh, N.K., 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
- Singh, N.K., Nelson, D.E., Kuhn, D., Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A. (1989) Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. Plant Physiol. 90, 1096-1101
- Skriver, K. y Mundy, J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. The Plant Cell 2, 503-512

- Skriver, K., Leah, R., Müller-Uri, F., Olsen, F.-L. y Mundy, J. (1992) Structure and expression of the barley lipid transfer protein gene *Ltp1*. *Plant Mol. Biol.* 18, 585-589
- Slabas, A.R. y Fawcett, T. (1992) The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis. *Plant. Mol. Biol.* 19, 169-191
- Sossountzov, L., Ruiz-Avila, L., Vignols, F., Jolliot, A., Arondel, V., Tchang, F., Grosbois, M., Guerbette, F., Miginiac, E., Delseny, M., Puigdomenech, P. y Kader, J. C. (1991) Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3, 923-933
- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517
- Stavarek, S.J. y Rains, D.W. (1984) Cell culture techniques: selection and physiological studies of salt tolerance. En "Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement", Staples, R.C. y Toenniessen, G.A., eds. Wiley International, New York, 321-334
- Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G. A., van Kammen, A. y De Vries, S. C. (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3, 907-921
- Steward, C.R. y Voetberg, G. (1985) Relationship between stress-induced ABA and proline accumulations and ABA-induced proline accumulation in excised barley leaves. *Plant Physiol* 79, 24-27
- Stuiver, C.E.E., Kuiper, P.J.C. Marschner, H. y Kylin, A. (1981) Effects of salinity and replacement of  $K^+$  by  $Na^+$  on lipid composition in two sugar beet inbred lines. *Physiol. Plant.* 52, 77-82
- Stuiver, C.E.E., Kuiper, P.J.C. y Marschner, H. (1978) Lipids from bean, barley and sugar beet in relation to salt tolerance. *Physiol. Plant.* 42, 124-128
- Szabolcs, I. (1989) Salt-affected soils. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
- Takishima, K., Watanabe, S., Yamada, M. y Mamiya, G. (1986) The amino-acid sequence of the nonspecific lipid transfer protein from germinated castor bean endosperms. *Biochem. Biophys. Acta* 870, 248-255
- Tchang, F., This, P., Stiefel, V., Arondel, V., Morch, M.D., Pagés, M., Puigdomenech, P., Grellet, F., Delseny, M., Bouillon, P., Huet, J.C., Guerbette, F., Beauvais-Cante, F., Duranton, H., Pernollet, J.C. y Kader, J.C. (1988) Phospholipid transfer protein: full-length cDNA and amino acid sequence in maize. *J. Biol. Chem.* 263, 16849-16855
- Thomas, J.C., McElwain, E.F. y Bohnert, H.J. (1992) Convergent induction of osmotic stress-responses. *Plant Physiol.* 100, 416-423
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354



- Treichel, S. (1986) The influence of NaCl on delta<sup>1</sup>-pyrroline-5-carboxylate reductase in proline-accumulating cell suspension cultures of *Mesembryanthemum nodiflorum* and other halophytes. *Physiol. Plant.* 67, 173-181
- Tsuboi, S., Suga, T., Takishima, K., Mamiya, G., Matsui, K., Ozaki, Y. y Yamada, M. (1991) Organ-specific occurrence and expression of the isoforms of nonspecific lipid transfer protein in castor bean seedlings, and molecular cloning of a full-length cDNA for a cotyledon-specific isoform. *J. Biochem.* 110, 823-831
- Vartanian, N., Damerval, G. y de Vienne, D. (1987) Drought-induced changes in protein patterns of *Brassica napus* var. *oleifera* roots. *Plant Physiol.* 84, 989-992
- Vernon, D.M. y Bohnert, H.J. (1992) A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.* 11, (6), 2077-2085
- Villardell, J., Goday, A., Freire, M.A., Torrent, M., Martinez, C., Torné, J.M. y Pagés, M. (1990) Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB17 in maize. *Plant Mol. Biol.* 14, 423-432
- von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* 133, 17-21
- 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., Pesci, P.A., Reinhold, L. y Lerner H. (1986) Proton fluxes as a response to external salinity in wild type and NaCl-adapted *Nicotiana* cell lines. *Plant Physiol.* 81, 454-459
- 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
- Wildon, D. C., Thain, J.F., Minchin, P.E.H., Gubb, I. R., Reilly, A.J., Skipper, Y.D., Doherty, H.M., O'Donnell, P.J. y Bowles, D.J. (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360, 62-64
- Wirtz, K.W.A. y Gadella Jr., T.W.J. (1990) Properties and mode of action of specific and non-specific phospholipid transfer proteins. *Experientia* 46, 592-598
- 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
- Ye, Z.-H. y Varner, J.E. (1991) Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues. *Plant Cell* 3, 23-37

Yu, Y. G., Chung, C. H., Fowler, A. y Suh, S. W. (1988) Amino acid sequence of a probable amylase/protease inhibitor from rice seeds. Arch. Biochem. Biophys. 265, (2), 466-475

Zeevaart, J.A.D. y Creelman, R.A. (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 439-73

## ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
APS	persulfato amónico
BSA	seroalbúmina bovina
Ci	curio
cpm	cuentas por minuto
ddATP	dideoxiadenosina-5'-trifosfato
ddCTP	dideoxicitidina-5'-trifosfato
ddGTP	dideoxiguanidina-5'-trifosfato
ddTTP	dideoxitiimidina-5'-trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNasa	deoxirribonucleasa
D.O.	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen-diaminotetraacético
EGTA	ácido etilen-bis oxietil nitrilo tetraacético
IEF	isoelectroenfoque
Ig	Inmunoglobulinas
Kb	kilopares de bases
kDa	kilodalton
LTP	protena transferente de lípidos
N	nucleótido
NEpHGE	electroforesis en gradiente de pH no equilibrado
PAGE	electroforésis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PEG	polietilén-glicol
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PPO	2,5-difeniloxazol
rpm	revoluciones por minuto
SDS	lauril sulfato sódico
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión
Tris	tri-(hidroximetil)-aminometano
UV	ultravioleta
V	voltios

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal de Examen de las tesis doctorales en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D.<sup>a</sup> Sonia Torres Schumann

de tema: Análisis molecular del esteroide en tomate: cambios en la especie fértil y caracterización del gen tscw12

expresando su conformidad con el dictamen. APTD CUM LAUDE POR UNANIMIDAD

Sevilla, 7 de Mayo 1993

El Vocal,

*[Handwritten signature]*

El Presidente

*[Handwritten signature]*

El Vocal,

*[Handwritten signature]*

El Secretario,

*[Handwritten signature]*

El Vocal,

*[Handwritten signature]*

El Doctorado,

*[Handwritten signature]*