

# VIII SIMPOSIO Metabolismo y modo de acción de Fito hormonas



*Consejería de Agricultura y Pesca*



**VIII SIMPOSIO  
Metabolismo y  
Modo de Acción  
de Fitohormonas**

Sevilla, 26 y 27 de Septiembre, 2002

**Título:** VIII Simposio. Metabolismo y modo de acción de Fitohormonas.

**©: Edita:**  
JUNTA DE ANDALUCÍA: Consejería de Agricultura y Pesca.

**Publica:**  
VICECONSEJERÍA. Servicio de Publicaciones y Divulgación.

**Colección:**  
CONGRESOS Y JORNADAS.

**Serie:**  
FISIOLOGÍA VEGETAL.

**Coordinador:**  
F. J. Cejudo Fernández.

**Autores:**  
Varios.

**Fotografía e ilustraciones:**  
Autores.

**I.S.B.N.:**  
84-8474-060-9

**Dep. Legal:**  
SE-2.172-2002

**Maquetación e Impresión:**  
A.G. Novograf, S.A. (Sevilla)

# ÍNDICE

## Conferencia inaugural

- V. Amador, M. Rodríguez-Falcón, E. Russo, J. Martínez-García y S. Prat  
La proteína U-box/arm-repeat PHOR1: un posible modulador  
de la respuesta a GAs en función de las condiciones de fotoperiodo ..... 11

## Etileno (Sesión)

### Revisión

Antonio Granell

- Etileno: la más pequeña de las hormonas cumple 101 años ..... 15

### Comunicaciones

López Nicolás J. I., Sánchez Bravo J. y Acosta M.

- Influencia del etileno en los valores de ploidía que presentan los hipocótilos  
etiolados de *Lupinus albus*. Relación con el crecimiento ..... 37

M.I. Puga-Hermida, M. Gallardo, M.C. Rodríguez-Gacio, C. Fernández-Otero, A.J. Matilla

- Las semillas heterogéneas de *Brassica rapa* L. cv. Rapa tienen afectada la  
transformación del SAM y la expresión de la ACC-oxidasa ..... 41

L. Zacarias, M.T. Lafuente, J. F. Marcos, M. Saladié y E. Dupille

- Activación de la síntesis de etileno por bajas temperaturas en los  
frutos cítricos ..... 45

Eva Miedes, Juan Carlos Cabrera y Ester Pérez Lorences

- Activación de la producción de etileno por oligosacáridos del xiloglucano ..... 47

Emilio Cervantes, Juana Gutiérrez De Diego y F. David Rodríguez García

- Efectos comunes de los mutantes Etr1 y GA1 en la expresión génica en  
semillas de *Arabidopsis* ..... 51

## **Poliaminas, Jasmónico, Salicílico**

### Revisiones

*Rubén Alcázar, Teresa Altabella y A.F. Tiburcio*

Poliaminas ..... 57

*José León*

Salicilatos y jasmonatos: reguladores de defensa y desarrollo en plantas ..... 79

### Comunicaciones

*Gloria de la Viña, Teresa Altabella y Antonio Fernández Tiburcio*

Crecimiento y contenido en poliaminas en plantas transgénicas de trigo portadoras del gen de la ADC de avena ..... 97

*Rubén Alcázar, Antonio F. Tiburcio y Teresa Altabella*

Efectos fenotípicos asociados a la expresión constitutiva de la Arginina descarboxilasa 2 de *Arabidopsis* ..... 101

*K. Proaño, M. Fos, D. Alabadi, F. Nuez, J. Carbonell, J.L. García-Martínez*

La mutación *pat-2*, que induce el desarrollo partenocárpico del fruto en tomate, altera el metabolismo de poliaminas en ovarios no polinizados ..... 105

*Mari Cruz Castillo, Cristina Martínez y José León*

Análisis molecular de la implicación de la  $\beta$ -oxidación en la defensa de *Arabidopsis* frente a heridas y patógenos..... 109

*Cristina Martínez y José León*

Control del tiempo de floración por ácido salicílico en *Arabidopsis* ..... 113

*Oscar Lorenzo, José Juan Sánchez-Serrano y Roberto Solano*

Señalización de etileno y ácido jasmónico en la respuesta a patógenos en *Arabidopsis*. Papel de ERF1 (*ethylene-response-factor1*)..... 117

## **ABA**

### Revisiones

*Claudia Nieva, Adela Goday y Montserrat Pagès*

Respuesta de las plantas al estrés ..... 123

*Francisco R. Tadeo, Domingo J. Iglesias, Eduardo Primo-Millo y Manuel Talón*

Control ambiental y hormonal de la abscisión en los cítricos ..... 135

### Comunicaciones

*Mary-Paz González, Oscar Lorenzo, Carlos Nicolás, Gregorio Nicolás y Dolores Rodríguez*

Sobreexpresión de una proteína fosfatasa de tipo 2C (FsPP2C1) específica de semillas y relacionada con la dormición, en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*..... 147

<i>Ana Belén Feria, Ludivine Cochereau, Rosario Alvarez, Jean Vidal , Sofía García-Mauriño y Cristina Echevarría</i>	
Efecto del ABA en la fosforilación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en condiciones de estrés salino y durante la formación de la semilla .....	151
<i>Cristina Urbez, Manuel Cercós y Juan Carbonell</i>	
Implicación de PsDAP en el desarrollo de la semilla y en estrés por sequía en guisante: ¿está regulado por ABA?.....	155
<i>Claudia Nieva y Montserrat Pagés</i>	
Aislamiento y caracterización en maíz de dos factores de transcripción de la familia de las bZIP .....	159
<i>J.A. Jiménez, D.Rodríguez, G. Nicolás y C. Nicolás</i>	
Aislamiento y caracterización de un clon de ADNc que codifica para una proteína de unión a calcio (FsCaBP) inducida por ABA y estrés salino en semillas durmientes de haya .....	163
<i>Mehouachi J., Lliso I., Agustí J., Alós E., Soler G., Iglesias D.J., Tadeo F.R. , Cercós M. y Talón M.</i>	
Efecto del estrés hídrico y de la rehidratación sobre la fructificación y los niveles de giberelinas y de ácido abscísico de los frutos cítricos.....	167
<b>Auxinas y citoquininas</b>	
Revisión	
<i>Esther Simón Martínez</i>	
Citoquininas y fitocromos.....	173
Comunicaciones	
<i>López Nicolás J. I., Acosta M. y Sánchez Bravo J.</i>	
Transporte polar de AIA durante el crecimiento de hipocótilos etiolados de <i>Lupinus albus</i> .....	185
<i>Centeno M.L., Moncaleán P., Alonso P., Fernández B., Rodríguez A. y Ordás R.</i>	
Optimización de la respuesta caulogénica inducida por citoquininas en cotiledones de <i>P. pinea</i> . Absorción y metabolismo de BA .....	189
<i>Alarcón M.V., Reis-Grilo C.M., Lloret, P.G. y Salguero J.</i>	
Regulación por auxina y etileno de la elongación y expansión radial de la raíz primaria de maíz.....	193
<i>Blanca Vioque, José M<sup>º</sup> Castellano y Jesús Chamarro</i>	
Estudio de la interacción auxina/etileno en plantas de tomate .....	197

## Giberelinas

### Revisiones

Miguel A. Blázquez

Bases moleculares de la señalización por giberelinas. Las proteínas DELLA..... 203

Pilar Carbonero, Montaña Mena, Inés Isabel-LaMoneda, Manuel Martínez,  
F. Javier Cejudo e Isabel Díaz

El papel de los factores transcripcionales de la clase DOF, BPBF y SAD,  
en la regulación de genes inducibles por GA en aleurona de cebada..... 211

### Comunicaciones

MariCruz González, Miguel Alcaide, Rodrigo Morillo, Luis F. Gordo y  
Francisco Javier Cejudo

Control del espigado de la remolacha mediante inhibidores de  
síntesis de giberelinas ..... 223

C. Gisbert, S. Ubeda-Tomás, J.L. García-Martínez y López-Díaz I.

Consecuencias de la manipulación de la ruta de giberelinas en el  
desarrollo de plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* ..... 227

José Pérez Gómez, Andy L. Phillips, Peter Hedden y José Luis García Martínez

Silenciamiento de GA-20 oxidasas de *Arabidopsis thaliana* mediante ribozimas  
y caracterización de dos nuevos clones de las mismas ..... 233

Martí C., Balaguer B., Ellul P., Moreno V., Carbonell J. y Granell A.

Papel del gen *gai* en la arquitectura de la planta y el cuajado del fruto  
de tomate ..... 237

Manuel Martínez, Ignacio Rubio, Pilar Carbonero e Isabel Díaz

Efecto antagónico del GA sobre la expresión de los genes que codifican  
una cisteín-proteasa (gen *CatB*) y una cistatina (gen *icy*) en aleurona  
de cebada ..... 241

Isabel Díaz, Montaña Mena, Inés Isabel-LaMoneda, Manuel Martínez, Ignacio Rubio,  
F. Javier Cejudo y Pilar Carbonero

Factores transcripcionales de la clase DOF que regulan genes de hidrolasas  
inducibles por GA en aleurona de cebada ..... 245

Fernando Domínguez y Francisco Javier Cejudo

Endonucleasas inducidas por GA<sub>3</sub>: Implicación en la muerte celular  
programada de la aleurona de trigo ..... 249

### Conferencia de clausura

T. Roitsch, M. E. Balibrea, R. Ehneß, M. Goetz

Regulation of source/sink relations by phytohormones ..... 255

## **CONFERENCIA INAUGURAL**



## LA PROTEÍNA U-BOX/ARM-REPEAT PHOR1: UN POSIBLE MODULADOR DE LA RESPUESTA A GAs EN FUNCIÓN DE LAS CONDICIONES DE FOTOPERIODO

V. Amador, M. Rodríguez-Falcón, E. Russo, J. Martínez-García y S. Prat.

**Dpto. Genética Molecular, IBMB- Centro de Investigación y Desarrollo, CSIC.  
Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona.**

**E-mail: [spmgms@cid.csic.es](mailto:spmgms@cid.csic.es)**

La formación de tubérculos en plantas de patata *S. tuberosum* ssp *andigena* es inducida por días cortos (SD) y reprimida en días largos (LD) ó en SD con una interrupción de la noche con 30 min de luz (SD+NB). Se ha observado que en LD, el contenido en giberelinas (GAs) es elevado en los estolones pero disminuye cuando la planta se expone a SD, lo que sugiere que las GAs podrían jugar un papel inhibitor de la tuberización en LD. A fin de explorar esta hipótesis, hemos aislado los genes de patata que codifican el enzima GA 20-oxidasa, un enzima clave en la ruta de biosíntesis de GAs. En patata, existen al menos tres genes que codifican la actividad GA 20-oxidasa y la sobre-expresión de uno de estos genes (*StGA20ox1*) da lugar a plantas con un retraso en el tiempo de tuberización, en tanto que la inhibición de la expresión de este gen mediante una construcción antisentido resulta en un fenotipo de tuberización temprana, de acuerdo con una función inhibitor de las GAs sobre el proceso de tuberización. Las líneas antisentido para el gen GA 20-oxidasa, sin embargo, aún requieren condiciones de SD para iniciar la formación de tubérculos, lo que indica que en condiciones inductoras de fotoperiodo, además de una disminución en los niveles de GAs en los estolones, deben ocurrir otros cambios adicionales. Estudios en los que se injertó hojas de plantas expuestas a condiciones inductoras de SD, a plantas base crecidas en condiciones de LD, demostraron que el principal sitio de percepción de la señal fotoperiódica es en las hojas. En condiciones favorables de SD éstas producen una señal inductora móvil que es transportada a los estolones donde induce la formación de tubérculos. Con ánimo de estudiar cuales son los mecanismos moleculares mediadores de este proceso de señalización,



hemos utilizado la técnica de RT-PCR differential display para comparar los patrones de expresión génica de hojas de plantas de patata crecidas en condiciones inductoras (SD) y no-inductoras (SD+NB). De este modo, hemos aislado el clon de cDNA PHOR1 (por photoperiod responsive 1) cuyo mensajero se acumula de forma más abundante en las hojas de las plantas inducidas para la tuberización. PHOR1 codifica una proteína U-box con un dominio arm-repeat similar a la proteína armadillo de *Drosophila*. El transcrito PHOR1 oscila con un ritmo diurno de expresión diferente en las plantas crecidas en SD ó SD+NB. La inhibición mediante antisense de PHOR1 (a-PHOR1) produce un fenotipo semi-enano similar al de las plantas deficientes en GAs. Las líneas a-PHOR1 muestran una respuesta reducida a la aplicación de GAs y un contenido en GAs mayor que el de las plantas control no transformadas. El mecanismo de control por retroalimentación negativa de los transcritos GA 20-oxidasa y GA 2-oxidasa está también alterado en estas líneas, lo cual es indicativo de una respuesta a GAs alterada en estas plantas. Estudios de localización subcelular en los que se fusionó la proteína PHOR1 a la proteína fluorescente GFP mostraron que las GAs inducen una rápida migración de la proteína PHOR1 al núcleo. Dicha migración nuclear dependiente de GAs es similar a la reportada para la proteína armadillo en respuesta a la señal Wnt/Wingless, y es consistente con una función de PHOR1 en la ruta de transducción de la señal de GAs. Las células de tabaco BY2 que expresan la proteína de fusión, y las líneas de patata que sobre-expresan la proteína muestran una respuesta exacerbada a GAs, lo cual estaría de acuerdo con una función intermediaria de la proteína PHOR1 en la ruta de señalización de las GAs. Hemos estudiado el mecanismo de acción de esta proteína intermediaria mediante ensayos doble-híbrido en levadura. Estos ensayos han conducido a la identificación de una proteína

F-box/kelch-repeat que reconoce específicamente la proteína PHOR1. Se discutirá la posible función de esta proteína F-box, junto con la de otras proteínas identificadas en los ensayos doble-híbrido.

La comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína PHOR1 con las secuencias disponibles en los bancos de datos han permitido identificar tres posibles homólogos de PHOR1 en *Arabidopsis thaliana*. Se reportarán los patrones de expresión de estos homólogos junto con su posible implicación en la señalización de GAs.

# ETILENO

## Revisión



*exactamente la misma y la planta parece utilizar preferentemente algunos receptores para funciones específicas. En cualquier caso, la sensibilidad y la capacidad de respuesta dependerían de la presencia de elementos funcionales anteriores a EIN3. La interconexión entre las diferentes hormonas y los genes/enzimas de biosíntesis y genes/elementos de la cadena de transducción de etileno conforman el complejo entramado de la respuesta hormonal.*

## Los protagonistas: el etileno vs. la planta y la planta vs. el etileno

Se cumplen 101 años desde que Neljubov, trabajando a la sazón en el Instituto Botánico de la Universidad de S. Petersburgo, identificara al etileno como el componente del gas del alumbrado que provocaba que las plántulas de guisante crecieran horizontalmente al suelo. Tendrían que pasar 33 años, para que Gane en el Reino Unido demostrara que las plantas son capaces de sintetizar etileno. Y ha sido en los últimos poco más de 10 años cuando científicos, fundamentalmente ubicados en los EUA, han empezado a desvelar cuales son los mecanismos por los que las plantas sintetizan y responden al más simple de los reguladores vegetales. Es notable que haya sido el estudio de la interacción entre la más simple de las hormonas y el más simple de los modelos vegetales la que haya dado los resultados más fructíferos dentro del área de las hormonas vegetales. Significativamente, el número de publicaciones basadas en la interacción planta-etileno ha tenido dos puntos de inflexión a lo largo de estos 101 años: coincidiendo con la introducción de la cromatografía de gases (que facilitó el análisis de etileno) en 1959 y la utilización de *Arabidopsis* (que está permitiendo el estudio de la componente planta de la interacción) como modelo experimental desde 1993. El ritmo de producción anual de publicaciones aumentó en aproximadamente 100 después de cada hito.

El etileno es ampliamente conocido por su efecto acelerador de los programas de senescencia de flores y maduración de frutos en ciertas especies. Sin embargo, la interacción del etileno con las plantas va más allá de estos casos y la capacidad de sintetizar etileno y de responder al mismo mediante cambios fisiológicos y de desarrollo, parece estar ampliamente extendida por todo el Reino Vegetal [24]. El principio para dicha interacción debió pues establecerse muy tempranamente en el tiempo evolutivo y, con el tiempo, ha dado paso a efectos muy diferentes en procesos como la floración, la maduración, la germinación de semillas y la abscisión [1].

A efecto de su interacción con la planta, la información contenida en el etileno queda definida por sus características físico-químicas: (1) el etileno es un gas, por lo tanto puede difundir con facilidad de un tejido a otro e incluso de una planta a otra; (2) el etileno es relativamente soluble en agua (cinco veces más soluble que el oxígeno), pero también muy soluble en lípidos, por lo que al menos inicialmente podría pasar las membranas lipídicas con cierta soltura; esta característica también debe determinar el entorno en el que el etileno ha de interaccionar con el posible receptor/sensor; (3) el

etileno forma complejos de coordinación con los metales de transición ( $\text{Ag}^+$  y  $\text{Cu}^+$  entre otros); esta donación de electrones "pi" desde el etileno a los orbitales "d" de los metales de transición tiene una energía de enlace que es la mitad de un doble enlace C-C, y por lo tanto, suficientemente estable como para formar parte del mecanismo de reconocimiento por la diana celular [23].

Esta información estructural "sencilla" no es la única componente de la señal, que se hace "complicada" por la propia planta, la cual decide en qué momento y dónde sintetizar etileno según ciertos determinantes del desarrollo o estrés medioambiental. Así pues, a la información estructural hay que añadir esta componente espacial y temporal. Otras componentes de la señal, como la cantidad, duración, o el que se trate de una cantidad absoluta o un aumento sobre un nivel anterior, también han de ser detectadas e interpretadas por la planta y contribuyen a configurar el tipo de respuesta. La implicación del propio etileno, junto con otros factores, como modulador positivo o negativo (según el caso) de su propia síntesis, o de algunos elementos de la ruta de percepción / transducción de la señal, indica la extremada sofisticación añadida por la planta a la sencillez estructural de la señal química.

El modelo actual de percepción / transducción de etileno está basado fundamentalmente en los mutantes de *Arabidopsis* de la triple respuesta (y en menor medida del estudio de sus ortólogos de tomate). Es posible que el estudio de otras respuestas reguladas por etileno o de otras especies vegetales obligue a ampliar dicho modelo, incorporando las peculiaridades necesarias en cada caso.

## Biosíntesis de etileno

La ruta de biosíntesis de etileno en plantas superiores fue descifrada por el grupo de S.F. Yang en la Universidad de California en Davis a principio de los 80 [35]. Conviene recordar, no obstante, que la mayor parte de las plantas sin flor sintetizan etileno mediante una vía aún desconocida y diferente de la descrita por Yang [1]. Un estudio filogenético, basado en el enzima ACO –último enzima de la ruta de biosíntesis de etileno–, indica que la forma canónica de sintetizar etileno debió aparecer en un antepasado común a los grupos que hoy representan las Cícades, Gimnospermas, Getales y Angiospermas [24]. En estas plantas, pues, el etileno se forma a partir de los carbonos C2-C3 de la metionina mediante un primer paso en el que se sintetiza una especie activada SAM (S-Adenosil-L-Metionina, que funciona en muchos otros procesos como dador universal de metilo, pero que en este caso es reciclada a través de diversos intermediarios del ciclo de Yang), y posteriormente se forma el primer intermediario comprometido de la vía: el ácido 1- Amino Ciclopropano -1- Carboxílico (ACC). Este es un intermediario, de naturaleza amino acidica, bastante inusual ya que contiene un ciclo de tres átomos de carbono. El ACC es generalmente el metabolito limitante de la vía, y es rápidamente convertido (oxidado) a etileno.

Cada uno de los dos pasos identificados por el grupo de Yang está catalizado por una actividad con varias formas isoenzimáticas, que se encarga de regular el flujo a



otra parte, el grupo de Don Grierson consiguió de manera similar retrasar la producción de etileno y la maduración del tomate mediante antisentido con la ACO1 mayoritaria del fruto. La tecnología (patente EUA 5,530,190) está en evaluación para su posible comercialización. En ambos casos se podía inducir la maduración de los frutos mediante el tratamiento exógeno con etileno. Se han descrito también otros abordajes para la manipulación genética de los niveles de etileno utilizando genes de otros organismos cuyos productos metabolizan la SAM o el ACC y por lo tanto evitan su posterior conversión a etileno (ver por ejemplo patentes EUA 5,702,933 ; 5,512,446; 5,589,623 y 5,416,250)

## Percepción y transducción de la señal etileno

Las plantas demuestran ser extremadamente sensibles al etileno: capaces de detectarlo en concentraciones del orden de nanomolar y de responder a su presencia con cambio en el desarrollo o en su fisiología –en comparación el umbral de detección por humanos es 29000 veces superior sin que produzca ningún efecto conocido a estas concentraciones; curiosamente somos en cambio muy buenos para detectar concentraciones picomolares de ciertos perfumes;–. La capacidad de responder a etileno está ampliamente distribuida por todo el reino vegetal [1]. Solamente, como curiosidad, comentaré tres ejemplos de situaciones extremas que abarcan diferentes reinos y que han aparecido recientemente en la literatura:

(1) el de *Potamogeton pectinatus* [20], una planta vascular que ha perdido la capacidad de sintetizar etileno –no sintetiza ACC oxidasa y por tanto acumula ACC–, pero es aún capaz de responder al etileno producido por otros organismos de su ecosistema, mediante cambios adaptativos en su pauta de crecimiento; (2) el de *Synechocystis* [25], una bacteria que aunque no parece responder a etileno, posee un gen *Str1212* que codifica una proteína de membrana con un dominio funcional muy similar al que las plantas utilizan para unir etileno; esto probablemente indica que el precursor del receptor del etileno se encontraba en el antepasado común de bacterias y plantas; y (3) el caso de la esponja *Suberites domuncula* [22], la primera especie animal descrita que parece ser capaz de responder fisiológica y molecularmente al etileno (la capacidad de responder a etileno podría no estar restringida a plantas).

La existencia de un receptor de etileno fue propuesta por Burg & Burg (1965) y posteriormente por Sisler y Sanders (1970's) para explicar la existencia de sitios de unión saturables que se podían determinar con etileno marcado con  $^{14}\text{C}$ . Los intentos de purificar el receptor por métodos bioquímicos resultaron, no obstante, infructuosos. Por otra parte, la existencia de genes regulados por etileno era conocida desde principios de los 80. En cambio, no se conocía ningún elemento de unión entre el receptor y la activación de esos genes, hasta que, a principio de los 90, se empezó a utilizar una aproximación genética.

Nuestro conocimiento de la forma en la que las plantas perciben el etileno deriva fundamentalmente del estudio de mutantes de sensibilidad a etileno, realizado por

diferentes grupos en los EUA [2,8] utilizando la triple respuesta\* y la planta *Arabidopsis thaliana*. Estos estudios revelan dos tipos de mutantes: los que muestran la triple respuesta incluso en la ausencia de etileno exógeno (muestran triple respuesta constitutiva o *ctr*; y sobre productores de etileno, *eto*, –estos últimos estarían afectados en la producción y no la respuesta) y los que muestran respuesta reducida en todos los tejidos, aún en presencia de concentraciones saturantes de etileno (*ein2*, *ein3*, *ein4*, *etr1*, *etr2*, *ers1*, *ers2*, *ein5*, *ein6*). Una categoría adicional la constituyen los mutantes *aux1*, *axr1*, *eir1* y *hls1* que muestran insensibilidad en algunos órganos/ tejidos, y no en otros, y que por lo tanto pueden corresponder a ramificaciones de la ruta.

Estudios de epistasia \*\* han permitido ordenar a los diferentes mutantes en una secuencia lineal de actuación que va desde el etileno hasta los efectos finales y sería: (*etr1*, *ers1*, *etr2*, *ein4*, *ers2*), *ctr*, *ein2*, *ein3*, *ein5/ein6*; después estarían *aux1*, *axr1*, *eir1* y *hls1*.

Según el modelo establecido el etileno sería reconocido por el receptor, seguramente ubicado en la membrana del RE, a través de su coordinación con un ion  $Cu^I$ , probablemente localizado en un pequeño entorno hidrófobo rico en electrones inmerso entre los dominios transmembrana de la molécula del receptor ETR/ERS. La unión produciría un cambio estructural en el receptor, que se transmitiría a lo largo de la molécula, o bien la señal se transmitiría por un mecanismo de fosforilación. Como el receptor parece estar en contacto físico con CTR1, este cambio sería transmitido a este elemento, el cual dejaría de actuar como represor de la proteína integral de membrana EIN2. EIN2 posee similitud con ciertos transportadores y, mediante un mecanismo aún por desvelar, activaría a los factores de transcripción tipo EIN3, iniciando con ello una reacción en cadena de factores de transcripción, y resultando finalmente en la activación o represión de los genes regulados por etileno [28].

El mecanismo de percepción y transducción de etileno resulta ser tan sofisticado como el de cualquier hormona animal. Representa, por otra parte, un ejemplo magnífico de aprovechamiento, ya que consigue integrar elementos de índole y origen muy diverso, como son:

1. Un elemento de origen *procariota*: el elemento sensor y transductor inicial parece haber sido reclutado del mundo bacteriano. ETR/ERS tienen similitud con los sistemas bacterianos de dos componentes; con un dominio sensor presente sólo en plantas y en *Synechocystis* spp. y con la salvedad de que puede que, aunque tenga un dominio quinasa más o menos completo, no utilice un sistema de autofosforilación / "fosfo relay" para transmitir la señal, como hacen las bacterias, sino un cambio conformacional.
2. Un elemento típicamente *eucariota*: una cadena de amplificación de señal con un elemento CTR, que parece ser una MAPKKK tipo Raf; no obstante, la existencia de una cascada de kinasas está por demostrar, aunque parece haber un contacto directo entre el elemento anterior ETR y CTR.



dominio sensor confieren insensibilidad dominante [2] en todos los aspectos regulados por etileno con independencia de cual sea el receptor de etileno mutado (tipo I o II; con o sin dominio receptor). (c) La pérdida de función ("knockout" por EMS, inserción de T-DNA, o por "antisense") de uno de ellos, o incluso dos de ellos, no produce ningún fenotipo observable mientras que los mutantes triples y cuádruples muestran un fenotipo de severidad creciente, apoyando el que los otros receptores presentes pueden realizar la misma función [19].

Es posible, no obstante, que en otras condiciones (por ejemplo menor concentración de etileno o determinadas condiciones de estrés o una observación más fina) sí se pueda observar especialización. Se ha propuesto que ciertas diferencias en especialización de los receptores podría ser la razón por la que el doble mutante de pérdida de función *etr1; ein4* (que por tanto no contiene ninguno de estos dos receptores) muestre efectos más importantes en la raíz y en la hoja que en el mutante sencillo *etr1*, mientras que el efecto sobre el alargamiento del hipocotilo sea el mismo en ambos casos [19]. A mi juicio, se trataría, no obstante, de diferencias cuantitativas y no cualitativas que podrían explicarse por diferencias en el grado de sensibilidad proporcionadas por los diferentes receptores *in vivo*, y que no necesariamente requieren invocar una especialización de función.

La situación podría ser diferente en otras plantas o situaciones. Así, y a diferencia de los que hemos descrito en *Arabidopsis*, la reducción de los niveles del mRNA de uno solo de los receptores en tomate (*LeETR4*) mediante técnica antisentido, sí que produjo un fenotipo observable [31]. El fenotipo es compatible con un aumento en la sensibilidad a etileno en múltiples tejidos de la planta como correspondería a un regulador negativo de la cadena de transducción de señal. Este aumento de la sensibilidad que se manifiesta por epinastia y senescencia /maduración acelerada es revertible por inhibidores de la acción del etileno como el ion plata o el metilciclopropeno, así como por sobre expresión en las mismas plantas del *LeETR3* (NR). En cambio la disminución de *LeETR3* (NR) siguiendo la misma estrategia no produce ningún fenotipo observable, aparentemente como resultado de la compensación funcional que realiza la planta al aumentar simultáneamente los niveles de *LeETR4* [31]. Ello nos indica que aunque cualquiera de ellos podría realizar la función del otro (como hemos descrito antes) algunos parecen ser requeridos en situaciones concretas y la planta no tiene mecanismos para suplantarlos con las otras formas. Es curioso, por otra parte, que el alelo silvestre NR (*LeETR3*) sea completamente prescindible para la maduración del [31], ya que una célebre mutación de ganancia de función en este gen (del tipo de la detectada en *etr1-1*) es la responsable de la mutación "never ripe" que incapacita al fruto para madurar normalmente y a las plántulas a mostrar la triple respuesta en ambiente de etileno [34]. Resultados indicativos de especialización de receptor para ciertas funciones se han obtenido con otros receptores de tomate: plantas de tomate con niveles reducidos del ARNm de *LeETR1* muestran un fenotipo de abscisión afectada [33].

¿Por qué regular la sensibilidad a etileno?, ¿por qué no simplemente regular la síntesis, cosa que como hemos visto la planta hace muy bien?. La explicación quizás haya que buscarla en parte en la naturaleza volátil del etileno (y quizás en su relativa abundancia en la atmósfera primitiva). El etileno es fácilmente difusible (gas) de una parte de la planta a otras, por tanto es posible que el etileno producido en una parte de la planta para regular un cierto proceso sea nocivo en otro órgano o tejido. Las plantas parecen haber adoptado la solución de regular la sensibilidad de los tejidos de forma que la respuesta se adapte a las necesidades del tejido o del estado de desarrollo, y no a la eventual exposición al gas procedente de otras fuentes. Una de estas necesidades sería pues regular la sensibilidad regulando los niveles de receptor según la concentración de etileno en el entorno celular. Así en *Arabidopsis* la expresión de ERS1, ERS y ETR2 es inducible por etileno [19]. Una situación similar se observa en tomate con NR y LeETR4.

Mediante la regulación de los niveles de receptor la planta puede modular la respuesta incluso en presencia de altas concentraciones de etileno. Según el modelo vigente, un aumento en los niveles de receptor libre (sin etileno unido) señalaría la ruta para mantener la respuesta reprimida. Un caso curioso es el que ocurre durante la maduración del tomate, en donde los niveles de receptor y la sensibilidad a etileno aumentan en paralelo, lo cual parecería contradictorio con que los niveles de los receptores se acumulan para reducir y retrasar la respuesta. Para reconciliar esta aparente paradoja hay que tener en cuenta que la síntesis de etileno también aumenta, de forma que llega a ser saturante (reducciones del 80% no ocasionan cambios en la maduración) por lo tanto los receptores estarían siendo ocupados rápidamente por etileno. En cambio la reducción de los niveles del receptor (LeETR4 en líneas transgénicas) sí que acelera la maduración; con lo que es probable que hasta un cierto momento todos los receptores que se van produciendo durante la maduración estén saturados con etileno y por tanto no repriman la respuesta. Una disminución de los niveles de etileno conllevaría a la frenada rápida en la respuesta por el exceso de receptores (inhibidores) que quedarían liberados.

La sutileza de las interacciones y de las aproximaciones experimentales utilizadas se pone de manifiesto con el experimento en el que plantas de tomate mutante *never ripe* (portadoras por tanto de la mutación que confiere insensibilidad dominante a etileno, y que ocasiona maduración y triple respuesta impedidas) son transformadas con el gen NR en orientación antisentido [15]. Las plantas obtenidas muestran una reducción importante en los niveles de nr y en consecuencia (según el modelo de inhibición del receptor) recuperan la sensibilidad a etileno del cultivar silvestre así como una maduración normal. Sin embargo en estado de plántulas muestran un fenotipo alterado de respuesta a etileno idéntico al del mutante nr. Quizás parte de la supuesta especificidad de respuesta es solo cuestión de pasar un cierto umbral de sensibilidad en los distintos tejidos u órganos (algo cuantitativo) para que se manifieste finalmente como una respuesta cualitativa diferencial.



### **CTR: ¿una cadena de kinasas en la ruta de transducción de etileno?**

CTR1 [21] fue identificado por Kieber y col. en el laboratorio de Joe Ecker de la Universidad de Penn, como un regulador negativo de la respuesta: mutantes de pérdida de función en este gen daban como resultado plantas que mostraban un fenotipo de respuesta a etileno constitutiva (es decir se comportaban como si el etileno estuviera constantemente presente en exceso). Experimentos de epistasia lo colocaban inmediatamente tras los receptores. La secuencia de *CTR1* corresponde a una Ser/Thr kinasa relacionada con la kinasa Raf que inicia la cascada de MAP kinasas y sugiere que este podría ser el mecanismo de amplificación de señal utilizado por la planta –las cascadas de MAPKs normalmente actúan modificando el estado de fosforilación de los factores de transcripción que ejecutan finalmente el programa de expresión. Sin embargo hasta el momento no se ha identificado ni genética ni bioquímicamente ningún elemento intermediario de la cascada de kinasas. Es más, *CTR1* en estudios de doble híbrido interacciona directamente con los dominios transmisores de los receptores de etileno, por lo que sería posible otro tipo de interacción directa. *CTR* se sitúa antes de *EIN2* y se comporta como un regulador negativo de la función determinada por *EIN2* [2].

### **EIN2, un elemento atípico en la cadena de transducción: ¿un transportador de qué?**

Identificado y caracterizado por Alonso y col en el laboratorio de Joe Ecker de la Universidad de Penn, *EIN2* [3] es el elemento más inusual de la cadena de transducción. Por una parte, mutaciones en este gen confieren a la planta la mayor insensibilidad a etileno observada con ninguno de los mutantes aislados: la pérdida completa de toda respuesta a etileno. Por otra, está la naturaleza singular para un elemento de la cadena de transducción que se predice del análisis de su secuencia. La proteína *EIN2* presenta dos dominios: por una parte el dominio amino terminal con similitud a una familia de transportadores de iones metálicos NRAMP y por otra el dominio carboxilo que se cree participa en la transducción de la señal a elementos posteriores de la ruta [3]. ¿Se trata de un elemento bifuncional para respuestas rápidas (mediada por el hipotético segundo mensajero transportado por la parte N-terminal de *EIN2*) y lentas (mediada por la transducción señal por la parte COOH terminal de *EIN2*)?. Aunque se desconoce como actúa *EIN2* el resultado es que es un activador de la respuesta que realiza su función antes que *EIN3*.

### **La familia de superactivadores transcripcionales de la respuesta a etileno EIN3 y EIN3-like**

*EIN3* [9, 27] fue también identificado en el lab de Joe Ecker y funciona como un activador positivo de la cadena de transducción, como demuestra el que su sobre-expresión en plantas transgénicas produzca un fenotipo típico de etileno.

*EIN3* no está solo, sino que conforma una familia génica de pocos miembros (7 en *Arabidopsis* *Ein3*, *Eil1-Eil6*) y al menos otros tantos en tomate. La familia formada

por *EIN3* no tiene equivalentes en otros organismos fuera del reino vegetal, pero diversas evidencias apuntan a que estas proteínas nucleares –*EIN3* y *EIL1* al menos– se unen específicamente al motivo PERE presente en el gen del factor de respuesta a etileno *ERF1* activando su transcripción. Esta secuencia parece que está también presente en el gen *E4* y *ACO1* de tomate quienes podrían ser dianas de los ortólogos de *EIN3* en esta planta [9, 27].

El que diferentes miembros de la familia *EIN3/EIL* se unan a la misma secuencia de DNA y que la sobre-expresión de *EIL1* o *EIL2* en plantas transgénicas sean capaces de complementar al mutante *ein3-1* [9] indica que estos factores son funcionalmente equivalentes. En esta misma línea están los resultados obtenidos en tomate, donde la reducción por técnica antisentido de uno solo de varios *LeEILs* no es suficiente para disminuir la respuesta a etileno, debido probablemente a la presencia de otros miembros que realizan la misma función. Además, solo cuando se consigue disminuir significativamente los niveles de expresión de 3 *LeEILs* simultáneamente, se obtiene un efecto cuantitativo, y no cualitativo, sobre la sensibilidad a etileno. Todos tendrían como dianas primarias otros factores transcripcionales, e iniciarían un proceso de regulación transcripcional en cascada. Así pues, la activación de una jerarquía de factores transcripcionales iniciada por *EIN3/EILs* permite proponer dos funciones fundamentales: por una parte ser una forma de amplificar la señal y por otra el permitir mediante la combinación de los reguladores adecuados adaptar la respuesta a las necesidades concretas.

### En búsqueda de la especificidad: una ojeada en la caja de Pandora más allá de *EIN3*

Todos los elementos de la cadena de transducción anteriores a *EIN3*, al menos en *Arabidopsis*, parecen afectar fundamentalmente a todas las respuestas de etileno, y no son por tanto específicos de ninguna de las respuestas individuales [8]. Deben de existir mecanismos que hagan que la respuesta a etileno sea específica del tejido o situación que se trate, ya que la experiencia de muchos años indica que no todos los tejidos u órganos responden al etileno de la misma manera. La cuestión es si la especificidad se debe a otros factores independientes de la propia cadena de transducción de señal que modifican la respuesta (por ejemplo otros factores del desarrollo u hormonas) o si la cadena se ramifica en algún momento para dar lugar a las diferentes respuestas y que estas ramificaciones están solamente activas en ciertas células/tejidos, casos o circunstancias. Quizás la respuesta esté en una combinación de ambas o quién sabe si incluso pueden existir mecanismos adicionales.

Parte de la especificidad de la respuesta a etileno parece darse al nivel de la familia de factores transcripcionales que regularían la expresión dependiente de etileno de forma diferente según su presencia en los distintos órganos /desarrollo o estrés ambiental. Uno de los factores, situado al principio de la cascada de factores transcripcionales, parece ser *ERF1* [27]. *ERF1* pertenece a la familia génica de



AP2/EREBP que incluye factores de transcripción implicados en funciones tan dispares como el desarrollo de la flor o la respuesta a patógenos. Aunque no de forma extrema, la sobreexpresión de ERF1 en *Arabidopsis* provoca el acotamiento de los hipocotilos, planta enana, y resistencia a hongos necrotrofos pero no la formación del gancho plumular indicando tal vez cierta especificidad.

Un subgrupo de los factores EREBP [13] parece unirse al elemento GCC (secondary ethylene response element o SERE) presente en solo un subconjunto de los genes regulados por etileno (p.ej. genes de PRs, Hls y algunos EREBPs). En otro eslabón jerárquico hay ciertos genes regulados por etileno que no contienen ninguno de los motivos descritos anteriores por lo que hay que suponer que en su activación intervienen otros factores desconocidos hasta el momento. Finalmente, no hay que olvidar que en ciertos casos los EREBP actúan no activando la transcripción sino inhibiéndola [13].

En esta búsqueda de factores implicados específicamente en una u otra componente de la respuesta fisiológica, hay que considerar que algunos aspectos de la respuesta pueden resultar de la interacción diferencial con otras hormonas o con sus cadenas de transducción más o menos activas en los distintos tejidos y situaciones. La interconexión entre la vía de etileno y la de otras hormonas está íntimamente relacionada con el hecho de que muchos procesos fisiológicos no dependen de una única hormona sino de varias al mismo tiempo. Incluso algunos componentes de la triple respuesta no están exclusivamente regulados por el etileno, sino que también están involucradas otras hormonas, como las auxinas y el ABA. Estas interacciones cruzadas ocasionan que el rastreo de mutantes para la triple respuesta de etileno identifiquen mutantes en auxinas como AUX1 y EIR [2]. Ambos mutantes parecen ser deficientes en el transporte de auxinas, posiblemente por tener mutadas sendas proteínas de transporte y ambos son sin embargo insensibles a etileno en la raíz. Otro ejemplo es el de *HLS1* (*hookless 1*) que parece incapaz de crear el crecimiento diferencial que conduce a la formación del gancho plumular. *HLS1* codifica una proteína tipo transacetilasa [2, 28] de especificidad desconocida, pero que posee una GCC box en la región promotora de su gen, y por tanto diana de EREBP, característica de genes regulados por etileno. Paradójicamente, está el caso contrario de un gen que interviene en la formación del gancho plumular inducido por auxinas (*NPH4*) [28]. *NPH4* posee un elemento de respuesta a auxinas en su promotor, y un mutante de este gen, que no forma el gancho, puede ser corregido mediante la aplicación exógena de etileno. Y finalmente, completando el espectro está el que en la búsqueda de mutantes afectados en la respuesta a otras hormonas como el ABA se recuperen alelos de genes típicos de la transducción de etileno *ein2* o *ctr1* [5, 14] ¿De qué estamos hablando pues cuando decimos ramificaciones de la cadena para respuestas específicas?

Prácticamente todos los componentes de la ruta de biosíntesis y de la de transducción de etileno son susceptibles de ser regulados por factores del desarrollo, o factores de especificidad o ser puntos de confluencia de otras rutas de señalización

hormonal. Los distintos procesos en los que el etileno participa (ojo participa no que tenga la exclusiva): triple respuesta, senescencia, maduración abscisión, etc., pueden poseer diferente susceptibilidad o sensibilidad a esos factores de control y por tanto esos otros factores contribuyen a la especificidad de la respuesta.

### Aplicaciones biotecnológicas de la cadena de transducción

La obtención de mutantes y el diseño de estrategias con objeto de alterar la sensibilidad o la respuesta al etileno despierta un enorme interés. Citaremos solo algunos ejemplos. La introducción de insensibilidad a etileno en plantas, mediante las mutaciones semidominantes o dominantes del receptor, permite obtener frutos con maduración alterada o flores con senescencia inhibida, dos caracteres muy importantes [31, 34]

Otro campo en el que la alteración de los niveles de sensibilidad a etileno parece estar dando resultados de interés biotecnológico es el de conseguir plantas que resistan el ataque de determinados patógenos. Plantas transgénicas de tomate que sobre expresan el receptor NR (al igual que ocurre con el mutante Nr) muestran menor necrosis durante la infección con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sugiere que es posible manipular los niveles de sensibilidad a etileno a través del receptor y en consecuencia la extensión de la necrosis. Por otra parte la reducción de los niveles de expresión de otra forma del receptor LeETR4 por técnica antisentido conlleva una mayor respuesta hipersensible y mayor resistencia [11, 12].

La expresión constitutiva de un elemento posterior en la cadena de transducción, ERF1, en plantas transgénicas confiere resistencia a varios hongos necrotrofos [6].

Una mayor especificidad se puede lograr actuando sobre elementos del final de la cadena de transducción. Así, ciertas EREBPS que ocupan una posición más tardía en la cadena de transducción de etileno parecen estar implicadas en la activación de genes que confieren a la planta la capacidad de tolerar mejor el estrés debido a determinados factores ambientales. Así, la sobreexpresión de una LeERBP de tomate en plantas transgénicas produjo plantas aparentemente normales pero que toleraban mejor las bajas temperaturas (Sanchez-Ballesta/ Bouzayen comunicación personal).

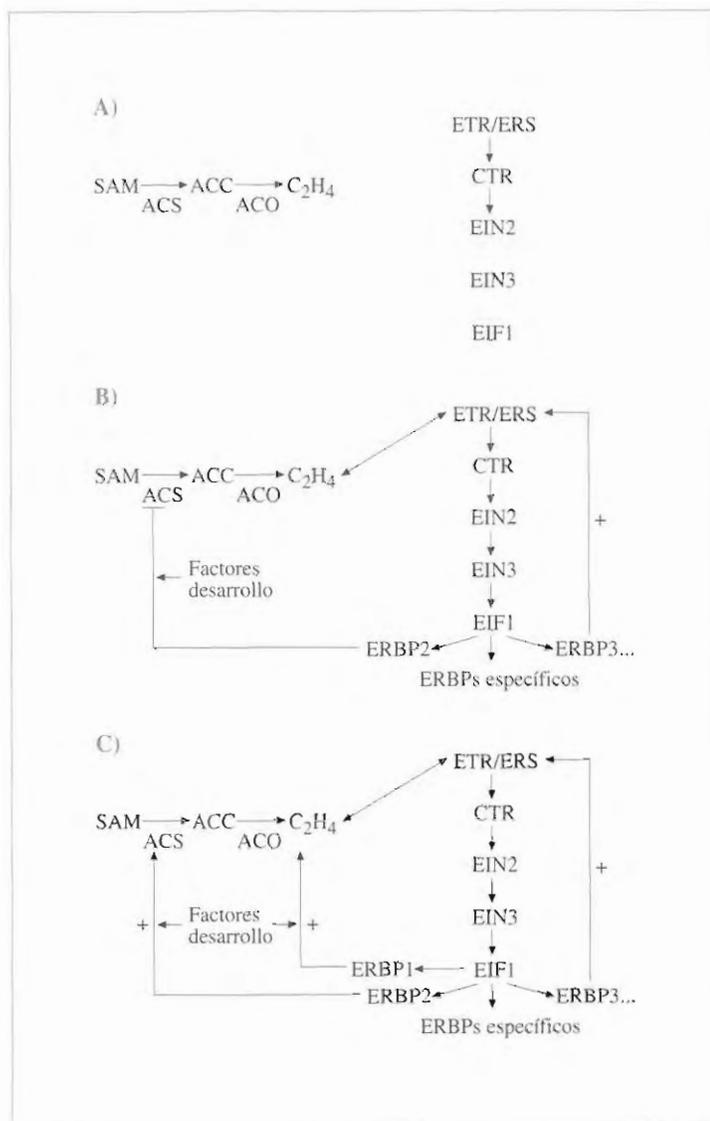
### El etileno en los próximos 101 años

Finalmente cabe preguntarse ¿conocemos todos los elementos de la cadena de transducción de señal?. Evidentemente, no. Después de todo ¿dónde acaba una cadena de transducción y empieza otra?. Aunque, la búsqueda de mutantes ha sido muy fructífera, hay que reconocer que descansa en haber utilizado concentraciones altas de etileno y, casi exclusivamente la triple respuesta en *Arabidopsis* como estrategia. Es de esperar que, utilizando otros métodos de selección (incluso otras plantas), se puedan obtener elementos adicionales. Así aunque el receptor y CTR1 puedan interactuar directamente, se sabe (doble híbrido, etc.) que otras proteínas también pueden participar en esta interacción; posteriormente en la vía, es probable



- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M.** (2000) *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393-404
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., McCourt, P.** (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1117-1126.
- Hackett, R.M., Ho, C-W, Lin A., H.C.C. Foote, Fray, R.G: y Grierson, D.** (2000) Antisense inhibition of the Nr gene restores normal ripening to the tomato *Never-ripe* mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model. *Plant Physiol.* **124**, 1079-1086.
- Hamilton, A.J., Bouzayen, M., and Grierson, D.** (1991) Identificación de un tomate gene for the ethylene-enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7434-7437.
- Hamilton, A.J., Lycett, G.W., and Grierson, D.** (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* **346**, 284-287.
- Hirayama, T., Kieber, J.J., Hirayama, N., Koga, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J.M., Dailey, W.P., Dancis, A. Y Ecker, J.R.** (1999) Responsive-to-antagonist, a Meinkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**, 383-393.
- Hua, J., y Meyerowitz, E.M.** (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**, 261-271.
- Jackson, B., Summers, J.E. y Voesenek, A.C.J.** (1997) *Potamogeton pectinatus*: a vascular planta that makes no ethylene. In (Kanellis et al.eds) *Biology and Biotechnology of the plant hormone ethylene*. Kluwer Acad. Press pp.229-237.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., y Ecker, J.R.** (1993) *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis* encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-441.
- Krasko, A., Schroder, H.C., Perovic, S., Steffen, R., Kruse, M., Reichert, W., Muller, I.M., Muller, W.E.G.** (1999) Ethylene modulates gene expression in cells of the marine sponge *Suberites domuncula* and reduces the degree of apoptosis. *J. Biol. Chem* **274**, 31524-31530.
- Muhs, M.A. y Wiess, F.T.** (1962) Determination of equilibrium constant of silver-olefin complexes using gas chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 4698-4705.
- Osborne, D.J.** (1989) The control role of ethylene in plant growth and development, in H. Clijsters et al. (eds), *Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene production in Lower and Higher Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-11.

- Rodriguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E. y Bleecker, A.B.** (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283, 996-998.
- Sato, T. Y Theologis, A** (1989) Cloning of the mRNA encoding 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6621-6625.
- Solano, R., Stepanova, A, Chao, Q., y Ecker, J.R.** (1988) Nuclear events in the ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ethylene-insensitive 3 and ethylene-response factor 1. *Genes & Dev.* 12, 3703-3714.
- Stepanova, A.N. y Ecker, J.R.** (2000) Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 353-360.
- Tatsuki, M. y Mori, H,** (2001) Phosphorylation of tomato 1-amino-1-cyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LeACS2 at the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 276, 28051-28057.
- Tieman, D.M., Ciardi, J.A.; Taylor, G.M.; y Klee, H.J.** (2001) Members of the tomato *LeEIL* (*EIN3-like*) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *The Plant J.* 26, 47-58.
- Tieman, D.M., Taylor, M.G., Ciardi, J.A. y Klee, H.** (2000) The tomato ethylene receptors **NR** and **LeETR4** are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 10, 5663-5668.
- Vrebalov, J., Ruesinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W. Y Giovannoni, J.** (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*Rin*) locus. *Science* 296, 343-346.
- Whitelaw, C.A., Lyssenko, N.N., Chen, L., Zhou, D., Matoo, A.K. Y Tucker, M.L.** (2002) Delayed abscission and shorter internodes correlate with a reduction in the ethylene receptor *Le ETR1* transcript in transgenic tomato. *Plant Physiol.* 128, 978-987.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H.-C., Giovannoni, J.J., y Klee, H.J.** (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science* 27, 1807-1809.
- Yang, S.F., & Hoffman, N.** (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 155-189.



**Interacción entre la vía de biosíntesis y la de respuesta a etileno en 3 casos paradigmáticos:** **A)** nivel de etileno por debajo del umbral de sensibilidad: el receptor libre señala a CTR para mantener toda la respuesta reprimida; **B)** nivel de etileno basal del tipo que regula aspectos del crecimiento vegetativo: el etileno se une al receptor con lo que CTR deja de reprimir la respuesta. EIN2 inicia la activación de la regulación transcripcional en cadena mediada por ERF1 y los distintos ERBPs. Entre ellos los responsables de la activación de los niveles de receptor y de la represión de ACS. Los dos mecanismos conducen a una síntesis y respuesta que se mantiene a niveles bajos hasta que eventualmente se pasa a una situación similar a la anterior; **C)** situación de tipo fruto climatérico con altos niveles de producción de etileno. Factores de desarrollo (como por ejemplo RIN) junto con un cierto nivel basal de etileno permiten la activación de ACS y ACO inducible por etileno que entra en auto-catálisis. La gran cantidad de etileno producida es ligada al gran número de receptores y la ruta se mantiene activa hasta que los factores del desarrollo dejan de activarla, pasándose a B) o a A).

**ETILENO**  
**Comunicaciones**



# INFLUENCIA DEL ETILENO EN LOS VALORES DE PLOIDÍA QUE PRESENTAN LOS HIPOCÓTILOS ETIOLADOS DE *Lupinus albus*. RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO

López Nicolás J I, Sánchez Bravo J., Acosta M,

**Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia.**

**Email: macosta@um.es**

## Sinopsis

Las células que constituyen los distintos tejidos de un hipocótilo etiolado de *Lupinus albus*, muestran una gran variabilidad en sus valores de ploidía, desde  $2n$  hasta  $32n$ . El reparto en porcentaje de los distintos valores, así como la aparición de los más altos ( $16n$ ,  $32n$ ) varían con la edad del órgano y la posición (apical / basal) de las células en él. La presencia de etileno altera la distribución entre los distintos porcentajes e induce la aparición de ciclos extra de endorreduplicación. Este efecto puede estar relacionado con el tamaño final de las células y su contribución al crecimiento del hipocótilo.

## Introducción

La poliploidía celular es un fenómeno común en las plantas y puede constituir un factor clave para su evolución (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Wendel, J. F., 2000) . La endorreduplicación se considera como una estrategia para aumentar el ADN sin que se verifique la división celular. Esta circunstancia está siendo utilizada para investigar en *Arabidopsis thaliana* ciertas pautas de desarrollo como la formación de tricomas, estomas y otros fenómenos asociados a divisiones celulares asimétricas y crecimientos posteriores anómalos en las células hijas (Traas et al., 1998; Kondorosi et al., 2000)

La germinación, en la oscuridad, de semillas de altramus (*Lupinus albus*) permite observar la aparición de un hipocótilo etiolado, que constituye un excelente modelo para investigar el crecimiento vegetal en ausencia de luz, con recursos limitados a las reservas de los cotiledones y modulado por factores hormonales endógenos.



En este modelo se comprueba la existencia de distintos niveles de ploidía y se investiga su variación con la edad del órgano y la posición de las células en zonas próximas (apicales) o alejadas (basales) del meristemo que las origina.

Puesto que el etileno es una hormona que determina el tamaño del hipocótilo, afectando al crecimiento celular, tanto en longitud como en grosor (López Nicolás et al., 2000), se ha investigado su influencia sobre el nivel de ploidía en las distintas zonas y edades escogidas.

## Resultados y discusión

Las semillas de altramuz (*Lupinus albus*) se imbiben en agua destilada (control) o en disoluciones acuosas del generador de etileno CEPA (ácido cloroetilfosfónico), de STS (tiosulfato de plata) inhibidor de la acción del mismo o combinación de ambos compuestos (CEPA+STS), durante 24 horas, tras las cuales se procede a la siembra en vermiculita como soporte inerte. Las plántulas crecen en oscuridad total, en cámara de cultivo, a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , efectuándose riegos de forma periódica.

A las edades seleccionadas y utilizando plántulas representativas de las distintas plantaciones, se estudian los niveles de ploidía en las distintas zonas de los hipocótilos control y tratados. Para ello se utiliza un citómetro de flujo Partec PAS (Partec GmbH, Alemania). La preparación del tejido consiste en la obtención de una suspensión intacta de núcleos y su posterior tinción con un colorante fluorescente DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol). Para ello se toman aproximadamente 100 mgr del material y se cortan en pequeños fragmentos con la ayuda de un bisturí, en tampón de extracción. A continuación la suspensión se filtra con una malla de tamaño de poro  $50\mu\text{m}$ . Por último, la suspensión se tiñe con DAPI y se deja incubando unos minutos antes de pasar la muestra por el citómetro de flujo equipado con un dispositivo láser para la excitación y lectura de la fluorescencia emitida.

Los resultados son analizados con el programa FloMax Software (Partec GmbH, Alemania) obteniendo picos con un coeficiente de variación menor de dos en todos los casos. Como patrón de referencia se usa el nivel  $2n$  de ploidía de los folíolos. Los valores de ploidía se expresan como porcentajes repartidos entre los distintos niveles ( $2n$ ,  $4n$ ,  $8n$ ...)

Las plántulas de 3 días de edad, en las que no se diferencian zonas, presentan varios niveles de ploidía. En el caso del control, se observa un 20 por ciento de células  $2n$ , repartiéndose el 80 por ciento restante de forma mayoritaria en el nivel  $4n$ , si bien se encuentran células hasta de  $16n$ . Cuando las plántulas han sido tratadas con CEPA, se reducen de forma significativa los porcentajes de los niveles de ploidía más bajos ( $2n$ ,  $4n$ ) y aumentan los de los niveles más altos ( $8n$  y  $16n$ ). El tratamiento con STS revierte de forma inequívoca el efecto producido por el etileno, observándose una situación similar a la del control. Así, esta redistribución de los niveles de ploidía puede asociarse a la presencia de etileno.

Al final del período de crecimiento, cuando las plántulas tienen 20 días, se diferencian las distintas zonas, apical y basal. En el caso del control, el 75 por ciento de las células de la zona apical presentan niveles bajos de ploidía ( $2n$  y  $4n$ ) mientras que los niveles más altos son minoritarios. Sin embargo en la zona basal el fenómeno se invierte, y predominan los niveles más altos de ploidía ( $8n$ ,  $16n$ ). Esta situación sugiere la existencia de un gradiente desde la zona apical a la basal, conforme nos alejamos del meristemo, que podría reflejar la historia previa de las células y su contacto con el etileno endógeno que se produce abundantemente en las zonas jóvenes más próximas al meristemo (Pérez Gilabert et al., 1991; Sánchez Bravo et al., 1992). En este sentido se trata de interpretar lo observado tras la aplicación de CEPA. La presencia de etileno adicional, vuelve a alterar la distribución de los niveles de ploidía, favoreciendo los valores más altos (en ambas zonas) y revelando, incluso, el ciclo más alto de endorreducción ( $32n$ ). El tratamiento con STS devuelve la situación a la del control, lo que nos lleva a concluir que el etileno contribuye a regular los turnos de endorreducción y, posiblemente, el tamaño final celular (relación núcleo/ citoplasma). Este mecanismo puede ayudar a un órgano (hipocótilo) a ajustar su crecimiento dependiendo de la modulación que, a través de la síntesis y acción del etileno, puedan ejercer las condiciones ambientales.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen la financiación de la CICYT/FEDER (Proyecto AGL-2001-0465) y la concesión de una beca predoctoral del MEC a J I López Nicolás. También a V. Moreno y B. Pineda del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia, por su ayuda y facilidades con la citometría de flujo.



de la oxidación del ACC, precursor inmediato del etileno en plantas, durante la embriogénesis de *B. rapa* cv. Rapa (Rodríguez-Gacio y Matilla, 2001), así como los de las alteraciones del ABA en la misma (Puga-Hermida, 2002), nos inducen también a pensar en una relación entre ambas fitohormonas. Este supuesto está más reforzado por la coincidencia en la semilla y pared de la silicua de *B. rapa* cv. Rapa de los máximos de ABA-libre y de la actividad ACC-oxidasa (ACO), ACC y producción de etileno (Rodríguez-Gacio y Matilla, 2001; Puga-Hermida y cols., 2002). Temporalmente, estos máximos tienen lugar en el estadio embriogénico en que se lleva a cabo la dehiscencia (proceso regulado por etileno) y concretamente cuando la expresión de la endo-poligalacturonasa (PG1) en la pared de la silicua es también máxima (Rodríguez-Gacio, 2002).

El resultado final de la embriogénesis zigótica en *B. rapa* cv. Rapa es la formación de una población de semillas maduras heterogéneas. Esta heterogeneidad es aparente por su tamaño, color y peso. Pero también es constatable una vez estudiados una serie de parámetros como: el porcentaje de germinación, la transformación de SAM en ACC, MACC y etileno, la sensibilidad al etileno, el contenido en ABA "libre" y "conjugado" y la actividad y expresión de la ACC-sintetasa (ACS) y ACO. Las alteraciones en estos parámetros se contemplan en esta comunicación.

## Material y métodos

Las semillas maduras de *B. rapa* cv. Rapa se clasificaron en tres lotes atendiendo a su color [negras (N), marrón oscuras (MO) y marrón claras (MC)]. La cuantificación de ACC, ACO y producción de etileno se efectuó como se describe en Rodríguez-Gacio y Matilla (2001), la determinación de MACC y poliaminas como en Gallardo y cols. (1996) y Puga-Hermida y cols. (2002) y la de ABA como describe Puga-Hermida y cols. (2002). Las metodologías de la Biología Molecular de la *BrACO1*, *BrACOII* y *BrACS* están en Rodríguez-Gacio (2002).

## Resultados y discusión

La heterogeneidad de las semillas de *B. rapa* cv. Rapa afecta sustancialmente a su capacidad germinativa. Si elegimos para esta comparación los 3d (emergencia radicular) y 6d (máxima producción de etileno) observamos que las semillas N alcanzan una germinación del 61 y 75%, respectivamente; mientras que las MO (40 y 55%) y las MC (20 y 35%). Existen varias razones para esta variabilidad germinativa. Una de ellas puede residir en las sustancias de reserva que posean las tres poblaciones. Sin embargo, en este trabajo hemos encontrado otros parámetros que pueden estar más directamente implicados en la incapacidad para germinar. Uno de ellos es el nivel de ABA "libre" presente en la semilla seca, el cual aumenta inversamente proporcional a la capacidad germinativa. No obstante, este dato puede no ser muy clarificador en tanto en cuanto no sabemos cuál es la ubicación del ABA (cotiledón y/o eje embrionario). Por otra parte, las semillas N contienen 1.4v y 1.8v más Spd y Spm que las semillas MC. No se observó modificación en el contenido de Put "libre"

en las tres poblaciones; pero sí en las especies “conjugadas”, que fueron sustancialmente menores en MO y MC con respecto a las N. La capacidad de producir etileno fue concomitante con la capacidad germinativa de las semillas. Hay que hacer constar que la presencia de etileno exógeno indujo más porcentaje de germinación en las MC que en las MO, no afectando a las N. Esto parece indicar que, si bien la sensibilidad al etileno puede estar afectada en MO y MC, la posibilidad de que el etileno sea un promotor de la germinación en estas semillas nos hace pensar que MO y MC tengan, por razones desconocidas, inhibida la capacidad de síntesis de gas. No obstante, los resultados obtenidos de los niveles de ACC, MACC y actividad ACO, en presencia de AVG y  $Cl_2Co$ , inhibidores de las actividades ACS y ACO, respectivamente, apuntan a una intervención muy compleja del etileno en el proceso germinativo de esta especie de crucifera. Quizás el mecanismo regulador “pase” por un control a nivel de la ACO y no de la ACS. Este supuesto viene determinado por los hechos siguientes: (1) la expresión de la ACS es constitutiva durante la germinación de esta semilla; (2) la expresión de los genes *BrACOI* y *BrACOI*, diferencialmente expresados durante la embriogénesis de *B. rapa* cv. Rapa, es muy intensa durante la germinación de N, intermedia en MO y apenas detectable en MC.

### Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por los proyectos BFI2000-0305 (DGI) y PGIDT00-AGR20301 (Xunta de Galicia). Nuestro agradecimiento a L. Zacarias y M.T. Lafuente (IATA, Valencia) por su gran ayuda en la determinación de ABA.



etileno (Cutillas-Iturralde y col.1998). Se ha descrito, que el efecto de inducción del crecimiento podría estar mediado por la activación de la enzima xiloglucano endo-transglucosilasa (XET). La XET pertenece a una familia multigénica (Nishitani, 1997), y los estudios de la expresión han puesto de manifiesto diferentes respuestas a distintas hormonas y estreses abióticos (Campbell y Braam 1999) lo que sugiere diversas funciones dependiendo de las distintas condiciones.

En trabajos anteriores, hemos descrito que los oligosacáridos del xiloglucano inducen la síntesis de etileno en frutos de kaki. Se ha sugerido que este efecto de los XGOs podría estar relacionado con una respuesta hipersensible a procesos de estrés, como la respuesta en la interacción planta-patógeno (Cutillas-Iturralde y col. 1998).

En este trabajo hemos caracterizado el efecto de los XGOs en la producción de etileno de frutos de tomate, estudiando la implicación de la una mayor o menor actividad XET en dicha respuesta.

## Resultados y discusión

Para realizar este trabajo se generaron plantas transgénicas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Money maker), que sobreexpresan o que tienen reprimida la expresión de un cDNA de la XET.

Se ha comprobado que existe un aumento/disminución de expresión de la XET en las plantas transgénicas en relación con la variedad silvestre, en distintos tejidos de la planta y en el fruto. Este aumento/disminución está relacionado con un aumento/disminución de la actividad enzimática, tanto en la planta como en los frutos.

Los frutos fueron infiltrados con oligosacáridos del xiloglucano (2  $\mu$ M) y se analizó la producción de etileno a lo largo del tiempo. Se observó un aumento en la síntesis de etileno en los frutos tratados con XGOs, que fue máximo a las 24 horas de infiltración, mientras que en los frutos infiltrados con agua no hubo respuesta. En los frutos que sobreexpresaban la actividad XET, la producción de etileno fue mucho más pronunciada que en los frutos de la variedad silvestre. Sin embargo, en los frutos que tenían disminuida la actividad XET, no se observó ningún incremento producción de etileno.

Estos resultados ponen de manifiesto la estrecha relación entre el efecto de los XGOs en la producción de etileno y la implicación de la XET en el proceso.

## Bibliografía

- Albersheim P, Darvill, A.G., McNeil M., Valent B., Sharp J.K. y col.** 1983. Oligosaccharins, naturally occurring carbohydrates with biological regulatory functions. In structure and functions of plant genomes. CerriO., Dure, L. (eds.). pp 293-312. Plenum. New York.
- Campbell. P., Braam, J.** Xyloglucan endotransglycosylases: Diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. 1999. Trends in Plant Sci. 4: 361-366.
- Cutillas-Iturralde, A., Fulton, D.C., Fry, S.C., Lorences, E.P.** 1998. Xyloglucan-derived xyloglucan induce ethylene synthesis in persimmon (*Diospyros kaki*, L.) fruit. J. Exp. Bot. 49: 701-706
- Fry, S.C.** 1993. Oligosaccharins as plant growth regulators. Biochemical Society Symposium. 60, 5-14.
- Ryan, C.L., Farmer, E.E.** 1991. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 42: 651-674.



## EFFECTOS COMUNES DE LOS MUTANTES Etr1 Y GA1 EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN SEMILLAS DE *Arabidopsis*

Emilio Cervantes<sup>1</sup>, Juana Gutiérrez De Diego<sup>2</sup>, F. David Rodríguez García<sup>2</sup>

<sup>1</sup>RNA-CSIC. Apartado 257. Salamanca.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Departamental, laboratorio 123 Campus Unamuno, Universidad de Salamanca. 37007 Salamanca.

### Sinopsis

Se ha empleado el protocolo de AFLP para identificar genes expresados diferencialmente durante la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*. Se han identificado genes relacionados con la progresión en el ciclo celular, factores de transcripción, transposones y otros. Se encuentran distintas pautas de expresión de estos genes en distintos mutantes para las síntesis de hormonas (etileno y ácido giberélico, *etol1* y *gal1*) y sus rutas de transducción de señales (*etr1*). Estos datos sugieren nuevas funciones para estas hormonas en el control de la expresión génica en semillas.

### Introducción

La germinación es un proceso crucial en el desarrollo de plantas en el que se concentran en espacio y en el tiempo muchos procesos de diferenciación celular integrados en un programa de desarrollo. Durante este proceso, se han reconocido diversas funciones para múltiples hormonas en distintas especies vegetales.

Este trabajo se realizó para identificar genes que se expresan diferencialmente en el tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* y en el mutante *gal1*. Encontramos que muchos de los genes que no se inducen en el mutante *gal1* durante la imbibición, tampoco son inducidos en *etr1* y corresponden a transcritos acumulados en la semilla seca.

### Resultados y Discusión

Se ha realizado un experimento basado en el protocolo de AFLP para identificar y clonar genes inducidos en la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*. Se han identificado genes inducidos diferencialmente en el tipo silvestre así como otros que se inducen en el mutante *gal1*.



**POLIAMINAS, JASMÓNICO, SALICÍLICO**  
**Revisiones**



se ha demostrado que las PAs modulan la síntesis proteica, afectando las estructuras secundarias del RNAm, RNAt y RNAr en células animales y bacterias (Igarashi y Kashiwagi 2000). Además, se han identificado los lugares de unión de las PAs a los ácidos nucleicos, que se caracterizan por ser regiones ricas en guaninas y citosinas.

Por otra parte, las PAs se consideran compuestos esenciales para el crecimiento y desarrollo de diversos organismos. Por ejemplo, algunos mutantes de levadura deficientes en PAs son incapaces de crecer a no ser que se añadan estas sustancias al medio de cultivo. También se ha observado que mutantes afectados en la conversión de Put en Spd y Spm (Fig.1) son incapaces de esporular (Tabor y Tabor, 1984). En mamíferos, el gen que codifica la ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17; Fig.1), la principal enzima implicada en la síntesis de Put en animales, es un proto-oncogén celular. Se ha demostrado que la transformación maligna inducida por diferentes carcinógenos u oncogenes está asociada a la activación constitutiva del gen ODC (Auvinen y col.1992, 1995).

Durante años, ha existido cierto debate sobre la función reguladora de las PAs en plantas, ya que para que estos compuestos afecten a un determinado proceso fisiológico, deben aplicarse a concentraciones mucho más elevadas que las fitohormonas. Esto es debido, probablemente, a la función dual (estructural y reguladora) que tienen las PAs, en contraposición con las hormonas clásicas que sólo presentan función reguladora.

Los últimos avances en el aislamiento de mutantes para genes implicados en la biosíntesis de poliaminas han demostrado su implicación en el normal desarrollo de la planta (Hanzawa y col. 2000) y en la respuesta de las plantas a estrés abiótico (Soyka y Heyer 1999).

## 2. Biosíntesis de PAs.

La síntesis de PAs se inicia con la formación de la diamina Put, la cual, en plantas superiores, puede formarse a través de dos rutas biosintéticas. Una de ellas implica la descarboxilación de ornitina catalizada por ODC (Fig.1), mientras que la otra empieza con la descarboxilación de Arg, por acción de la enzima arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19), para formar agmatina, que se convierte en N-carbamoylputrescina por acción de la agmatina iminohidrolasa y después en Put por la N-carbamoylputrescina amidohidrolasa (Fig.1).

Los genes que codifican ADC y ODC se han clonado en diferentes especies vegetales (Tabla1), y el estudio de sus patrones de expresión indica que la ODC se expresa fundamentalmente en tejidos en división, mientras que la ADC lo hace durante la elongación celular y en procesos de estrés. Estos resultados están de acuerdo con las funciones propuestas previamente para estas dos enzimas en plantas (Slocum y Flores 1991).

Para convertir la Put en Spd se debe adicionar un grupo aminopropilo. Este grupo deriva de la metonina, que se transforma primero en S-adenosilmetionina (SAM) y, posteriormente, se descarboxila para formar SAM descarboxilada (SAMdc), en reacciones catalizadas por SAM sintasa (EC 2.5.1.6) y SAM descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50), respectivamente (Fig. 1). La Spd sintasa (SPDS, EC 2.5.1.16) cataliza la transferencia de un grupo aminopropilo procedente de la SAMdc a Put para formar Spd.

La Spm sintasa (SPMS, EC 2.5.1.22) cataliza la conversión de Spd en Spm por adición de otro grupo aminopropilo, procedente también de SAMdc. La 5'-metiltioadenosina (MTA) procedente de las reacciones de transferencia de grupos aminopropilo (Fig.1), se recicla para regenerar SAM. En plantas la SAM, además de participar en numerosas reacciones de transmetilación, como hace en otros organismos, actúa como precursora de etileno vía ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Fig.1).

Los genes que codifican la SAMDC, SPDS y SPMS han sido clonados en diferentes especies vegetales (Tabla 1).

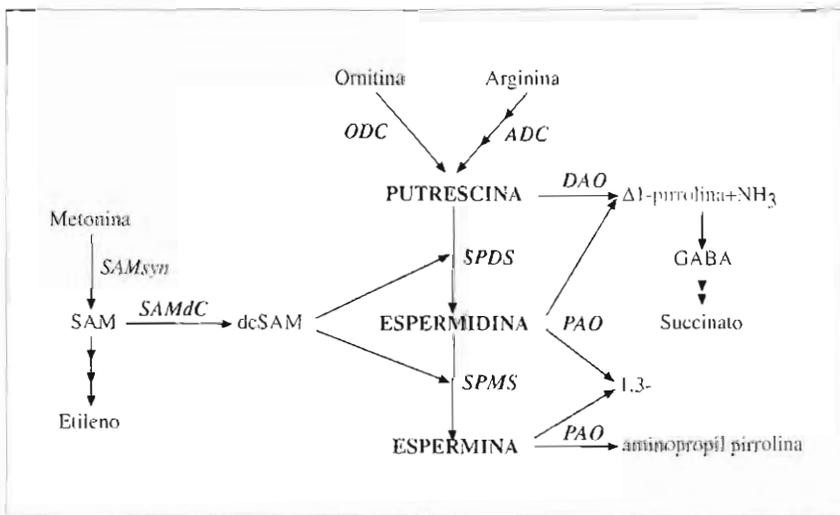


Figura 1. Representación esquemática de la ruta metabólica de las poliaminas en plantas. ADC, arginina descarboxilasa; DAO, diamino oxidasa; dcSAM, S-adenosilmetionina descarboxilada; MTA, metiltioadenosina; ODC, ornitina descarboxilasa; PAO, poliamino oxidasa; SAM, S-adenosilmetionina; SAMDC, SAM descarboxilasa; SPDS, espermidina sintasa; SPMS, espermina sintasa.



Tabla 1. Genes clonados para las ADC, ODC, SPDS y SAMDC de diferentes especies vegetales y sus respectivos números de acceso

	Especie vegetal	N <sup>os</sup> de acceso	Autores
ADC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	U52851 AF009647	Watson, M.B (1996) Yu, W. (1997)
	<i>Avena sativa</i>	X56802	Malmberg, R.L. (1990)
	<i>Brassica juncea</i>	AF220097 AF220098 AF077547	Hua, M. (1998, 1999)
	<i>Datura stramonium</i>	AJ251898	Michael, A.J. (1999)
	<i>Dianthus caryophyllus</i>	U63832	Chang, K.S. (1996)
	<i>Glycine max</i>	U35367	Nam, K.H., (1996)
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	L16582	Rastogi, R., (1993)
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	AB012873	Nakakita, M. (1998)
	<i>Vitis vinifera</i>	X96791	Roubelakis-Angelakis, K.A. (1996)
ODC	<i>Datura stramonium</i>	X87847	Michael, A.J. (1996)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	D89984	Imanishi, S. (1996)
SPDS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ251296 AJ251297	Michael, A.J. (1999)
	<i>Coffea arabica</i>	AB015599	Hatanaka, T. (1998)
	<i>Datura stramonium</i>	Y08252 Y03253	Michael, A.J. (1996)
	<i>Hyoscyamus niger</i>	AB006690 AB006691	Hashimoto, T. (1998)
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AJ006414	Carbonell, J. (1998)
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	AB006692	Hashimoto, T. (1998)
	<i>Oryza sativa</i>	AJ251298	Michael, A.J. (1999)
	<i>Pisum sativum</i>	AF043108 AF043109	Alabadi, D. (1998)
	<i>Solanum tuberosum</i>	AJ345003	Stenzel, O. (2001)
SPMS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF184094	Hanzawa, Y. (1999)
SAMDC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ251915	Franceschetti, M. (2001)
	<i>Brassica juncea</i>	X95729	Kim, B.-K. (1997)
	<i>Datura stramonium</i>	Y07768	Michael, A.J. (1996)
	<i>Dianthus carioophyllus</i>	U38526 U38527	Lee, M.M. (1996)
	<i>Helianthus annuus</i>	AF066078	Eliasson, A. (1998)
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Z24741	Espartero, J. (1994)
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	AB015609	Nakakita, M. (1998)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	U91924	Paramale, S.R. (1997)
	<i>Oryza sativa</i>	Y07766 AJ251899	Franceschetti, M. (2001);
	<i>Phaseolus lunatus</i>	AB062360	Arimura, G. (2002)
	<i>Spinacea oleracea</i>	X81414	Bolle, C. (1995)
	<i>Vicia faba</i>	AJ250026	Fruehling, M. (2000)
	<i>Zea mays</i>	Y07767	Franceschetti, M. (2001)

#### 4. Las enzimas de la ruta biosintética de PAs están compartimentadas

En fracciones obtenidas mediante centrifugación diferencial de extractos de hoja de tabaco, Walker y col. (1987) detectaron actividad ADC principalmente en citosol y, en menor medida, en mitocondrias y cloroplastos. También se ha detectado actividad ADC en cloroplastos aislados de cotiledones de pino y en mitocondrias de *Helianthus tuberosus* (Torrighiani y col. 1986). Mas recientemente, en nuestro laboratorio, mediante técnicas de inmunolocalización, se ha podido determinar la localización subcelular de la ADC para diferentes especies vegetales. Así, la ADC de avena se ha localizado en el cloroplasto asociada a la membrana tilacoidal (Borrell y col. 1995).

En tabaco se ha detectado actividad ODC principalmente en citosol, pero también en núcleo (Walker y col 1987). La utilización de  $^{14}\text{C}$ -DFMO asociada a técnicas de fraccionamiento (Panagiotidis y col. 1982) o autorradiografía al microscopio óptico (Slocum 1991) han permitido localizar la ODC principalmente en vacuola y núcleo de tomate, mientras que en cebada se ha encontrado actividad ODC en citosol y asociada a cromatina.

La actividad SAMDC se ha detectado en la fracción citosólica de pino (Torrighiani y col 1986) y tabaco (Walker y col.1987), y la SPDS en citosol de col china (Shindu y Cohen 1984). Hasta el momento no se ha podido determinar la localización de SPMS.

#### 5. Las PAs experimentan procesos degradativos

Las amino oxidasas son proteínas dependientes de cobre que incluyen las diamino oxidasas (DAO, EC 1.4.3.6), definidas en base a su alta especificidad por las diaminas, y las flavoproteínas poliamino oxidasas (PAO, EC 1.5.3.3), que oxidan los grupos amino secundarios de Spd y Spm (Federico y Angelini 1991). Los productos de reacción de la DAO a partir de Put son pirrolina, peróxido de hidrógeno y amonio, mientras que PAO produce pirrolina y 1,5-diazabicyclononano a partir de Spd y Spm, respectivamente, conjuntamente con diaminopropano (DAP) y peróxido de hidrógeno (Fig. 1). El DAP puede ser convertido en  $\beta$ -alanina, mientras que la pirrolina puede ser catabolizada a ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en una reacción catalizada por la pirrolina deshidrogenasa. El GABA es posteriormente transaminado y oxidado a ácido succínico, que es incorporado al ciclo de Krebs. Así, esta vía asegura el reciclaje de carbono y nitrógeno procedentes de Put y Spd (Tiburcio y col 1990) (Fig.1).

Recientemente, se han clonado los genes que codifican la DAO de lenteja, guisante y *Arabidopsis thaliana*. También se ha clonado el gen que codifica para la PAO de avena y maíz.



## 6. Las PAs se conjugan a moléculas de distinta naturaleza

En la naturaleza, las PAs se encuentran no sólo como bases libres, sino también como conjugados, formando parte de un péptido (p.ej. glutationilespermidina), un aminoácido (p.ej. putreamina) o un antibiótico (p.ej. bleomicina). Las PAs se pueden conjugan con ácido acético, formando acetil derivados, que son comunes en el reino animal. En plantas los conjugados de PAs más comunes son las amidas del ácido hidroxicinámico. Así, en algunas plantas, Put, agmatina, Spd y Spm están unidas mediante un enlace tipo amida con una o dos moléculas de ácido cumárico, cafeico y/o ferúlico, formando hidroxicinamoil amidas (revisión, Martin-Tanguy 1997).

La unión por enlace covalente de las PAs a proteínas está catalizada por una clase de enzimas conocidas como transglutaminasas (TGasas; EC 2.3.2.13) (Serafini-Fraccasini y col. 1995). De forma similar a las TGasas de origen animal, la mayoría de TGasas vegetales parecen tener relación con funciones estructurales. Además, se ha sugerido que las TGasas podrían participar en el proceso fotosintético, ya que catalizan la unión de las PAs a proteínas cloroplásticas (Del Duca y col. 1995). La clonación de genes que codifican las TGasas en vegetales permitirá estudiar en el futuro los mecanismos que controlan la conjugación de las PAs a proteínas, así como establecer el mecanismo molecular mediante el cual estos compuestos tienen un papel en la fotosíntesis.

## 7. Las PAs se transportan a lo largo de la planta

En células animales, existen múltiples sistemas de importe de PAs que no son específicos (Byers y col. 1987). En animales, el importe de PAs exógenas necesita energía y aumenta durante la estimulación hormonal (Seiler y Dezeure, 1990). También se observa un incremento del importe en tejidos con alta demanda de PAs, como son las células en rápida proliferación y los tumores (Volcow y col. 1983). La proteína antizima de la ODC regula negativamente el importe, al mismo tiempo que estimula la excreción de PAs (Sakata y col., 2000).

En *E. coli* existen tres sistemas de transporte de PAs en la membrana plasmática (Igarashi y Kashiwagi, 1999). En los canales de importe de PAs se han caracterizado los diferentes componentes proteicos y se han identificado dos receptores específicos para Put y Spd, respectivamente (Kashiwagi y col. 1986). Un tercer sistema regula el importe y la excreción de Put. En este último sistema, el importe depende del potencial de membrana, mientras que la excreción consiste en un antiporte de Put y ornitina (Kashiwagi y col. 1992).

En plantas, los estudios sobre transporte de PAs son más complejos, debido a la capacidad de la pared celular para secuestrar las PAs suministradas exógenamente (Bagni y Pistocchi 1991). Sin embargo, hay datos que indican la existencia de transporte de PAs en pétalos de *Santipaulia ionantha* (Bagni y Pistocchi 1985, Pistocchi

y col 1986), en células (Pistocchi y col. 1987, Pistocchi y Bagni 1990) y protoplastos de zanahoria (Pistocchi y col. 1988). Este transporte es bidireccional, y el importe depende de ATP y de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Existe también un control hormonal del importe, que es estimulado por auxinas y citoquininas.

El transporte a larga distancia es probablemente un aspecto esencial para determinar la función hormonal de una sustancia. Estudios realizados en planta entera, muestran la existencia de un transporte apolar de PAs. Estos compuestos pueden ser absorbidos por las raíces, o bien sintetizados en diferentes órganos y transportados, vía xilema y/o floema, a otras partes de la planta (Friedman y col. 1986). Por ejemplo, en plántulas de maíz y tomate, la Put se absorbe rápidamente por las raíces a favor de gradiente de concentración y es translocada, como tal o en forma de metabolito, a las partes superiores. Esta translocación de PAs parece estar ligada a la transpiración de la planta.

## 8. Rutas de señalización

En *E. coli* se han encontrado receptores para Put y Spd (Kashiwagi y col. 1986), sin embargo en plantas por el momento no se ha encontrado ningún receptor de poliaminas.

En animales y plantas se ha descrito la capacidad de la espermina, y con menor afinidad el resto de poliaminas, para regular los canales de potasio dependientes de voltaje (Williams 1997) y de este modo modular la apertura estomática (Liu y col. 2000). La aplicación exógena de espermina no produce este efecto, y sólo la espermina intracelular es capaz de unirse y bloquear la proteína de membrana, sugiriendo que los efectos de las poliaminas dependen en gran medida de su localización subcelular.

En células animales, se ha propuesto que las PAs podrían controlar los niveles basales de mensajeros secundarios y modular señales extracelulares transducidas por los receptores acoplados a proteína-G (Bueb y col. 1992). En plantas, la información sobre el papel de las PAs en las rutas de señalización es escasa. Se conoce que las PAs pueden influir sobre la actividad de proteínas quinasas específicas de plantas (Roux 1993). Por ejemplo, la Spm activa una quinasa y modula la fosforilación de una proteína nuclear en guisante (Datta y col. 1987). Se han descrito otros casos en los que las PAs, especialmente Spm, modulan la fosforilación de proteínas, desempeñando así un papel en la transducción de señales celulares. También se ha sugerido que las PAs, al igual que las auxinas y citoquininas, pueden utilizar la vía del fosfatidilinositol para la transducción de señales entre células vegetales (Dureja-Munjal y col. 1992). Las PAs podrían tener también un papel en la regulación génica (Li y col. 1992, Bueno y col. 1993, Van der Broek y col. 1994, Borrell y col. 1996). Por ejemplo, se ha descrito que en frutos de tomate las PAs modulan la expresión del gen que codifica para la ACC-sintasa, enzima clave en la síntesis de etileno.



## 9. Regulación de la división celular

Bagni (1966) fue el primero en observar el efecto de las PAs sobre la división celular. Cuando cortes de tejido parenquimático de *Helianthus tuberosum* se escinden de un tubérculo en estado vegetativo y se hacen crecer en un medio de cultivo sin hormonas exógenas, las células no se dividen, mientras que el suministro de PAs (Spm, Spd y Put) al medio, estimula activamente la división celular. Este efecto es similar al observado por el tratamiento con hormonas.

Usando células en suspensión de remolacha, se ha investigado la regulación de los niveles de PAs durante la transición desde estado quiescente al proliferativo. Durante dicha transición se observa un incremento en la síntesis de DNA que va acompañado por un marcado aumento en el contenido de PAs, el cual viene precedido por un incremento rápido y transitorio de las actividades ODC y SAMDC. La división celular se inhibe por aplicación de MGBG (inhibidor de la SAMDC) y, en menor grado por DFMO (inhibidor de la ODC). La transición de las células de fase G2 a mitosis es dependiente de la actividad de un complejo multiproteico que incluye la ciclina. La expresión de la ciclina mitótica en células quiescentes de remolacha se induce tanto por PAs (especialmente Put) como por sus precursores arginina y ornitina. Estos resultados indican que las PAs tienen un papel en el control la división celular.

## 10. Las PAs están implicadas en los procesos de morfogénesis vegetal

### 10.1 Embriogénesis

Los primeros estudios sobre la influencia morfogenética de las PAs los realizaron Feirer y col. (1984) en cultivos de zanahoria. En presencia de elevados niveles de auxina, estos cultivos crecen como callo, sin formar embrioides, pero cuando se elimina la auxina incrementan la actividad ADC y el contenido en Spd y, posteriormente, se produce la embriogénesis. Al aplicar el inhibidor biosintético DFMA, se reducen los niveles de actividad ADC y de Spd y no se produce embriogénesis a menos que se añada Spd. Las líneas no embriogénicas de zanahoria no muestran el incremento en ADC ni ninguna dependencia de Spd, lo que sugiere que este efecto es sobre la morfogénesis y no sobre el crecimiento en general (Fienberg y col. 1984).

Las células de zanahoria crecidas con niveles altos de auxina carecen de potencial embriogénico, y se ha observado que producen más etileno y menos PAs. Ello indica que el potencial morfogenético para producir embrioides es favorecido por PAs e inhibido por etileno (Robie y Minocha 1989). Sería interesante estudiar si la interacción entre etileno y PAs se produce a nivel de biosíntesis o de rutas de señalización.

### 10.2. Inducción floral

Cuando se cultivan *in vitro* explantos superficiales de tallos florales de tabaco se puede inducir la formación de órganos vegetativos, flores o raíces controlando las

condiciones del cultivo (Tran Thanh Van 1973). Cuando los explantos crecen en un medio basal suplementado con auxina y citoquinina (1:1) producen yemas florales, mientras que un aumento en los niveles de citoquinina produce la diferenciación de yemas vegetativas (Kaur-Sawhney y col. 1988). Durante la diferenciación de yemas vegetativas y florales, hay un incremento de la actividad ADC y un descenso de la actividad ODC (Tiburcio y col. 1988). La aplicación de DFMA inhibe la organogénesis, pero no la de DFMO. Las PAs endógenas incrementan durante el desarrollo de las yemas, y se ha observado que los niveles de Spd son superiores en yemas florales que en yemas vegetativas. Cuando se inhibe la formación de Spd con ciclohexilamina (CHA) se reduce la floración. Esta menor floración va acompañada de un descenso paralelo en los niveles de Spd, y el efecto revierte por aplicación de Spd exógena (Kaur-Sawhney y col. 1988).

En *Arabidopsis thaliana* se ha aislado un mutante para una de las dos isoformas de espermina sintasa (ACAULIS5). El gen se expresa de forma específica en tallo y raíz (Hanzawa y col., 2000), y el mutante presenta un fenotipo enano, pero la floración no se ve alterada. En plantas transgénicas de tabaco transformadas con la ADC de avena bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina, en algunas de las líneas se observa un adelanto de la floración que se relaciona con un incremento de Spd (Masgrau y col. 1997). Este adelanto en la floración se observa también en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la ADC de avena bajo el control de un promotor inducible por ABA (Martin-Tanguy 1997).

### 10.3. Desarrollo floral

Plantas transgénicas de tabaco sobreexpresoras de ODC de ratón producen inflorescencias con entrenudos más cortos, flores con estambres más cortos y un desarrollo anormal del ovario (DeScenzo y Minocha 1993). Estos resultados están en consonancia con los observados en una línea mutante de tomate estéril sin estambres, que mostró niveles anormalmente elevados de PAs en todos los órganos florales (Rastogi y Sawhney 1990a). La aplicación de PAs exógenas causó desarrollos florales anormales y, recíprocamente, algunos inhibidores de la biosíntesis de PAs indujeron el desarrollo normal del polen en el mutante (Rastogi y Sawhney 1990b). Recientemente, en nuestro laboratorio, hemos observado que un acúmulo de Put en *Arabidopsis* se relaciona con fenómenos de esterilidad debidos al menor tamaño de los estambres. Parece por tanto que los niveles anormales de PAs se relacionan con alteraciones en el desarrollo de los órganos florales.

### 10.4. Formación de raíces

Está bien establecido que la diferenciación de la raíz en la planta entera proviene en general de las células perivasculares. Sin embargo, los explantos superficiales, que carecen de estas células, ya que están compuestos sólo de células epidérmicas, subepidérmicas y corticales, pueden dar lugar a raíces cuando se cultivan *in vitro* (Tran Thanh Van 1973). Este sistema es útil para estudiar la iniciación radicular, ya que refleja la iniciación organogénica en sentido estricto. La diferenciación de la raíz en este



sistema no sólo depende de la proporción auxina/citoquinina, sino también del pH del medio de cultivo. En colaboración con el grupo del Prof. Tran Thanh Van (CNRS, Francia), utilizamos este sistema para investigar el papel de las PAs en la formación de raíces, y demostramos que los niveles de Put endógena aumentan rápidamente, alcanzando un máximo alrededor del séptimo día de cultivo, y luego disminuyen progresivamente. Cuando se añaden los inhibidores DFMA y DFMO, la formación de raíces se inhibe en ambos casos, pero el incremento en los niveles de PAs sólo se inhibe por DFMA. Cuando explantos expuestos a DFMA durante 4 días se transfieren a un medio carente de inhibidor, pero que contiene Put, son capaces de producir raíces, mientras que la inhibición mediada por DFMO no puede ser revertida por aplicación de Put. Estos resultados indican que la inhibición de raíces mediada por DFMO no es específica, mientras que la Put formada vía ADC puede ser incluida entre los factores que controlan la formación de raíces en tabaco (Tiburcio y col. 1989).

### 10.5. Formación de tubérculos

En plantas transgénicas de patata que contienen el cDNA de la SAMDC en antisentido, la reducción del nivel de transcrito de SAMDC va acompañada de la aparición de una serie de cambios fenotípicos como son: crecimiento alterado, tallos muy ramificados, entrenudos cortos, hojas pequeñas y cloróticas, e inhibición del crecimiento de la raíz (Kumar y col 1996). Además, estas plantas no florecen, pero producen tubérculos muy pequeños y alargados. Las características de estas plantas se correlacionan con bajos niveles de transcrito SAMDC, actividad enzimática y PAs, así como con un incremento de la producción de etileno.

Aunque estos resultados parecen indicar que las PAs juegan un papel en la formación de tubérculos, se requieren nuevas investigaciones para entender completamente la relación entre las PAs y el etileno.

Más recientemente, en colaboración con el grupo del Dr. M.Taylor (Dundee), hemos generado plantas transgénicas de patata portadoras del gen que codifica la SAMDC en sentido y antisentido bajo el control del promotor de la patatina (específico de tubérculo). Los tubérculos procedentes de las plantas transformadas con el gen en sentido presentan incrementos en los niveles de transcrito, actividad SAMDC y PAs. Estas plantas producen el mismo número de tubérculos que las plantas control, pero éstos son mucho más pequeños (Rafart-Pedros y col. 1999). Esta área de investigación puede tener en un futuro aplicaciones agronómicas.

## 11. Las PAs son moléculas “antisenescentes” en competencia con el etileno

Los primeros trabajos sobre los efectos antisenescentes de las PAs se realizaron con protoplastos de avena (Altman y col. 1977). Más recientemente, se ha observado que en hojas de avena incubadas en la oscuridad se produce una disminución en los niveles de proteínas filaciales (D1, D2 y citocromo f) y estromales (subunidad

grande de la Rubisco), que está relacionada con una pérdida progresiva de clorofila. El tratamiento de las hojas con Spd o Spm previene la pérdida de clorofila, estabiliza la composición molecular de las membranas tilacoidales y retrasa la senescencia (Besford y col. 1993). Con el objeto de estudiar el mecanismo implicado en la acción antisenescente de las PAs, se estudió la influencia de estos compuestos sobre la peroxidación de lípidos en hojas senescentes de avena. Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de la peroxidación lipídica podría ser uno de los mecanismos responsables de los efectos antisenescentes de las PAs (Borrell y col. 1997). Otro mecanismo propuesto estaría relacionado con la capacidad de la Spm para formar un complejo terciario con el  $\text{Fe}^{2+}$ , cambiando su susceptibilidad a la autooxidación, y así su capacidad para generar radicales libres (Tadolini 1988).

Recientemente, se han producido plantas transgénicas de tomate sobreexpresoras de la SAMDC de levadura bajo el control de un promotor inducible por etileno y maduración (E8). En algunas de estas plantas la senescencia de las hojas y la maduración de los frutos están significativamente retrasados (Mehta y col. 1997). Estas líneas transgénicas de tomate están siendo utilizadas como sistema experimental para estudiar las interacciones entre PAs y etileno en la regulación de la senescencia de la planta.

## 12. Las PAs están implicadas en la respuesta de las plantas frente al estrés ambiental

Desde el descubrimiento en la década de los años 50 que los niveles de Put aumentan en plantas sometidas a condiciones de deficiencia de  $\text{K}^+$ , se ha observado que otros tipos de estrés, como el osmótico, el ácido, las altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ , la exposición a contaminantes atmosféricos, tales como  $\text{SO}_2$  o  $\text{Cd}_2^+$ , y las bajas temperaturas producen el mismo efecto.

Se ha demostrado que en vegetales la regulación del metabolismo de las PAs por estrés tiene lugar principalmente a nivel de la enzima ADC. Así, por ejemplo, en plántulas de avena deficientes en  $\text{K}^+$  se produce un rápido incremento de la actividad ADC. El aumento de Put y actividad ADC se reducen considerablemente al aplicar DFMA (Flores y Galston 1984). La acumulación de Put en hojas de avena sometidas a estrés osmótico es el resultado no sólo de una activación de ADC, sino también de un descenso en la actividad Spd sintasa.

Esta acumulación de Put inducida por estrés no es un fenómeno generalizado para todas las plantas, ya que en hojas de tabaco sometidas a estrés osmótico los niveles de Put y la actividad ADC disminuyen, mientras que la Spd y Spm aumentan. Esta misma respuesta se ha observado en otros sistemas experimentales y se ha sugerido que una inducción de Spd y Spm podría conferir resistencia a estrés. Por el contrario, el acúmulo excesivo de Put podría tener efectos nocivos para la planta.



Cuando la planta se ve sometida a niveles elevados de ozono, se inducen una serie de cambios bioquímicos, algunos de los cuales forman parte de los mecanismos de defensa de la planta. Las reacciones frente a este estrés oxidativo incluyen incrementos en ácido ascórbico, peroxidasas, compuestos fenólicos, etileno y PAs. Cuando se proporcionan PAs exógenas a plantas de tabaco y tomate, se produce una supresión de la lesión foliar inducida por ozono. En hojas de cebada tratadas con ozono se observa un incremento de la actividad ADC previo a la aparición de lesiones, y los niveles de Spd aumentan durante el tratamiento. Cuando se adiciona DFMA a las hojas, no se da el incremento en la actividad ADC e incrementa considerablemente la lesión por exposición a ozono. Estos resultados sugieren que las PAs podrían tener un papel protector frente al ozono.

Los niveles de radical superóxido formados enzimáticamente con xantina oxidasa, o químicamente, con riboflavina, se inhiben *in vitro* mediante la aplicación de PAs. Esto sugiere que el mecanismo de acción de las PAs podría estar relacionado con la captación de radicales libres inducidos por el tratamiento con ozono.

En condiciones de estrés osmótico, se ha observado que existe una asociación entre el aumento de los niveles de PAs y el acúmulo del aminoácido prolina. Recientemente, en *Arabidopsis thaliana* se ha podido comprobar que el estrés osmótico induce la expresión de la pirrolina-5-carboxilasa sintetasa, que es una de las enzimas responsables del incremento de prolina. La transcripción del gen que codifica para dicho enzima está regulada por una ruta de señalización dependiente de ABA. Puesto que el metabolismo de las PAs está interconectado con la síntesis de prolina (Fig.1), será interesante determinar si la interacción prolina/PAs tiene lugar a través de esta ruta de señalización celular.

La implicación de las PAs en la respuesta de las plantas a estrés también ha sido demostrada por experimentos de transformación genética. Por ejemplo, la sobreexpresión de la ODC de ratón en cultivos celulares de zanahoria, incrementa la tolerancia a estrés salino. Todos estos resultados ponen de manifiesto las potenciales aplicaciones biotecnológicas que pueden tener este tipo de estudios en un futuro próximo.

### 13. Las PAs están interconectadas con el metabolismo secundario

La Put, aparte de ser precursora de Spd y Spm, es también precursora en la biosíntesis de alcaloides pirrolidínicos (Tiburcio y col. 1990, 1997). Así, los anillos de pirrolidina de los alcaloides de tabaco (nicotina, nornicotina, anabasina y anatabina), alcaloides tropánicos (hiosciamina, hioscina y meteloidina), alcaloides pirrolizidínicos (retronecina), alcaloides de *Erythroxylum coca* (higrina, cuscohigrina), y probablemente fenantroindolizidinas (tiloporina) derivan de la Put. Además, la Spd, la homoespermidina y la Spm pueden conjugarse a los ácidos grasos o ácidos cinámicos formando alcaloides complejos denominados alcaloides macrocíclicos. Ejemplos de



alcaloides derivados de Spd son las oncinotinas, inandeninas, palustrinas, lunarinas y los alcaloides de *Cannabis*. La solamina y la solapalmitina son alcaloides derivados de homoespermidina, mientras que la homalina, la verbascenina y pitecolobinas son ejemplos de alcaloides derivados de Spm. Por otro lado, la diamina cadaverina es una precursora de los alcaloides piperidínicos de *Nicotiana* y de los alcaloides quinolizidinicos del género *Lupinus*.

El flujo de los niveles de diaminas puede ser dirigido mediante manipulación genética hacia rutas "primarias" o "secundarias". Por ejemplo, cultivos de raíces transgénicas de *Nicotiana glauca* que contienen el gen que codifica para la lisina descarboxilasa bacteriana (LDC, EC 4.1.1.18) mostraron un aumento de los niveles de actividad LDC, cadaverina y anabasina, un alcaloide derivado de e la cadaverina (Fecker y col. 1992).

La variación del flujo de Put mediante manipulación genética tiene incluso mayor interés, ya que esta diamina no sólo es precursora de nicotina, sino también de otros compuestos importantes en medicina como, por ejemplo, los alcaloides tropánicos. En raíces transgénicas de *Nicotiana rustica* que contienen el gen que codifica la ODC de levadura se observa un incremento de actividad ODC asociado a un mayor acumulo de Put y nicotina (Hamill y col. 1990).

### **Agradecimientos**

El trabajo de investigación realizado por nuestro grupo ha sido financiado a través de los proyectos CICYT-BIO96-813 y CICYT-BIO-99-453. Rubén Alcázar disfruta de una beca FPI del Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (DOGC núm. 3073, 08/02/00).



- mines in xylem and phloem exudates of plants. *Plant Physiol* 82: 1154-1157.
- Hamill, J.D., Robins, R.J., Parr, A.J., Evans, D.M., Furze, J.M., Rhodes, M.J.** (1990). Overexpression of a yeast ornithine decarboxylase gene in transgenic roots of *Nicotiana rustica* can lead to enhanced nicotine accumulation. *Plant Mol Biol* 15: 27-38.
- Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M.J., Burtin, D., Michael, A.** (2001). Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J.* 27: 551-160.
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A.J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Coupland, G., Komeda, Y.** (2000). ACAULIS5, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J* 19: 4248-4256.
- Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K., Yamada, Y.** (1998). Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant cell Physiol* 39: 73-79.
- Heimer, Y.M., Mizrahi, Y.** (1982). Characterization of ornithine decarboxylase in tobacco cells and tomato ovaries. *Biochem J* 201: 373-374.
- Hiatt, A.C., Mc Indoo, J., Malmberg, R.L.** (1986). Regulation of polyamine synthesis in tobacco. Effects of inhibitors and exogenous polyamines on arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem* 261: 1293-1298.
- Koromilas, A.E., Kyriakidis, D.A.** (1988a). Purification and properties of ornithine decarboxylase from germinating barley seeds. *Phytochemistry* 27: 989-992.
- Koromilas, A.E., Kyriakidis, D.A.** (1988b). The existence of ornithine decarboxylase antizyme complex in germinated barley seedlings. *Physiol Plant* 72: 718-724.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K.** (1999). Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem J* 344: 633-642.
- Igarashi K., Kashiwagi K.** (2000). Polyamine: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 559-569.
- Imanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Nakamura, K.** (1998) Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. *Plant Mol Biol*: 38(6): 1101-11
- Kashiwagi, K., Kobayashi, H., Igarashi, K.** (1986). Apparently unidirectional polyamine transport by proton motive force in polyamine-deficient *Escherichia coli*.

J Bacteriol 165: 972-977.

- Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Suzuki, F., Kobayashi, H., Igarashi, K.** (1992). Excretion of putrescine by putrescine-ornithine antiporter encoded by the *potE* gene of *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad Sci* 89: 4529-4533.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A.F., Galston, A.W.** (1988). Spermidine and flower bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. *Planta* 173: 282-284.
- Kumar, A., Taylor, M.A., Mad Arif, S.A., Davis, H.V.** (1996). Potato plants expressing antisense and sense SAMDC transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant J*: 147-158.
- Lee, M.M., Lee, S.H., Park, K.Y.** (1997). Characterization and expression of two members of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant Mol Biol* 34: 371-382.
- Li, N., Parsons, B.L., Liu, D., Matto, A.K.** (1992). Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant Mol Biol* 18: 477-487.
- Li, X.Q., Coffino, P.** (1994). Distinct domains of antizyme required for binding and proteolysis of ornithine decarboxylase. *Mol Cell Biol* 14: 87-92.
- Liu K., fu H., Bei Q., Luan, S.** (2000) Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol* 124(3): 1315-26
- Mad Arif, S.A., Taylor, M.A., George, L.A., Butler, A.R., Burch, L.R., Davies H.V., Stark M.J.R., Kumar, A.** (1994) Characterization of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene from potato. *Plant Mol Biol* 26: 327-338
- Malmberg, R.L., Smith, K.E., Bell, E., Cellino, M.L.** (1992). Arginine decarboxylase of oats is clipped from a precursor into two polypeptides found in the soluble enzyme. *Plant Physiol* 100 : 146-152.
- Malmberg, R.L., Cellino, M.L.** (1994). Arginine decarboxylase of oats is activated by enzymatic cleavage into two polypeptides. *J Biol Chem* 269 : 2703-2706.
- Martin-Tanguy, J.** (1997). Conjugated polyamines and reproductive development : biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol Plant* 100: 675-688.
- Masgrau, C., Altabella, T., Farrás, R., Flores, D., Thompson, A-J., Besford, R-T., Tiburcio, A-F.** (1997) Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant J* 11: 465-473
- Mehta, R.A., Handa A., Li, N., Mattoo, A.K.** (1997). Ripening-activated expres-



- sion of S-adenosylmethionine decarboxylase increases polyamine levels and influences ripening in transgenic tomato fruits. *Plant physiol* 114: S-44.
- Michael, A.J., Furze, J.M., Rhodes, M.J.C., Burtin, D.** (1996). Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA. *Biochem J* 314: 241-248.
- Panagiotidis, C.A., Georgatsos, J.G., Kyriakidis, D.A.** (1982). Superinduction of cytosolic and chromatin-bound ornithine decarboxylase activities of germinating barley seeds by actinomycin D. *FEBS Lett* 146: 193-196.
- Panagiotidis, C.A., Kyriakidis, D.A.** (1985). Purification of a non-histone protein with properties of antizyme to ornithine decarboxylase from germinated barley seedlings. *Plant Growth Regul* 3: 247-255.
- Pandit, M., Ghosh, B.** (1988). Ornithine decarboxylase from embryos of jute seeds. *Phytochemistry* 27: 1609-1610
- Pistocchi, R., Bagni, N., Creus, J.A.** (1986). Polyamine uptake, kinetics and competition among polyamines and between polyamines and inorganic cations. *Plant Physiol* 80: 556-560.
- Pistocchi, R., Bagni, N., Creus, J.A.** (1987). Polyamine uptake in carrot cell cultures. *Plant Physiol* 80: 374-380.
- Pistocchi, R., Keller, F., Bagni, N., Matile, P.** (1988) Transport and subcellular localization of polyamines in carrot protoplasts and vacuoles. *Plant Physiol* 87: 514-518.
- Pistocchi, R., Bagni, N.** (1990) Effect of calcium on spermine uptake in carrot cell cultures. *J. Plant Physiol* 136: 728-733.
- Primikiros, N.I., Roubelakis-Angelakis, K.A.** (2001) Indications for post-translational regulation of *Vitis vinifera* L. arginine decarboxylase. *Plant Mol Biol* 45: 669-78.
- Rafart Pedros, A., MacLeod, M.R., Ross, H.A., McRae, D., Tiburcio A.F., Davis, H.V., Taylor, M.A.** (1999). Manipulation of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in potato tubers. *Planta* 209: 153-160.
- Rastogi, R., Sawhney, V.K.** (1990a). Polyamines and flower development in male sterile stamenless-2 mutant of tomato. I. Level of polyamines and their biosynthesis in normal and mutant flowers. *Plant Physiol* 93: 439-445.
- Rastogi, R., Sawhney, V.K.** (1990b). II. Effects of polyamines and their biosynthetic inhibitors on the development of normal and mutant floral buds cultured in vitro. *Plant Physiol* 93: 446-452.



- Robie, C.A., Minocha, S.C.** (1989). Polyamines and embryogenesis. I. The effects of difluoromethylornithine and difluoromethylarginine. *Plant Sci* 65: 45-54
- Roux, S.** (1993). Casein kinase-2-type protein kinases in plants: possible targets of polyamines action during growth regulation? *Plant Growth Regul* 12: 189-193.
- Sakata, K., Kashiwagi, K., Igarashi, K.** (2000). Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme. *Biochem J* 347: 297-303.
- Schröder, G., Schröder, J.** (1995). cDNAs for S-adenosyl-L-methionine decarboxylase from *Catharantus roseus*, heterologous expression, identification of the proenzyme-processing site, evidence for the presence of both subunits in the active enzyme, and conserved region in the 5' mRNA leader. *Eur J Biochem* 228: 74-78.
- Schuber, F.** (1989). Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem. J* 260: 1-10.
- Seiler, N., Dezeure, F.** (1990). Polyamine transport in mammalian cells. *Int J Biochem* 22 : 211-218
- Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S., Beninati, S.** (1995). Plant transglutaminases. *Phytochemistry* 40 : 355-365.
- Tassoni, A., Antognoni, F., Battistini, M.L., Sanvido, O., Bagni, N.** (1998). Characterization of spermidine binding to solubilized plasma membrane proteins from zucchini hypocotyls. *Plant Physiol* 117: 971-977.
- Slocum, R-D.** (1991) Tissue and subcellular localization of polyamines and enzymes. In: Slocum RD, Flores HE (eds) *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp93-103
- Slocum, R-D., Flores, H.E.** (eds) (1991) *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. CRC Press, Boca Raton
- Soyka, S., Heyer, A.G.** (1999) Arabidopsis knockout mutation of ADC2 gene reveals inducibility by osmotic stress. *FEBS Lett* 458: 219-223
- Tabor, C.W., Tabor, H.** (1984). Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53: 749-790
- Tadolini, B.** (1988) Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochem J* 249: 33-36.
- Tiburcio, A.F., Kaur-Sawhney, R., Galston, A.W.** (1988). Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tissue cultures. *Plant Cell Physiol* 29: 1241-1249.

## Biosíntesis y metabolismo

El ácido salicílico, ó 2-hidroxibenzoico (Figura 1), es un producto de la ruta general del ácido shikímico. Esta ruta biosintética genera una amplia gama de moléculas que abarca desde fenilpropanoides precursores de flavonoides, antocianinas o de los propios salicilatos, hasta aminoácidos aromáticos. El SA puede ser sintetizado en plantas a través de dos rutas distintas que derivan de la ruta general del ácido shikímico (Figura 2). Una de ellas, caracterizada en plantas solaráceas, partiría de fenilalanina que tras una desaminación se convierte en ácido trans-cinámico, el cual mediante  $\beta$ -oxidación acorta su cadena lateral para dar ácido benzoico (Ribnicky et al., 1998; Jarvis et al., 2000) y finalmente, éste se hidroxila en posición 2 del anillo aromático (León et al., 1993) para dar SA (Yalpani et al., 1993). Por otro lado, recientemente se ha identificado una nueva ruta en *Arabidopsis thaliana*, similar a la descrita en bacterias, que partiendo de corismato se isomeriza hasta isocorismato y, finalmente, se escinde en piruvato y SA (Wildermuth et al., 2001). Ambas rutas biosintéticas difieren en su localización subcelular, mientras la ruta que parte de fenilalanina implicaría la intervención de cloroplastos y peroxisomas, la ruta derivada de corismato sería esencialmente cloroplástica (Figura 2).

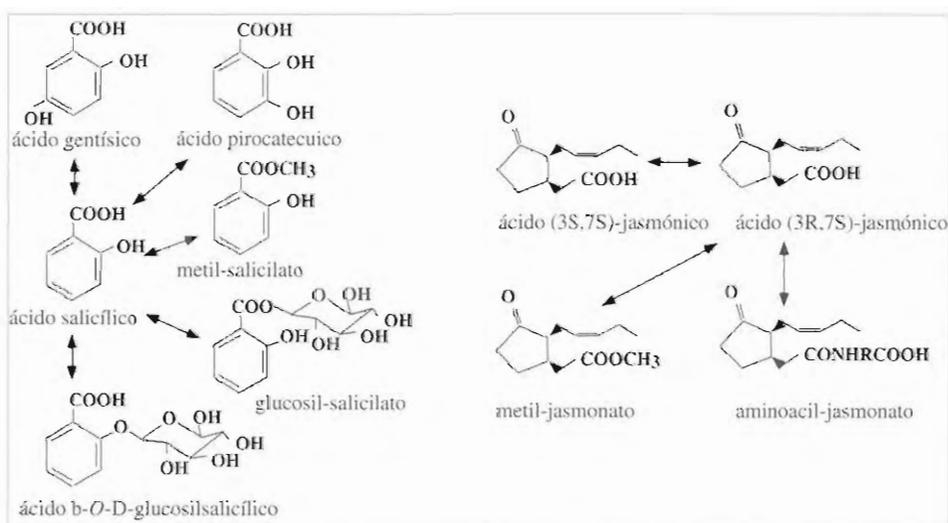


Figura 1. Estructuras químicas de los ácidos salicílico y jasmónico y sus metabolitos más frecuentes en plantas. AOC: óxido de aleno ciclasa; AOS: óxido de aleno sintasa; BA2H: ácido benzoico 2-hidroxilasa; HP: hidroperóxido; LNA: ácido linoléico; LOX: lipooxigenasa; OPC-8:O: ácido 10,11 dihidro-12-oxofitodienoico; OPDA: ácido 12-oxofitodienoico; OPDAR: reductasa del ácido 12-oxofitodienoico; PAL: fenilalanina amonio liasa; PL: piruvato liasa; SID2: salicylic acid induction deficient 2.

El ácido jasmónico, ó 3-oxo-2-[cis-2-pentenil]-ciclopentano-1-acético (Figura 1), es un producto de la ruta general de los octadecanoides que partiendo de ácidos grasos insaturados de 18C, ácidos linoleico y linoléico fundamentalmente, dan lugar al correspondiente dodecanoide a través de reacciones redox, ciclaciones y  $\beta$ -oxidacio-

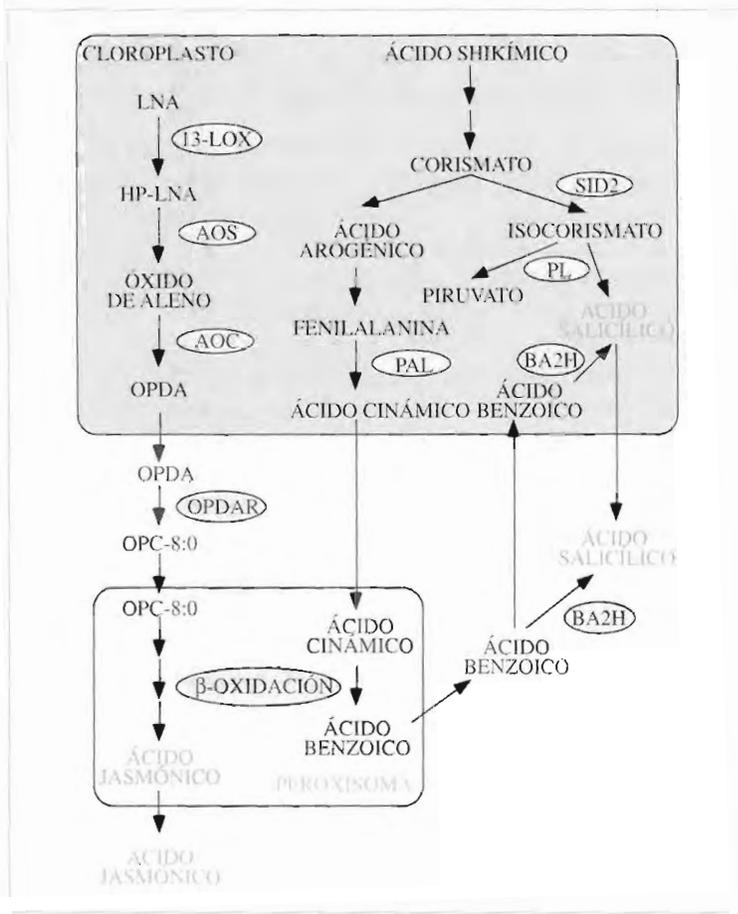


Figura 2. Localización intracelular de las rutas de biosíntesis de jasmonatos y salicilatos en plantas.

AOC: óxido de aleno ciclasa; AOS: óxido de aleno sintasa; BA2H: ácido benzoico 2-hidroxilasa; HP: hidropéroxido; LNA: ácido linolénico; LOX: lipooxigenasa; OPC-8:0: ácido 10,11 dihidro-12-oxofitodienoico; OPDA: ácido 12-oxofitodienoico; OPDAR: reductasa del ácido 12-oxofitodienoico; PAL: fenilalanina amonio liasa; PL: piruvato liasa; SID2: salicylic acid induction deficient 2.

nes (Creelman y Mullet, 1997). La ruta consta de un número elevado de pasos que incluirían la liberación del ácido linolénico por acción de una fosfolipasa A1 (Ishiguro et al., 2001), la oxidación por la acción de 13-lipooxigenasas (Bell et al., 1995), la deshidratación hasta óxido de aleno y posterior ciclación hasta ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) (Laudert y Weiler, 1998; Hamberg and Fahlstadius, 1990), y finalmente, la reducción hasta ácido 3-oxo-2(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico (OPC-8:0) y la acción de tres rondas sucesivas de β-oxidación (Schaller 2001) (Figura 2). Esta ruta une a la complejidad propia del número de reacciones implicadas, la participación de tres compartimentos subcelulares distintos. Los primeros pasos de la ruta, hasta la



síntesis de OPDA, ocurren en el cloroplasto pero luego el OPDA se transporta al citoplasma donde se reduce y el OPC-8:0 resultante se transporta entonces hasta el interior de peroxisomas y glioxisomas donde tiene lugar la  $\beta$ -oxidación (Figura 2).

Los ácidos libres SA and JA no son las formas más abundantes de salicilatos y jasmonatos presentes en plantas. Las formas más abundantes de estos compuestos son los correspondientes ésteres y glucósidos (Figura 1). En el caso del SA las formas conjugadas más abundantes son el ácido  $\beta$ -O-D-glucosil-salicílico, inactivo y de escasa movilidad (Tanaka et al., 1990; Enyedi et al., 1992) y el éster metílico, de naturaleza volátil y con similar actividad a la mostrada por el ácido libre (Buttery et al., 1982; 1984; Shulaev et al., 1997). En menor medida, el SA puede ser metabolizado al correspondiente éster con glucosa (Barz et al., 1978), a conjugados con aminoácidos (Steffan et al., 1988) o hasta ácidos benzoicos polihidroxilados (Ibrahim y Towers, 1959). El metabolito más abundante del JA es sin duda el correspondiente éster metílico, molécula muy volátil que conserva la actividad mostrada por el ácido libre (Farmer y Ryan, 1990; Creelman et al., 1992) aunque también se han descrito conjugados con aminoácidos (Schmidt et al., 1995).

### **Funciones relacionadas con el desarrollo**

Se han descrito numerosos procesos relacionados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas que parecen estar regulados por jasmonatos y salicilatos. Los jasmonatos parecen estimular el desarrollo de las flores así como la maduración de frutos, la tuberización y la senescencia. En cambio, inhiben la fotosíntesis, la germinación del polen y el crecimiento de las raíces. Sin embargo, estas funciones sugeridas no han sido convenientemente estudiadas ni documentados los correspondientes mecanismos moleculares.

Existen dos procesos del desarrollo que parecen estar regulados por salicilatos: la termogénesis en los apéndices de flores de plantas termogénicas del género *Arum* (Raskin et al., 1987) y la senescencia de las hojas (Morris et al., 2000). Además, se ha propuesto que el SA podría ser una molécula con actividad inductora de la floración (Cleland y Ajami, 1974; Cleland y Tanaka, 1979; Watanabe et al., 1981). Sin embargo, esta función nunca fue correlacionada con cambios en los niveles endógenos de SA ni propuesto un mecanismo molecular que explicase la función reguladora del SA sobre la floración. Nuestro trabajo más reciente con mutantes de *Arabidopsis* deficientes en SA, los cuales presentan fenotipo de floración tardía, sugiere que el SA podría regular la transición de la fase vegetativa a reproductiva en *Arabidopsis* a través de rutas dependientes e independientes de fotoperiodo (Martínez y León, sometido a publicación).

Recientemente, se ha propuesto que los jasmonatos también parecen actuar como reguladores tanto de la senescencia como del desarrollo floral en *Arabidopsis*. La senescencia inducida en hojas de *Arabidopsis* parece requerir la vía de señalización activada por JA, ya que no se produce en el mutante *coi1*, insensible a JA, y parece requerir la síntesis de esta molécula, ya que el proceso de senescencia conlleva la



expresión inducida de genes de su ruta biosintética y la acumulación correspondiente de JA en hojas senescentes (He et al., 2002). Por otro lado, la síntesis y percepción de JA son esenciales para un normal desarrollo floral en *Arabidopsis*, ya que mutantes deficientes o insensibles a JA presentan alteraciones en la maduración del polen, la dehiscencia de las anteras o la apertura de las flores (Xi et al., 1998; Sanders et al., 2000; Stintzi y Browse 2000; Ishiguro et al., 2001).

## Funciones relacionadas con defensa frente a estrés

Tanto los salicilatos como los jasmonatos son importantes reguladores de procesos de defensa frente a estrés en plantas (Reymond y Farmer, 1998). Esta función ha sido ampliamente documentada en las respuestas de defensa frente a insectos y frente a patógenos y el papel regulador de ambas moléculas sustentada por diversas evidencias: (1) en plantas dañadas por insectos o infectadas por patógenos se acumulan altos niveles de jasmonatos y salicilatos (Creelman et al., 1992; Gundlach et al., 1992; Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990); (2) tanto JA como SA activan la expresión de genes cuyos productos tienen actividad antipatogénica o inhibidora de la acción de insectos fitófagos, como las proteínas relacionadas con patogénesis (Linthorst 1991; Ward et al., 1991) o los inhibidores de proteasas (Farmer y Ryan, 1990; Farmer et al., 1992; Hildmann et al., 1992), potenciando así la resistencia de la planta sometida a los distintos factores de estrés; (3) mutantes afectados en la síntesis, acumulación, percepción o señalización de SA o JA son deficientes en la activación de genes de defensa y más susceptibles al ataque de patógenos e insectos fitófagos (Delaney et al., 1994; Howe et al., 1996; Vijayan et al., 1998; Dong 2001); en cambio, mutantes con elevados niveles o señalización constitutivamente activada de SA o JA son más resistentes (para una revisión reciente ver Heil y Baldwin, 2002).

Tanto salicilatos como jasmonatos son inductores de defensas no sólo a nivel local, donde se sintetizan en respuesta al factor de estrés, sino también a nivel sistémico. Se ha propuesto que los propios SA y JA podrían actuar como señales móviles capaces de ser translocadas a partes distantes de la planta y allí activar mecanismos de defensa de naturaleza sistémica. Sin embargo, esta función está sometida a controversia. Con los datos disponibles en la actualidad, podemos probablemente asegurar que ambas moléculas juegan un papel señalizador en la activación de las correspondientes defensas, si bien su función no siempre es indispensable, sino que podrían también actuar como potenciadores de la acción de otras señales.

La activación de defensas frente a la herida producida por factores de estrés de origen tanto biótico como abiótico, así como el papel que juega el JA se han estudiado fundamentalmente en solanáceas y en *Arabidopsis* (León et al., 2001). En plantas solanáceas se ha propuesto una señalización activada por la herida que implica la participación sucesiva del péptido sistemina y la acción coordinada de las hormonas JA, etileno y ABA (Peña-Cortés et al., 1995; Ryan 2000). Sin embargo, en *Arabidopsis* se han propuesto rutas de señalización de la herida dependientes e independientes de JA (Titarenko et al., 1997) con una regulación por etileno (Rojo et al., 1999) distinta de

la señalización son más susceptibles al ataque por patógenos necrotróficos (Staswick et al., 1998; Vijayan et al., 1998; Thomma et al., 1998; Norman-Setterblad et al., 2000), pero se muestran más resistentes frente a estirpes virulentas biotróficas de bacterias y hongos (Feys et al. 1994; Petersen et al., 2000; Kloeck et al., 2001), lo que sugiere que la resistencia/susceptibilidad de la planta mediada por señalización dependiente de jasmonatos varía con el patógeno y el tipo de interacción planta-patógeno (Berger 2002). Por otro lado, se ha descrito que mutantes tanto deficientes como insensibles a JA son más susceptibles al ataque por insectos (McConn et al., 1997; Xie et al., 1998; Stotz et al., 2002).

El uso de mutantes afectados tanto en la síntesis como en la acumulación y percepción de salicilatos y jasmonatos ha permitido también sustentar la implicación de estas moléculas en la activación de defensas frente a factores de estrés de naturaleza abiótica. Entre los mejor estudiados, cabe destacar la respuesta a ozono, que provoca en la planta expuesta la aparición, dependiente de especies activas de oxígeno, de microlesiones similares a las que se producen durante la respuesta hipersensible a patógenos avirulentos. Esta respuesta incluye la activación de las rutas de señalización de SA y etileno y la participación de JA como factor que limita la extensión de las lesiones (Overmyer et al., 2000; Rao et al., 2000).

### **Interacciones regulatorias entre salicilatos y jasmonatos. Aproximaciones genómicas**

La activación de resistencia en plantas infectadas por patógenos no es un proceso simple sino que requiere de la participación de diversas rutas de señalización con sus correspondientes metabolitos intermediarios y que suelen conducir a la activación de genes de defensa. Por otro lado, otros factores de estrés que contribuyen también al establecimiento de resistencia son capaces de activar la síntesis y función de algunas de las señales y genes de defensa que son activadas por patógenos. Aunque hasta hace poco las secuencias de eventos implicados en la percepción y transducción de los diferentes factores de estrés se han considerado como procesos de señalización independientes, lo cierto es que las plantas han desarrollado mecanismos de control que requieren de la regulación cruzada entre diferentes vías, y que permiten de esta manera afinar la calidad y magnitud de sus respuestas de defensa al abanico de factores de estrés con el que se enfrenta y que, a menudo, pueden afectar a la planta de manera simultánea.

Las vías de señalización activadas por salicilatos y jasmonatos presentan numerosos puntos de interacción regulatoria que permiten coordinar la expresión de genes de defensa frente a estrés (Reymond y Farmer, 1998). Sin embargo, estas interacciones regulatorias se han estudiado hasta hace muy poco a nivel de uno o un grupo reducido de genes. Por ejemplo, se ha documentado el efecto inhibitorio de los salicilatos y patógenos sobre la expresión de genes activada por herida y jasmonatos (Peña-Cortés et al., 1993; Doares et al., 1995; Preston et al., 1999), pero sin

embargo, se han descrito también procesos en los que acción de salicilatos y jasmonatos es cooperativa (Norman et al., 1999; van Wees et al., 2000). Se ha descrito que las defensas frente a patógenos y frente a herida podrían estar interconectadas a nivel de fosforilación catalizada por MAP quinasa (Romeis et al., 1999). No obstante, la verdadera conexión regulatoria entre las diferentes vías de señalización requiere de un análisis más amplio no restringido a unos pocos genes. En este sentido, la aplicación de herramientas genómicas como el análisis transcriptómico mediante microarrays de ADN está permitiendo un abordaje global del análisis de la expresión génica en defensa activada por diferentes factores, y en concreto, por herida o insectos y patógenos, haciendo hincapié en el papel regulador de salicilatos y jasmonatos (Maleck et al., 2000; Reymond et al., 2000; Schenk et al., 2000; Sasaki et al., 2001; Stintzi et al., 2001). En uno de estos estudios, de un total de 2375 genes de *Arabidopsis* representados en el microarray utilizado para analizar los perfiles de expresión génica en plantas inoculadas con patógenos o tratadas con SA, JA o etileno, el mayor número de genes co-inducidos o co-reprimidos se detectó precisamente en los tratamientos con SA y JA (Schenk et al., 2000), desmintiendo la función antagonista que se había propuesto para estas dos fitohormonas previamente. Por otro lado, el uso de microarrays de ADN ha permitido identificar vías de señalización distintas activadas por herida mecánica o por mordedura de insectos, proponiéndose una componente dependiente de deshidratación necesaria en la activación génica por herida pero no en la producida por insectos (Reymond et al., 2000). Además, mediante el análisis transcriptómico comparado entre plantas silvestres y mutantes *coi1* y *opr3* insensibles y deficientes en JA, heridas o tratadas con JA o su precursor ácido 12-oxofitodienoico, se han identificado genes inducibles a través de rutas dependientes e independientes de COI1 y activados tanto por JA como por OPDA (Reymond et al., 2000; Stintzi et al., 2001).

## Perspectivas de futuro

La combinación de los resultados derivados de múltiples experimentos con microarrays de DNA con el análisis de la función de los genes seleccionados, mediante estrategias basadas en genética reversa como la generación de mutantes nulos de dichos genes por inserción de T-DNA o de elementos transponibles, servirá para dilucidar la naturaleza y función de los componentes implicados en las diferentes rutas de señalización así como los potenciales puntos de interconexión regulatoria. Una aproximación genómica como la que se empieza a utilizar debe completarse necesariamente con experimentos de proteómica y metabolómica que permitan identificar las proteínas que cumplen las correspondientes funciones reguladoras o señalizadoras, así como los metabolitos implicados en el proceso de señalización. En este sentido, la obtención de perfiles metabólicos complejos nos servirá para determinar las huellas metabólicas que confieren a una determinada condición de la planta la cualidad de activar programas tanto de desarrollo como de defensa.



- Hamberg, M., Fahlstadius, P.** (1990) Allene oxide cyclase: an enzyme in plant lipid metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 518-526.
- Heil, M., Baldwin, I.T.** (2002) Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends Plant Sci.* 2, 61-67.
- Hildmann, T., Ebnerth, M., Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J.J., Willmitzer L., Prat S.** (1992) General roles of abscisic acid and jasmonic acid in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4, 1157-1170.
- Hilpert, B., Bohlmann, H., op den Camp, R., Pryzbyla, D., Miersch, O., Cuchala, A., Apel, K.** (2001) Isolation and characterization of signal transduction mutants of *Arabidopsis thaliana* that constitutively activate the octadecanoid pathway and form necrotic microlesions. *Plant J.* 26, 1-14.
- Howe, G.A., Lightner, J., Browse, J., Ryan, C.A.** (1996) An octadecanoid pathway mutants (JL5) of tomato is compromised in signalling for defense against insect attack. *Plant Cell* 8, 2067-2077.
- Ibrahim, R.K., Towers, G.H.N.** (1959) Conversion of salicylic acid to gentisic acid and o-pyrocatechuic acid, all labelled with carbon-14, in plants. *Nature* 184, 1803.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Hishida, I., Okada, K.** (2001) The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2191-2209.
- Jarvis, A.P., Schaaf, O., Oldham, N.J.** (2000) 3-Hydroxy-3-phenylpropanoic acid is an intermediate in the biosynthesis of benzoic acid and salicylic acid but benzaldehyde is not. *Planta* 212, 119-126.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E.** (1999) *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13583-13588.
- Kloek, A.P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoeltz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F., Kunkel, B.N.** (2001) Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J.* 26, 509-522.
- Laudert, D., Weiler, E.W.** (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* 15, 675-684.
- León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J.** (2001) Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 52, 1-9.
- Linthorst, H.J.M.** (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 123-150.

- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I.** (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250, 1002-1004.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L., Dietrich, R.A.** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet.* 26, 403-10.
- Métraux, J-P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B.** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004-1006.
- Meyer, A., Miersch, O., Buttner, C., Dathe, W., Sembdner, G.** (1984) Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J. Plant Growth Regul.* 3, 1-8.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., Browse, J.** (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5473-5477.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W.** (1994) Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 218, 425-435.
- Norman, C., Vidal, S., Paiva, E.T.** (1999) Oligogalacturonide-mediated induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis in response to the cell-wall-degrading enzymes of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 12, 640-644.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., Palva, E.T.** (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 430-438.
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O., Bowles, D.J.** (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274, 1914-1917.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, H.K., Kangasjaervi, J.** (2000) The ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12, 1849-1862.
- Peña-Cortés, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E.W., Willmitzer, L.** (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191, 123-128.



- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J.** (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7209-7214.
- Ward, E.R., Ukness, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P, Métraux, J-P, Ryals, J.A.** (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- Watanabe, K., Fujita, T., Takimoto, A.** (1981) Relationship between structure and flower-inducing activity of benzoic acid derivatives in *Lemna paucicostata* 151. *Plant Cell Physiol.* 20, 847-850.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., Turner, J.G.** (1998) COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280, 1091-1094.
- Xu, L., Liu, F., Wang, Z., Peng, W., Huang, R., Xie, D.** (2001) An Arabidopsis mutants *cex1* exhibits constant accumulation of jasmonate-regulated AtVSP, Thi2.1 and PDF1.2. *FEBS Lett.* 494, 161-164.
- Zhou, J.M., Tootle, T.L., Tsui, F., Klessig, D.F., Glazebrook, J.** (1998) PAD4 functions upstream of salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1021-1030.
- Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., Klessig, D.F.** (2000) NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 191-202.

**POLIAMINAS, JASMÓNICO, SALICÍLICO**  
**Comunicaciones**



# CRECIMIENTO Y CONTENIDO EN POLIAMINAS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TRIGO PORTADORAS DEL GEN DE LA ADC DE AVENA

Gloria de la Viña, Teresa Altabella y Antonio Fernández Tiburcio

**Departament de Fisiologia Vegetal. Facultat de Farmacia.  
Universitat de Barcelona. Avenida**

**Diagonal 643, 08028-Barcelona**

## Sinopsis

En este estudio se han utilizado tres líneas transgénicas independientes de trigo (*Triticum aestivum*) conteniendo el gen de la arginina descarboxilasa (ADC) de *Avena sativa*, que fueron obtenidas mediante el método biobalístico de transformación genética. El crecimiento de estas tres líneas adctransgénicas (*adc-27*, *adc-35* y *adc-36*), fue significativamente superior al de las plantas control no transformadas. En el estadio de 3 hojas se determinó el peso seco total de las plántulas, distinguiendo entre parte aérea (hojas) y raíces. Para determinar el crecimiento relativo de las hojas respecto de las raíces, se calculó la proporción hojas/raíces referida a peso seco. Por otro lado, se analizó el contenido en poliaminas de la hoja más joven completamente desarrollada y de las raíces. Posteriormente, se establecieron correlaciones entre el contenido de las distintas poliaminas (putrescina, espermidina y espermina), y los valores de peso seco de la raíz y de las hojas, así como con el cociente hojas/raíces. Estas correlaciones se establecieron tanto para los valores de poliaminas totales como para sus distintas fracciones (libre, conjugada soluble y conjugada insoluble). Todas las líneas transgénicas presentaron un mayor crecimiento de la parte aérea que las plantas control, así como un mayor contenido de espermina total en hoja y raíces, proporcional a dicho crecimiento. Ni la putrescina, ni la espermidina mostraron altos índices de correlación con el aumento del crecimiento observado en las líneas transgénicas. Los resultados obtenidos muestran una correlación directa entre el contenido en espermina total en hoja y el aumento del cociente hojas/raíces, mientras que esta correlación es inversamente proporcional al contenido de espermina total en la raíz. La línea *adc-27* mostró un aumento significativo del cociente hojas/raíces comparando con las líneas *adc-35* y



*adc-36* Esta línea también presentó los valores más altos de espermina total en la hoja y los más bajos en las raíces. Nuestros resultados sugieren que la espermina, a pesar de ser la poliamina minoritaria, sería la principal implicada en la promoción del crecimiento observado en las plantas *adc*-transgénicas de trigo.

## Introducción

Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) han sido descritas como factores inductores del crecimiento en todo tipo de organismos; bacterias, levaduras, plantas y animales. En plantas se ha comprobado que las poliaminas estimulan la división celular en cultivos *in vitro* de protoplastos, entrenudos, frutos y meristemos. (1). En plantas, la síntesis de putrescina, precursora de espermidina y espermina, está mediada por dos enzimas, la ornitina descarboxilasa (ODC) y la arginina descarboxilasa (ADC), al igual que ocurre en bacterias y al contrario de lo que ocurre en animales, donde únicamente está presente la ODC. La función de las poliaminas en la división celular y la morfogénesis ha sido estudiada tradicionalmente utilizando distintos tipos de sistemas experimentales; (i) estableciendo correlaciones entre contenido en poliaminas, la actividad de sus enzimas biosintéticas y la división celular o procesos morfogénicos, (ii) estudiando el efecto de la aplicación de poliaminas exógenas sobre la división celular, (iii) estudiando el efecto de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas sobre procesos morfogénicos y, (iv) utilizando plantas mutantes para el metabolismo de las poliaminas. La aplicación de las técnicas de transformación genética constituye una herramienta útil de cara a obtener información sobre la función de genes biosintéticos de poliaminas en los procesos del crecimiento y morfogénesis. El estudio de estos procesos en plantas de la importancia del trigo posee un interés añadido, debido a que esta planta constituye una fuente de alimento preferente a nivel mundial.

Para este estudio se han utilizado tres líneas transgénicas de trigo conteniendo el gen de la arginina descarboxilasa (*adc*) de *Avena sativa* (2), que fue clonado en dirección sentido bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S y el intrón de *Zea mays Adh1 Intr1*. Dichas líneas transgénicas fueron producidas por De la Viña et al. (3) en el Grupo de Transformación de Cereales de la Estación Experimental de Rothamsted (UK) y seleccionadas por su tolerancia al estrés salino por De la Viña et al. (4) en el Grupo de Biología del Estrés de dicha Estación Experimental. Las líneas transgénicas se encontraban en su generación  $T_3$  y constituían líneas transgénicas homocigotas. Para realizar este trabajo, se sembraron en invernadero 10 plantas por cada línea transgénica, y sus controles, en una mezcla al 50% (v/v) de vermiculita y perlita en macetas de 8 cm de diámetro y 15 cm de altura. Como solución nutritiva se utilizó Hoagland al 50%. Cuando las plantas se encontraban en el estadio de desarrollo 13 (5) (3 hojas completamente desarrolladas), 5 de ellas se utilizaron para obtener el peso seco (48 h en estufa a 80 °C) de hojas y raíces y otras 5 para llevar a cabo el análisis de poliaminas en hojas y raíces, siguiendo el método descrito por Marcé et al. (1995) (6). Se analizó la hoja más joven completamente desarrollada de cada planta y la totalidad de sus raíces.

## Resultados y Discusión

Todas las líneas transgénicas analizadas presentaron un mayor crecimiento de la parte aérea que las plantas control, así como un mayor contenido en espermina total en hoja y raíces, proporcional a dicho crecimiento. Los resultados obtenidos muestran una correlación directa entre el contenido en espermina total en hoja y el aumento de la proporción hojas/raíces, mientras que esta correlación es inversamente proporcional al contenido de espermina total en la raíz. La línea *adc-27* mostró un aumento significativo del cociente hojas/raíces comparando con las líneas *adc-35* y *adc-36*, así como los valores más altos de espermina total en hoja y más bajos en raíz. De la espermina presente en el tallo, el 53% se encontraba en su forma conjugada soluble, el 32 % como espermina libre y sólo el 15% como espermina conjugada insoluble, es decir, unida a membranas, proteínas y paredes celulares. En raíz estos porcentajes fueron muy diferentes, ya que el 100% de la espermina estaba en su forma conjugada insoluble. Resultados similares se encontraron en las distintas líneas transgénicas y en las plantas no transformadas. La cantidad de espermina total en hoja oscila entre 8 y 20 nmoles/g peso fresco, 4 veces menor que el total de putrescina y 10 veces menor que el total de espermidina. En raíz la cantidad de espermina total es del orden de 10 veces menor que en el tallo, entre 0.9 y 1.6 nmoles/g peso fresco, lo que representa que en raíz el contenido total de ésta poliamina es del orden de 10 veces menor que el contenido de espermidina total y 100 veces menor que el contenido de putrescina total. Ni la putrescina, ni la espermidina mostraron altos índices de correlación con el aumento del crecimiento observado en las líneas transgénicas. Nuestros resultados sugieren que la espermina, a pesar de constituir la poliamina minoritaria, sería la principal responsable de la promoción del crecimiento observado en las plantas *adc*-transgénicas de trigo. La atribución de este aumento de crecimiento a la presencia del transgen *adc* de avena podrá establecerse cuando se analice su expresión por northern.

Shen y Galston (8) realizaron un estudio en el que correlacionaban el contenido de poliaminas con el crecimiento de plántulas de las especies *Pisum sativum*, *Lycopersicon esculentum* y *Pennisetum*. Estos autores observaron que la espermina, junto con la espermidina, eran más abundantes en los ápices y que su contenido disminuía progresivamente al aumentar la edad de la planta. La espermina era pues más abundante en aquellos tejidos que presentaban una capacidad de división celular más alta. Si la mayor biomasa observada en las plantas transgénicas analizadas fuera un reflejo de la mayor actividad de división celular en sus meristemas, podríamos concluir que las plantas *adc*-transgénicas presentaron un aumento de la tasa de división celular, particularmente en las hojas, respecto de las plantas no transformadas. Ya que este aumento de biomasa se correlaciona con un aumento de espermina total, tanto en hoja como en raíz, podríamos proponer la hipótesis de que la espermina podría ser la principal responsable del estímulo del crecimiento observado en las líneas *adc*-transgénicas de trigo.



## Bibliografía

- Egea-Cortines, M. y Mizrahi, Y.** (1991). Polyamines in cell division, fruit set and development, and seed germination. In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, 144-158 pp. Slocum R.D. & Flores H.E. (eds). CRC Press, London.
- Bell, E. y Malberg, R.L.** (1990). Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidence protein processing. *Mol. Gen. Genet.* 224, 431-436.
- De la Viña, G., Doherty, A., Lazzeri P., Lawlor, D.W., Tiburcio, A., Barceló, P.** (1998). In: *Proceedings of SEB workshop. Molecular Physiology 11. Engineering Crops for Hostile Environments.* Association of applied biologists. The society for experimental biology (SEB). IACR-Rothamsted, Harpenden, UK.
- De la Viña, G., Driscoll, S.D., Wallsgrave, R., Lawlor, D.W.** (2001). Polyamines and salt stress tolerance: initial physiological study in GM wheat. Cost Action 917 "Biogenically active amines in food". gth workshop. Final and General Workshop on Biogenic Amines in Food. Krems, Austria (in press).
- Zadocs, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F.** (1974). A decimal code for the growth of cereals. *Weed Research* 14: 415-421.
- Marcé, M., Brown, D.S., Capell, T., Figueras, X., Tiburcio, A.F.** (1995). Rapid high-performance liquid chromatographic method for quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues.
- Shen, H.-J. y Galston, A.W.** (1985). Correlations between polyamine ratios and growth patterns in seedling roots. *Plant Growth Regulation* 3: 353-363.

## Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por la "European Science Foundation" (Estrasburgo, Francia), mediante una beca postdoctoral concedida a Gloria de la Viña en el "Plant Adaptation ESF Scientific Programme", así como por los fondos del Grupo de Poliaminas dirigido por el Dr. Antonio Fernández Tiburcio y Teresa Altabella (Departament de Fisiologia Vegetal, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona). Agradecemos al Dr. David W. Lawlor (Crop Performance and Improvement Division, Rothamsted Experimental Station, UK) su apoyo para la obtención de esta beca.

Las plantas adc-transgénicas analizadas fueron producidas por Gloria de la Viña en la Estación Experimental de Rothamsted (Harpenden, UK), durante una estancia postdoctoral financiada por el antiguo Ministerio de Educación y Ciencia.

## EFFECTOS FENOTÍPICOS ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE LA ARGININA DESCARBOXILASA 2 DE *Arabidopsis*

Rubén Alcázar, Antonio F. Tiburcio, Teresa Altabella \*

**Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia,  
Universidad de Barcelona. Avda Diagonal, 643 – 08028 Barcelona**

\*E-mail : [taltab@farmacia.far.ub.es](mailto:taltab@farmacia.far.ub.es)

### Sinopsis

La expresión constitutiva del gen ADC2 de *Arabidopsis* provoca alteraciones en el desarrollo de la planta que se relacionan con los niveles de putrescina alcanzados. Los datos obtenidos sugieren que la putrescina libre, y no sus productos de degradación, es la responsable directa o indirecta de estas alteraciones.

### Introducción

En plantas, la putrescina puede formarse por descarboxilación de ornitina, catalizada por el enzima ornitina descarboxilasa (ODC), o bien a través de la descarboxilación de arginina mediada por el enzima arginina descarboxilasa (ADC). Si bien se han clonado las ODC de *Datura stramonium* y tabaco, y se ha detectado actividad enzimática ODC en diferentes especies vegetales, en *Arabidopsis* no se conservan secuencias totales ni parciales homólogas a las ODC conocidas ni se ha detectado actividad ornitina descarboxilasa (Hanfrey y col. 2000). Así en *Arabidopsis* las ADC son las únicas enzimas implicadas en la biosíntesis de Put, que posteriormente puede ser transformada en espermidina (Spd) y espermina (Spm), a través de las enzimas espermidina sintasa (SpdSin) y espermina sintasa (SpmSin), respectivamente. En *Arabidopsis* existen dos isoformas para las ADC (ADC1 y ADC2), que presentan un diferente patrón de expresión. Así, la ADC2 está implicada en procesos de respuesta a estrés osmótico, mientras que la ADC1 se expresa de forma constitutiva (Soyka y Heyer 1999). Mediante el clonaje del cDNA que codifica la ADC2, bajo el promotor constitutivo CaMV35s, hemos obtenido plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con una expresión constitutiva del gen ADC2 que se relaciona con un incremento significativo de los niveles de Put y se asocia a un fenotipo de enanismo.



## Resultados y discusión

Tras la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* que contenía la construcción pBIN19-ADC2 sentido se obtuvieron 11 transformantes. Las líneas con mayores niveles de transcrito ADC2, presentaron un marcado retraso en el desarrollo y murieron en forma de roseta basal con dos pares de hojas expandidas y acumulación de antocianinas en los meristemos apicales. La acumulación de estos pigmentos se pudo revertir por aplicación de DFMA, pero no se consiguió que se desarrollara la planta adulta. El resto de líneas sobreexpresoras ADC2 (líneas 2, 3 y 9) mostraron un marcado retraso en la elongación y la floración, y las plantas adultas presentaban menor tamaño que las control; mientras que las líneas con menor expresión del transgén (línea 7), o sin modificaciones en su expresión (líneas 1, 4, 11), no mostraron alteraciones fenotípicas. En los ensayos de actividad enzimática ADC se obtuvieron valores que correlacionaban con los niveles de expresión del transgén, y lo mismo ocurrió con las cantidades de Put acumulada. Los niveles de actividad DAO (enzima implicada en la degradación de la Put) fueron similares a los detectados en las plantas control, e incluso se veían disminuidos en las líneas sobreexpresoras, quizás como consecuencia de la saturación del enzima por el incremento de sustrato (Put).

Las líneas 2, 3 y 9 mostraron niveles de Put 15 veces superiores al fenotipo salvaje, mientras que la línea 7, presentó un incremento de 5 veces. Este incremento fue debido a la Put libre, ya que los niveles de Put conjugada a compuestos solubles e insolubles no mostraron diferencias significativas, a excepción de la línea 3 que mostró un incremento en los niveles de Put conjugada de la fracción soluble muy superior a la planta salvaje. Los niveles de Spd y Spm libre y conjugada no experimentaron diferencias significativas respecto al control. Este dato nos sugiere que la conversión de Put a Spd es un paso altamente regulado en *Arabidopsis*, y que las enzimas S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) y/o SpdSin pudieran actuar como limitantes.

Los niveles de expresión de los demás genes implicados en la ruta biosintética no variaron significativamente en relación con los observados en la planta salvaje. Así los niveles de transcrito SAMDC para las líneas sobreexpresoras no sufrieron modificación respecto al control, lo cual, junto con el hecho de que no se detectaran incrementos en los niveles de Spd y Spm ni sus productos de degradación, nos indujo a pensar que los fenotipos mostrados no se relacionaban con el etileno, para cuya biosíntesis se utiliza un sustrato común (S-adenosilmetionina) en competencia con la biosíntesis de Spd y Spm.

Si bien la planta adulta es de menor tamaño que el control, la cinética de elongación del hipocotilo en plántulas etioladas no mostró ninguna diferencia con el control. Según estos datos el menor tamaño de la planta adulta no se explicaría por un defecto en el proceso de la elongación celular (Gendreau y col. 1997). Tampoco se consiguió revertir el fenotipo por aplicación de hormonas implicadas en procesos de elongación, como son las giberelinas (GA3) y las auxinas (IAA, 2,4-D).

Mediante estudios de microscopía óptica y electrónica en cortes transversales de tallo, hoja y raíz, observamos que las líneas con fenotipo más marcado presentaban alteraciones importantes en el tejido vascular, especialmente en el floema. Asimismo observamos acúmulos de cuerpos electrodensos en el interior de la vacuola, especialmente en las células del córtex de la raíz, sin que su naturaleza haya sido acualmente dilucidada. Todos estos datos nos sugieren que la Put libre, y no sus productos de degradación es la responsable directa o indirecta del fenotipo mostrado, y formulamos la hipótesis de que el fenotipo de enanismo podría estar relacionado con una incapacidad de la planta para el correcto transporte de nutrientes debido a las alteraciones en el tejido vascular.

Actualmente estamos intentando determinar la diana sobre la cual actúa la Put mediante la utilización de técnicas de biología molecular, con el fin de conocer los posibles mecanismos de acción y rutas de señalización de las poliaminas en plantas.



## Bibliografía

- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., Hofte, H.** (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 114: 295-305
- Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M.J., Burtin, D., Michael, A.** (2001) *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J.* 27: 551-160.
- Soyka, S., Heyer, A.** (1999) *Arabidopsis* knockout mutation of ADC2 gene reveals inducibility by osmotic stress. *FEBS Lett.* 458: 219-223.

# LA MUTACIÓN PAT-2, QUE INDUCE EL DESARROLLO PARTENOCÁRPICO DEL FRUTO EN TOMATE, ALTERA EL METABOLISMO DE POLIAMINAS EN OVARIOS NO POLINIZADOS

K. Proaño<sup>1</sup>, M. Fos<sup>1,2</sup>, D. Alabadí<sup>1</sup>, F. Nuez<sup>3</sup>, J. Carbonell<sup>1</sup>, J.L. García-Martínez<sup>1</sup>

**Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas<sup>1</sup>, Departamento de Biología Vegetal<sup>2</sup> (mfos@bvg.upv.es) y Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad<sup>3</sup>; Universidad Politécnica de Valencia**

## Sinopsis

La partenocarpia facultativa inducida por la mutación recesiva *pat-2* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) depende de giberelinas (GAs) y está asociada a cambios en el contenido de GAs en los ovarios no polinizados. En este trabajo se investiga si *pat-2* altera en estos ovarios el contenido y metabolismo de poliaminas (PAs). La aplicación de  $\alpha$ -difluorometilornitina (DFMO) [inhibidor irreversible de la ornitina descarboxilasa (ODC)] a ovarios emasculados de la línea partenocárpica MA/*pat-2* inhibió el desarrollo partenocárpico del fruto. El efecto inhibitorio no fue revertido con la aplicación conjunta de espermidina pero sí con la aplicación de GA<sub>3</sub>. En los ovarios no polinizados MA/*pat-2* el contenido de putrescina fue menor y los contenidos de espermidina y espermina fueron superiores que en los ovarios MA/wt. El nivel de transcritos de un gen que codifica arginina descarboxilasa (ADC) fue similar en los ovarios MA/wt y MA/*pat-2* mientras que el nivel de transcritos de los genes que codifican ODC y espermidina sintasa fueron superiores en los ovarios MA/*pat-2*. La actividad ODC también fue superior en los ovarios MA/*pat-2*. Los resultados muestran que las PAs son necesarias para el desarrollo partenocárpico de los frutos *pat-2*. La biosíntesis de poliaminas y los contenidos de espermidina y espermina son mayores en los ovarios *pat-2* antes de la antesis por activación de la ruta ODC de biosíntesis de putrescina.

## Introducción

La partenocarpia es una ruta alternativa al desarrollo del fruto con semillas, que implica el crecimiento del ovario en ausencia de polinización y fecundación. El desarrollo de un fruto sin semillas puede ser inducido por aplicaciones exógenas de fitohormonas o estar controlado genéticamente. En este último caso se ha sugerido que la expresión de genes de partenocarpia afectaría a la producción, metabolismo y/o transporte de hormonas produciendo una concentración suficiente en el ovario para inducir el cuajado en ausencia de polinización y/o fecundación (Gillaspy *et al.* 1993). En el caso del mutante de tomate *pat-2*, la expresión de la partenocarpia depende de GAs y está asociada al mayor nivel endógeno de GAs activas en los ovarios antes de la polinización (Fos *et al.* 2000).

No se conocen referencias sobre la inducción del cuajado y desarrollo del fruto no polinizado por aplicación de poliaminas. Sin embargo, resultados de aplicación de inhibidores de su biosíntesis a frutos polinizados, medidas de niveles de poliaminas y de transcritos y actividades de las enzimas de la ruta de biosíntesis indican que las poliaminas podrían tener un papel en el desarrollo del fruto en tomate y otras especies (Cohen *et al.* 1982; Egea-Cortines y Mizrahi 1991; Alabadí *et al.* 1996; Alabadí y Carbonell 1998).

En este trabajo se ha investigado el papel de las poliaminas en el desarrollo partenocárpico del fruto en tomate *pat-2*. Para ello se han realizado: a) aplicaciones de PAs e inhibidores de biosíntesis de PAs (DFMO) a ovarios MA/wt y MA/*pat-2* no polinizados, y b) determinaciones de los contenidos de PAs, niveles de transcritos de genes que codifican enzimas de su biosíntesis (ODC, ADC y espermidina sintasa) y actividades de la ODC y ADC en ovarios no polinizados (en botón floral, preantesis y antesis) de MA/wt y MA/*pat-2*. En conjunto los resultados obtenidos indican que las PAs poseen cierta capacidad para inducir el desarrollo partenocárpico del fruto en tomate y que son importantes para inducir el desarrollo del fruto controlado por *pat-2*. Esta mutación activaría específicamente la ruta ODC de biosíntesis de putrescina incrementando el nivel de transcritos de la ODC y la actividad ODC en los ovarios antes de la antesis.

## Resultados y discusión

La aplicación de espermidina (1 mM) a ovarios no polinizados MA/wt indujo parcialmente el cuajado (38%) y produjo frutos con un 50% de peso que el de los frutos polinizados. Los tratamientos con putrescina (1 mM) y espermina (1 mM) fueron menos efectivos que los de espermidina tanto sobre el cuajado como sobre el desarrollo del fruto. Estos resultados sugieren que las PAs están implicadas en el desarrollo del fruto en tomate.

En el caso de los ovarios no polinizados MA/*pat-2* la aplicación de DFMO (1 mM) inhibió completamente el crecimiento partenocárpico, GA<sub>3</sub> (2 µg) revertió el efecto

inhibidor del DFMO, completamente el cuajado y parcialmente el peso del fruto. Esta inhibición, sin embargo, no pudo ser revertida con la aplicación de espermidina.

El contenido medio en los ovarios (media de los tres estadios del desarrollo floral) de putrescina (200 a 250  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF) fue superior que el contenido medio de espermidina (100 a 140  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF) y éste superior al contenido medio de espermina (20 a 40  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF). El contenido medio de putrescina fue 20% superior en los ovarios MA/wt que en los ovarios MA/pat-2 mientras que los de espermidina y espermina fueron entre un 20 y un 80%, respectivamente, superiores en los ovarios MA/pat-2 que en los ovarios MA/wt.

Los niveles de transcritos del gen de la ADC fueron similares en ovarios MA/wt y MA/pat-2. Por el contrario, en el caso del gen de la ODC los niveles de transcritos en los ovarios MA/pat-2 fueron muy superiores a los de MA/wt (sobre todo en botón floral y preantesis). Para el gen de la espermidina sintasa, el patrón de niveles de transcritos fue similar al encontrado para el gen de la ODC, aunque las diferencias entre MA/wt y MA/pat-2 fueron menores que para el gen de la ODC.

Se ha medido las actividades ADC y ODC en los ovarios wt y pat-2 para determinar si las diferencias observadas en los niveles de poliaminas y transcritos estaban asociadas a diferencias en las actividades de los enzimas de biosíntesis. Dichas actividades no variaron significativamente durante el desarrollo de la flor en las dos líneas. Los valores medios de la actividad ADC no fueron diferentes entre ambas líneas, pero la actividad ODC fue significativamente mayor (50%) en los ovarios MA/pat-2 que en los ovarios MA/wt.

Los resultados obtenidos sugieren que las poliaminas son necesarias para el desarrollo partenocárpico del fruto pat-2. Esta mutación activaría específicamente la ruta ODC de biosíntesis de putrescina aumentando el nivel de transcritos y la actividad ODC en el ovario antes de la antesis lo que conduciría a un mayor nivel de PAs.



# CONTROL DEL TIEMPO DE FLORACIÓN POR ÁCIDO SALICÍLICO EN *Arabidopsis*

Cristina Martínez y José León

**Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV), Avda. de los Naranjos s/n, 46022 Valencia.**

**E-mail: [crimarhe@doctor.upv.es](mailto:crimarhe@doctor.upv.es)**

## Sinopsis

Genotipos transgénicos y mutantes de *Arabidopsis* deficientes en los niveles endógenos de ácido salicílico (SA) muestran fenotipos de floración tardía tanto en condiciones de fotoperiodo de días largos como cortos. Este fenotipo es más acusado en días cortos y se correlaciona con niveles más elevados del transcrito del gen *FLC*, represor de la floración en *Arabidopsis*. El fenotipo de floración tardía de plantas deficientes en SA se puede rescatar parcialmente por aplicación de SA exógeno en mutantes *eds5* y *sid2*, afectados en la síntesis de SA pero no en su acumulación, pero no en plantas transgénicas *nahG* incapaces de acumular SA debido a que lo metabolizan, con alta eficiencia, hasta catecol. La vernalización de plantas *eds5*, *sid2* y *nahG* reduce los niveles de *FLC* y el tiempo de floración, a través de una vía independiente de SA. En días largos, el fenotipo de floración tardía se correlaciona con niveles reducidos de expresión de los genes *CO*, *FT* y *SOC1*, y con una ligera elevación de los niveles de expresión de *FLC*.

## Introducción

La transición del estado vegetativo a reproductivo en *Arabidopsis* está regulada por mecanismos multifactoriales (Simpson et al., 1999; Araki 2001) que implican la existencia de al menos cuatro vías de promoción a la floración: la dependiente de fotoperiodo activa en días largos; la autónoma, independiente de fotoperiodo; la activada por vernalización; y la activada por giberelinas, esencial en días cortos. Los productos de genes como *CO*, *FT* y *SOC1* han sido caracterizados como inductores de la floración en días largos, mientras que el producto de *FLC* es un represor universal de la floración (Michaels y Amasino, 1999). La transición a la floración puede



también activarse en plantas sometidas a estrés (Levy y Dean, 1998). En la década de los 70 se sugirió que el ácido salicílico (SA), una molécula con función reguladora en defensa frente a estrés en plantas (Raskin 1992), podría promover la floración (Cleland y Ajami, 1974). La disponibilidad de mutantes deficientes en SA como *eds5/sid1* y *sid2* (Nawrath y Métraux, 1999), afectados en la síntesis, y de plantas transgénicas *nahG*, que no acumulan SA al metabolizarlo hasta catecol por acción de una salicilato hidroxilasa bacteriana (Delaney et al., 1994), nos han permitido correlacionar la deficiencia en SA con fenotipos de floración tardía y caracterizar la función de SA en el control del tiempo de floración en *Arabidopsis*.

## Resultados y Discusión

Hemos determinado el tiempo de floración, mediante el conteo de hojas totales a la subida a flor, en plantas silvestres Col y en los genotipos deficientes en SA, *nahG*, *eds5* y *sid2*, en diferentes fotoperiodos. El fenotipo tardío es muy acusado en días cortos y se correlaciona con elevados niveles del transcrito de *FLC* y con la aparición de rosetas aéreas en lugar de hojas caulinares en los tres genotipos SA-deficientes. El fenotipo de floración tardía de las plantas SA-deficientes, tanto en días largos como cortos, puede revertirse parcialmente por elevación de los niveles endógenos de SA, por aplicación exógena o por irradiación con luz UV, en los genotipos afectados en la síntesis de SA (*eds5* y *sid2*) pero no en las líneas transgénicas afectadas en la acumulación (*nahG*). En cambio, la vernalización es capaz de reducir el tiempo de floración y los niveles del transcrito de *FLC* tanto en *nahG* como en los mutantes *eds5* y *sid2*.

El fenotipo tardío menos marcado observado en días largos es presumiblemente motivado por la reducción en los niveles de expresión de los genes de tiempo de floración de la ruta dependiente de fotoperiodo (*CO*, *FT* y *SOC1*) y la elevación en los niveles del transcrito de *FLC*. Proponemos un modelo en el que el SA sería capaz de regular el tiempo de floración en *Arabidopsis* a través de al menos tres vías diferentes: 1) una ruta dependiente de fotoperiodo en la que SA podría inducir la expresión de *CO* o de sus dianas *FT* y *SOC1*, o bien, reprimir *FLC* que es a su vez represor de dichos genes; 2) una ruta independiente de fotoperiodo y dependiente de *FLC* activa en días cortos; y quizás, 3) una ruta independiente de *FLC* promovida por vernalización. Estamos completando estos datos con la obtención de dobles mutantes SA-deficientes y mutados en genes implicados en las diferentes rutas de transición a la floración descritas previamente, y la posterior determinación del tiempo de floración y niveles de expresión de genes de tiempo de floración en los mismos.



## Bibliografía

- Araki, T.** (2001) Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 63-68.
- Cleland, C.F., Ajami, A.** (1974) Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiol.* 54, 904-906.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J.** (1994) A central role for salicylic acid in plant resistance. *Science* 266, 1427-1450.
- Levy, Y.Y., Dean, C.** (1998) The transition to flowering. *Plant Cell* 10, 1973-1989.
- Michaels, S.D., Amasino, R.M.** (1999) *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11, 949-956.
- Nawrath, C., Métraux, J-P.** (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11, 1393-1404.
- Raskin, I.** (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 439-463.
- Simpson, G.G., Gendall, A.R., Dean, C.** (1999) When to switch to flowering. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 99, 519-550.



## SEÑALIZACIÓN DE ETILENO Y ÁCIDO JASMÓNICO EN LA RESPUESTA A PATÓGENOS EN *Arabidopsis*. PAPEL DE ERF1 (*ethylene-response-factor1*)

Oscar Lorenzo, José Juan Sánchez-Serrano y Roberto Solano

**Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Campus de la Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049-Madrid.**

**E-mail: [olorenzo@cnb.uam.es](mailto:olorenzo@cnb.uam.es)**

### Sinopsis

Las rutas de señalización de etileno (E) y ácido jasmónico (JA) son esenciales para la defensa de las plantas frente al ataque por patógenos necrotrofos. Actualmente, la cascada de transducción de señales de E en *Arabidopsis* se conoce en profundidad, mientras que los mecanismos moleculares por los que actúa el JA aún no se han esclarecido. Con el fin de entender el papel del JA en las respuestas de defensa de las plantas a patógenos necrotrofos hemos ideado un nuevo método de búsqueda de mutantes de respuesta a JA, que nos ha permitido identificar tres nuevos loci implicados en la señalización de esta hormona, denominados *JAI1*, 2 y 3 (*Jasmonic Acid Insensitive*) cuyo clonaje y caracterización molecular se está llevando a cabo.

Un elemento clave en la activación de los mecanismos de defensa dependientes de E y JA es ERF1 (*Ethylene-Response-Factor1*). La expresión de *ERF1* se induce tras infección por *Botrytis cinerea* y por tratamientos con JA y con E. La inducción por cualquiera de estas hormonas no ocurre en mutantes *ein2* o *coi1*, lo que sugiere un papel de ERF1 como posible integrador de las señales de ambas rutas (E y JA) en respuesta a patógenos. Para entender como ERF1 regula estas respuestas hemos realizado un análisis del transcriptoma de plantas que sobreexpresan ERF1, observando que se expresan constitutivamente un gran número de genes relacionados con la defensa.



## Bibliografía

- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F. and Cammue, B.P.A.** (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.*, 13, 63-68.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q.M. and Ecker, J.R.** (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development*, 12, 3703-3714.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. and Solano, R.** (2002) Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal*, 29, 23-32.

**ABA**  
**Revisiones**



## RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS

*Claudia Nieva, Adela Goday y Montserrat Pagès*

**Departamento de Genética Molecular. Instituto de Biología Molecular de Barcelona. Centro de Investigación y Desarrollo. C.S.I.C. Barcelona.**

**E-mail: [mptgmm@cid.csic.es](mailto:mptgmm@cid.csic.es)**

La respuesta fisiológica de la planta al estrés osmótico puede producirse mediante cambios físicos a nivel celular, como disminución de la turgencia, cambio en el volumen de la célula o en el contenido en solutos del citoplasma. Estos cambios activan una ruta de transducción de señal, transformando un estrés físico en una respuesta bioquímica.

Por la ruta de transducción se envía el mensaje a través de una cadena molecular en la que intervienen mensajeros secundarios (calcio), y otros intermediarios como la ADP-Ribosa cíclica, kinasas y fosfatasas, hasta los factores de transcripción, que regularán la expresión de los genes encargados de la respuesta al estrés. La hormona vegetal ácido abscísico (ABA) juega un papel importante en la señalización del estrés osmótico. Los niveles de ABA aumentan en respuesta al estrés hídrico y participan en la tolerancia de las plantas a sequía, salinidad y frío. La expresión de un gran número de genes es inducida por ABA y/o estrés (Figura 1).

El estudio de promotores ha identificado un número limitado de elementos cis importantes para la regulación del gen. Entre ellos destacan dos tipos: el elemento ABRE (ABA response element), de respuesta a ABA, y el elemento DRE (Drought Response Element), de respuesta a sequía pero independiente de ABA y que tienen un papel preponderante en la regulación génica.

El elemento ABRE, está definido por la secuencia central ACGT y se une a proteínas del tipo cremallera de leucina (bZip). Fue identificado por primera vez en el gen Em del trigo, y se ha demostrado que este elemento es funcional en maíz, trigo, arroz, tabaco y Arabidopsis. Sin embargo el motivo ACGT se encuentra también en otros elementos cis responsables de la respuesta a distintos estímulos, como luz, auxinas, ácido jasmónico y ácido salicílico. Es pues importante determinar los elementos responsables de la especificidad de la respuesta. Es posible que las secuencias que



En la embriogénesis tardía, cuando el embrión sufre una deshidratación progresiva y severa, se expresan una serie de genes que están relacionados con la tolerancia a la desecación. Sus mRNAs se expresan de un modo coordinado (son los denominados genes *lea*) y durante la germinación, cuando se produce la hidratación de la semilla, desaparecen. El ABA es un prerrequisito para su expresión, aunque los niveles de la hormona en condiciones normales se halla muy por encima de las condiciones requeridas para su inducción. Los genes *rab17* (Pla 1989, Viladell 1990) *rab28* (Pla 1991), *Em* y *Cat1* (Williamson y Scandalios 1992) son algunos ejemplos de genes que se expresan abundantemente en los embriones maduros del maíz (Figura 3).

En tejidos embrionarios del maíz existe un factor de transcripción, el VP1, específico de la semilla que controla diversos genes inducidos por ABA interaccionando con las regiones reguladoras de los genes que responden al ácido abscísico e intensificando su expresión (McCarty 1995). La identificación de este factor de transcripción se ha logrado mediante de los mutantes *vp1* del maíz y *abi3* de *Arabidopsis* y se ha demostrado la conservación de este gen entre mono y dicotiledóneas (Giraudaut 1992). Estos mutantes tienen niveles normales de ABA pero son insensibles al tratamiento con ABA exógena. Los genes inducidos por ABA, *rab28* y *Em* se expresan poco en los mutantes *vp1*, a no ser que sean tratados previamente con ABA (Pla 1991, Williamson y Scandalios 1992). Sin embargo, las proteínas VP1 y ABI3 no se pueden considerar partes integrantes de la vía de señalización por ABA porque tienen funciones independientes del ABA. Son elementos de distintas vías que se estimulan a través de la inducción de genes diana comunes. Las proteínas VP1/ABI3 podrían considerarse factores de transcripción multifuncionales que integran las señales de la vía del ABA y de otros reguladores durante la maduración de la semilla, probablemente interaccionando con distintos factores trans que aún están por identificar.

Muchos de los genes inducidos durante la embriogénesis tardía se pueden inducir con un tratamiento de ABA exógena tanto en el embrión como en los tejidos vegetativos (Gómez 1988, Mundy y Chua 1988, Bohnert 1995). Asimismo, una situación de deshidratación en un tejido vegetativo que provoca un aumento endógeno del ABA, induce a su vez, la expresión de estos genes.

Existen también genes que responden al ABA y que sólo se expresan en tejidos vegetativos. Tal es el caso del gen *rab16D* que se expresa exclusivamente en tejidos vegetativos del arroz (Yamaguchi-Shinozaki 1989). En el tomate, dos genes de respuesta al ABA, el *le25* y *le4* se expresan en el embrión maduro y en respuesta al estrés (Bray 1993). La respuesta a la desecación requiere ABA puesto que no se inducen en los mutantes de tomate flaca deficientes en ABA. El mRNA de *le25* se acumula preferentemente en embriones, mientras que el mRNA de *le4* se acumula más en tejidos vegetativos sometidos a estrés (Cohen 1991). Por otro lado, ambos se inducen (aunque en distinto grado) en hojas y no en las raíces durante estrés hídrico, mientras que su expresión es más elevada en raíces cuando el estrés es de salinidad. El nivel de ABA logrado en los tejidos a consecuencia de los distintos estreses no tiene correlación con



el nivel de expresión de los genes. Es posible que la desecación induzca una mayor sensibilidad al ABA en hojas mientras que la salinidad lo haga en las raíces. También, existe otro gen de tomate, el *le16*, que es inducible en hojas y nunca en raíces por desecación ó salinidad. En resumen, parece ser que los distintos genes que responden al ABA tienen un patrón de expresión específica de órganos que es totalmente independiente de los niveles absolutos del ABA en el tejido, lo que indica que en su expresión diferencial posiblemente intervengan otros factores.

## Genes dependientes e independientes de ABA en repuesta al estrés

Existen otros genes que siendo inducibles por tratamiento con ABA en tejidos vegetativos, también lo son por frío en mutantes deficientes en ABA o en presencia de inhibidores de la biosíntesis de la hormona, lo que sugiere que el ABA no es necesario para su inducción (Gilmour y Tomashow 1991, Nordin 1991). Tal es el caso del gen *rab18* cuya expresión es modulada por ABA durante la aclimatación al frío de *Arabidopsis*, indicando que la hormona está implicada en el la expresión génica en el tratamiento a bajas temperaturas (Nordin 1991). Sin embargo, el frío induce una serie de genes en los mutantes deficientes e insensibles al ABA, lo cual indica que existe otra vía independiente del ABA y que conduce a la expresión génica durante el estrés por frío (Gilmour y Tomashow 1991, Nordin 1991). Es curioso que todos estos genes responden al tratamiento con ABA exógena, lo que los califica de inducibles por ABA pero no dependientes de ABA. La inducción de un mismo gen tanto por frío como por desecación demuestra que hay varias vías distintas que conducen a la misma expresión génica durante el estrés. (Cohen 1991).

Algunos genes que no responden al ABA exógeno, se inducen durante la primera hora de desecación en *Arabidopsis* mientras que el contenido de ABA de las plantas estresadas no aumenta de un modo significativo hasta al cabo de dos horas después del inicio de la desecación. Esto indica que la expresión génica hasta las dos primeras horas de iniciarse el estrés hídrico es independiente de la síntesis de novo de ABA (Guerrero 1990, deVetten, 1992).

También existen genes como el *rd29A* del arroz que tienen una inducción en dos etapas: una primera de menos de 20 minutos inducida exclusivamente por la desecación y otra segunda etapa, en cuestión de horas, que coincide con un aumento del nivel de ABA endógeno (Yamaguchi-Shinozaki 1993). En estos casos, hay pues una expresión génica rápida en repuesta al estrés hídrico y otra vía más lenta que requiere la síntesis de ABA endógeno.

Otro factor a tener en cuenta es si todas estas inducciones requieren o no síntesis proteica, es decir si los factores de transcripción y otras moléculas implicadas ya están preformadas en la célula. Los experimentos con inhibidores de la síntesis proteica, como la cicloheximida, han mostrado que existen vías de expresión génica inducidas por ABA dependientes e independientes de síntesis de proteínas. Además,



así como existe una inducción diferencial por ABA según los órganos y estado de desarrollo, también parece haber un requerimiento diferencial de síntesis de proteínas para la respuesta al estrés según el tipo celular y las distintas condiciones fisiológicas. Los experimentos con el gen *rab16* del arroz muestran que la vía lenta de inducción requiere síntesis proteica, mientras que la rápida no (Mundy y Chua 1990, Nakagawa 1996). Todo ello conduce a pensar que posiblemente exista una respuesta rápida al ABA, sin necesidad de síntesis de novo, que sería seguida por una respuesta secundaria con síntesis de proteínas reguladoras codificadas por los genes activados en la respuesta primaria. Este mecanismo sería similar al mecanismo de regulación de los factores de crecimiento en células de mamífero.

### Perspectivas de futuro

Los recientes avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta de las plantas a las condiciones ambientales extremas, así como la gran variedad de técnicas que permiten tanto la identificación y aislamiento de genes de respuesta al estrés como su introducción por manipulación genética en la planta, permite augurar un avance importante en la obtención de plantas mejor adaptadas a condiciones ambientales extremas en un futuro próximo.

Uno de los puntos importantes a resolver es el mecanismo de percepción del estrés por la planta, el aislamiento y caracterización de los receptores hormonales involucrados, así como la identificación de nuevas moléculas integrantes de las rutas de transducción de señal e inducción de la expresión génica.

También es importante que la activación génica se pueda limitar a aquellos genes que son activados de modo natural en la planta lo que evitará efectos secundarios no deseados. En este sentido un problema técnico importante con el que nos encontramos es la elección del promotor que dirige la expresión del transgen.

La utilización de promotores constitutivos del tipo 35S (del virus del mosaico de la coliflor) puede causar efectos no deseables (floración temprana, retraso del crecimiento, y graves alteraciones en el fenotipo de la planta). Es pues de una gran importancia poder controlar tanto el nivel como el momento y tejido en el que se exprese el transgen. La utilización de promotores inducibles por estrés o ABA parece ser importante para aumentar la tolerancia al estrés sin afectar el crecimiento normal de la planta.

Finalmente la obtención de plantas transgénicas portadoras de un único gen regulador bajo el control de un promotor inducible que dirija la expresión de varios genes involucrados en la resistencia al estrés abre una de las perspectivas de futuro para la que se prevé una mayor aplicabilidad en agricultura. En este contexto las nuevas aproximaciones por genómica funcional serán de gran ayuda para el descubrimiento de nuevos genes y la determinación de sus funciones en la tolerancia al estrés en la planta.

## Agradecimientos

El trabajo de investigación en el estudio de los genes regulados por estrés osmótico en el maíz está financiado por el Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico con el proyecto BIO 2000 1562, por la CIRIT de la Generalitat de Catalunya en el proyecto Suport a Grups de Recerca Consolidats. 1999SGR 00191, y por la Comisión de las Comunidades Europeas en el programa BIOTECH con el proyecto BIO4-CT96-0062.

## Referencias

- Bartels, D., Schneider, K., Terstappen, G., Piatowski, D., Salamini, F.** (1990) Molecular cloning of abscisic acid modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Ceratostigma plantagineum*. *Planta* 181, 27-34.
- Bohner, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G.** (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099-1111.
- Bray, E.A.** (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol* 103: 1035-1040.
- Bray, E.A.** 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2:48-54
- Close, T.J.** (1996) Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plantarum* 97: 795-803
- Cohen, A., Plant, A.P., Moses, M.S., Bray, E.A.** (1991) Organ-specific and environmentally regulated expression of two abscisic acid-induced genes of tomato. *Plant Physiol* 97: 1367-1374.
- Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon C., Parcy F. and Goodman H.M.** (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4:1251-1261.
- Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P.C., Bouvier-Durand, M., Vartanian, N.** (1994) Current Advances in abscisic acid action and signaling. *Plant Molec Biol* 26:1557-1577.
- Gómez, J, Sánchez-Martínez, D., Stiefel, V., Rigua, J., Puigdomènech, P. and Pagés, P.** (1988) A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein *Nature* 334, 262-264.
- Guerrero, F.D., Jones, J.T., Mullet, J.E.** (1990) Turgor-responsive gene transcription and mRNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted: séquence and expresión of three inducible genes. *Plant Mol.Biol.* 15:11-26.
- Guilmour, S.J. and Tomashow, M.F.** (1991) Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molec Biol.* 17: 1233-1240.



- Hwang, I. and Goodman, H.M.** (1995) An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA and NaCl. *Plant Journal* 8:37-43.
- Ingram, J. and Bartels, D.** 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* 47:377-403
- Jensen, A.B., Busk, P.K., Figueres, M., Albà, M.M., Perachia, G., Messeguer, R., Goday, A. and Pagès, M.** (1996) *Plant growth regulation* 20, 105-110.
- Koornneef, M.,** (1986) Genetic aspects of abscisic acid. In: Blonstein AD, King PJ (eds.) *A genetic approach to plant biochemistry*. pp 34-54. Springer Verlag. Vienna. Austria.
- McCarty, D.R.** (1995) Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Molec Biol* 46: 71-93.
- Mundy, J. and Chua, N.H.** (1988) Abscisic acid and water stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J* 7:2279-2286.
- Mundy, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., 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, 1406-1410.
- Nakagawa, H., Ohmiya, K., Hattori, T.** (1996) A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant J* 9:217-227.
- Nordin K., Heino, P. and Palva, T.** (1991) *Plant Molec Biol.* 16: 1061-1071.
- Pla M., Goday A, Vilardell J., Gómez J. and Pagès M.** (1989) Differential regulation of the ABA induce 23-25 kD proteins in embryo and vegetative tissues of the viviparous mutants of maize, *Plant Molec.Biol.* 13: 385-389
- Pla M., Gómez J., Goday A., Pagès** (1991) Regulation of the abscisic acid-responsive gene *rab18* in maize viviparous mutants. *Mol Gen Genet.* 230:394-400.
- Quatrano, R.S., Ballo, B.L., Williamson, J.D., Hamblin, M.T. and Mansfiels, M.** (1983) in: RB Goldberg (Ed.) *Plant Molecular Biology*, AR Liss New York, USA, pp 343-353.
- Skriver, K. and Mundy, J.** (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2:503-512.
- Tan, B.C., Schwartz, S.H., Zeevart, J.A.D. and McCarty, D.R.** (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc.Nath.Acad.Sci USA* 94:12253-12240.
- Tardieu, F.** (1996) Drought perception in plants. Do cells of droughted plants experience water stress? *Plant Growth Regulation* 20:93-104.



- deVetten, N.C., Lu G., Ferl R.J.** (1992) A maize protein associated with the G-box binding complex has homology to brain regulatory proteins. *Plant Cell* 4: 1295-1307.
- Vilardell J., Goday, A., Freire, M.A., Torrent, M., Martínez, M.C., Torné, J.M. and Pagès, M.** (1990). Gene sequence, developmental expression and protein phosphorylation of rab17 in maize. *Plant.Molec.Biol.* 14, 423-432
- Williamson, J.D. and Scandalios, J.G.** (1992) Differential response of maize catalases to abscisic acid:Vp1 transcriptional activator is not required for abscisic acid regulated Cat1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8842-8846.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Mundy, J. and Chua, N.H.** (1989) Four tightly linked rab genes are differently expressed in rice. *Plant Mol Biol* 14:29-39.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1993) Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in responsiveness to drought, low-temperature or high-salt stress. *Mol Gen Genet* 236:331-340.
- Zeevart, J.A.D. and Creelman, R.A.** (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 439-473.



## CONTROL AMBIENTAL Y HORMONAL DE LA ABCISIÓN EN LOS CÍTRICOS

*Francisco R. Tadeo, Domingo J. Iglesias,  
Eduardo Primo-Millo y Manuel Talón.*

**Dept. Citricultura y Otros Frutales, I.V.I.A. 46113 Moncada (Valencia).**

**E-mail: [ftadeo@ivia.es](mailto:ftadeo@ivia.es)**

La abscisión es un proceso programado que implica la disolución de las paredes celulares en localizaciones concretas de la planta y, en último término, la separación celular (Sexton y Roberts, 1982; Osborne, 1989). El proceso de abscisión es universal, pues ocurre en todas las plantas superiores, y afecta a diferentes estructuras aéreas como hojas, brotes, flores, pétalos, estilo, estambres, frutos y semillas. En los frutales, la abscisión adquiere una especial relevancia debido a sus repercusiones económicas y comerciales. Durante el periodo de cuajado del fruto, los árboles suelen desprenderse de un número variable de estructuras reproductivas. Si la abscisión es masiva la cosecha será escasa, mientras que si cuaja un número excesivo de frutos su tamaño final no alcanzará el calibre comercial adecuado. Por otro lado, la maduración debilita la fuerza con la que los frutos están unidos al árbol. Si por razones comerciales es necesario retrasar la recolección, las posibilidades de desprendimiento de fruta aumentan y el volumen de la cosecha puede verse así comprometido. Por tanto, el estudio y la comprensión de cómo está regulado y de cómo se produce el proceso de abscisión es uno de los retos a los que se enfrenta la fruticultura actual.

La producción mundial de cítricos en el pasado ejercicio 2001 fue de casi 100 millones de Tm ([www.fao.org](http://www.fao.org)), siendo Brasil y USA los principales productores. Una quinta parte fue producida por los países de la cuenca mediterránea, ocupando España la primera posición con más de 5 millones de Tm. La mayor parte de la producción española está destinada al consumo en fresco de la fruta. El cultivo de los cítricos supone una fuente de riqueza importante para las principales zonas productoras (la Comunidad Valenciana, Murcia y Andalucía).

*La abscisión afecta tanto a órganos jóvenes como a aquellos que ya han completado su desarrollo.*

Los cítricos pueden desprenderse de hojas, flores o frutos independientemente del estadio de desarrollo en que éstos órganos se encuentren. El programa de abscisión puede desencadenarse en cualquier momento, como ocurre por ejemplo durante el proceso de fructificación. El periodo de cuajado es una época clave en la fructificación. En éste periodo se producen normalmente dos oleadas de abscisión que implican, en primer lugar, a flores y a ovarios en el estadio fenológico de caída de pétalos y, a continuación, a frutos en crecimiento de 2-4 cm de diámetro (Sinclair, 1984; Monselise, 1986). Esta última época de abscisión se conoce en el hemisferio Norte como "caída de Junio". La abscisión de flores y ovarios depende en gran medida del tipo de inflorescencia en la que se encuentren y de su posición en la rama. Las inflorescencias mixtas, con estructuras reproductivas contiguas a grupos de hojas, tienen más probabilidades de permanecer unidas al árbol que las inflorescencias sin hojas (Mehouachi y cols., 2000). Un factor clave para que continúe el crecimiento del ovario o se desencadene el proceso de abscisión en esta etapa del desarrollo es su nivel de giberelinas (Talón y cols., 1990; 1992). La "caída de Junio", por su parte, parece asociarse con el aporte de fotoasimilados (Jones y cols. 1974; Iglesias y cols. 2002). Mediante distintos tratamientos de defoliación en el estadio de antesis podemos variar el nivel de carbohidratos del ovario y modificar el patrón de abscisión (Mehouachi y cols, 1995). Según el tipo de hoja que se elimine se induce, o bien 1 o bien 2 oleadas de abscisión que pueden variar en intensidad y en el tiempo.

*Los cítricos responden a las condiciones medioambientales adversas desprendiéndose de los órganos dañados.*

La presencia o la imposición de condiciones medioambientales adversas provoca el desencadenamiento de un número variable de respuestas en las plantas (Tadeo, 2000). La carencia de agua (estrés hídrico) o el exceso de sales en el suelo (estrés salino) son condiciones a las que las plantas deben enfrentarse a menudo y suelen provocar el deterioro tanto de hojas como de flores y frutos produciéndose, en último término, su abscisión.

La falta de agua provoca la abscisión de estructuras vegetativas y reproductivas en los cítricos, aunque el proceso ocurre de una forma singular. Cuando las plantas se someten a estrés hídrico los órganos pierden turgencia y sufren daños aparentes a simple vista, pero no abscinden. Solamente cuando desaparecen las condiciones de sequía, por la lluvia o por la irrigación, se desprenden del árbol (Tudela y Primo-Millo, 1992).

La salinidad reduce el tamaño final y provoca la aparición de amarilleamientos y clorosis en las hojas de los cítricos, mientras que ralentiza el crecimiento inicial de los frutos en desarrollo y retrasa su maduración. Además, provoca la abscisión de éstos órganos. En los cítricos, el efecto de la salinidad sobre el crecimiento parece estar relacionado más con el aumento de sales solubles que con la reducción del potencial osmótico radicular, mientras que los daños en las hojas se deben únicamente al exceso de iones tóxicos. Dado que el patrón de abscisión de hojas sigue una evolución

similar a la acumulación de cloruro, los iones tóxicos parecen ser los causantes del desencadenamiento del proceso de abscisión (Bañuls y Primo-Millo, 1995).

*La abscisión implica la activación de un tejido especializado: la zona de separación o de abscisión.*

La causa final de la caída de hojas, flores y frutos es la activación de un tejido que se denomina zona de abscisión (ZA). Este tejido puede estar presente de antemano en los órganos que van a caer o formarse como consecuencia de señales intracelulares de las que se desconoce, por el momento, su naturaleza concreta. El concepto de ZA implica la diferenciación de tipos celulares en localizaciones particulares de la planta, con una especialización funcional concreta.

La abscisión en los cítricos ha sido objeto de diferentes estudios en los que se observa que el proceso, en términos generales, es similar al que ocurre en otros sistemas vegetales (Goren, 1993). La hoja presenta dos zonas de separación: a) la zona de abscisión limbo-pecíolo (ZA-LP), situada entre el extremo basal del limbo y la porción apical del pecíolo y b) la zona de abscisión pecíolo-rama (ZA-PR), localizada entre la base del pecíolo y su unión a la rama. Las hojas maduras abscinden por la ZA-PR, mientras que durante el proceso de desarrollo de la hoja ésta abscinde por la ZA-LP. La abscisión de las estructuras reproductivas puede producirse por la denominada zona de abscisión A (ZA-A), situada entre el pedúnculo y el tallo, o por la zona C (ZA-C), localizada en la zona de unión del cáliz con el ovario/fruto. Las flores y los ovarios se desprenden por la ZA-A, mientras que durante la “caída de Junio” y el resto del periodo de fructificación caen por la ZA-C. Por tanto, la localización de la zona activa durante la abscisión cambia progresivamente desde el pedúnculo hasta el cáliz. Se ha especulado con la posibilidad de que durante los periodos de caída puedan producirse cambios en la sensibilidad de las zonas de abscisión a diferentes factores, como los hormonales (Greenberg y cols., 1975). Otra posibilidad es que las señales desencadenantes del proceso provengan en cada caso de zonas diferentes del árbol, de la raíz o de las hojas en el caso de la ZA-A y del fruto en desarrollo en el caso de la ZA-C.

*El proceso de abscisión se produce por desintegración de las paredes celulares.*

#### **a) Cambios anatómicos y ultraestructurales.**

Las ZAs de las hojas y de los frutos presentan características estructurales y fisiológicas similares (Goren, 1993). En ambas, el proceso de separación implica, por una parte, el hinchamiento y el cambio de consistencia de las paredes celulares y, a continuación, la degradación de sus componentes y su disolución y eliminación. Estos cambios reducen la fuerza con que el órgano está unido al árbol y posibilita su fácil desprendimiento. La abscisión de la hoja comienza de fuera hacia dentro, es decir, las primeras paredes que se deterioran corresponden a las de las células que se encuentran en el exterior de los estrangulamientos que delimitan la ZA. A continuación,

el proceso procede hacia las regiones celulares más profundas. En los frutos, la desintegración de las paredes comienza en las células del córtex interno del disco floral y avanza implicando tanto a las células del sistema vascular como a las del córtex externo y de la epidermis. Los cambios ultraestructurales que se observan durante el proceso de separación son también comunes para las diferentes ZAs (Iwahori y van Stevenink, 1976). Antes de la separación celular, la lámina media de la pared se vuelve muy electrodensa y la pared primaria toma una apariencia poco fibrosa, síntomas que sugieren fuertemente que se está produciendo la desintegración de los polisacáridos que la componen. En las proximidades de la pared se observa el aumento del número de perfiles de retículo endoplásmico rugoso, vesículas y áreas de Golgi en el citoplasma celular. El plasmalema y el tonoplasto toman, por su parte, una apariencia ondulada con abundantes invaginaciones.

### **b) Cambios en la actividad de enzimas hidrolíticas.**

Las paredes celulares están compuestas por polisacáridos de tipo pectina, celulosa y hemicelulosa y el proceso de abscisión está asociado al incremento en la actividad de las enzimas que los hidrolizan, las poligalacturonasas (PGs) y las celulasas (Cel, endo- $\beta$ -1,4-glucanasas). En las ZAs de los cítricos se observa un paralelismo entre la evolución del proceso de abscisión y los cambios que se producen en la actividad de las enzimas hidrolíticas (Huberman y Goren, 1979; Burns y cols., 1998). En la variedad de naranjo dulce Valencia, la abscisión desencadena el incremento en las actividades Cel y PG en la zona de abscisión del cáliz. El pico principal de actividad Cel correspondía a polipéptidos de pl de 8.0 y una masa molecular de 51 kD, mientras que el pico de menor actividad correspondía a polipéptidos de pl de 5.5 (Burns y cols., 1998). En cuanto a la actividad la PG, los polipéptidos responsables de la misma tenían un pl de 5.5. Basándose en secuencias parciales de Cel de la zona de abscisión del cáliz se diseñaron oligonucleótidos degenerados que han permitido el clonaje de dos fragmentos de cDNA con una identidad del 59% a nivel de nucleótidos. Ambos clones (*Cela* y *Celb*) se expresan en las zonas de abscisión A y C del fruto y en las de la hoja, pero no se observa expresión en las zonas de abscisión no inducidas, en la madera joven o en el flavedo del fruto. Otras enzimas, las pectinmetilesterasas (PME), que participan en el recambio de componentes de la pared celular, también han sido implicadas en el proceso de abscisión. En las zonas de abscisión del naranjo dulce Valencia se han aislado e identificado dos genes (*CsPME1* y *CsPME3*) que codifican PMEs y que parecen estar regulados diferencialmente por las condiciones que generan abscisión (Nairn y cols., 1998).

### **c) Las hormonas intervienen en el desencadenamiento del proceso de abscisión.**

#### *1. Las auxinas actúan, en general, como moduladores negativos de la abscisión.*

La actuación de las auxinas se ha relacionado tradicionalmente con los procesos de elongación celular. En los cítricos se ha observado que el nivel de auxinas en los ovarios aumenta cuando comienza su crecimiento activo, durante las fases I

y II (Talón y cols., 1990). Sin embargo, el tratamiento con auxinas, tanto naturales como sintéticas, induce abscisión durante el periodo de cuajado aunque se utiliza con éxito para reducir la caída pre-cosecha de frutos (Agustí y cols., 1995). La utilización de inhibidores del transporte polar de auxinas, como el ácido 2,3,5-triiodobenzoico (TIBA), incrementa la respuesta de los frutos maduros de cítricos a los compuestos inductores de la abscisión (Yuan y cols., 2001b). Las investigaciones realizadas con explantos de ZAs señalan a las auxinas (al ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-D) como retardadores de la abscisión y como agentes bloqueantes del incremento en la actividad de enzimas hidrolíticas (Goren y Huberman, 1976).

## 2. El ácido abscísico (ABA) es una señal intermedia en el proceso de abscisión.

El ácido abscísico (ABA) es otra fitohormona que se relaciona frecuentemente con la abscisión. En los cítricos, el tratamiento con ABA a la parte aérea del árbol no es capaz de estimular la abscisión, mientras que los experimentos realizados en explantos de hojas sugieren que el ABA induce la actividad de las enzimas hidrolíticas y también la abscisión (Sagee y cols., 1980, Goren, 1993). En los explantos, se ha observado que el ABA estimula también la formación de etileno, lo que induce a pensar que el ABA no es el efector hormonal final del proceso. El estudio de la abscisión de ovarios y frutos en desarrollo en los cítricos ha permitido implicar al ABA como una señal hormonal intermedia en el proceso de abscisión inducido por condiciones de estrés hídrico, de salinidad y de carencia de carbohidratos (Talon y cols., 1997; Gómez-Cadenas y cols., 2000; 1996, 1998). La ruta de señalización hormonal de la abscisión comienza con la acumulación de ABA, la cual desencadena el incremento en los niveles del precursor inmediato del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y la abscisión. El pre-tratamiento con un inhibidor indirecto de la síntesis de ABA, la norflurazona, reduce la síntesis de ACC y bloquea parcialmente la abscisión.

## 3. El etileno y los jasmonatos actúan como moduladores positivos de la abscisión.

El etileno actúa como un regulador positivo de la abscisión. Su aplicación exógena acelera la caída tanto de hojas como de flores y de frutos maduros e inmaduros de cítricos (ver Goren, 1993). De hecho, la respuesta de la ZA del fruto al etileno o a compuestos que inducen su síntesis ha sido tradicionalmente explotada en citricultura para facilitar su recogida. Sin embargo, los compuestos utilizados (ácido 2-cloroetilfosfónico [etefón], CMN-pyrazole, etc.) presentan problemas de inconsistencia en su acción abscisora y, además, no suelen tener especificidad en cuanto a los órganos diana ya que actúan también sobre hojas, flores y frutos jóvenes en desarrollo (Kender y cols., 2001; Yuan y cols., 2001a). Por otra parte, el tratamiento con inhibidores de la síntesis o de la acción del etileno provoca tanto retraso en la abscisión como una menor incidencia del proceso (Sisler y cols., 1985; Talon y cols., 1997, Zhong y cols., 2001). Las condiciones de estrés que provocan abscisión están precedidas en los cítricos por incrementos en los



niveles de ACC y de etileno. En condiciones de sequía severa, las raíces de las plantas experimentan una acumulación transitoria de ACC mientras se mantiene el estrés (Tudela y Primo-Millo, 1992). Una vez regadas las plantas, el ACC viaja hasta la parte aérea a través del xilema, el limbo foliar produce grandes cantidades de etileno y se desencadena la abscisión. El pre-tratamiento con inhibidores de la síntesis de etileno a la raíz antes de que se imponga el estrés reduce la magnitud de la abscisión y si, una vez producido el estrés, separamos la parte aérea del sistema radicular y la hidratamos no se observa abscisión foliar. Por tanto, el ACC producido en la raíz bajo condiciones de sequía parece ser el efector directo de la abscisión de hojas una vez se ha metabolizado a etileno. La salinidad también induce la acumulación de ACC tanto en la raíz como en las hojas de los cítricos y aumenta la producción de etileno en la hoja (Gómez-Cadenas y cols., 1998). Como en el caso anterior, el tratamiento con inhibidores del etileno reduce la abscisión. El estrés por carencia de carbohidratos inducido por la defoliación provoca los mismos cambios en biosíntesis de etileno y la abscisión de frutos en desarrollo (Gómez-Cadenas y cols., 2000). Bajo condiciones de cultivo adversas, la ruta hormonal de transmisión de la señal de abscisión en los cítricos es: estrés → ABA → ACC → etileno → abscisión. El etileno, además, induce la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas y la expresión de genes que codifican estas enzimas (Burns y cols., 1998), mientras que el antagonista del etileno 1-metilciclopropeno revierte la expresión génica inducida por el etileno (Zhong y cols., 2001).

El ácido jasmónico (JA) es un compuesto de naturaleza hormonal, producido a través de la ruta de los ácidos octadecanoicos, que ha sido tradicionalmente relacionado con las respuestas de las plantas al estrés por heridas y por ataque de patógenos (Tadeo, 2000), aunque recientemente se ha asociado también al proceso de abscisión. En los cítricos, el tratamiento de los frutos con el derivado metilado del JA, el metil-jasmonato (JA-ME), provoca la reducción en la fuerza de unión del fruto al cáliz y promueve su rápido desprendimiento del árbol, a los 7-10 días después de realizado el tratamiento (Hartmond y cols., 2000). Sin embargo, al igual que ocurre con el etileno, también induce defoliación en los árboles tratados (Kender y cols., 2001).

## Bibliografía

- Agusti M., El-Otmani M., Aznar, M., Juan, M. y Almela, V.** (1995). Effect of 3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid on clementine early fruitlet development and on fruit size at maturity. *J. Hortic. Sci.* 70, 955-962.
- Bañuls, J. y Primo-Millo, E.** (1995). Effects of salinity on some *Citrus* scion-roots-tock combinations. *Ann. Bot.* 76, 97-102.
- Burns, J.K., Lewandowski, D.J., Nairn, C.J. y Brown, G.E.** (1998). Endo-1,4-b-glucanase gene expression and cell wall hydrolase activities during abscission in Valencia orange. *Physiol. Plant.* 102, 217-225.
- Greenberg, J., Goren, R. y Riov, J.** (1975). The abscission of young and mature Shamouti orange fruits. *Physiol. Plant.* 39, 1-7.
- Gómez-Cadenas, A., Mehouachi, J., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E. y Talon, M.** (2000). Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta* 210, 636-643.
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E. y Talon, M.** (1996). Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscissic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* 112, 401-408.
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E. y Talon, M.** (1998). Involvement of abscissic acid and ethylene in the responses of citrus plants to salt shock. *Physiol. Plant.* 103, 475-484.
- Goren, R.** (1993). Anatomical, physiological, and hormonal aspects of abscission in citrus. *Hort. Rev.* 15, 33-46.
- Goren, R. y Huberman, M.** (1976). Effects of ethylene and 2,4-D on the activity of cellulase isoenzymes in abscission zones of the developing orange fruit. *Physiol. Plant.* 37, 123-130.
- Hartmond, U., Yuan, R.C., Burns, J.K., Grant, A. y Kander, W.J.** (2000). Citrus fruit abscission induced by methyl-jasmonate. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 125, 547-552.
- Huberman, M. y Goren, R.** (1979). Exo- and endo-cellular cellulase and polygalacturonase in abscission zones of developing orange fruits. *Physiol. Plant.* 45, 189-196.
- Iglesias, DJ, Tadeo, FR, Talon, M** (2002). Fruit-set dependence upon carbohydrates in citrus. *Tree Physiology* (en revisión).
- Iwahori, S. y van Stevenink, R.F.M.** (1976). Ultrastructural observation of lemon



**ABA**  
**Comunicaciones**



## **SOBREEXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA FOSFATASA DE TIPO 2C (FsPP2C1) ESPECÍFICA DE SEMILLAS Y RELACIONADA CON LA DORMICIÓN, EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana***

Mary-Paz González, Oscar Lorenzo, Carlos Nicolás, Gregorio Nicolás y Dolores Rodríguez

Dpto. Fisiología Vegetal, Fac. Biología, Universidad de Salamanca.  
Pl. de los Doctores de la Reina s/n. 37007 Salamanca.

E-mail: chos@usal.es; tlf: 923 294400 ext 1951

### **Sinopsis**

Mediante RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados correspondientes a los dominios catalíticos 2 y 8 presentes en todas las serina/treonina proteína fosfatasas de tipo 2C descritas hasta el momento (Lorenzo et al., 2001), obtuvimos un fragmento de aproximadamente 550 pb, que presentaba una alta similitud con otros miembros de la familia de proteína fosfatasas de tipo 2C (ABI1, ABI2, AtPP2CA).

El clon completo, que codifica para una proteína que denominamos FsPP2C1, se aisló a partir de una librería de cDNA de semillas durmientes de haya (*Fagus sylvatica*) tratadas con ABA (Nicolás et al., 1997). Esta fosfatasa está claramente inducida por ABA, mientras que su expresión tiende a desaparecer en los tratamientos que eliminan la dormición, como la estratificación a 4 °C o el ácido giberélico (Nicolás et al., 1996). Además, el gen correspondiente se expresa específicamente en semillas y podría estar implicado en los mecanismos que regulan la dormición en semillas de haya (Lorenzo et al., 2001).

Para estudiar la función de FsPP2C1 en la dormición, el gen correspondiente ha sido sobreexpresado constitutivamente en *Arabidopsis thaliana*, (Col/35S::FsPP2C1), utilizando el vector PBI121 y el sistema *Agrobacterium* para la infección de tejidos vegetales y posterior obtención de plantas transgénicas.



## Introducción

La fosforilación/desfosforilación de proteínas es un mecanismo general de transmisión de señales, probablemente implicado en la regulación de la dormición de las semillas (Trewavas, 1987), en el cual tienen gran importancia la familia PP2C de serina/treonina proteína fosfatasa (Rodríguez, 1998).

En plantas, algunas de estas proteína fosfatasa, como ABI1 y ABI2, se consideran reguladores negativos en la ruta de señalización del ABA (Merlot et al, 2001), hormona implicada, entre otros procesos, en las respuestas a estrés ambiental y en el mantenimiento de la dormición. En este trabajo hemos pretendido profundizar en el posible papel de FsPP2C1 en la regulación de la dormición de semillas mediante la sobreexpresión del gen en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

## Resultados y discusión

En trabajos anteriores hemos observado que FsPP2C1 se expresa específicamente en semillas durmientes de haya tras la aplicación exógena de ABA, que mantiene las semillas en dormición, mientras que la estratificación a 4°C o la adición de giberelinas, tratamientos que eliminan la dormición (Nicolás et al, 1996), producen un descenso en los niveles de sus transcritos; es decir, la expresión de FsPP2C1 se correlaciona negativamente con la germinación de las semillas (Lorenzo et al., 2001). Adicionalmente, este gen se expresa exclusivamente en las semillas, a diferencia de otras PP2C vegetales que también se expresan en otros tejidos vegetativos y en respuesta a diferentes tipos de estrés, cosa que no ocurre con FsPP2C1. Por lo tanto, FsPP2C1 parece estar implicada en la dormición de semillas inducida por ABA, por lo que, y debido a la imposibilidad de obtener plantas transgénicas de *Fagus sylvatica*, hemos sobreexpresado FsPP2C1 en plantas de *Arabidopsis thaliana* con el objetivo de profundizar en el papel de esta proteína fosfatasa tanto en la dormición de semillas como en la ruta de transmisión de la señal del ácido abscísico.

Una vez obtenidas semillas transgénicas homocigotas para dicho gen, realizamos ensayos de dormición y sensibilidad al ABA, utilizando como controles semillas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (ecotipo Columbia) y semillas de los mutantes *aba 2* (deficiente en ABA) y *abi1* y *abi2* (insensibles al ABA y que presentan alteraciones en proteína fosfatasa de tipo 2C).

En los ensayos de dormición se analizaron los porcentajes de germinación de diferentes semillas que primero fueron estratificadas durante 0, 24 y 120 horas a 4°C en oscuridad y posteriormente mantenidas en una cámara de germinación con un fotoperíodo de 16 horas de luz a 21°C. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre presentan dormición, por lo que si no se estratifican apenas van a germinar, mientras que tras 120 horas de tratamiento frío se observan porcentajes de germinación cercanos al 60%. *Aba2*, por su parte, presenta porcentajes de germinación del 40% sin estratificar y valores cercanos al 100% tras 120 horas de tratamiento

frío. Por último, *abi1*, *abi2* y algunas de las líneas de FsPP2C1 presentan porcentajes de germinación del 80-90% tanto en las muestras estratificadas como en las que no habían sido sometidas a ningún tratamiento previo, lo que sugiere que estas semillas no presentan dormición.

También se analizaron los porcentajes de germinación de las semillas en presencia de diferentes concentraciones de ABA (0.5  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$ ) para estudiar la sensibilidad al ABA. Con estos ensayos comprobamos que las semillas de tipo silvestre y las del mutante *aba2* (deficiente en ABA) eran capaces de germinar cuando las concentraciones de ABA eran muy bajas (0.5  $\mu\text{M}$ ), pero no lo hacían a concentraciones superiores (3  $\mu\text{M}$ ). Por su parte, las semillas de los mutantes *abi1* y *abi2* (insensibles al ABA) germinaban en su totalidad a bajas concentraciones de ABA, mientras que en concentraciones superiores (3  $\mu\text{M}$ ), presentaban valores de germinación entre el 50% y el 60%. Las semillas transgénicas FsPP2C1 germinan en su totalidad en concentraciones de ABA 0.5  $\mu\text{M}$  y alcanzan valores superiores el 80% de germinación en concentraciones 3  $\mu\text{M}$ , lo que indica una insensibilidad a la hormona similar a los mutantes ya descritos.

Todos estos datos indican la importancia de FsPP2C1 en los mecanismos que controlan la dormición de semillas, en la cual puede participar como un regulador negativo en la ruta de transducción de señales del ABA, aunque estos datos tendrán que ser corroborados mediante la correlación del fenotipo de las diferentes líneas con la expresión de FsPP2C1 por northern blot y la inducción de genes marcadores de la cascada de señalización del ABA, como ABI3 o Rab18 en un paso posterior al de la acción de las PP2Cs, en las plantas transgénicas.



## **Bibliografía**

**Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., Giraudat, J.** (2001). *Plant J.* 25: 295-303.

**Nicolás, C., Nicolás, G., Rodríguez, D.** (1996). *Physiol. Plant.* 96: 244-250.

**Nicolás, C., Rodríguez, D., Poulsen, F., Eriksen, E.N., Nicolás, G.** (1997). *Plant Cell Physiol.* 38: 1303-1310.

**Lorenzo, O., Rodríguez, D., Nicolás, G., Rodríguez, P.L., Nicolás, C.** (2001). *Plant Physiol.* 125: 1949-1956.

**Rodríguez, P.L.** (1998). *Plant Mol. Biol.* 38: 919-927.

**Trewavas, A.J.** (1987). *Bioassays* 6: 87-92.

## EFECTO DEL ABA EN LA FOSFORILACIÓN DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO Y DURANTE LA FORMACIÓN DE LA SEMILLA

Ana Belén Feria<sup>1</sup>, Ludivine Cochereau<sup>1</sup>, Rosario Alvarez<sup>1</sup>, Jean Vidal<sup>2</sup>, Sofía García-Mauriño<sup>1</sup>, Cristina Echevarría<sup>1</sup>.

<sup>(1)</sup>Dpto Biología Vegetal y Ecología (Unidad de Fisiología Vegetal). Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. 41012 Sevilla. Tlf. 954-557073.

E-mail: echeva@us.es

<sup>(2)</sup>Institut de Biotechnologie des Plantes, bât. 630, ERS CNRS 569. Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 91405 ORSAY Cedex, France.

E-mail: Jean.Vidal@ibp.u-psud.fr

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (E:C: 4.1.1.31, PEPC) es una enzima ampliamente distribuida en plantas, algas y microorganismos, pero no está presente en animales. Cataliza la  $\beta$ -carboxilación del PEP, en presencia de  $Mg^{2+}$ , rindiendo oxalacetato (OAA) que es rápidamente transformado en aspartato o L-malato.

La PEPC está regulada por un mecanismo de fosforilación reversible que amplifica la regulación metabólica de sus efectores L-malato y glucosa-6P y la respuesta al pH (Echevarría et al. 1995, Chollet et al. 1996). En concreto, la PEPC fosforilada es menos sensible a la inhibición por L-malato. La determinación de la  $IC_{50}$  para este inhibidor se utiliza como índice del nivel de fosforilación de la PEPC.

La quinasa implicada (PEPC quinasa) fosforila una única Ser situada en el extremo N-terminal de la PEPC (Jiao et al. 1991b). En plantas  $C_4$  la fosforilación de la PEPC es dependiente de la intensidad de luz mientras que en plantas CAM ocurre durante la noche y parece estar mediada por los niveles de L-malato (Nimmo 2000). A nivel celular la ruta de señalización descrita es la siguiente: una alcalinización del pH citosólico (pHc); se estimula una fosfolipasa C y la producción de inositol trifosfato; se



abren canales de calcio situados en el tonoplasto (sensibles a TMB8) activándose una quinasa  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente (inhibida por W7). Como consecuencia de esto, la PEPC quinasa se activa en un proceso dependiente de una síntesis proteica (Jiao et al 1991a), dando como resultado la fosforilación de la PEPC (Vidal and Chollet, 1997, Coursol et al., 2000).

Además de en hojas de plantas  $\text{C}_4$  y CAM, la fosforilación reversible de la PEPC ha sido descrita en nódulos, hojas de plantas  $\text{C}_3$ , estomas y raíces.

Nuestro grupo de investigación ha descrito la fosforilación reversible de la PEPC en respuesta al estrés salino (Echevarría et al. 2001) y en la germinación y desarrollo de la semilla de trigo y cebada (Osuna et al. 1996, 1999).

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que el estrés salino produce un espectacular incremento de la actividad PEPC quinasa y de la fosforilación *in vivo* de la PEPC. La posibilidad de que este efecto estuviera mediado por ABA se estudió en plantas con diferentes tratamientos, bien suministrando ABA (60  $\mu\text{M}$ ) a los cultivos hidropónicos durante 2 semanas o pulverizándolo sobre las hojas (3 veces por semana, dos semanas). La eficacia de los tratamientos con ABA se evidenció por una disminución del crecimiento de la planta y una disminución en la velocidad de fotosíntesis, respecto del control. Sin embargo, las plantas tratadas con ABA, si bien estimulan ligeramente la actividad PEPC quinasa, no reproducen en ningún caso la magnitud de la respuesta provocada por el estrés salino en la fosforilación *in vivo* de la PEPC y en los niveles de actividad *in vitro* de la PEPC quinasa, concluyendo por tanto que esta respuesta es independiente de ABA (Echevarría et al. 2001).

También hemos estudiado la fosforilación de la PEPC durante la germinación de la semilla (Osuna et al. 1996 y 1999). En este trabajo se muestra que la PEPC de capas de aleurona de trigo se fosforila en un 80% durante las primeras 48 h de imbibición completándose el proceso a los 4 días. A diferencia de otros contextos fisiológicos donde se produce una síntesis de la PEPC quinasa concomitante con el proceso de fosforilación, nuestros resultados pusieron en evidencia que la PEPC quinasa se encuentra ya en la semilla seca y no es activada durante la germinación por la vía de transducción de señales descritas hasta la fecha que culmina con la síntesis de la proteína (Osuna et al. 1999). Estos resultados sugirieron que la síntesis de la PEPC quinasa se tenía que realizar durante la fase de desarrollo o maduración de la semilla quedando acumulada en la semilla seca. El trabajo que realizamos actualmente muestra que, en efecto, hay un aumento considerable de la actividad PEPC quinasa durante la formación de la semilla.

Resultados previos de otros autores han puesto de manifiesto que la imbibición de capas de aleurona en presencia de ABA provoca un aumento del pH citosólico así como un incremento del nivel intracelular de L-malato y su liberación hacia el exterior

celular (Heimovaara-Dijkstra et al., 1994). En plantas  $C_4$  la basificación del citosol es un requisito indispensable para el inicio de la cadena de traducción de señales que promueve la fosforilación de la PEPC.

La posibilidad de que el ABA induzca la síntesis/activación de la PEPC quinasa durante la formación de la semilla se ha estudiado de una forma indirecta, utilizando semillas secas y desembrionadas, incubadas con ABA (40  $\mu$ M). Nuestros resultados indican que la imbibición con ABA y con  $^{32}$ P durante 48 h incrementa la fosforilación *in vivo* de la PEPC (medida como incorporación *in vivo* de  $^{32}$ P) así como la actividad *in vitro* de la PEPC quinasa (determinada en ensayos de fosforilación *in vitro* con  $\gamma^{32}$ P-ATP. Estos resultados sugieren que el aumento de ABA durante el desarrollo y maduración de la semilla podría ser la señal que desencadene la síntesis de la PEPC quinasa y la fosforilación de la PEPC. Durante la maduración, a partir de los 25 dpa los niveles de PEPC quinasa son altos y están establecidos pero la enzima *in vivo* es inactiva. La posibilidad de que la enzima se encuentre inactiva coincidiendo con una disminución del ABA durante la fase de maduración y desecación de la semilla esta siendo estudiada. La participación de factores como la hipoxia o la deshidratación de la semilla, en la regulación de la PEPC por fosforilación reversible en la aleurona de trigo, son también contempladas en este trabajo.



## Bibliografía

- Chollet, R., Vidal, J., O'Leary, M.H.** (1996). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 273-298.
- Coursol, S., Giglioli-Guivarc'h, Vidal, J., Pierre, J.N.** *The Plant Journal* 23: 497-506
- Echevarría, C., Pacquit, V., Bakrim, N., Osuna, L., Delgado, B., Arrio-Dupont, M., Vidal, J.** (1994). *Arch. Biochem. Biophys.*, 315 (2): 425-430.
- Echevarría, C., García-Mauriño, S., Alvarez, R., Soler, A., Vidal, J.** (2001) *Planta* 214: 283-287.
- Heimovaara-Dijkstra, S., Heistek, J.C., Wang, M.** (1994). *Plant Physiol.*, 106: 359-365.
- Jiao, J., Echevarría, C., Vidal, J., Chollet, R.** (1991a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2712-2715.
- Jiao, J., Vidal, J., Echevarría, C., Chollet, R.** (1991b). *Plant Physiol.*, 96: 297-301.
- Nimmo, H.G.** (2000) *Trens Plant Sci* 5:75-80.
- Osuna, L., Gonzales, M.C., Cejudo, F.J., Vidal, J., Echevarría, C.** (1996) *Plant Physiol* 111: 551-558
- Osuna, L., Pierre, J-N., Gonzalez, M-C., Alvarez, R., Cejudo, J.F., Echevarría C., Vidal J.** (1999) *Plant Physiol.* 119:511-520
- Vidal J., Chollet R.** (1997). *Trends Plant Sci.*, 2(6): 230-237.

## IMPLICACIÓN DE PsDAP EN EL DESARROLLO DE LA SEMILLA Y EN ESTRÉS POR SEQUÍA EN GUISANTE: ¿ESTA REGULADO POR ABA?

Cristina Urbez, Manuel Cercós y Juan Carbonell\*

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), CSIC-UPV.  
Avda. de los Naranjos s/n, 46022-Valencia.*

\*E-mail: [jcarbon@ibmcp.upv.es](mailto:jcarbon@ibmcp.upv.es)

### Sinopsis

Mediante la técnica de "mRNA Differential Display" se buscaron genes expresados de forma diferencial durante los procesos de desarrollo temprano del fruto y senescencia del ovario de guisante. Uno de los fragmentos obtenidos codifica una proteína rica en Glicina similar a otras de la misma familia que están reguladas por ácido abscísico (ABA) y cuya expresión se induce en condiciones de estrés por frío y sequía. Los estudios de expresión indican que este gen, al que se denominó PsDAP (*Pisum sativum Droughth Associated Protein*), se induce durante el desarrollo de la semilla, en situaciones de estrés por sequía y al aplicarle un tratamiento exógeno de ABA.

### Introducción

El ovario de guisante constituye un sistema experimental apropiado para estudiar la senescencia de los órganos reproductivos y el desarrollo del fruto. Los ovarios no polinizados entran en un programa de senescencia alrededor de dos-tres días después de la antesis, que conduce a su muerte y abscisión (Carbonell y García-Martínez, 1980). La senescencia puede ser evitada por la polinización, que induce la fructificación, o por la aplicación exógena de giberelinas, auxinas o citoquininas, las cuales inducen el desarrollo partenocárpico del fruto (García-Martínez y Carbonell, 1980). El estudio de los factores moleculares que controlan el desarrollo alternativo del ovario se ha abordado mediante la identificación de genes cuya expresión cambia durante el desarrollo temprano del fruto o la senescencia del ovario. Para ello hemos utilizado la técnica de "mRNA Differential Display" (Liang y Pardee, 1992) comparando mRNA de ovarios en antesis, de ovarios senescentes y de frutos inducidos por tratamiento con GA<sub>3</sub>. Los



fragmentos de cDNA con intensidad diferencial fueron clonados y secuenciados y su patrón de expresión confirmado por análisis Northern. Aquí mostramos los resultados obtenidos con uno de ellos: PsDAP.

## Resultados y Discusión

Mediante análisis Northern se confirmó que la expresión de PsDAP se induce durante la senescencia del ovario y el desarrollo del fruto. En ovarios polinizados la expresión en la vaina fué máxima durante su senescencia pero en la semilla este máximo se alcanzó durante el desarrollo, indicando que PsDAP puede estar implicado en procesos de desarrollo distintos que tienen en común el proceso de deshidratación, ya que durante la senescencia de la vaina se produce un proceso de desecación y de esclerificación de las células y en la semilla se ha descrito también una pérdida de humedad en la cubierta de la semilla y en el embrión. De hecho, los estadios finales de relleno de los cotiledones tienen lugar bajo condiciones donde hay una considerable deshidratación de las células (Pate y Flinn, 1977). Durante la germinación de la semilla los niveles de mensajero disminuyeron, incrementándose de nuevo cuando la radícula emerge. El análisis de la secuencia de PsDAP mostró que es una proteína rica en glicina similar a otros miembros de este grupo que están regulados por ABA (Sachetto-Martins et al, 2000) y cuya expresión se induce por frío y sequía (Laberge et al, 1993). Plántulas etioladas de guisante de seis días fueron sometidas a condiciones de frío (4<sup>o</sup>), estrés osmótico (0'6 M Manitol) y tratamientos con ABA (100 $\mu$ M) observándose un aumento de expresión tras los tratamientos con Manitol y con ABA y no tras el tratamiento de frío. Este aumento se localizó en las raíces, mientras que la expresión en la parte aérea de la planta se mantuvo constante. Estos mismos análisis de expresión se realizaron en el mutante Wilty de guisante (Wang et al., 1984), deficiente en la síntesis de ABA, observándose que los niveles de expresión de PsDAP estaban en relación con la concentración de ABA en la planta. Asimismo se sometieron a sequía plantas adultas de guisante de las variedades Alaska y Wilty observándose cambios en la expresión de PsDAP que parecen estar relacionados con los cambios en la concentración de ABA en la planta durante la sequía (Wang et al., 1984). Para poder confirmarlo se están realizando medidas de la concentración de ABA en plantas de las dos variedades y a diferentes tiempos después del establecimiento de la sequía. Los análisis de hibridación in situ mostraron una acumulación de mRNA con un patrón diferente en ovarios polinizados y no polinizados, pero siempre concentrándose en aquellos tejidos en los que están teniendo lugar procesos de senescencia que conllevan una deshidratación celular (Vercher, 1989).

El ABA juega un papel vital no sólo mediando procesos fisiológicos tales como la germinación y desarrollo de las semillas, sino también modulando respuestas adaptativas de las plantas bajo condiciones ambientales adversas. Los resultados parecen indicar que PsDAP está implicado en procesos de deshidratación debidos tanto a procesos naturales del desarrollo de la planta tales como el desarrollo de la semilla o la senescencia de los tejidos, como a condiciones externas de estrés por sequía que también originan deshidratación de los tejidos. En ambos casos la expresión podría estar relacionada con los cambios en las concentraciones de ABA durante estos procesos.

---

## Bibliografía

- Carbonell, J., García-Martínez, J.L.** (1980) Fruit set of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L.: influence of vegetative parts. *Planta* 147: 451-456.
- García-Martínez, J.L., Carbonell, J.** (1980) Fruit set of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L.: influence of plant growth regulators. *Planta* 147: 444-450.
- Laberge, S., Castonguay, Y., Vézina, L.P.** (1993) New cold- and drought-regulated gene from *Medicago sativa*. *Plant Physiol* (1993) 101: 1411-1412.
- Liang, P., Pardee, A.B.** (1992) Differential Display of eucaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reactions. *Science* 257: 967-971.
- Pate, J.S., Flinn, A.M.** (1997) Fruit and seed development. In: JF Sutcliffe, JS Pate, eds. *The physiology of the garden pea*. Academic Press, London, pp 431-468.
- Sachetto-Martins, G., Franco, L.O., Oliveira, D.E.** (2000) Plant Glycine-rich proteins: a family or just a proteins with a common motif? *Biochim et Biophys Acta* 1492: 1-14.
- Vercher, Y.** (1989) Cambios morfológicos e histoquímicos en ovarios no polinizados de *Pisum sativum* durante la senescencia o la fructificación inducida por ácido giberélico y otras hormonas. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.
- Wang, T.L., Donkin, M.E., Martin, E.S.** (1984) The physiology of a Wilty Pea: abscisic acid production under water stress. *J Exp Bot* 35: 1222-1232.



## Introducción

Existe una regulación diferencial del gen *rab28* en tejidos vegetativos y embrionarios (Pla 1993, Busk 1997a, Busk et al 1999), participando en su regulación embrionaria el factor de transcripción específico de embrión VP1 (viviparous 1) (Busk and Pagés 1997b). Este gen contiene en su promotor 2 elementos ABRE necesarios para su inducción durante la embriogénesis y en respuesta al ABA. Estudios de *foot-printing in vivo* han mostrado que existe una protección sobre sus ABRE típica de los factores de transcripción de la familia de las bZIP. Con estos estudios previos realizados sobre el gen *rab28* en nuestro grupo, nuestro objetivo ha sido el aislamiento de miembros de la familia de factores de transcripción bZIP, involucrados en la regulación de *rab28* en tejidos embrionarios y vegetativos.

## Resultados y discusión

### Aislamiento y caracterización de los factores bZIP *zm721*, *zm92* y *zm10*

Para el aislamiento de los factores se diseñaron 2 oligonucleótidos degenerados correspondientes a la región básica conservada característica de los factores bZIP. Mediante dos reacciones de PCR usando como molde cDNAs de una librería de embrión seco y de una librería de hoja estresada hídricamente, ambas de maíz, se amplificaron 2 bandas. Las secuencias bZIP obtenidas definieron una familia de factores bZIP en maíz *EmBP-1 like*. Se realizaron screenings de las 2 librerías anteriores usando como sonda dos de las secuencias aisladas y se obtuvieron 2 secuencias parciales en el embrión, *zm721* y *zm92* y una completa en hoja estresada, *zm10*. Las secuencias parciales se completaron en sus extremos 5' mediante la técnica de gene-*race*. *Zm92* y *zm10* resultaron ser la misma secuencia que se diferencia únicamente en una región adicional en *zm10* de 28 aminoácidos adyacente y en 3' del elemento bZIP.

### Expresión de los factores en tejidos embrionarios y vegetativos

Se ha estudiado la expresión de estos factores por RT-PCR durante el desarrollo embrionario y en respuesta al estrés hídrico en hojas de 5dag. *zm721*, *zm921* y *zm10* se encuentran en el embrión a los 15dap y continúan hasta el estadio de embrión seco. También están presentes en tejido vegetativo. Las 3 proteínas están presentes en el embrión.

### Localización subcelular de *zm10* en células BMS de maíz

Utilizando la técnica de la biolística se transformaron células BMS de maíz con la construcción consistente en el cDNA de *zm10* fusionado a la proteína marcadora GFP bajo el control del promotor 2x35S. Esta proteína quimérica se localiza en el núcleo y en el citoplasma, no apreciándose ningún cambio de localización con tratamiento con ABA o DRB.

### **Efecto de zm721 y zm10 en la transcripción del gen rab28**

Mediante la técnica de la biolística se transformaron embriones de maíz de 23 días con las construcciones efectoras zm10 y zm721 bajo el promotor 2x35S, con plásmidos reporter que contienen el promotor mínimo que confiere respuesta a ABA del gen rab28 salvaje y mutado en los elementos cis ABREA y ABREB fusionado al gen GUS. Como control interno se utilizó el gen de la luciferasa. En el embrión, tanto zm10 como zm721 presentan un efecto transactivador dependiente de los ABRE sobre el gen rab28, aunque solamente al tratar los embriones con ABA. En plántulas de 2 d.d.g. también se produce una activación de las mismas características que en el embrión mediada por los dos factores.

### **Interacción *in vitro* de los factores bZIP con el DNA mediante ensayos EMSA**

Con ensayos tipo EMSA hemos definido como es la interacción *in vitro* de las proteínas zm92 y zm721 con los elementos cis ABREA y ABREB así como la interacción entre ellas y con el DNA. Las dos proteínas presentan interacción específica con ABREA y ABREB. Esta interacción con el DNA varía cuando las 2 proteínas se unen como heterodímero, ya que su competición con sonda fría es menor. Esto podría significar que estos 2 factores, que además coexisten en el embrión, puedan interaccionar *in vivo* regulando los mismos genes.

### **Interacción *in vivo* de los factores bZIP con el DNA mediante ensayos EMSA-Supershift**

Ensayos tipo supershift nos han permitido detectar dentro de las proteínas nucleares de un extracto de embrión seco, una banda retardada que interacciona con el anticuerpo contra la proteína zm721 y que además es competida su interacción con la sonda ABREA cuando al extracto se le añade la proteína zm721. Estos resultados señalan que la proteína zm721 presente en el extracto de embrión interacciona con ABREA y que tiene un papel regulador en la expresión del gen rab28 *in vivo*.

### **Fosforilación de los factores bZIP por CK2 e implicación en su interacción con el DNA *in vitro***

La proteína quinasa CK2 se ha involucrado en la regulación de muchos factores bZIP mediante la fosforilación. Los factores zm721 y zm92 presentan en la secuencia posibles dianas de fosforilación por esta proteína y por este motivo se diseñaron ensayos de fosforilación *in vitro* de estas proteínas por CK2. Las 2 proteínas resultaron ser fosforiladas. Cuando se estudió la interacción de las proteínas fosforiladas con el ABREA mediante EMSA, la interacción de zm721 se había incrementado mientras que la interacción de zm92 no se producía. Esto nos permite pensar en un posible mecanismo de regulación de la actividad de estos factores *in vivo* mediado por fosforilación por CK2, tal y como está descrito para otros factores de transcripción tipo bZIP.



## Bibliografía

- Busk, P. K., Jensen, A. B., and Pages, M.** (1997a). Regulatory elements in vivo in the promoter of the abscisic acid responsive gene rab17 from maize, *Plant Journal* 11, 1285-95.
- Busk, P. K., and Pagès, M.** (1997b). Protein binding to the abscisic acid-responsive element is independent of viviparous1 in vivo, *Plant Cell* 9, 2261-2270.
- Busk, P. K., Pujal, J., Jessop, A., Lumbreras, V., and Pagès, M.** (1999). Constitutive protein-DNA interactions on the abscisic acid-responsive element before and after developmental activation of the rab28 gene, *Plant Molecular Biology* 41, 529-536.
- Pla, M.** (1993). The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene rab28, *Plant Molecular Biology* 21, 259-66.

## **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN CLON DE ADNc QUE CODIFICA PARA UNA PROTEÍNA DE UNIÓN A CALCIO (FsCaBP) INDUCIDA POR ABA Y ESTRÉS SALINO EN SEMILLAS DURMIENTES DE HAYA**

*J.A. Jiménez, D. Rodríguez, G. Nicolás, C. Nicolás.*

**Dpto. de Fisiología Vegetal, Fac. Biología, Universidad de Salamanca.  
Pl. de los Doctores de la Reina s/n. 37007 Salamanca.**

**E-mail: [jeanjn@gugu.usal.es](mailto:jeanjn@gugu.usal.es)**

### **Sinopsis**

Recientemente se han descrito diversas proteínas vegetales de unión a calcio implicadas en las respuestas de las plantas al ácido abscísico (ABA) y a diferentes tipos de estrés (1, 2). En nuestro laboratorio estamos interesados en los mecanismos de respuesta de semillas durmientes de haya al ABA y al calcio y por ello, mediante RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados conservados en este tipo de proteínas, hemos aislado un fragmento de 460 pb que presenta similitud con proteínas de unión a calcio. El clon completo, denominado FsCaBP, se aisló a partir de una genoteca de ADNc construida partiendo de ARNm de semillas de haya tratadas con ABA (3).

### **Introducción**

El ácido abscísico es una sustancia reguladora del crecimiento que ejerce distintas funciones, tanto activadoras como inhibitoras, durante el ciclo de vida de la planta. Está implicado en el control de un amplio rango de procesos fisiológicos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, como la formación y germinación de semillas o la adaptación de la planta a condiciones ambientales desfavorables (4), mediante la expresión de genes específicos para cada proceso.

Por otra parte, en los últimos años se han acumulado evidencias de que el calcio puede actuar como segundo mensajero en algunos de los efectos fisiológicos provocados por el ABA (5). Más concretamente, se ha postulado la existencia de 2 vías en la ruta de transducción de señales del ABA, una dependiente y otra independiente de calcio (6).



En experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio se ha demostrado que el ABA es capaz de inducir la síntesis de algunas proteínas y sus ARNm correspondientes durante la germinación de semillas de garbanzo y que este efecto era dependiente de calcio (7, 8). También hemos demostrado que el ABA puede inducir la expresión de ciertos genes relacionados con el mantenimiento de la dormición de semillas de haya, tanto por una ruta independiente del calcio (9) como por una dependientes de este ión (10).

En este trabajo, nuestro objetivo ha sido aislar y caracterizar una proteína de unión a calcio inducida por ABA y tratar de determinar su función en las respuestas de estas semillas al ácido abscísico durante la dormición, la germinación o las respuestas a condiciones de estrés.

## Resultados

Mediante RT-PCR, usando oligonucleótidos correspondientes a dominios conservados característicos de proteínas de unión a calcio, hemos aislado un clon de ADNc que codifica para una proteína de este tipo.

La secuencia proteica deducida de este clon está formada por 204 aminoácidos y contiene un único dominio de unión a calcio (EF-hand). La comparación de esta secuencia de aminoácidos con las bases de datos, reveló una homología del 50 al 60% con otras proteínas vegetales de unión a calcio (11, 12).

El análisis de la expresión de los transcritos correspondientes a este clon se determinó por northern blot. FsCaBP muestra una clara inducción por ácido abscísico, tratamiento que mantiene a las semillas en dormición, mientras que tiende a desaparecer en los tratamientos que provocan la salida de la dormición, como la estratificación a 4<sup>o</sup> C o la adición de ácido giberélico. También se ha observado un claro incremento en los niveles de expresión de este transcrito cuando las semillas se sometieron a estrés salino. Además el análisis de la expresión de este clon en diferentes tejidos de la planta pone de manifiesto que esta proteína de unión a calcio es específica de semillas.

Todos estos datos relacionan claramente esta proteína de unión a calcio con las respuestas al ABA en las semillas, si bien serán necesarios experimentos adicionales para determinar la función de esta proteína en la dormición de semillas y en las respuestas a condiciones de estrés.

## Bibliografía

- Takahashi, S., Katagiri, T., Yamaguchi-Shinozaki, K.** *Plant Cell Physiol.* 41: 898-903. (2000).
- Frandsen, G., Mueller-Uri, F., Nielsen, M., Mundy, J., Skriver, K.** *J. Biol. Chem.* 271: 343-348. (1996).
- Nicolás, C., Rodríguez, D., Poulsen, F., Eriksen, E.N., Nicolás, G.** *Plant Cell Physiol.* 38: 1303-1310. (1997).
- Leung, J., Giraudat, J.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 9: 199-222. (1998).
- Pandey, S., Tiwari, S.B., Upadhaya, K.C., Sopory, S.K.** *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 291-318. (2000).
- Gilroy, S.** *Plant Cell* 8: 2193-2209. (1996).
- Colorado, P., Rodríguez, A., Nicolás, G., Rodríguez, D.** *Physiol. Plant.* 83: 461-467. (1994).
- Colorado, P., Nicolás, G., Rodríguez, D.** *Physiol. Plant.* 94: 1-6. (1995).
- Lorenzo, O., Rodríguez, D., Nicolás, G., Rodríguez, P.L., Nicolás, C.** *Plant Physiol.* 125: 1949-1956. (2001).
- Lorenzo, O., Nicolás, C., Nicolás, G., Rodríguez, D.** *Plant Cell Physiol.* 43: 27-34. (2002).
- Chow, T., Hsu, T., Tsai F., Hsing Y.** *Plant Physiol.* 114: 1568-1568. (1997).
- Chen, J.C.F., Tsai, C.C., Tzen, J.T.C.** *Plant Cell Physiol.* 40: 1079-1086. (1999).



## EFFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO Y DE LA REHIDRATACIÓN SOBRE LA FRUCTIFICACIÓN Y LOS NIVELES DE GIBERELINAS Y DE ÁCIDO ABCSÍCICO DE LOS FRUTOS CÍTRICOS

Mehouachi J, Lliso I, Agustí J, Alós E, Soler G, Iglesias DJ, Tadeo FR, Cercós M, Talón M

**Departamento de Citricultura, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial 46113-Moncada, Valencia.**

**E-mail: mtalon@ivia.es**

### Sinopsis

Se ha estudiado el efecto del estrés hídrico en condiciones de campo sobre la fructificación y los niveles de giberelinas y de ácido abscísico de los frutos en desarrollo de las variedades Satsuma Okitsu y Clementina de Nules. En ambas variedades, los periodos de carencia de agua durante el crecimiento inicial del fruto incrementan la abscisión de los mismos. La rehidratación, sin embargo, desencadena una nueva oleada de abscisión en la variedad Clemenules, pero no así en la variedad Okitsu. Los incrementos de ABA en los frutos se relacionan con periodos sin lluvias, mientras que los descensos se relacionan o bien con las lluvias o bien con la rehidratación. La GA<sub>20</sub> parece ser el miembro de la ruta de la 13-hidroxilación que responde a las condiciones alternantes de humedad baja y alta, ya que cambios en sus niveles antagonizan aquellos que muestra el ABA. En condiciones severas de estrés hídrico, toda la ruta de síntesis de GAs parece activarse tras la rehidratación. Los resultados obtenidos respecto al efecto del estrés hídrico sobre las hojas en desarrollo utilizando plántulas de cítricos en condiciones de invernadero también indican que el ABA y GA<sub>20</sub> muestran variaciones antagónicas.

### Introducción

Cuando los cítricos son sometidos a estrés hídrico las hojas pierden turgencia, si bien permanecen unidas al árbol hasta que el estrés se libera mediante irrigación o lluvia, momento en que se produce una abscisión súbita (Tudela y Primo-Millo, 1992;



Gómez-Cadenas et al., 1996). Este comportamiento no es exclusivo de los cítricos, sino que se encuentra extendido a otras muchas plantas. En general, los cítricos poseen una adecuada regulación hídrica y en este sentido son plantas que conservan el agua debido a una combinación de factores anatómicos y fisiológicos que limitan el movimiento de la misma en su interior. Nuestro equipo ha mostrado que el ABA y el ACC se acumulan en las raíces en condiciones de estrés hídrico muy severo, y se reducen a niveles basales inmediatamente después de la rehidratación. La rehidratación restaura el movimiento xilemático e incrementa los niveles de ABA y ACC del fluido xilemático. Estas observaciones sugieren que el ABA y el ACC se transportan después de la rehidratación a las partes aéreas a través del xilema, induciendo la abscisión de hojas. El estrés hídrico, sin embargo, induce la acumulación de ABA en las hojas sin incrementar los niveles de ACC y etileno en estas condiciones.

A pesar de este conocimiento en relación con el desarrollo vegetativo, no poseemos una hipótesis adecuada que explique la regulación hormonal de la abscisión de los frutos en condiciones de estrés hídrico, aunque es bien conocido que en las condiciones de cultivo del área mediterránea la carencia de agua constituye un factor limitante de su desarrollo. En este trabajo se estudian los efectos del estrés hídrico sobre la fructificación y los niveles de GAs y ABA de los frutos en desarrollo.

## Material y Métodos

Como material vegetal en condiciones de campo se utilizaron las variedades Clementina de Nules (*Citrus clementina*) y Satsuma Okitsu (*Citrus unshiu*). También se utilizaron plántulas en desarrollo de la variedad Cleopatra para los estudios en ambientes controlados en invernadero. Se emplearon dos tratamientos: control (riego) y estrés hídrico (supresión del riego), que pudo continuarse o no con la liberación del estrés mediante rehidratación. Mediante procedimientos estándares se realizaron determinaciones de la humedad volumétrica del suelo, del potencial hídrico foliar, del desarrollo y producción de frutos, de las tasas de abscisión, de los parámetros de maduración interna y externa y de los contenidos endógenos de GAs y ABA de los frutos.

## Resultados y discusión

Se ha estudiado el efecto del estrés hídrico en condiciones de campo sobre la fructificación y los niveles de giberelinas y de ácido abscísico de los frutos en desarrollo de las variedades Satsuma Okitsu y Clementina de Nules. Los resultados indican que ambas variedades presentan un comportamiento diferencial en sus respuestas al estrés hídrico y posterior rehidratación. Así, en la variedad Clementina de Nules, los periodos de carencia de agua reducen el desarrollo del fruto al inicio de la fase de elongación celular. Este efecto, que puede perdurar hasta la cosecha, no es contrarrestado por la rehidratación. Por el contrario, en la variedad Okitsu, la rehidratación permite una cierta recuperación del desarrollo del fruto. En ambas variedades,

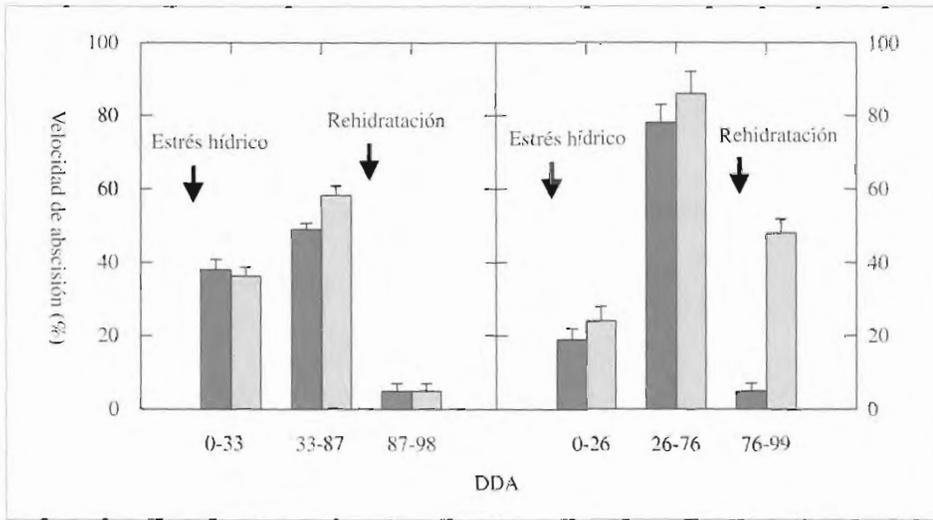


Figura 1. Efecto del estrés hídrico sobre la abscisión de frutos en desarrollo de las variedades Satsuma Okitsu (izq.) y Clementina de Nules (der.) Barras negras= control; Barras blancas=estrés.

los periodos de carencia de agua durante el crecimiento inicial del fruto incrementan la abscisión de los mismos (Figura 1). La rehidratación, sin embargo, desencadena una nueva oleada de abscisión en la variedad Clemenules, pero no así en la variedad Okitsu. Los incrementos de ABA en los frutos se relacionan con periodos sin lluvias, mientras que los descensos se relacionan o bien con las lluvias o bien con la rehidratación. La  $GA_{20}$  parece ser el miembro de la ruta de la 13-hidroxilación que responde a las condiciones alternantes de humedad baja y alta, ya que los cambios en sus niveles antagonizan aquellos mostrados por el ABA. En condiciones severas de estrés hídrico, toda la ruta de síntesis de GAs parece activarse tras la rehidratación. Los resultados obtenidos sobre el efecto del estrés hídrico sobre las hojas en desarrollo de plántulas de cítricos en condiciones de invernadero también indican que el ABA y  $GA_{20}$  muestran cambios antagónicos.



## Bibliografía

- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Talón, M., Primo-Millo, E.** (1996) Leaf abscission induced by ethylene in water stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* 112: 401-408.
- Tudela, D., Primo-Millo, E.** (1992) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiol.* 100: 131-137.

# **AUXINAS Y CITOQUININAS**

## **Revisión**



del aparato fotosintético, floración y estrategias para evitar la sombra. Están codificados por una pequeña familia de genes divergentes, cinco en *Arabidopsis* (*PHY-A*, *PHY-B*, *PHY-C*, *PHY-D* y *PHY-E*), y siete en tomate. Los fitocromos A (phy A) y B (phy B) son los mejor conocidos. Phy A, mayoritario en plantas etioladas, es el responsable de las respuestas de alta irradiancia (HIR), desencadenadas con prolongadas irradiaciones de luz FR. A phy B, estable a la luz, se le atribuyen las clásicas respuestas R/FR fotoreversibles y las respuestas a baja relación R/FR en plantas que crecen a la luz (Kendrick and Kronenberg, 1994; Chamovitz and Deng, 1996; Song PS, 1999; Sharma, 2001).

Las **citoquininas** son clásicas hormonas estimuladoras de la división y diferenciación celular que afectan una amplia gama de procesos de desarrollo de las plantas, entre los que cabe citar la iniciación del desarrollo del cloroplasto, el retraso de la senescencia, la movilización de nutrientes, la estimulación de la expansión de los cotiledones, así como la inducción de la formación de brotes en cultivos de tejidos vegetales. (Letham and Palni 1983, Mok, 1994). Su metabolismo y mecanismo de acción han sido revisados recientemente (Mok and Mok, 2001; Hare and Van Staden, 1997, Chen 1997, Haberer and Kieber, 2002).

Ya en los años cincuenta, recién descubiertas las CKs, se observó una similitud entre los efectos de la luz R y los de las CKs en el control de la germinación de semillas y expansión foliar (Miller, 1956), similitud que se describió, posteriormente, en otros procesos como el control de la síntesis de pigmentos o el desarrollo de los cloroplastos (Piatelli et al. 1971, Stetler and Laetsch, 1965). A pesar de la abundante información obtenida hasta la fecha, el tipo de interacción entre luz R y CKs no está aclarado. Con frecuencia se encuentra que sus efectos son aditivos como en la acumulación de clorofilas y antocianina en cotiledones de mostaza (Ford et al. 1981) o la síntesis de betalanina en amaranto (Kochhar et al. 1981). En ello se apoyan los modelos de acción independiente, en los que a menudo se postula que tanto CKs como Pfr afectan a un intermediario común. Sin embargo, otros datos apuntan a una acción de Pfr sobre los niveles de CKs en determinadas respuestas (Thomas et al. 1997). Indudablemente, un análisis de los datos existentes indica que la implicación de una hormona en un proceso controlado por la luz no se clarifica con facilidad, dada las complejas interacciones de las diferentes hormonas y de los distintos fitocromos entre sí (Smith et al. 1997; Short, 1999).

Las respuestas dependientes de Pfr y CKs corresponden a diversas etapas de la vida de la planta, abarcando desde el control de la germinación, la inducción foto-periodica de la floración, el estado nutricional, la síntesis de pigmentos, o la regulación del desarrollo en las plántulas etioladas al ser transferidas a la luz. Las posibles interacciones entre hormonas y luz en dichas respuestas han sido revisadas y discutidas por Thomas et al. (1997) y Kraepiel and Miginiac (1997). El debate respecto al nivel de interacción entre CKs y Pfr sigue abierto.



Se sabe que la luz **R induce la síntesis** de isopenteniladenosina en semillas de *Pinus sylvestris* (Qamaruddin and Tillberg, 1989), **o el incremento de CKs** en semillas de *Rumex* (van Staden and Wareing, 1972) y apio (Thomas et al, 1978), asociándose estos cambios a la interrupción de la dormición. En estas últimas especies se considera que el aumento de CKs procedería de la interconversión de distintas CKs almacenadas y no de nueva síntesis. Por otra parte, los mutantes de fitocromo *pew* de *Nicotiana plumbaginifolia* tienen un contenido foliar de zeatina mitad de las plantas salvajes (Kraepiel et al. 1995).

Durante la desetiología CKs y luz R causan respuestas similares, como desarrollo foliar, cotiledonar y diferenciación de cloroplastos, con la biosíntesis de clorofilas y organización tilacoidal asociada (Dei, 1982; Fletcher et al. 1973). Tanto CKs como R parecen inducir la expresión de genes del plasto (Bracale et al, 1988; Cohen et al 1988).

Por otra parte, la aplicación de CK es capaz de inhibir la acumulación de los mRNA de *PHY A* en cotiledones etiolados de pepino (Cotton et al. 1990) sustituyendo así la acción inhibitoria del propio fitocromo. Considerados estos datos en conjunto podría postularse que la **acción del fitocromo** se realizaría, al menos en parte, **por un incremento de la concentración o efectividad de las CKs**, y que, estas a su vez determinarían la capacidad de percepción de la luz. En este último aspecto, cabe destacar el trabajo reciente de Seyedi et al. (2001) con el mutante *lip 1* de guisante. *Lip 1* contiene niveles significativamente bajos de *phy A* y le falta el cuerpo prolamelar en oscuridad. La aplicación de 2-isopenteniladenina incrementa la cantidad de *phy A* y revierte en parte la escotomorfogénesis.

No obstante, en otros casos **CKs y R tienen efectos independientes y aditivos**, como en la inhibición de la elongación del hipocotilo de *Arabidopsis*. Los mutantes *hy* insensibles a la luz tienen una respuesta a las CKs normal salvo en el caso de *phy B* (*hy3*). Tanto CKs como luz saturan la respuesta. Actuarían por dos vías de señalización independientes y el efecto de las CKs dependería del etileno (Su and Howell, 1995). Cabe señalar que el mutante *phy B* tiene una respuesta alterada a CKs, lo que sugiere una relación, quizá indirecta, de la transducción de *phy B* y CK.

CKs y Pfr estimulan la **acumulación de clorofilas** afectando a la síntesis del ácido aminolevulínico (ALA) y a la protoclorofilida oxidoreductasa (POR). La acción a nivel de la producción de ALA se ha estudiado en cotiledones etiolados de pepino donde CKs y R parecen actuar de manera independiente (Fletcher et al. 1973; Ford et al. 1981; Kasemir and Mohr, 1982). En Angiospermas se conocen dos enzimas POR. POR A se acumula en tejidos etiolados, es el componente proteico principal del cuerpo prolamelar y, en muchas especies, se degrada de un modo importante al pasar el tejido a la luz. POR B, presente durante todo el ciclo vital, tiene una expresión más o menos independiente de la luz (Reinbothe and Reinbothe, 1996). El *phy A* inactiva el gen de POR en plántulas etioladas de *Arabidopsis* de manera que la luz FR bloquea la desetiología y el desarrollo del plasto con una represión severa del gen POR (Barnes et al 1996). En cotiledones etiolados de *Cucumis* (Kuroda et al. 1996) y de



*Lupinus* (Kusnetsov et al 1998), la aplicación de CKs incrementa los niveles de POR, sus mRNA, y la acumulación de clorofila. Un tratamiento con FR antes de la adición de la hormona mantiene los niveles de POR bajos y una pérdida del efecto hormonal (Kusnetsov et al 1998). Sin embargo, estas observaciones no pueden generalizarse, ya que la regulación hormonal y luminosa de POR difiere según las especies.

Los **mutantes** *det1* y *det2* de *Arabidopsis* cuando crecen a oscuras presentan muchas características de plantas creciendo a la luz, tales como desarrollo de cloroplastos y hojas, inhibición de la elongación del hipocotilo y alta expresión de genes *cab3* y *chs*. La aplicación de CK producía desetiación de las plántulas salvajes etioladas dando fenotipos similares a los de los mutantes *det1* y *det2* (Chory et al 1994). O sea, que la hormona era capaz de sustituir el requerimiento luminoso necesario para el desarrollo del cloroplasto. DET 1 podría ser un represor nuclear en la oscuridad de genes regulados por la luz y la CK reprimiría su actividad. Puesto que no se observaron diferencias significativas entre los niveles de CKs endógenos de las plantas salvajes y los mutantes *det1* y *det2*, se propuso que Pfr y CKs actuarían independiente o secuencialmente a través de un mecanismo de señalización común que implicaría la acción represora de DET 1 y DET 2. Cabe señalar, que dado el tamaño de *Arabidopsis* la cuantificación de CKs corresponde a plantas enteras sin que puedan apreciarse posibles diferencias específicas de órganos. Además, *det1* y *det2* pueden poseer, de manera puntual, niveles de alguna CK hasta 4 veces superiores a los de las plantas control. Por estas y otras razones, Hare and Van Staden (1997) sugieren que quizá estos cambios en los niveles endógenos de CKs de estos mutantes no han sido valorados adecuadamente.

La estrecha relación entre los efectos de las CKs y la luz R se pone también de manifiesto en otro mutante de *Arabidopsis*: *amp1* que sobre produce CKs y presenta fotomorfogénesis constitutiva parcial cuando crece en la oscuridad (Chin-Atkins et al. 1996). Estos autores infieren que las CKs o procesos dependientes de ellas estaría implicadas en la regulación de la desetiación. Chory et al (1994) y Chin-Atkins et al. (1996) proponen distintos **modelos de interacción** para explicar el comportamiento de los mutantes *det*, *amp 1* y *hy* recopilados y simplificados por Thomas et al. (1997) y Kraepiel and Miginiac (1997).

Tanto fitocromos como CKs actúan regulando la **expresión de genes nucleares**. Son genes relacionados con la fotosíntesis, la percepción de la luz o la protección frente a un exceso de luz, en los que CKs y Pfr parecen tener vías de transducción independientes. (Schumullig et al. 1997). Así, los gen *PAL 1*, *rbcS* y *cab* se regulan transcripcionalmente por luz (Ohl et al 1990, Silverthorne and Tobin, 1984, Karlin-Neumann et al. 1988) y posttranscripcionalmente por CKs (Deikam and Hammer, 1995, Flores and Tobin, 1988). Esto indicaría vías de transducción distintas que afectan al mismo gen.

Otros aspectos del **metabolismo nutricional** dependen también de fitocromos y CKs. Por ejemplo, el metabolismo nitrogenado. Su enzima clave, la nitrato reductasa, está sujeta a un complejo sistema de regulación, que incluye una regulación

transcripcional via fitocromos con intervención de un oscilador endógeno (Pattanyak and Chatterjee, 1998). Las CKs estimulan también su actividad controlando su transcripción. Por el contrario, la actividad de la asparagina sintetasa disminuye con luz R y mediante la aplicación de benziladenina (Dembinski et al. 1996).

La **síntesis de antocianos** es otro de los procesos, bien conocido, estimulado por Pfr y CKs. En *Arabidopsis* La luz regula a nivel transcripcional la fenilalanina amonioliasa (PAL1) y la chalcona sintasa (CHS). CKs provocan la acumulación de antocianos, solo en presencia de luz, incrementando los transcritos correspondientes a 4 enzimas: PAL1, CHS, chalcona isomerasa (CHI) y dihidroflavonol reductas (DFR). CHS y DFR se regulan a nivel transcripcional, PAL1 y CHI a nivel posttranscripcional. Dado que el control de la PAL1 lo realizan a distinto nivel se supone la existencia de diferentes vías de transducción (Deikman and Hammer, 1995).

Más recientemente se han descrito otros genes cuya expresión se estimula por CKs y luz como el gen de la monogalactosildiacilglicerol sintasa (MGDG) (Yamario et al. 2000), el de la hidroxipiruvato reductasa (Jin et al. 1998) de pepino y el AtZFP1 (Chrispeels et al. 2000). En general, la acción de la luz y las CKs origina respuestas estimuladoras de signo positivo. Sin embargo, también se conocen acciones de CKs y luz represoras de la expresión génica como las descritas sobre el gen CRR12 de pepino (Toyama et al. 1999). En los cotiledones de *Lupinus* la acción es opuesta, el gen que codifica la proteína ribosómica S14 (*rps14*) se estimula con CKs y se reprime con luz (Cherepneva et al. 1998).

Hay pues evidencia que indica que fitocromos y CKs actúan independientemente regulando muchos procesos de crecimiento y diferenciación. Sin embargo, otros datos experimentales indican relaciones distintas y es posible que la luz modifique el metabolismo de las CKs o regule etapas de su vía de transducción. Así, Sano and Youssefian (1994) estudian la acumulación de una **quinasa de proteína: el *wpk4*** que, en trigo y otras especies, responde a la luz y CKs (Ohba et al. 2000; Ikeda et al. 1999). Detectan que un antagonista de las CKs elimina el efecto de la luz, apoyando que las CKs están implicadas en la vía de señalización de la luz (Chikano et al. 2001).

Teniendo presente el conjunto de la información disponible no puede afirmarse la implicación de las CKs en las cadenas de transducción de los fitocromos. Sin embargo, dado el número y variedad de procesos regulados por CKs y fitocromos, es probable que el futuro esclarezca una amplia red de vías de transducción de señales luminosas, unas con intervención de CKs y otras no, interaccionando con otras señales reguladoras en el control del desarrollo vegetal.



## Bibliografía

- Barnes, S.A., Nishizaya, N.K., Quaggio, R.B., Whitelam, G.C., Chu, N.H.,** (1996) Far-red light blocks greening of *Arabidopsis* seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *Plant Cell* 8:601-615.
- Bracale, M., Longo, G.P., Rossi, G., Longo, C.P.,** (1988) Early changes in morphology and polypeptide pattern of plastids from watermelon cotyledons induced by benzyladenine and light are very similar. *Physiol. Plant.* 72:94-100.
- Chamovitz, D.A., and Deng, X.W.,** (1996) Light signaling in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:455-478.
- Chen, C.** (1997). Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiol. Plant.* 101: 665-673.
- Cherepneva, G., Olemüeller, R., Kulaeva, O.N., Kusnetsova, V.V.** (1998). Expression of the ribosomal protein S14 in lupin cotyledons is stimulated by cytokinin and inhibited by abscisic acid and light. *Botanica Acta* 111:287-290.
- Chikano, H., Ogawa, M., Ikeda, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H.** (2001) Two novel genes encoding SNF1-related protein kinases from *Arabidopsis thaliana*: differential accumulation of AtSR1 y AtSR2 transcripts in response to cytokinins and sugars, and phosphorylation of sucrose synthase by AtSR2. *Mol. Gen. Genet.* 264:674-681.
- Chin-Atkins, A.N., Craig, S., Hocart, CH., Dennis, E.S., Chaudhury, A.M.,** (1996). Increased endogenous cytokinin in *Arabidopsis amp1* mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta*:198:549-556.
- Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T., Brenner, M.,** (1994). A role of cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 104:339-347
- Chrispeels, H.E., Oettinger, H., Janvier, N., Tague, B.W.** (2000) AtZFP1, encoding *Arabidopsis thaliana* C2H2 zinc-finger protein 1, is expressed downstream of photomorphogenic activation. *Plant Mol. Biol.* 42:279-290.
- Cohen, L., Arzee, T., Zilberstein, A.** (1988) Mimicry by cytokinins of phytochrome regulated inhibition of chloroplast development in etiolated cucumber cotyledons. *Physiol. Plant.* 72:57-64.
- Cotton, R.L.S., Ross, C.W., Birne, D.R., Colbert, J.T.,** (1990) Down-regulation of phytochrome mRNA abundance by red light and benzyladenine in etiolated cucumber cotyledons. *Plant. Mol. Biol.* 14:707-714.
- Dei, M.** (1982) A two-fold action of benzyladenine in chloroplast formation in etiolated cucumber cotyledons. *Physiol. Plant.* 56:407-414.



- Deikam, J. and Hammer, P.E.** (1995). Induction of anthocyanin accumulation by cytokinin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 108:47-57.
- Dembinski, E., Wisniewska, I., Zebrowski, J., Raczynska-Bojanowska, K.** (1996) Negative regulation of asparagine synthetase in the leaves of maize seedlings by light, benzyladenine and glucose. *Physiol. Plant.* 96: 66-70.
- Fletcher, R.A., Tao, C., Ali A.** (1973) Stimulation of chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons by benzyladenine. *Can. J. Bot.* 51:937-939.
- Flores, S. and Tobin, E.M.** (1988) Cytokinin modulation of LHCP mRNA levels: the involvement of posttranscriptional regulation. *Plant Mol. Biol.* 11:409-415.
- Ford, M., Kasemir, H., Mohr, H.** (1981) The influence of phytochrome and kinetin on chlorophyll accumulation. *Ver Deutch Bot.Ges.* 94:35-41.
- Haberer, G. and Kieber, J.J.** (2002). Cytokinins. *New Insights into a classic phytohormone.* *Plant Physiol.* 128:354-362.
- Hare, P.D. and van Staden, J.** (1997). The molecular basis of cytokinin action. *Plant Growth Regulation* 23:41-78.
- Ikeda, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H.** (1999) Sucrose and cytokinin modulation of *WPK4*, a gene encoding a SNF1-related protein kinase from wheat. *Plant. Physiol.* 121: 813-820.
- Jin G., Davey, M.C., Ertl, J.R., Chen, R., Yu, Z.T., Daaniel, S.G., Becker, W.M., Chen, C.M.** (1998) Interaction of DNA-binding proteins with the 5'-flanking region of a cytokinin-responsive cucumber hydroxypyruvate reductase gene. *Plant Mol. Biol.* 38:713-724.
- Karlin-Neumann, G.A., Sun, L., Tobin, E.M.** (1988) Expression of light-harvesting chlorophyll a/b-protein genes is phytochrome-regulated in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* 88:1323-1331.
- Kasemir, H. and Mohr, H.** (1982) Coaction of three factors controlling chlorophyll y anthocyanin synthesis. *Planta* 156: 282-288.
- Kendrick, R.E. and Kronenberg, G.H.M.** (1994) *Photomorphogenesis in Plants.* 2<sup>nd</sup> ed. Kluwer Acad.Pub. 828 pp.
- Kochhar, V.K., Kochhar, S., Mohr, H.** (1981) Action of light and kinetin on beta-lain synthesis in seedlings of *Amaranthus caudatus*: a two-factor analysis. *Ber. Dtsch.Bot.Ges.* 94:27-34.
- Kraepiel, Y., Marrec, K., Sotta, B., Caboche, M., Miginiac, E.** (1995). *In vitro* morphogenic characteristics of phytochrome mutants in *Nicotiana plumbaginifolia* are modified and correlated to high indol-3-acetic acid levels. *Planta* 197: 142-146.



- Kraepiel, Y. and Miginiac E.** (1997) Photomorphogenesis and phytochrome. *Plant Cell Envir.* 20: 807-812.
- Kuroda, H., Masuda, T., Ohta, H., Shioi, Y., Takamiya, K.** (1996) Effects of light, developmental age and phytohormonas on the expression of the gene encoding NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in *Cucumis sativus*. *Plant Physiol. Biochem.* 34:17-22.
- Kusnetsov, V., Herrmann, R.G., Kulaeva, O.N., Oelmüller, R.** (1998). Cytokinin stimulates and abscisic acid inhibits greening of etiolated *Lupinus luteus* cotyledons by affecting the expresión of the light-sensitive protochlorophyllide oxidoreductase. *Mol. Gen. Genet.* 259:21-28.
- Letham, D.S., and Palni, L.M.S.** (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34:163-197.
- Miller, C.O.** (1956) Similarity of some kinetin and red light effects. *Plant Physiol.* 31:318-319.
- Mok, M.C.** (1994) Cytokinins and plant development- an overview. In: Cytokinins- Chemistry, activity and function. Mok DWS and Mok MC eds. CRC Press, Boca Raton, pp 155-166.
- Mok, D.W.S. and Mok, M.C.** (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:89-118.
- Ohba, H., Steward, N., Kawasaki, S., Berberich, T., Ikada, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H.** (2000) Diverse response of rice and maize genes encoding homologs of WPK4, an SNF-related protein kinase from wheat, to light, nutrients, low temperature and cytokinins. *Mol. Gen. Genet.* 263:359-366.
- Ohl, S., Hedrick, S.A., Chory, J., Lamb, C.** (1990) Functional properties of a phenylalanine ammoniua-lyase promotor from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2:837-848.
- Pattanayak, D., and Chatterjee, S.R.** (1998) Light-mediated regulation of nitrate reductase in higher plants. *J. Plant Biochem. Biotech.* 7: 73-78
- Piatelli, M., Giuidici de Nicola, M., Castrgiovanni, V.** (1971) The effect of kinetin on amaranthin synthesis in *Amaranthus tricolor* in darkness. *Phytochemistry* 10: 289-293.
- Qamaruddin, M. and Tillberg, E.** (1989) Rapid effects of red light on the isopen-tenyladenosine content in scots pine seeds. *Plant Physiol.* 91:5-8.
- Reinbothe, S. and Reinbothe, C.** (1996) The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 237: 323-343.



- Sano, H. and Youssefian, S.** (1994) Light and nutritional regulation of transcripts encoding a wheat protein kinase homolog is mediated by cytokinins. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 91: 2582-2586.
- Schmülling, T., Schäfer, S., Romanov, G.** (1997). Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiol. Plant.* 100:505-519.
- Short, TW.** (1999). Overexpression of Arabidopsis phytochrome B inhibits phytochrome A function in the presence of sucrose. *Plant Physiol.* 119: 1497-1505.
- Seyedi, M., Selstam, E., Timko, MP., Sundqvist, C.** (2001) The cytokinin 2-isopentenyladenine causes partial reversion to skotomorphogenesis and induces formation of prolamellar bodies and protochlorophyllide<sub>657</sub> in the *lip 1* mutant of pea. *Physiol. Plant.* 112:261-272.
- Sharma, R.** (2001) Phytochrome: A serine kinase illuminates the nucleus!. *Curr. Sci.* 80: 178-188
- Silverthorne, J. and Tobin, E.M.** (1984) Demonstration of transcriptional regulation of specific genes by phytochrome. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 81:1112-1116.
- Smith, H., Xu, Y., Quail, P.H.** (1997) Antagonistic but complementary actions of phytochrome A and B allow optimum seedling de-etiolation. *Plant Physiol.* 114:637-641.
- Song, P.S.** (1999) Inter-domain signal transmission within the phytochromes. *J. Biochem. Mol. Biol.* 32: 215-225..
- Stetler, D.A. and Laetsch, W.M.** (1965) Kinetin-induced chloroplast maturation in cultures of tobacco tissues. *Science* 149:1387-1388.
- Su, W. and Howell, S.H.** (1995) The effects of cytokinin and light on hypocotyl elongation in *Arabidopsis* seedlings are independent and additive. *Plant Physiol.* 108:1423-1430.
- Thomas, T.H., Biddington, N.L., Palevitch, D.** (1978) The role of cytokinins in the phytochrome-mediated germination of dormant imbibed celery (*Apium graveolens*) seeds. *Photochem. Photobiol.* 27: 231-236.
- Thomas, T.H., Hare, P.D., Van Staden, J.** (1997). Phytochrome and cytokinin responses. *Plant Growth Reg.* 23: 105-122.
- Toyama, T., Teramoto, H., Ishiguro S., Tanaka, A., Okada, K., Takeba, G.** (1999). A cytokinin-repressed gene in cucumber for a bHLH protein homologue is regulated by light. *Plant Cell Physiol.* 40:1087-1092.



**Van Staden, J. and Wareing, P.F.** (1972) The effect of light on endogenous cytokinin levels in seeds of *Rumex obtusifolius*. *Planta* 104: 126-133.

**Yamario, Y., Kanai, D., Awai, K., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, KI., Ohta, H.** (2000). Transcriptional regulation by light and phytohormones of the MGD gene in cucumber. *Biochem. Soc. Trans.* 28:738-740

**AUXINAS Y CITOQUININAS**  
**Comunicaciones**



## TRANSPORTE POLAR DE AIA DURANTE EL CRECIMIENTO DE HIPOCÓTILOS ETIOLADOS DE *Lupinus albus*

López Nicolás J I, Acosta M, Sánchez Bravo J

*Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia.*

*E-mail: jsbravo@um.es*

### Sinopsis

Se ha estudiado el transporte de AIA en secciones de hipocótilos etiolados de altramuces (*Lupinus albus*, L.) utilizando  $^3\text{H}$ -AIA. El transporte de la hormona es mayoritariamente basípeto y sensible a la inhibición por NPA, y por tanto reúne las características típicas del transporte polar de auxinas. La intensidad y polaridad del transporte son mayores en las zonas apicales, con crecimiento activo, que en las basales sin crecimiento. Al aumentar la edad de la planta disminuye la polaridad y más aún la intensidad del transporte. Los resultados sugieren la existencia de una correlación positiva entre el transporte polar y el crecimiento en longitud.

### Introducción

El transporte de AIA en el tallo está polarizado en dirección basípeta. De acuerdo con la hipótesis quimiosmótica propuesta por Rubery y Shelldrake (1974) y Raven (1975), la polaridad se basa en la existencia de transportadores de salida localizados en la base de las células transportadoras. En varios estudios se ha confirmado la presencia de proteínas transportadoras en la base de células de parénquima asociado a los tejidos vasculares (Morris y Thomas 1978, Gätweiler et al. 1998). Inhibidores específicos del transporte polar tales como el ácido Nafiltalámico (NPA) se han utilizado con profusión para estudiar el papel que desempeña el transporte polar de auxinas (TPA) en distintos procesos de desarrollo (crecimiento del tallo, formación de raíces adventicias, tropismos etc.). Mientras que se acepta de forma generalizada que el TPA es decisivo para el enraizamiento de esquejes (Katsumi et al. 1969, Garrido et al. 2002), su función en el alargamiento del tallo parece más discutida. La mayor



parte de los estudios realizados indican que la inhibición del TPA inhibe el crecimiento en plantas crecidas a la luz pero no el de plantas crecidas en oscuridad (Jensen et al. 1998) con algunas excepciones (Sánchez-Bravo et al. 1992, Tamimi y Firn 1985). Algunos autores sugieren que en el crecimiento de los tallos etiolados, estarían implicados reguladores no auxínicos tales como brasinoesteroides (Jensen et al. 1998). Ante estas discrepancias, hemos investigado las características del TPA en hipocótilos etiolados de altramuz y su relación con el crecimiento.

## Resultados y discusión

El TPA se ha estudiado en secciones de hipocótilo con distinta localización a lo largo del órgano y en plantas de diferentes edades. Se ha utilizado el método de Van der Weij (1932) con algunas modificaciones (Guerrero et al. 1999). Las secciones individuales se colocan en posición vertical sobre bloques de agar y a la superficie de corte del extremo superior se aplica  $^3\text{H-AIA}$ . Los bloques de agar se renuevan periódicamente y se mide por centelleo líquido la radioactividad transportada a tiempos variables para obtener las curvas de transporte (radioactividad (Bq) frente a tiempo (h)). Dichas curvas presentan una parte lineal cuya pendiente corresponde a la intensidad del transporte (en  $\text{Bq h}^{-1}$ ). De las curvas se deduce que, en las condiciones experimentales utilizadas, el transporte después de 8 h es muy escaso. Se realizaron ensayos con secciones derechas o invertidas a fin de medir el transporte basípeto o acrópeto respectivamente. La polaridad del transporte se determinó aplicando NPA a la superficie de corte unos minutos antes de la aplicación de  $^3\text{H-AIA}$ .

Los resultados indican que el transporte basípeto es de 3 a 10 veces mayor que el transporte acrópeto, y que el NPA produce una fuerte inhibición del transporte basípeto pero no altera el acrópeto. Lo anterior indica claramente que este órgano exhibe las características habituales del transporte polar en los tallos.

Por otra parte se ha comprobado que la intensidad del transporte basípeto y su inhibición por NPA (polaridad), varían dependiendo de la localización de la sección en el órgano y de la edad de la planta. Así, durante el período de crecimiento del órgano (entre 5 y 12 días de edad) la zona apical adyacente a los cotiledones, que es la zona con mayor velocidad de crecimiento, es la que muestra los valores más altos de intensidad de transporte. La zona basal sin crecimiento presenta los valores más bajos y la zona media del órgano muestra valores intermedios. Estos resultados confirman los obtenidos en un estudio previo (Sánchez-Bravo et al. 1992). Por otra parte, al aumentar la edad de la planta, la intensidad de transporte disminuye en todas las zonas.

De forma análoga, la polaridad del transporte (medida como el porcentaje de inhibición producido por NPA) es mayor en la zona apical que en la basal. La polaridad también disminuye con la edad especialmente en las zonas media y basal.

Los resultados indican la existencia de una correlación positiva entre el transporte polar y el crecimiento y sugieren que el TPA puede desempeñar un papel importante en la regulación del crecimiento en tallos crecidos en la oscuridad.



## Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de la CICYT/FEDER (Proyecto AGL-2001-0465) y la concesión de una beca predoctoral del MEC a J I López Nicolás.

## Bibliografía

- Gälweiler, L., Guan, Ch., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephemov, A., Palme, K.** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-2229
- Garrido, G., Guerrero, J.R., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J.** (2002) Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. *Physiol Plant.* 114: 303-312
- Guerrero, J.R., Garrido, G., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J.** (1999) Influence of 2,3,5-Triiodobenzoic acid and 1-N-Naphthylphthalamic acid on Indoleacetic acid transport in carnation cuttings. Relationship with rooting. *J Plant Growth Regul* 18: 183-190
- Jensen, P. J., Hangarter, R.P. y Estelle, M.** 1998. Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 116: 455-462.
- Katsumi, M., Chiba, Y., Fukuyama, M.** (1969) The roles of the cotyledons and auxin in the adventitious root formation of hypocotyl cuttings of light-grown cucumber seedlings. *Physiol Plant* 22: 993-1000
- Morris, D.A., Thomas, A.G.** (1978) A microautoradiographic study of the auxin transport in the stem of intact pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *J Ex Bot* 29: 147-157
- Raven, J.A.** (1975) Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol* 74: 163-172
- Rubery, P.H., Sheldrake, A.R.** (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 118: 101-121
- Sánchez-Bravo, J., Ortuño, A., Botía, J.M., Acosta, M., Sabater, F.** (1992b) The decrease in auxin polar transport down the lupin hypocotyl could produce the indole-3-acetic acid distribution responsible for the elongation growth pattern. *Plant Physiol* 99: 108-114
- Tamimi, S., Firn, R.D.** (1985) The basipetal auxin transport system and the control of cell elongation in hypocotyls. *J Exp Bot.* 36(167): 955-962
- Van der Weij, H.G.** (1932) Der Mechanismus des Wuchsstofftransportes. *Recl Trav Bot Néerl* 29: 379-496



*P. pinea* el proceso ocurre al cultivar los cotiledones en un medio con 4,4  $\mu\text{M}$  de 6-benciladenina (BA), aunque la respuesta disminuye a medida que avanza el periodo de germinación de los embriones de los que proceden (Capuana y Giannini 1995, Valdés et al 2001). Dadas ésta y otras características del sistema experimental, esto permite estudiar aspectos básicos de la acción de las citoquininas (Cks) en la inducción caulogénica.

En este trabajo tratamos de optimizar el sistema aumentando la producción de yemas y reduciendo el tiempo de cultivo. Para ello ensayamos la respuesta de cotiledones C0 (aislados de embriones previamente embebidos 48 h) y C4 (procedentes de embriones cultivados en un medio de germinación sin hormonas 4 d tras la imbibición) a diferentes Cks. También determinamos los periodos mínimos de exposición de C0 a 4,4, 10 y 44  $\mu\text{M}$  de BA necesarios para obtener respuesta. Por último, y como un primer paso para conocer la acción de BA en los tejidos cotiledonares, analizamos su absorción y metabolismo, así como los cambios en el contenido de otras Cks endógenas, en C0 durante la inducción caulogénica promovida por BA 4,4  $\mu\text{M}$ .

## Resultados y discusión

Las curvas dosis-respuesta para C0 y C4 mostraron que BA dio lugar a los mejores resultados: el 85-100% de los explantos C0 respondió incluso a concentraciones tan bajas como 0,4  $\mu\text{M}$ , aunque el número de yemas formadas por cotiledón aumentó de 20 a 100 con incrementos en la concentración aplicada. La eficiencia de las restantes Cks disminuyó en el siguiente orden: ribósido de BA, meta-Topolina, isopenteniladenina (iP) y Zeatina (Z), y no hubo respuesta para los ribósidos de iP y Z. En C4 la respuesta siempre fue menor y la concentración mínima de Ck necesaria para inducirla mayor, lo que indica una pérdida de sensibilidad del tejido cotiledonar a Cks durante la germinación de los embriones.

El período mínimo de contacto con BA para inducir yemas adventicias en C0 resultó ser de 12 h, 3 d y 6 d en concentraciones de 44, 10 y 4,4  $\mu\text{M}$  de BA respectivamente, si bien, para que respondieran el 100% de los cotiledones fue necesario el cultivo con BA durante 1, 8 y 12 d, saturándose la respuesta, medida como número de yemas formadas por cotiledón, a partir de 4, 16 y 30 días de exposición. Los datos sugieren que los periodos de inducción caulogénica descritos (Dimantoglou et al. 1990, García-Férriz et al. 1994, Capuana y Giannini 1995, Humara et al. 1999, Valdés et al. 2001) se pueden reducir a 4 días con 44  $\mu\text{M}$  de BA, lo que simplifica el sistema y aumenta la eficiencia del protocolo.

También prueban que la baja respuesta de C0 a periodos cortos de exposición con BA 4,4  $\mu\text{M}$  puede ser compensada aumentando cualquiera de las dos variables, la concentración de BA o el período de exposición a la Ck.

Respecto a la absorción y metabolismo de BA en explantos C0 cultivados en presencia de [ $^{14}\text{C}$ ]BA 4,4  $\mu\text{M}$ , se observaron 2 máximos de absorción de la Ck. La primera



acumulación se produjo tras 16 h (210 nmol de BA absorbidos.g<sup>-1</sup> ps) y fue seguida de un mínimo a los 2 días. Esta entrada y salida de BA probablemente estuvo asociada a movimientos de agua en los cotiledones. En esos 2 días, BA apenas fue metabolizada por CO (el 40-80% de la radiactividad presente correspondió a BA libre) y su concentración endógena llegó a ser de 88,04 μM a las 16 h, 20 veces mayor que la aplicada en el medio. Sólo se detectaron trazas de los 7- y 9- glucósidos de BA, formas de conjugación y detoxificación, de adenina y adenosina, resultantes de la degradación de BA, y un porcentaje cada vez mayor del 5'-nucleótido de BA, metabolito considerado forma activa debido a la rápida interconversión entre éste, el ribósido de BA y BA (Mok y Mok 2001).

El 2º máximo (188 nmol de BA absorbidos.g<sup>-1</sup> ps) se observó a los 8 días de cultivo. Durante el período previo, los cotiledones aumentaron tanto en peso fresco como en peso seco, luego hubo crecimiento. En esta ocasión la BA absorbida fue mayoritariamente metabolizada en forma de 5'-nucleótido (77% de la radiactividad presente). Ello dio lugar a descensos en la concentración endógena de BA (3,58 μM a los 8 días) e incrementos en la del nucleótido (27,49 y 30,69 μM a los 4 y 8 d). También se detectaron trazas de otros derivados. Los datos sugieren que:

Los primeros 2 días de cultivo suponen un período de adaptación de los explantos a las condiciones de cultivo y a la entrada masiva de BA. No obstante, la alta concentración de BA alcanzada en CO en el primer día es, probablemente, la inductora de procesos de división celular visibles en preparaciones de cotiledones cultivados durante tres días.

Posteriormente, los cotiledones reaccionan metabolizando BA principalmente en forma de nucleótidos, no teniendo apenas capacidad para conjugar BA con glucosa.

La segunda entrada de BA, que coincide con la mayor proporción y concentración de nucleótidos de BA en los tejidos, podría ser la desencadenante de la respuesta caulogénica dado que el período mínimo de inducción en 4,4 μM es de 6 días.

El "pool" de nucleótidos de BA desempeña un papel importante en la regulación y mantenimiento de las formas activas de BA responsables de la respuesta caulogénica.

El contenido de las Cks endógenas analizadas (Z, DHZ, iP y sus ribósidos) fue de 0,3-0,4 nmol. g<sup>-1</sup> ps y mostró poca variación en el tiempo con excepción de un incremento detectado a las 2 h de cultivo (3,5 nmol.g<sup>-1</sup> ps) debido principalmente a aumentos en los niveles de Z y RDHZ.



## Bibliografía

**Capuana, M., Giannini, R.** (1995) *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 31:202-206

**Dimantoglou, S., Panagopoulos, I., Muñoz-Ferriz, A., Rhizopoulou, S.** (1990) *J Plant Physiol*. 137:58-63

**García-Ferriz, L., Serrano, L., Pardos, J.A.** (1994) *Plant Cell Tiss Org Cult*. 36:135-140

**Humara, J.M., Ordás, R.J.** (1999) *Plant Cell Rep*. 19:51-58

**Mok, D.W.S., Mok, M.C.** (2001) *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 52:89-118

**Valdés, A.E., Ordás, R.J., Fernández, B., Centeno, M.L.** (2001) *Plant Physiol. Biochem* 39:1-8

## REGULACIÓN POR AUXINA Y ETILENO DE LA ELONGACIÓN Y EXPANSIÓN RADIAL DE LA RAÍZ PRIMARIA DE MAÍZ

\*Alarcón M.V. \*Reis-Grilo C.M., \*Lloret, P.G., \*\*Salguero J.

\**Biología Celular, Facultad de Ciencias Univ. de Extremadura. 06071Badajoz.*

\*\**Fisiología Vegetal, E. I. A. Univ. de Extremadura. 06071 Badajoz.*

E-mail: salguero@unex.es

### Sinopsis

La adición exógena de ácido naftalénacético (ANA) y/o del precursor de etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) produce la inhibición de la elongación y el aumento del diámetro de la raíz primaria de maíz, siendo mucho mayores estos efectos en los tratamientos con la auxina. El tratamiento de raíces primarias de maíz con concentraciones micromolares de ACC, en presencia de bajas concentraciones de ANA (0,01-0,05  $\mu\text{M}$ ), estimula el efecto inhibitor de la elongación producido por la hormona. Además, la expansión radial, medida como incremento del diámetro transversal de la raíz, causada por la auxina también se incrementa por la adición de ACC. Estos efectos estimuladores del ACC sobre la acción de la auxina no se observan cuando se utilizan concentraciones de ANA mayores de 0,5  $\mu\text{M}$ , que inhiben completamente la elongación. La auxina controla los niveles de etileno en raíces y ANA en concentraciones mayores de 0,5  $\mu\text{M}$  estimula significativamente la producción de etileno. Estos resultados sugieren que el etileno participa, en interacción con la auxina, en la regulación del desarrollo de la raíz; el grado de participación en este proceso depende de la producción endógena de etileno, que está controlado, entre otros factores, por la propia auxina.

### Introducción

La auxina es la principal hormona en el control del desarrollo de la raíz. La adición exógena de ANA a raíces primarias de maíz inhibe la elongación y estimula el crecimiento radial (Kerk y Feldman, 1995). Además, la auxina promueve la producción de



etileno. Las raíces tratadas con ANA incrementan la velocidad de producción de etileno, que vuelven a valores normales cuando se elimina el ANA del medio externo. En raíces de maíz, el tratamiento con ACC produce efectos similares, es decir, inhibición de la elongación y aumento del diámetro transversal (Alarcón et al., 2001). Dado que la auxina regula la producción de etileno y que ambas hormonas producen efectos parecidos, la participación del etileno en los procesos regulados por auxina está sometida a una fuerte controversia, planteándose dos hipótesis alternativas. Una de ellas propone al etileno como mediador del efecto de la auxina (Jackson, 1991) mientras la otra lo excluye, suponiendo una acción directa de la auxina (Eliasson et al., 1989). Recientemente (Rahman et al., 2001), se ha propuesto a la auxina como regulador positivo de las respuestas mediadas por el etileno, lo que ofrece una tercera posibilidad basada en la interacción de ambas hormonas, que pueden actuar de forma cooperativa en un determinado proceso. Para comprobar esta última hipótesis, se han realizado tratamientos combinados utilizando ACC y ANA de forma conjunta y en condiciones que permitan observar la posible interacción de ambas hormonas, es decir concentraciones de ANA que mantengan la producción de etileno en valores cercanos a los de raíces no tratadas.

## Resultados y discusión

Los tratamientos con ANA y ACC producen efectos similares: inhiben la elongación e incrementan en diámetro de la raíz. Sin embargo, en la raíz primaria de maíz hemos encontrado algunas diferencias en los efectos de estas dos moléculas. La auxina es más efectiva en la inhibición de la elongación, produciendo la inhibición total, mientras que tratamientos con ACC no inhiben más de un 60 %. Respecto al crecimiento por expansión, ambos compuestos producen un incremento en el diámetro de la raíz. Este incremento, medido como peso del cm apical, representa un 200 % en el caso de la auxina pero sólo un 40% en los tratamientos con ACC durante 24 horas.

La adición exógena de auxina estimula la producción de etileno; pero sólo las raíces tratadas con concentraciones superiores a  $0,5 \mu\text{M}$  mantienen los niveles de etileno más elevados que en raíces no tratadas. Del mismo modo, el ACC incrementa los niveles de etileno de forma dependiente de la concentración. Así,  $1 \mu\text{M}$  ACC produce un ligero aumento en la producción de etileno mientras que  $5 \mu\text{M}$  ACC la eleva hasta diez veces.

Los resultados obtenidos en los tratamientos combinados de ANA+ACC muestran que el ACC incrementa el efecto inhibitorio del ANA sobre la elongación a concentraciones inferiores a  $0,1 \mu\text{M}$ . Si la concentración de ANA es mayor de  $0,5 \mu\text{M}$  la inhibición por la auxina es total, por lo que no es posible observar el efecto añadido del ACC.

Respecto a la expansión radial, se ha medido el diámetro transversal de la raíz en los 15 mm apicales. Tanto la auxina como el etileno promovido por el ACC incrementan el diámetro de la raíz presentando un máximo de acción a una distancia de 5 mm desde el extremo del ápice. Este efecto es dependiente de la concentración



para ambos compuestos. Al igual que ocurría con la elongación, la acción de la auxina sobre la expansión radial es más potente que la del etileno. En los tratamientos con ANA se ha medido un incremento máximo del 53%, mientras que con ACC sólo se alcanza el 28%. La expansión radial es menos sensible al etileno que la elongación. Así 2  $\mu\text{M}$  ACC, que inhibe el 38% la elongación, sólo incrementa un 6% el diámetro transversal de la raíz a 5 mm del ápice.

En los tratamientos combinados, el efecto del ACC sobre la expansión transversal depende de la dosis de la auxina suministrada al mismo tiempo. A bajas concentraciones de ANA (0,01  $\mu\text{M}$ ) se observa estimulación del diámetro transversal en los tratamientos combinados con 1, 2 y 5  $\mu\text{M}$  ACC. Sin embargo, en los tratamientos con dosis de ANA más altas (0,5  $\mu\text{M}$ ) sólo se estimula significativamente el engrosamiento tras la adición de ACC 5  $\mu\text{M}$ .

Estos resultados sugieren que la auxina y el etileno interaccionan en la regulación del crecimiento de la raíz. Si bien se acepta que la auxina es la principal hormona que interviene en dicho proceso, el etileno parece jugar un papel relevante modulando los efectos de la auxina.

### **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos IPR98B016 y 2PR01B009 de la Consejería de Educación y Juventud (Dirección General de Enseñanzas Universitarias e Investigación) de la Junta de Extremadura.



## Bibliografía

- Alarcón, M.V., Lloret, P.G., Iglesias, D.J., Gutiérrez, L., Lara, A. y Salguero, J.** (2001). Diferencias entre los efectos de auxina y etileno en raíces de maíz. XIV Reunión Nacional Sociedad Española de Fisiología Vegetal. VII Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Pp. 185.
- Jackson, M.B.** (1991). Ethylene and root growth and development. En *The Plant Hormone Ethylene* Matoo, A.K. y Suttle J.C. (Eds). Pp 159-181- CRC Press Boca Raton USA.
- Kerk, N.M. y Feldman, L.J.** (1995). A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. *Development*, 121: 2825-2833.
- Rahman, A., Amakawa, T., Goto, N., y Tsurumi, S.** (2001). Auxin is a positive regulator for ethylene-mediated responses in the growth of arabidopsis roots. *Plant Cell Physiol.*, 42: 301-307.

## ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN AUXINA/ETILENO EN PLANTAS DE TOMATE

Blanca Vioque<sup>1a</sup>, José M<sup>a</sup> Castellano<sup>1b</sup> y Jesús Chamorro<sup>2c</sup>

<sup>1</sup>Instituto de la Grasa-CSIC. P.O. Box 1078, E-41012 Sevilla

<sup>2</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas-UPV-CSIC. Avda. de los Naranjos s/n. 46022 Valencia

E-mail: <sup>a</sup>[bvioque@cica.es](mailto:bvioque@cica.es); <sup>b</sup>[jmcas@cica.es](mailto:jmcas@cica.es); <sup>c</sup>[chamarro@ibmcp.upv.es](mailto:chamarro@ibmcp.upv.es)

### Sinopsis

Las plantas transgénicas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill. cv. Ailsa craig) transformadas con el gen *iaaM* de *Agrobacterium tumefaciens* bajo el control del promotor 35S CaMV, además de sobreproducir auxina también sobreproducen etileno. Los resultados obtenidos son consistentes con el modelo de inducción secuencial de los enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa por la auxina.

### Introducción

El ácido indol-3-acético (IAA) y el etileno son dos importantes fitorreguladores en plantas que presentan importantes interacciones tanto a nivel de biosíntesis como de acción, hasta el punto de que con frecuencia resulta difícil distinguir los efectos producidos por ambas fitohormonas (Abeles *et al.*, 1992). Así, por ejemplo, se ha sugerido que la auxina podría desencadenar la producción autocatalítica de etileno que marca el inicio de los procesos asociados a la maduración en los frutos climatéricos, y éste, a su vez, podría acelerar la destrucción del IAA (considerado como inhibidor de la maduración) una vez iniciado el proceso (Mousdale y Knee, 1981; Brady, 1987). La ruta de biosíntesis del etileno está regulada fundamentalmente por los enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa. Por el contrario, la ruta biosintética del IAA en plantas es todavía tema de debate. Distintas evidencias indican que en tejidos vegetativos la estimulación de la producción de etileno por auxina responde a una inducción secuencial de los enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa (Peck y Kende, 1995; 1997). La mayor parte de las experiencias planteadas para abordar estos problemas se han llevado a cabo mediante aplicaciones exógenas de



# GIBERELINAS

## Revisiones

las respuestas relacionadas con GAs, el resto de mutantes aislados en distintos rastros presentan fenotipos relacionados sólo con algunos subgrupos de los procesos controlados por GAs. Así, el mutante semidominante *gai-1* presenta enanismo que no puede ser compensado por la aplicación exógena de GAs, pero sus flores son fértiles y las semillas germinan normalmente[9, 10]. Y la pérdida de función de *RGA* (*REPRESSOR OF GA RESPONSE*) suprime el enanismo provocado por la ausencia de GAs, pero no el defecto de germinación ni la esterilidad[11, 12]. Tanto *GAI* como *RGA* parecen codificar, por tanto, reguladores negativos de la señalización por GAs.

## Las proteínas DELLA

*GAI* y *RGA* muestran un elevado porcentaje de similitud de secuencia entre ellas y pertenecen a una familia de proteínas reguladoras denominada GRAS[13], en la que también se incluye *SCARECROW*, implicada en el desarrollo de raíz[14]. Así como el dominio C-terminal está muy conservado entre los numerosos miembros de la familia GRAS, el extremo N-terminal es más variable. La presencia de un **motivo DELLA** en la primera mitad de la proteína es exclusiva de *GAI* y *RGA*, y de otras tres proteínas relacionadas: *RGL1*, *RGL2* y *RGL3*[15, 16]. Dicho motivo parece ser esencial para la transducción de la señal por GAs, puesto que la eliminación de 17 aminoácidos incluyendo el motivo DELLA convierte al menos a *GAI*, *RGA*, *RGL1* y *RGL2* en represores constitutivos de la señalización por GAs[10, 15-17].

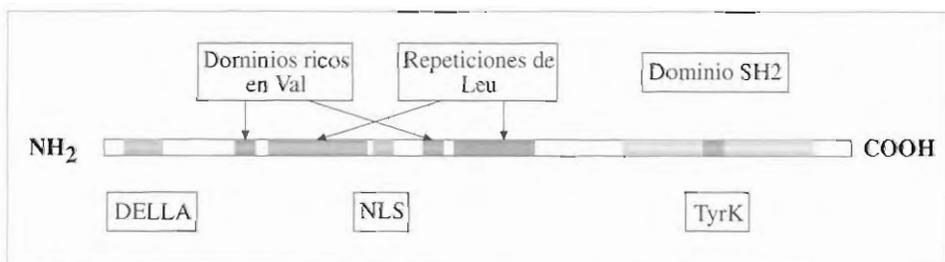


Figura 1. Esquema con los motivos conservados en las proteínas DELLA. El tamaño medio de estas proteínas es de 500 aminoácidos.

Además del motivo DELLA, las proteínas de esta subfamilia presentan unas características estructurales que apoyan la función reguladora que se les atribuye basándose en los fenotipos mutantes (Figura 1). Todas las proteínas presentan una **señal de localización nuclear (NLS)** bipartita (dos aminoácidos básicos + diez aminoácidos cualquiera + 3 aminoácidos básicos más entre los cinco siguientes)[18]. Utilizando fusiones a GFP se ha podido comprobar que, en efecto, *RGA*, *RGL1*, y *SLR1/OsGAI* (una proteína DELLA de arroz) se acumulan específicamente en el núcleo[11, 16, 17, 19], aunque no se ha comprobado si la NLS predicha es la responsable de dicha localización. La presencia de las proteínas DELLA en el núcleo hace relevante la presencia de un **motivo LXXLL** que en otros organismos

es responsable de la unión de coactivadores transcripcionales a receptores nucleares[20]. También está presente una **región rica en Val** (VHIID en casi todos los casos, incluyendo miembros de la familia GRAS no relacionados con la señalización por GAs), cuya función se desconoce. Más interesantes son la región de **repeticiones de Leu** y un **dominio del tipo SH2** que son típicas de proteínas señalizadoras descritas en mamíferos y denominadas STATs por su doble función de transductoras de señales extracelulares y activadoras de la transcripción[21]. En el dominio SH2 se encuentra perfectamente conservado un sitio de fosforilación por Tyr kinasas, cuya relevancia fisiológica aún no ha sido comprobada.

### Mecanismos moleculares de la señalización

Es muy probable que la función molecular de las proteínas DELLA sea activar o reprimir la expresión de genes modulados por GAs. De hecho, algunas proteínas DELLA han mostrado ser buenos activadores transcripcionales en sistemas heteroespecíficos, como levadura [19] (L.G-C, D.A. y M.A.B., resultados no publicados). Aunque las STATs presentan capacidad de unión al DNA, se desconoce si las proteínas DELLA son capaces de unirse directamente a los promotores de genes regulados por GAs. No obstante, la posibilidad de establecer interacciones proteína-proteína a través del dominio LXXLL o algún otro dominio no identificado, permite imaginar fácilmente mecanismos de acceso de las proteínas DELLA a los promotores diana.

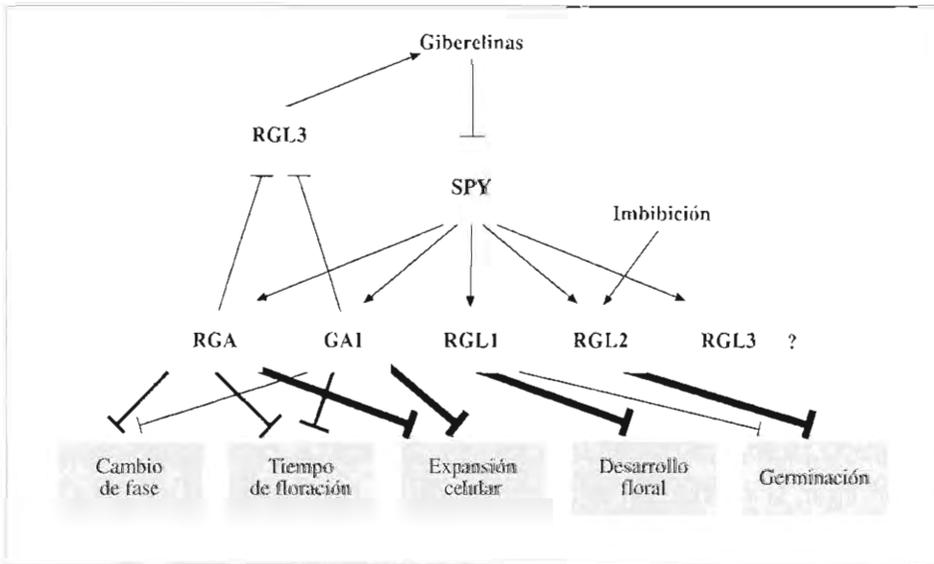


Figura 2. Red de señalización de giberelinas en Arabidopsis mediana por proteínas DELLA.



## Bibliografía

- Hooley, R.**, "Gibberellins: perception, transduction and responses". *Plant Mol Biol*, 26: 1529-1555 (1994).
- Kamiya, Y. and J.L. Garcia-Martinez**, "Regulation of gibberellin biosynthesis by light". *Curr Opin Plant Biol*, 2: 398-403 (1999).
- Xu, Y.L., D.A. Gage, and J.A. Zeevaart**, "Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. Effects of photoperiod on expression of the GA4 and GA5 loci". *Plant Physiol*, 114: 1471-1476. (1997).
- Xu Y.L., et al.**, "Feedback regulation of GA5 expression and metabolic engineering of gibberellin levels in *Arabidopsis*". *Plant Cell*, 11: 927-936. (1999).
- Reed, J.W., et al.**, "Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in *Arabidopsis*". *Plant Physiol*, 112: 337-342 (1996).
- Jacobsen, S.E., K.A. Binkowski, and N.E. Olszewski**, "SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9292-9296 (1996).
- Jacobsen, S.E. and N.E. Olszewski**, "Mutations at the SPINDLY locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction". *Plant Cell*, 5: 887-896 (1993).
- Thornton, T.M., S.M. Swain, and N.E. Olszewski**, "Gibberellin signal transduction presents: the SPY who O-GlcNAc'd me". *Trends Plant Sci*, 4: 424-428. (1999).
- Koornneef, M., et al.**, "A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*". *Physiol. Plant.*, 65: 33-39 (1985).
- Peng, J., et al.**, "The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses". *Genes Dev.*, 11: 3194-3205 (1997).
- Silverstone, A.L., C.N. Ciampaglio, and T.-p. Sun**, "The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway". *Plant Cell*, 10: 155-169 (1998).
- Silverstone, A.L., et al.**, "The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*". *Genetics*, 146: 1087-1099 (1997).
- Pysh, L.D., et al.**, "The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes". *Plant J.*, 18: 111-119 (1999).
- Di Lorenzo, L., et al.**, "The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root". *Cell*, 86: 423-433. (1996).

- Lee, S., et al.**, "Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition". *Genes Dev*, 16: 646-658. (2002).
- Wen, C.K. and C. Chang**, "Arabidopsis RGL1 Encodes a Negative Regulator of Gibberellin Responses". *Plant Cell*, 14: 87-100. (2002).
- Dill, A., H.S. Jung, and T.P. Sun**, "The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 14162-14167. (2001).
- Dingwall, C. and R.A. Laskey**, "Nuclear targeting sequences—a consensus?". *Trends Biochem Sci*, 16: 478-481. (1991).
- Ogawa, M., et al.**, "Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level". *Gene*, 245: 21-29. (2000).
- Heery, D.M., et al.**, "A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors". *Nature*, 387: 733-736. (1997).
- Darnell, J.E., Jr.**, "STATs and gene regulation". *Science*, 277: 1630-1635. (1997).
- Silverstone, A.L., et al.**, "Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis". *Plant Cell*, 13: 1555-1566. (2001).
- Harberd, N.P., et al.**, "Gibberellin: inhibitor of an inhibitor of...?". *Bioessays*, 20: 1001-1008. (1998).
- Dill, A. and T. Sun**, "Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana". *Genetics*, 159: 777-785. (2001).
- Dill, A. and T.-P. Sun**. *Studies on null alleles of RGA and GAI, repressors of gibberellin signaling in Arabidopsis*. in *11th International Conference on Arabidopsis Research*. 2000. Madison, WI.
- King, K.E., T. Moritz, and N.P. Harberd**, "Gibberellins are not required for normal stem growth in Arabidopsis thaliana in the absence of GAI and RGA". *Genetics*, 159: 767-776. (2001).
- Fu, X., et al.**, "Expression of Arabidopsis GAI in transgenic rice represses multiple gibberellin responses". *Plant Cell*, 13: 1791-1802. (2001).
- Peng, J., et al.**, "'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators". *Nature*, 400: 256-261 (1999).
- Ikeda, A., et al.**, "slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8". *Plant Cell*, 13: 999-1010. (2001).

**Boss, P. and M. Thomas**, "Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation". *Nature*, 416: 847-850. (2002).

**Collett, C.E., N.P. Harberd, and O. Leyser**, "Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation". *Plant Physiol*, 124: 553-562. (2000).

**Blázquez, M.A., et al.**, "Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter". *Plant Cell*, 10: 791-800 (1998).

**Blázquez, M.A., et al.**, "*LEAFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis*". *Development*, 124: 3835-3844 (1997).

**Blázquez, M.A. and D. Weigel**, "Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*". *Nature*, 404: 889-892 (2000).

## EL PAPEL DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES DE LA CLASE DOF, BPBF Y SAD, EN LA REGULACIÓN DE GENES INDUCIBLES POR GA EN ALEURONA DE CEBADA

Pilar Carbonero<sup>1</sup>, Montaña Mena<sup>1</sup> \*, Inés Isabel-LaMoneda<sup>1</sup>, Manuel Martínez<sup>1</sup>, F. Javier Cejudo<sup>2</sup> e Isabel Díaz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular , Dpto. de Biotecnología-UPM, ETS Ingenieros Agrónomos, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.

<sup>2</sup>Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla, CICC, Avda. Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla.

\*Dirección actual: Unidad de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente. Universidad Castilla-La Mancha, Avda. Carlos III s/n. 45071 Toledo.

### Sinopsis

Los genes de cebada que codifican los factores transcripcionales de la clase DOF, BPBF y SAD (genes Pbf y Sad), se expresan en células de aleurona post-germinación. El mRNA de Pbf es inducido por GA y reprimido por ABA, mientras que el gen Sad no responde a tratamientos hormonales. Ensayos de tipo EMSA han mostrado que ambos factores proteicos se unen específicamente a la caja de pirimidinas presente en los promotores de genes que codifican una cistein-proteasa tipo catepsina B (gen Al21) y una  $\alpha$ -amilasa de bajo pI (gen Amy2/32b), ambos inducidos por GA en aleuronas de cebada. En experimentos de expresión transitoria en capas de aleurona, SAD activa la transcripción del promotor del gen Al21 mientras que BPBF revierte la activación inducida por GA en este promotor.

### Introducción

En el ciclo de vida de las semillas de los cereales pueden distinguirse tres fases: desarrollo o formación del grano, dormancia y germinación. La fase de desarrollo se inicia en el momento de la fecundación que genera un embrión diploide y un

endospermo triploide (Berger, 1999). Durante la formación de la semilla las células del endospermo se van a diferenciar en dos tipos, las del endospermo amiláceo, especializadas principalmente en la síntesis y almacenamiento de almidón y proteínas de reserva, que sufrirán un proceso de muerte celular durante la etapa de desecación de la semilla (Young y Gallie, 1999), y las periféricas células de la aleurona, que permanecerán vivas tras el proceso de desecación. La imbibición de la semilla inicia el proceso germinativo en el que las giberelinas (GAs) sintetizadas en el embrión, difunden hacia el endospermo donde son percibidas por las células de aleurona (Appleford y Lenton, 1997). La respuesta final de estas células consiste en la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas que movilizan los compuestos de reserva almacenados en el endospermo para generar el soporte nutritivo para el crecimiento de la nueva plántula (Skadsen, 1998).

La regulación génica en las células de la capa de aleurona está controlada fundamentalmente por la relación entre GAs y ácido abscísico (ABA). Las GAs, sintetizadas por el embrión, difunden hacia la aleurona donde disparan la activación transcripcional de una serie de genes que codifican hidrolasas, tales como  $\alpha$ -amilasas, proteasas,  $\beta$ -glucanasas, etc. (Lovegrove y Hooley, 2000). Aún cuando el receptor de GA no ha sido aislado ni caracterizado, sin embargo, se han acumulado una serie de datos relativos al lugar de percepción de GA, localizado en la cara externa de la membrana plasmática (Gilroy y Jones, 1994), y relativos a la cadena de transducción de señales que sigue a la percepción del GA (Bethke y Jones, 1998; Lovegrove y Hooley, 2000). Sin embargo, se sabe poco acerca de los factores transcripcionales (TFs) concretos implicados en la regulación de los genes que codifican las hidrolasas mencionadas.

El análisis funcional de los promotores de  $\alpha$ -amilasas de cebada (*Hordeum vulgare* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.) han identificado un elemento en cis ampliamente conservado, requerido para la inducción por GA, denominado GARC (GA-Responsive Complex). Aún cuando el GARC no siempre es tripartito, frecuentemente incluye tres motivos de secuencia: i) la caja 5'-TAACAAA-3' o elemento GARE (GA-Responsive Element); ii) la caja de pirimidinas 5'-CCTTTT-3'; iii) la caja 5'-TATCCAC-3' (Skriver et al., 1991; Gubler y Jacobsen, 1992; Rogers et al., 1994). Mutaciones en el GARC de los promotores de genes de  $\alpha$ -amilasas, tanto de bajo como de alto pl (Amy2/32b, Amy1/pHv19, etc.), han demostrado que los tres elementos son necesarios para una respuesta completa de aquéllos frente a GA en aleurona (Lanahan et al., 1992; Jacobsen et al., 1995). Regiones promotoras similares al GARC se han descrito en otros genes que se inducen en respuesta a GA en aleurona post-imbibición, tales como los que codifican  $\beta$ -glucanasas (Slakeski y Fincher, 1992), tiol-proteasas tipo catepsina B (Cejudo et al., 1992a; 1992b) y EPB1 (Cercós et al., 1999). A pesar de la similitud de la mayoría de los GARC en distintos promotores de hidrolasas existen, a veces, notables diferencias en cuanto a conservación de secuencias dentro de cada motivo y en cuanto al orden de los motivos, que podrían explicar los distintos patrones de expresión espacio-temporal regulados por cada promotor en concreto.

El primer factor transcripcional descrito que en trans activa los genes de hidrolasas en células de aleurona de cebada, fue un TF de cebada de la clase MYB que se denominó GAMYB, por ser inducido por GA (Gubler et al., 1995). GAMYB es capaz de trans-activar una serie de promotores génicos de hidrolasas (Gubler et al., 1995; 1999), a través de su unión al motivo GARE. Trabajos recientes de nuestro grupo han definido varios TFs de la clase DOF expresados en aleurona post-imbibición que interactúan con la caja de pirimidinas del GARC.

## Resultados

### BPBF y Sad son TFs de la clase DOF relacionados estructuralmente.

El hecho de que la caja de pirimidinas 5'-CCTTTT-3', contenga en su hebra complementaria la secuencia 5'-T/AAAAG-3', que es el motivo central de unión de los TFs de la clase DOF (DNA with One Finger; Yanagisawa, 1996), junto con la observación casual de que el mRNA que codifica la proteína DOF, BPBF, se expresa en aleurona de cebada a los dos días de la germinación, nos hizo postular que tal vez algún TF de la clase DOF pudiera estar participando en la regulación de los genes de hidrolasas expresados en aleurona post-imbibición. El gen Pbf (proteína BPBF) había sido implicado durante el desarrollo del endospermo como un activador transcripcional del gen *Hor2* (proteína B-hordeína) a través de la unión a la caja de prolaminas, 5'-TGTAAG-3' (Mena et al., 1998).

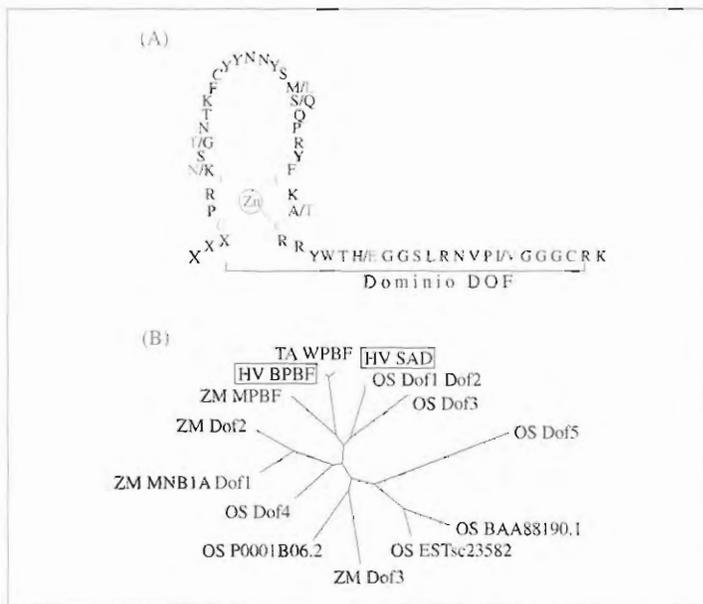


Figura 1 (A). Estructura en dedo de zinc del dominio DOF de BPBF; se indican en gris los residuos variables de SAD. (B) Dendrograma de la secuencia de aminoácidos de los dominios DOF de BPBF y SAD de cebada comparados con otros DOF de cereales en los bancos de datos (HV=cebada; ZM=maíz; OS=arroz).

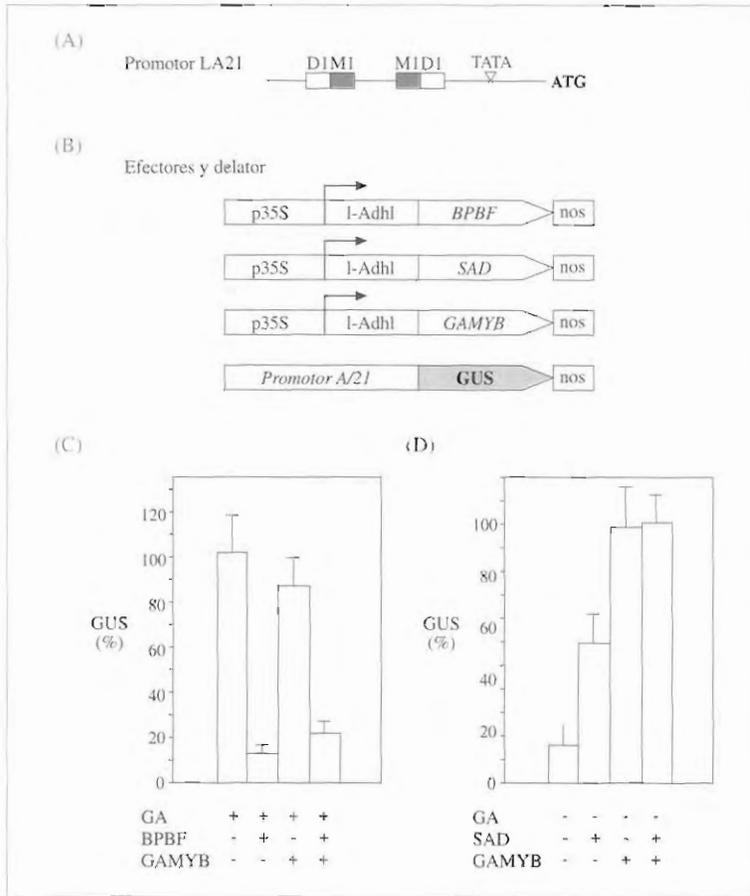


Figura 3 (A). Representación esquemática de los motivos en cis en el promotor del gen *Al21* que codifica una proteasa tipo cathepsina B. M1 y M2, motivos posibles de unión a *GAMYB*; D1 y D2 posibles motivos de unión a *DOF*. (B) Representación esquemática de las construcciones de efectores y del delator Promotor *Al21::GUS*, utilizados en la expresión transitoria en capas de aleurona de cebada. (C) Reversión por *BPBF* de la inducción transcripcional del promotor de *Al21* mediada por *GAMYB* o por incubación en 1 mM *GA3*. (D) Activación transcripcional del promotor de *Al21* por co-expresión (1:1) de *SAD* en aleurona.

## Discusión

Estos resultados en su conjunto, parecen indicar que la regulación de los genes de hidrolasas en la aleurona post-germinación es compleja y además de *GAMYB*, TFs de la clase *DOF* parecen jugar también un importante papel a través de su unión a la caja de pirimidinas. No resulta fácil de integrar en el modelo regulatorio el dato de que la proteína *BPBF* codificada por un gen inducible por *GA* resulte ser un represor, mientras que la proteína *SAD*, que no es inducida por *GA*, resulte ser un activador transcripcional, al menos en experimentos de expresión transitoria.

La idea de que BPBF fuera un competidor de otro activador transcripcional de la clase DOF, p.e. SAD, es consistente con la observación de que las dos cajas de pirimidinas, D1 y D2, son elementos positivos del promotor del gen *AI21* (Cejudo et al. 1992a). Las concentraciones relativas de SAD y BPBF en cada momento, así como sus afinidades relativas por los elementos D1 y D2, dirigirán el efecto global de las cajas de pirimidinas en el promotor de *AI21*. Estas actividades (activador-represor) a su vez operarían a través de la asociación con otros TFs, p.e. GAMYB. En este sentido es interesante constatar que ambos factores transcripcionales DOF (BPBF y SAD) interaccionan fuera del dominio de unión a DNA, concretamente por sus extremos C-terminales, con GAMYB en el sistema de 2-híbridos de levadura (Díaz et al., 2002; Isabel-LaMoneda et al., 2002).

Dado que los transcritos de BPBF aparecen más tarde que los de GAMYB y son simultáneos con los de *AI21*, un posible papel, para BPBF pudiera ser el de poner fin a la transcripción del *AI21*, y posiblemente a la de otros genes de hidrolasas, como parte del inicio de la muerte celular programada (PCD) en células de aleurona.

Se vislumbra, por tanto, un complejo entramado transcripcional compuesto por proteínas de las clases MYB y DOF y, por el hasta ahora desconocido factor(es) transcripcional(es) que reconozcan el tercer motivo del GARC, 5'-TATCCAC-3', en la regulación de los genes que codifican hidrolasas en la aleurona post-germinación.

### ***Agradecimientos***

Se reconoce la financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto BMC2000-1483) y de la Comunidad de Madrid (proyecto 07M/0015/2001).



**GIBERELINAS**  
**Comunicaciones**

frías de Andalucía se originan problemas de espigado con importantes pérdidas en las cosechas. El fenómeno de la vernalización está controlado por las giberelinas, hormonas que juegan un papel importante en la transición a floración. Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio del efecto de inhibidores de síntesis de giberelinas sobre el espigado de la remolacha de siembra otoñal, así como sobre las enzimas implicadas en la degradación de sacarosa.

## Resultados y discusión

Con objeto de estudiar el efecto del paclobutrazol (inhibidor de biosíntesis de giberelinas) sobre el espigado de plantas de remolacha de siembra otoñal se han llevado a cabo aplicaciones de dicho inhibidor en ensayos de campo. Un tratamiento único realizado en el mes de Abril produjo una alta inhibición del espigado respecto al observado en plantas control (superior al 90%). Se ha estudiado el efecto de su aplicación en distintos momentos del desarrollo del cultivo, aplicando también una repetición de dicha dosis dos semanas después del tratamiento inicial. Los resultados obtenidos muestran que la efectividad del tratamiento depende del momento en el que se realiza, siendo el más efectivo el realizado a principios de Marzo, mientras que tratamientos posteriores, cuando el cultivo ha sobrepasado un determinado estado de desarrollo, dejan de ser efectivos. Por tanto, este tratamiento podría ser un método adecuado para el control del espigado de la remolacha, teniendo en cuenta la dependencia de su eficacia de la fase de desarrollo del cultivo. El tratamiento con paclobutrazol tiene además un efecto beneficioso sobre el grado de polarización, presentando las muestras con menor espigado el mayor grado de polarización, así como un menor contenido en sodio. No se produjeron efectos significativos sobre el contenido de potasio y alfa-aminos, pero sí una reducción en el contenido de azúcares reductores, principalmente en los tratamientos tempranos (enero y marzo). Estos datos muestran que el tratamiento con paclobutrazol ejerce un efecto beneficioso sobre la producción y calidad de la sacarosa.

Con objeto de entender las bases fisiológicas del efecto del paclobutrazol sobre la producción y calidad del azúcar para la optimización de su aplicación, se ha estudiado el efecto del tratamiento sobre la expresión de los genes del metabolismo de degradación de sacarosa, que controlan la distribución del azúcar en la planta. La sacarosa sintasa, uno de los genes más importantes de dicho metabolismo, mostró una expresión predominante en la parte de la raíz que engrosa, en la que se acumula la sacarosa, donde puede ejercer una función importante en la regulación de su contenido. El análisis de la evolución de su expresión en el ciclo del cultivo mostró un aumento en su expresión hasta el mes de Mayo, seguido de una disminución progresiva de sus niveles en la fase de acumulación de sacarosa en la raíz. Este patrón de expresión no mostraba una alteración sustancial en los tratamientos con paclobutrazol.

Las invertasas, por su papel en el metabolismo de degradación de la sacarosa, pueden ejercer también un papel importante en la regulación del nivel de sacarosa y azúcares reductores en la raíz. Los estudios, llevados a cabo con plantas crecidas

en cámara, muestran un nivel de expresión de las invertasas muy inferior al de la sacarosa sintasa, existiendo además una gran especificidad de tejido. Así la invertasa neutra se expresa en niveles similares en todos los tejidos, aunque su expresión es ligeramente superior en tejidos verdes; la invertasa vacuolar se expresa predominantemente en peciolo con niveles muy bajos en raíz; y las invertasas exocelulares muestran niveles indetectables de mensajeros en la raíz. El patrón de expresión de la invertasa neutra en las muestras de campo es análogo al observado para la SS, con un máximo es el mes de Marzo y disminución posterior, sin que se modifique de manera sustancial por el paclobutrazol, aunque sí se observa una caída en su expresión en el mes de Agosto en los tratamientos tardíos, que podría ser en parte responsable de la disminución en los niveles de azúcares reductores descrita. De igual manera, la invertasa vacuolar muestra un comportamiento semejante en cuanto a la evolución de su expresión con el desarrollo del cultivo, aunque en este caso los tratamientos con paclobutrazol si muestran una reducción significativa de su expresión en raíz, que puede ser otra causa del efecto positivo del tratamiento sobre los niveles de azúcares reductores.

En conjunto los resultados descritos muestran el diseño de un método efectivo para reducir el espigado de la remolacha, que además incrementa significativamente la producción y calidad del cultivo, poniendo de manifiesto la importancia del estado de desarrollo del cultivo en el momento de su aplicación. Este tratamiento podría tener una gran importancia en el control del cultivo de la remolacha azucarera, si bien sería de gran interés realizar ensayos que permitieran optimizar el momento de aplicación del tratamiento.

### **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado mediante el proyecto IFD97-0893-C03-02 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.



## CONSECUENCIAS DE LA MANIPULACIÓN DE LA RUTA DE GIBERELINAS EN EL DESARROLLO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Nicotiana tabacum*

C. Gisbert, S. Ubeda-Tomás, J.L. García-Martínez \*I. López-Díaz

**Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, C.S.I.C.  
Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.**

\*E-mail: [llopez@ibmcp.upv.es](mailto:llopez@ibmcp.upv.es)

### Sinopsis

Las giberelinas (GAs) están implicadas en distintos procesos del desarrollo de las plantas. Se ha visto que hay una correlación entre los niveles de GAs activas y la elongación del tallo, pero también existe correlación con otros procesos de desarrollo. Los niveles de GAs activas se regulan mediante el control de los enzimas de la biosíntesis y también por medio de enzimas de inactivación. La superproducción de enzimas como la GA 20-oxidasa, GA 3-oxidasa y la GA 2-oxidasa, en plantas de tabaco, ha permitido alterar los niveles de GAs y la altura de las plantas (Vidal et al 2001, Ubeda en preparación) y además ha puesto de manifiesto el papel limitante de algunos enzimas, pero no de otros, en los procesos controlados por GAs. La disponibilidad de plantas transgénicas de tabaco, superproductoras de diversos enzimas de giberelinas, nos ha permitido obtener, por cruzamiento entre ellas, nuevas líneas híbridas que poseen más de un paso de la ruta de GAs alterado o líneas con distintas dosis génicas del transgén y estudiar los efectos fenotípicos de tales modificaciones. El gen *Ps3ox1*, que codifica una GA 3-oxidasa de guisante, y cuya sobreexpresión en tabaco no afecta la altura de las plantas, es capaz de intensificar el fenotipo alargado inducido por el gen *CcGA20ox1*, de la GA 20oxidasa de naranjo, en líneas híbridas para ambos transgenes. La sobreexpresión conjunta del gen *Cc20ox1* (inductor de fenotipo alargado) y del gen *NoGA2ox1* (inductor de fenotipo enano) permite deducir la importancia relativa de los respectivos enzimas en distintas fases y procesos de desarrollo. El fenotipo causado por el gen *Cm20ox1* (inducción de alargamiento o reducción de altura) depende de la dosis génica y de la presencia de otros transgenes.



## Abstract

Gibberellins (GAs) control several plant developmental processes and, in the case of stem elongation, there is a direct correlation between the content of active GAs and the final length of the shoot. Active GAs levels are regulated by controlling the biosynthetic enzymes and also by inactivation enzymes. Over-production of enzymes such as GA 20-oxidases, GA 3-oxidases and GA 2-oxidases, from different sources, in genetically modified plants of tobacco, can alter the GA content and increase or reduce stem elongation (Vidal et al 2001, Ubeda en preparation). It also showed that some enzymes are limiting steps in GA control, but not others. Crosses among these and other transgenic lines, available in our laboratory, allow the isolation of new hybrid plants over-expressing more than one enzyme of the GA pathway. In these way, we have been able to study the co-operative and opposite effect of different GA enzymes when simultaneously over-expressed. We have also found that the phenotype induced by the *CmGA20ox1* gene of pumpkin, which code for an atypical GA 20-oxidase (Lange et al. 1994) depend on the presence of other transgenes and on gene dose.

## Introducción

Las giberelinas (GAs) están implicadas en distintos procesos del desarrollo de las plantas como la elongación del tallo, la floración, la fructificación o la germinación. En el caso de la elongación del tallo se ha encontrado una correlación muy estrecha entre los niveles de GAs activas y la altura de la planta, pero también se han descrito cambios en los niveles de GAs asociados a otros procesos de desarrollo. Los niveles de giberelinas se regulan mediante el control de los enzimas de la biosíntesis y también por medio de enzimas de inactivación. Los compuestos activos como la  $GA_1$  y  $GA_4$  se sintetizan a partir de una serie de reacciones en las que intervienen ciclasas, monooxigenasas y dioxigenasas. Las GA 2-oxidasas inactivan las giberelinas activas irreversiblemente y se les otorga un papel clave en la regulación de los niveles de las mismas. Muchos de los enzimas de la ruta de GAs están codificados por familias de genes que se expresan diferencialmente en distintos órganos o en respuesta a circunstancias ambientales. Las mutaciones que producen deficiencias en los enzimas de biosíntesis, han ayudado a comprender su papel y su regulación en el desarrollo. La sobreexpresión de estos genes en plantas transgénicas, posible al haber sido clonados la mayoría de los genes, permite también estudiar las consecuencias de alterar la regulación de la ruta en distintos pasos.

La obtención de plantas transgénicas que superproducen enzimas de la ruta de GAs ha puesto de manifiesto el papel limitante de algunos enzimas, pero no de otros, en los procesos controlados por GAs. La ruta de biosíntesis de GAs es un ruta compleja cuya parte final, la que conduce del  $GA_{12}$ , a las GAs biológicamente activas está catalizada en su mayor parte por dos enzimas que actúan consecutivamente, la GA 20-oxidasa y la GA 3-oxidasa. Las GA 20-oxidasas son dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato que catalizan varios pasos sucesivos de oxidación dentro de la

ruta biosintética de giberelinas (GAs) y cuyos productos finales ( $GA_{20}$  y  $GA_9$ ) son precursores de GAs activas. La sobreexpresión de genes de 20-oxidasa en plantas transgénicas es capaz de aumentar los niveles de GAs y consiguientemente la altura de las plantas en *Arabidopsis* (Coles et al. 1999) y tabaco (Vidal et al. 2001). Las GA 3-oxidasa son también dioxigenasas que catalizan la conversión de los productos de la GA 20-oxidasa en las giberelinas activas  $GA_1$  y  $GA_4$ . La superproducción de este enzima en tabaco no conduce a ninguna alteración en la altura de la planta (resultados no publicados obtenidos en nuestro laboratorio).

El silenciamiento de los genes de GAs, como método de reducir las GAs, puede tener consecuencias muy distintas dependiendo de que exista o no redundancia de genes en el control de un enzima. Para reducir los niveles de giberelinas, hemos transformado plantas de tabaco con genes que codifican enzimas que producen GAs inactivas a partir de precursores como la  $GA_{12}$  o los productos activos  $GA_1$  y  $GA_4$ . Por un lado hemos introducido el gen *CmGA20ox1* (Lange et al. 1994), que codifica una GA 20-oxidasa atípica que cataliza mayoritariamente la síntesis de GAs sin actividad biológica ( $GA_{17}$  y  $GA_{25}$ ). Contra lo que cabría esperar, y al contrario que en *Arabidopsis* (Xu et al. 1999), *Solanum dulcamara* (Curtis IS et al., 2000) y lechuga (Niki T et al., 2001) las plantas de tabaco poseen una mayor altura. En este trabajo estudiamos las razones que pueden explicar esta discrepancia. Mediante la superproducción de una GA 2-oxidasa (que convierte las  $GA_1$  y  $GA_4$  activas en  $GA_8$  y  $GA_{34}$  inactivas) en plantas de tabaco, si hemos conseguido reducir los niveles de la  $GA_1$  activa y la altura de las plantas (Ubeda et al).

La disponibilidad de plantas transgénicas de tabaco, superproductoras de diversos enzimas de giberelinas, (35S::*CcCPS1*), (35S::*Cc20ox1*), (35S::*Cm20ox1*), (35S::*Ps3ox1*) y (35S::*No2ox1*), nos ha permitido obtener, por cruzamiento entre ellas, líneas que poseen más de un paso de la ruta de GAs alterado o líneas con distintas dosis génica del transgén y estudiar sus efectos sobre el fenotipo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de nuevas líneas híbridas con la ruta de GAs modificada genéticamente

Las líneas híbridas conteniendo dos transgenes diferentes se obtuvieron por fertilización cruzada entre las transgénicas ya existentes portadoras de alguno de los siguientes transgenes: (35S::*CcCPS1*), (35S::*Cc20ox1*), (35S::*Cm20ox1*), (35S::*Ps3ox1*) y (35S::*No2ox1*). Todas las transgénicas proceden de la variedad *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi y poseían el transgén insertado en un solo loci.



Cruces obtenidos:

L17(35S::Cm20ox1)xL64(35S::CcCPS1),

L17(35S::Cm20ox1)xL45(35S::No2ox1),

L3.8(35S::Ps3ox1)xL5(35S::Cc20ox1),

L3.8(35S::Ps3ox1)xL9.1(35S::Cc20ox1)

L3.8(35S::Ps3ox1)xL41(35S::No2ox1),

L3.8(35S::Ps3ox1)xL45(35S:: No2ox1)

L5(35S::Cc20ox1)xL45(35S::No2ox1),

L5(35S::Cc20ox1)xL43(35S::No2ox1),

L5(35S::Cc20ox1)xL41(35S::No2ox1),

La líneas con diferentes dosis génica fueron obtenidas por cruzamiento de una línea homocigótica con una línea silvestre (para obtener la línea hemizigota) o con otra línea transgénica independiente (para dosis de mas de dos copias del transgén).

El fenotipo de los híbridos se estudió *in vitro* a nivel de plantula (germinación, crecimiento del hipocotilo y raíz), en medio MS (sales Murashige y Skoog) con 1% de sacarosa y 0.8% de agar, al cual se añadía las hormonas o inhibidores en las concentraciones requeridas. Los cultivos se mantenían en cámara de cultivo a 26°C y un fotoperiodo de 16h de luz. La longitud de los hipocotilos se midió entre 6 y 9 días después de la siembra. El fenotipo de la altura, floración y fructificación se estudió en la planta completa cultivada en el invernadero.

Sobreexpresión del gen *Cm20ox1*, que codifica una GA 20-oxidasa atípica de calabaza, en tabaco. Causas posibles del fenotipo alargado.

Se han obtenido plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen *Cm20ox1* bajo control del promotor 35S y que lejos de tener un fenotipo enano, muestran un incremento de la altura de hasta un 60% y un mayor contenido de GAs activas. La diferencia fenotípica con las transgénicas de otras especies podría deberse a diferencias en la relación sustrato/GA 20-oxidasa. La abundancia de sustrato haría irrelevante la desviación de una parte de éste hacia productos inactivos y solo la fracción de sustrato que el enzima de calabaza es capaz de convertir en GAs activas tendría repercusión sobre el fenotipo. Para apoyar esta hipótesis se ha variado la relación enzima/sustrato por dos estrategias y se han estudiado los efectos fenotípicos de dichas variaciones. Aumentos en la dosis génica, que conllevaría un aumento de los niveles de enzima, no producen un incremento de la altura sino que parecen estar asociados a una ligera disminución de dicho fenotipo. Aumentos de la cantidad de sustrato, por

adición exógena o mediante la aportación de un transgén para la CPS (el primer enzima de la ruta de GAs), tienen como consecuencia una intensificación del fenotipo alargado. También se ha estudiado la reducción de los niveles de sustrato mediante la aplicación de inhibidores y se ha investigado los efectos conjuntos de este transgén con el gen *NoGA2ox1* para el enzima de inactivación GA 2-oxidasa.

Sobreexpresión del gen *Ps3ox1*, que codifica una GA 3-oxidasa de guisante, en tabaco. Causas posibles de la falta de un fenotipo alargado.

Se han obtenido plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen *Ps3ox1*, para la GA 3-oxidasa de guisante (Martin et al., 1997), bajo el control del promotor 35S y cuyo fenotipo no presentaba diferencias significativas con la plantas control. La falta de fenotipo de estas plantas transgénicas puede entenderse si el factor limitante del paso catalizado por la 3-oxidasa es el sustrato y no el enzima. Con el objetivo de aumentar el aporte de sustrato, se han obtenido plantas híbridas que además de una copia del gen *Ps3ox1* eran portadoras de una copia del gen *CcGA20ox1* (para el enzima GA 20-oxidasa) que cataliza el paso anterior. Dichas plantas híbridas mostraban un incremento de la longitud de la inflorescencia. La longitud del hipocotilo parecía estar ya cercana a la saturación en las plantas 35S::*CcGA20ox1*. También hemos obtenido plantas híbridas que poseían una copia del gen *NoGA2ox1*, para el enzima de inactivación GA 2-oxidasa, que compite por los mismos sustratos que el enzima 3-oxidasa. La presencia del enzima 3-oxidasa reduce el efecto enanizador de la 2-oxidasa en mayor medida que la 20-oxidasa, aun cuando ésta tiene un enorme efecto fenotípico por si misma, que no tiene la 3-oxidasa.

Sobreexpresión conjunta en plantas de tabaco del gen *Cc20ox1* (inductor de fenotipo alargado) y del gen *NoGA2ox1* (inductor de fenotipo enano).

Los genes *CcGA20ox1* y *NoGA2ox1* que codifican respectivamente una GA 20-oxidasa de naranjo y una GA 2-oxidasa de adelfa tienen efectos opuestos en plantas de tabaco. Además su importancia en distintas fases del desarrollo es cuantitativamente muy diferente. El efecto de *Cc20ox1* es mas patente en el crecimiento del hipocotilo y el de *NoGA2ox1* se incrementa en fases vegetativas mas tardías. Del análisis del fenotipo de las plantulas se desprende que, a nivel del crecimiento del hipocotilo, la GA 20-oxidasa es el enzima mas importante y solo con las líneas parentales enanas mas extremas se puede apreciar un efecto debido a sobreexpresión conjunta de ambos genes. Se presentarán los resultados de los efectos conjuntos sobre el desarrollo vegetativo posterior, la floración y el desarrollo de los frutos.



## **Bibliografía**

- Coles, J.P., Phillips A.L., Croker, S.J., Garcia-Lepe, R., Lewis, M.J., Hedden, P.** (1999) *Plant J.* 17, 547-556.
- Curtis, I.S., Ward, D.A., Thomas, S.G., Phillips, A.L., Davey, M.R., Power, J.B., Lowe, K.C., Croker, S.J., Lewis, M.J., Magness, S.L., Hedden, P.** (2000). *Plant J* 23: 329-338
- Lange, T.; Hedden, P. and Graebe, E.** (1994) . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8552-85556
- Martin, D.N., Proebsting, W.M., Hedden, P.** (1997) *P.N.A.S. USA* 94(16) 8907-8911.
- Niki, T., Nishijima, T., Nakayama, M., Hisamatsu, T., Oyama-Okubo, N., Yamazaki, H., Hedden, P., Lange, T., Mander, L.N., Koshioka, M.** (2001). *Plant Physiol* 126: 965-972
- Vidal, A.M., Gisbert, C., Talon, M., Primo-Millo, E., Lopez-Diaz, I., Garcia-Martinez, J.L.** (2001). *Physiol. Plant.* Vol. 112, Iss. 2: 251-260
- Xu Y.L., Li L., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.** (1999). *Plant Cell* 11:927-36.

## SILENCIAMIENTO DE GA-20 OXIDASAS DE *Arabidopsis thaliana* MEDIANTE RIBOZIMAS Y CARACTERIZACIÓN DE DOS NUEVOS CLONES DE LAS MISMAS

José Pérez Gómez<sup>1</sup>, Andy L. Phillips<sup>2</sup>, Peter Hedden<sup>2</sup>  
y José Luis García Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC)  
Avda. tarongers s/n. 46022 Valencia.

\*E-mail: [jperez@ibmcp.upv.es](mailto:jperez@ibmcp.upv.es)

<sup>2</sup>IACR-Long Ashton Research Station, Department of Agricultural  
Sciences, University of Bristol, Long Ashton, Bristol BS4 9AF, U.K.

### Sinopsis

Con el objetivo de conocer el papel que juegan los genes *AtGA20ox1*, 2, 3 y 4, de la familia multigénica de GA 20-oxidasas de *Arabidopsis thaliana*, se han obtenido plantas transgénicas que expresan ribozimas de cabeza de martillo diseñados para cortar de forma específica cada uno de esos genes. Asimismo se han obtenido clones de cDNA para los genes *AtGA20ox4* y 5, y se ha medido su actividad GA 20-oxidasa *in vitro*.

### Introducción

Los enzimas GA 20-oxidasas catalizan uno de los últimos pasos de la biosíntesis de giberelinas (GAs) activas (1). En *Arabidopsis* se conocen 5 genes distintos que codifican GA 20-oxidasas. Tres de ellos están muy bien caracterizados (2): *AtGA20ox1* se expresa principalmente en tejidos vegetativos, *AtGA20ox2* en tallos de inflorescencia y meristemas florales, y *AtGA20ox3* en siliquis inmaduras y plántulas muy jóvenes. Los dos restantes, *AtGA20ox4* y *AtGA20ox5*, se obtuvieron como clones de DNA genómico a partir de los datos de la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana*, desconociéndose todavía su regulación a nivel transcripcional.

Con el objetivo de obtener una mayor información sobre el papel concreto de cada uno de estos genes en el desarrollo de *Arabidopsis*, se diseñaron ribozimas de cabeza de martillo, pequeños RNAs catalíticos capaces de cortar otras moléculas de RNA en trans (3), que solo fueran catalíticamente activos frente a uno de los genes de la familia multigénica de las GA 20-oxidasas de *Arabidopsis*.

Asimismo, también se han obtenido clones de cDNA de los genes *AtGA20ox4* y *AtGA20ox5*, con los que se ha medido la actividad GA 20-oxidasa *in vitro* de los mismos tras obtener las correspondientes proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.

## Resultados y discusión

Con la ayuda de programas de predicción de estructura secundaria de RNA (4) se diseñaron ribozimas de cabeza de martillo frente a los genes *AtGA20ox1*, 2, 3 y 4, ya que el gen *AtGA20ox5* todavía no se había obtenido. Cada ribozima se diseñó frente a un sitio NUH (donde N es cualquier nucleótido y H cualquier nucleótido excepto G), necesario para que exista actividad catalítica, en el que no hubiera un uracilo en el resto de genes de la familia. A modo de control, para cada ribozima se diseñó uno homólogo, con un cambio en una base que le hacía perder su actividad catalítica. Las distintas copias de cDNA de los ribozimas se obtuvieron como oligonucleótidos sintéticos, que fueron clonadas en vectores de *E. coli*.

Para comprobar la actividad *in vivo*, los cDNAs de los ribozimas se clonaron en vectores de *E. coli* bajo el control del promotor constitutivo 35S. Estas construcciones fueron introducidas en hojas de *Arabidopsis*, mediante la técnica del bombardeo de micropartículas, junto a otras que contenían la región de corte de cada GA 20-oxidasa fusionada al gen reportador *GUS* y también bajo el control del promotor 35S. Junto a ellas se introdujo un clón del gen de la luciferasa, necesario para normalizar las medidas de los distintos experimentos. Tras una incubación de 12 horas, se midió la actividad  $\beta$ -glucuronidasa de esas células transformadas transitoriamente. En los ribozimas diseñados frente a *AtGA20ox1*, 2 y 4 la actividad del gen *GUS* se redujo a la mitad cuando el ribozima activo estaba presente. También se observó reducción de la actividad *GUS* cuando se co-bombardeó con el ribozima inactivo, indicando la existencia de efectos de RNA antisentido. En el caso de los ribozimas diseñados frente a *AtGA20ox3*, la reducción de la actividad *GUS* fue muy pequeña tanto con el ribozima activo como con el inactivo.

Las copias de cDNA de los ribozimas fueron clonadas en el vector binario pBIN-JIT, bajo el control de una copia duplicada del promotor 35S. Con ellas se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* mediante la técnica de inmersión floral. Tras obtener líneas puras para cada planta transgénica, se procedió a la evaluación fenotípica de las mismas. Ninguna de las plantas que expresan ribozimas frente a los genes *AtGA20ox1*, 2 y 3 mostró un fenotipo de carencia de GAs, como altura reducida, retraso en el tiempo de floración o menor porcentaje de germinación, a pesar de que los ribozimas se expresaban con altos niveles de transcripción. Para comprobar si esto se

debía a un fenómeno de redundancia génica, en el que la expresión de otro gen de la familia podría enmascarar la falta del silenciado, se realizaron cruces entre estas transgénicas. Tampoco se observaron fenotipos en estas plantas que expresan dos ribozimas. La falta de fenotipos puede ser debida a la regulación *feed-back* que sufren estos genes (2), ya que una disminución en el contenido de GAs activas provoca un aumento en la transcripción de los mismos. Posiblemente la capacidad de los ribozimas de disminuir la expresión de una GA 20-oxidasa no sea suficiente para sobrepasar este mecanismo de regulación.

En el caso de plantas transgénicas que expresan ribozimas frente a *AtGA20ox4*, únicamente una de las líneas transgénicas mostró fenotipo de carencia de GAs (altura reducida y retraso de floración en día corto). No obstante, la secuenciación del sitio de inserción del T-DNA mostró que éste se hallaba en la zona codificante del locus *GA4*, correspondiente a una GA 3-oxidasa, enzima que cataliza el último paso en la biosíntesis de GAs activas.

Por último, a partir de RNA de flores y del mutante *ga1* de *Arabidopsis*, se han obtenido clones de cDNA para los genes *AtGA20ox4* y 5. Sus zonas codificantes se han clonado en el vector de expresión pET32, y se ha obtenido la proteína recombinante en la cepa BL21 de *E. coli*. La actividad GA 20-oxidasa de estas proteínas se midió por incubación de lisados de estos cultivos con sustratos marcados radiactivamente. La proteína *AtGA20ox4* es capaz de catalizar *in vitro* los pasos de  $GA_{12}$  hasta  $GA_9$ , pero no ha mostrado actividad cuando el sustrato es  $GA_{53}$ . Por su parte, *AtGA20ox5* solamente es capaz de catalizar el paso de  $GA_{12}$  a  $GA_{15}$ .



los mutantes recesivos de respuesta constitutiva a GAs que incluiría a *spy* en *Arabidopsis*, *slr1* en arroz, *procera* en tomate y posiblemente *sln* y *lacry<sup>s</sup>* en guisante.

*GAI*, *RHT*, *D8* y *SLR1* son genes que codifican reguladores negativos de la respuesta a GAs y son miembros de la subfamilia DELLA de la familia GRAS de proteínas reguladoras (Pysh et al., 1999). La subfamilia DELLA se caracteriza por poseer el motivo conservado DELLA en la región amino terminal de la proteína. Es en este motivo donde el mutante semidominante de ganancia de función *gai* y sus ortólogos presentan deleciones. Esto sugiere que la región DELLA es necesaria para la respuesta a GAs. Su ausencia convertiría a la proteína en un represor constitutivo de la señal hormonal, insensible a la presencia de GAs (Peng et al., 1999).

En *Arabidopsis* se han identificado cinco genes de la subfamilia DELLA: *GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2* y *RGL3*. *GAI* y *RGA* tendrían funciones parcialmente redundantes, afectando su expresión a la expansión de las hojas, el tiempo de floración, la elongación del tallo y la dominancia apical. Su efecto sobre la germinación y el desarrollo floral sería mínimo, sobre los que sí parece que estaría actuando *RGL1* (Wen y Chan, 2002).

En contraste con *Arabidopsis*, en el genoma del arroz sólo parece haber un gen tipo DELLA. En consecuencia, mientras que alelos nulos de *RGA* o *GAI* producen un fenotipo normal o débil en *Arabidopsis* (Dill y Sun, 2001), el mutante de pérdida de función *slr1* de arroz presenta un fenotipo alargado, típico de mutantes de respuesta constitutiva a GAs (Ikeda et al., 2001; Itoh et al., 2002).

En el modelo vigente que explica la regulación del crecimiento mediado por GAs en *Arabidopsis*, la respuesta a éstas estaría bloqueada constantemente por la acción represora de las proteínas *GAI* y *RGA*. Sólo la interacción, directa o indirecta, de las GAs con la región DELLA de la proteína provocaría el desbloqueo de la respuesta y por lo tanto el crecimiento de la planta (Harberd et al., 1998). Este desbloqueo se produciría por la degradación del represor. Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que la proteína de fusión *RGA-GTP* se ha localizado en el núcleo, desapareciendo tras la aplicación exógena de GAs (Silverstone et al., 2001). Lo mismo ha ocurrido con la proteína *SLR1* de arroz (Ikeda et al., 2001). Sin embargo, la aplicación de GAs no afectó a la proteína mutada *rga-Δ17* que siguió detectándose en el núcleo. La deleción de 17 aminoácidos en la región DELLA produciría una mayor estabilidad de la proteína (Dill et al., 2001). Aunque este mecanismo no parece operar de igual manera con otros miembros de la familia.

## Resultados y discusión

El objeto de este trabajo es estudiar el efecto de la alteración de la ruta de transducción de la señal de GAs y concretamente, el papel del gen *GAI* en el desarrollo de la planta de tomate.

Con el fin de obtener plantas con la respuesta a GAs reprimida, se generaron plantas transgénicas de tomate con dos construcciones portadoras del gen mutado *gai* de *Arabidopsis*, una bajo el control del promotor 35S del TMV (35S::*gai*) y otra bajo el control del propio promotor del gen (*gai*::*gai*). Por análisis northern se comprobó que expresaban el transgen y que éste era transmisible a la siguiente generación. Las plantas muestran un aspecto compacto con una menor altura respecto al silvestre, proliferación de ramificaciones secundarias y dificultad en el cuajado de los frutos.

Para la obtención de plantas que tuvieran la respuesta a GAs activada constitutivamente se clonó el gen *LeGAI* de tomate y se sobreexpresó en antisentido bajo el control del promotor 35S del TMV (35S::*GAls*). Se comprobó, por RT-PCR, que las plantas transgénicas obtenidas expresaban el transgen y que había una disminución en los niveles de expresión del gen endógeno. El fenotipo de estas plantas es estilizado, de una altura mayor que las silvestres, disminución de las ramificaciones secundarias y presenta frutos partenocárpicos.

Los datos sugieren que en tomate el gen *GAI* estaría controlando la elongación del tallo, la dominancia apical y el desarrollo de la hojas. A diferencia de *Arabidopsis*, también parece estar implicado en el desarrollo del fruto. Ninguno de los transformantes presentó diferencias en la longitud del hipocotilo respecto al tipo silvestre, tanto en presencia de luz como en oscuridad. No se detectó disminución en los niveles de expresión de un gen *GAI-like* de tomate. Esto último parece indicar que, en tomate, la pérdida de función de *LeGAI* es suficiente para obtener un fenotipo de respuesta constitutiva a GAs.

## Bibliografía

- Dill, A., Jung H-S., Sun, T-P.** (2001) *PNAS* 98: 14162-14167.
- Dill, A., Sun, T-P.** (2001) *Genetics* 159: 777-785.
- Harberd, N.P., King, K.E., Carol, P., Cowling, R.J., Peng, J., Richards, E.** (1998). *BioEssays* 20: 1001-1008.
- Hedden, P., Phillips, A.L.** (2000) *Trends Plant Sci* 12: 523-530.
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., Yamaguchi, J.** (2001) *Plant Cell* 13: 999-1010.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M., Matsuoka, M.** (2002) *Plant Cell* 14: 57-70.
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D., Harberd, N.P.** (1999) *Nature* 400: 256-261.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., Benfey, P.N.** (1999) *Plant* 18: 111-119.
- Silverstone, A.L., Jung, H-S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., Sun, T-P.** (2001) *Plant Cell* 13: 1555-1565.
- Wen, C.-K., Chang, C.** (2002) *Plant Cell* 14: 87-100.

## EFFECTO ANTAGÓNICO DEL GA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN UNA CISTEÍN-PROTEASA (GEN *CatB*) Y UNA CISTATINA (GEN *Icy*) EN ALEURONA DE CEBADA

Manuel Martínez, Ignacio Rubio, Pilar Carbonero e Isabel Díaz

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Dpto. de Biotecnología-UPM, ETSI Agrónomos, 28040 Madrid.

E-mail: [isabel@bit.etsia.upm.es](mailto:isabel@bit.etsia.upm.es)

### Sinopsis

Las cistein-proteasas de plantas son enzimas proteolíticas cuya actividad puede estar regulada por inhibidores endógenos específicos, las cistatinas. En determinados tejidos, enzimas e inhibidores están a su vez regulados por hormonas. Se ha caracterizado un clon cDNA (gen *CatB*) de cebada que codifica una cistein-proteasa homóloga a la catepsina B de trigo (Cejudo et al. 1992) y mediante análisis de tipo Northern blot se ha demostrado que se expresa en todos los tejidos analizados, especialmente en aleurona en post-germinación, donde sus niveles de mRNA se inducen por ácido giberélico (GA) y se reprimen por ácido abscísico (ABA). De forma análoga, la expresión del gen *Icy* que codifica una cistatina de cebada (Gaddour et al. 2001), inhibidor *in vitro* de la catepsina B bovina, aparece en los mismos tejidos que el gen *CatB*, pero en aleurona los correspondientes transcritos disminuyen con el tiempo durante la post-germinación, se apagan por GA y no responden a tratamientos con ABA. Además, ambos genes se expresan en otros tejidos, tanto de semilla como vegetativos y en hojas se inducen por frío y adoptan patrones de expresión siguiendo ritmos circadianos. Estos datos sugieren que la expresión de los genes *CatB* e *Icy* de cebada está regulada de manera coordinada.

### Introducción

Las cistein-proteasas de plantas comprenden un amplio grupo de enzimas que participan en múltiples procesos fisiológicos como son homeostasis, desarrollo, muerte celular programada, "turnover" proteico, etc (Beers et al. 2000). Estas enzimas



son inhibidos por proteínas denominadas cistatinas, capaces de regular su función (Margis et al. 1998). Hasta la fecha se han descrito numerosas cistein-proteasas tipo catepsina H y L, principalmente implicadas en la germinación, en distintas especies vegetales incluida cebada (Cercos et al. 1999; Mikkonen et al. 1996; Rogers et al. 1985), pero solo se han caracterizado catepsinas B en trigo, tabaco y guisante (Cejudo et al. 1992; Lidggett et al. 1995; Vincent et al. 2000). Sin embargo, si que se ha descrito una cistatina de cebada codificada por el gen *Icy* (Gaddour et al. 2001) capaz de inhibir *in vitro* catepsinas B, H y L comerciales de origen bovino.

El objetivo de este trabajo ha consistido en la clonación y caracterización molecular de un cDNA de cebada (gen *CatB*) que codifica una cistein-proteasa homóloga a la catepsina B de trigo y la comparación de su expresión espacio-temporal con su putativo inhibidor, la cistatina de cebada (gen *Icy*), en distintos tejidos así como la respuesta de ambos genes a tratamientos con GA y ABA en capas de aleurona.

## Resultados y Discusión

Se ha caracterizado un clon cDNA (gen *CatB*) que codifica una proteína de 344 aminoácidos, que presenta un 97% de identidad con la secuencia deducida del gen *Al21* de trigo (Cejudo et al. 1992) con analogía con catepsinas B. Mediante análisis tipo Southern se ha comprobado que es un gen de copia única. Dado que la mayoría de las cistein-proteasas de cereales se expresan en la semilla durante la germinación desempeñando un papel en la movilización de las proteínas de reserva y que sus putativos inhibidores, las cistatinas, están implicadas en la regulación de este proceso (Kondo et al. 1990), se ha analizado mediante Northern blot la expresión temporal de los genes *CatB* e *Icy* (que codifica una cistatina de cebada) en las capas de aleurona de cebada incubadas en presencia de GA o ABA. Los niveles de mRNA del gen *CatB* aumentan durante la germinación alcanzando un máximo a las 48h post-imbibición y se inducen fuertemente por GA, efecto que se revierte por ABA, mientras que los transcritos del gen *Icy* disminuyen durante las 48h descritas, son reprimidos por GA en capas de aleurona y no responden a tratamientos con ABA.

También se ha investigado la presencia de los mRNAs de ambos genes embrión y endospermo amiláceo, y en tejidos vegetativos (hojas y raíces). En todos los casos analizados se ha detectado expresión tanto del gen *CatB* como del gen *Icy*, aunque sus niveles varían según el tejido y su estado fisiológico. En hojas, ambos genes se inducen por frío, no responden a tratamientos de GA o ABA y adoptan patrones de expresión siguiendo ritmos circadianos, apareciendo los niveles máximos de mRNAs correspondientes a la catepsina B durante el período de luz y los de la cistatina durante el de oscuridad.

Todos estos patrones antagónicos de expresión espacio-temporal y de respuesta a GA y ABA de los genes *CatB* e *Icy* sugieren un papel de la cistatina como modulador de la expresión de la catepsina B en los diferentes procesos fisiológicos donde interviene esta cistein-proteasa y apuntan a una regulación coordinada de la expresión de ambos genes en cebada.

## Bibliografía

- Beers, E.P., Woffenden, B.J. y Zhao, C. (2000) *Plant Mol Biol* 44:399-415
- Cejudo, F.J., Murphy, G., Chinoy, C. y Baulcombe, D.C. (1992) *Plant J* 2:937-948
- Cercos, M., Gómez-Cadenas, A. y Ho, T.H.D. (1999) *Plant J* 19:107-118
- Gaddour, K., Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Isabel-LaMoneda, I., Diaz, I., y Carbonero, P. (2001) *Plant Mol Biol* 45:599-608
- Kondo, H., Abe, K., Nishimura, I., Watanabe, H., Emori, Y. y Arai, S. (1990) *J Biol Chem* 265:15832-15837
- Lidgett, A.J., Moran, M., Wong, K.A.L., Furze, J., Rodees, M.J.C. y Hamill, J. (1995) *Plant Mol Biol* 29:379-384
- Margis, R., Reis, E.M., y Villeret, V. (1998) *Arch Biochem Biophys* 359:24-30
- Mikkonen, A., Polari, I., Cercos, M. y Ho, T.H.D. (1996) *Plant Mol Biol* 31:239-254
- Rogers, J.C., Dean, D. y Heck, G.R. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6512-6516
- Vincent, J.L., Dahiya, P. y Brewin, N.J. (2000) *Mol Plant-Microb Inter* 13:778-780



## FACTORES TRANSCRIPCIONALES DE LA CLASE DOF QUE REGULAN GENES DE HIDROLASAS INDUCIBLES POR GA EN ALEURONA DE CEBADA

*Isabel Díaz, Montaña Mena, Inés Isabel-LaMoneda, Manuel Martínez, Ignacio Rubio, F. Javier Cejudo y Pilar Carbonero*

**Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular,  
Dpto. de Biotecnología-UPM, ETSI Agrónomos, 28040 Madrid.**

**E-mail: pcarbonero@bit.etsia.upm.es**

### Sinopsis

El análisis funcional de promotores de genes que codifican hidrolasas inducidas por ácido giberélico (GA) en células de aleurona durante la germinación, ha permitido la identificación de un complejo de respuesta a GA (GARC), como un elemento tripartito a través del cual se regula su expresión espacio-temporal mediada por factores proteicos. Describimos el papel que desempeñan dos factores transcripcionales de cebada de la clase DOF, BPBF (gen Pbf) y SAD (gen Sad), en el control de la expresión de genes de hidrolasas durante la germinación de la semilla de cebada. Análisis de tipo Northern blot, RT-PCR e hibridación in situ han demostrado que los transcritos de ambos genes se expresan en las capas de aleurona durante la germinación, donde el gen Pbf es inducido por GA y reprimido por ácido abscísico (ABA), mientras que el gen Sad no responde a tratamientos hormonales. Ensayos de tipo EMSA han mostrado que ambos factores proteicos se unen específicamente a la caja de pirimidinas presente en los promotores de genes que codifican una cisteinoproteasa tipo catepsina B (gen Al21) y una  $\alpha$ -amilasa de bajo pI (gen Amy2/32b), ambos inducidos por GA en aleuronas de cebada. En experimentos de expresión transitoria en capas de aleurona, SAD activa la transcripción del promotor del gen Al21 mientras que BPBF revierte la activación inducida por GA en este promotor.

### Introducción

Durante la germinación de la semilla de cereales se produce la movilización de las sustancias de reserva almacenadas en el endospermo amiláceo gracias a la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas producidas por las células de la aleurona (Rastogi y

Oaks, 1986; Domínguez y Cejudo, 1996). El ácido giberélico, producido por el escute-lo, actúa como inductor de la expresión de genes que codifican hidrolasas a través de una cadena de trasducción de señales (Jacobsen et al. 1995), desembocando en la síntesis de factores transcripcionales que a su vez actúan como reguladores de la expresión de dichas hidrolasas en las semillas ( Cercos et al.1999; Gubler et al. 1999; Hoecker et al. 1995). Entre los factores proteicos implicados en el control de genes que se expresan durante la germinación se encuentran las proteínas de la clase DOF (Yanagisawa, 1996), proteínas con capacidad para estructurarse como un único dedo de zinc, que presentan un dominio multifuncional involucrado tanto en el reconocimiento y unión a secuencias específicas de DNA (caja de pirimidinas) como en interacciones proteína-proteína. En cebada, entre los miembros de esta familia están el factor BPBF implicado también en la activación transcripcional de genes que codifican proteínas de reserva durante el desarrollo de la semilla (Mena et al. 1998, 2002; Carbonero et al. 2000) y el factor SAD, que también regula la expresión génica en procesos tanto de desarrollo como de germinación (Isabel-LaMoneda et al., ms en preparación).

El objetivo de este trabajo ha consistido en esclarecer el papel que desempeñan estos dos factores transcripcionales, BPBF y SAD, como reguladores de la expresión de genes que codifican hidrolasas inducibles por GA durante la germinación de la semilla de cebada.

## Resultados y Discusión

Se han caracterizado dos factores transcripcionales de cebada, BPBF (gen Pbf) y SAD (gen Sad) pertenecientes a clase DOF, que presentan en la región N-terminal una secuencia conservada de 52 aminoácidos ( dominio DOF ). Análisis de tipo Northern blot, RT-PCR e hibridación in situ han demostrado que los transcritos de ambos genes se detectan principalmente en las capas de aleurona durante la germinación. Mediante RT-PCR se ha comprobado que el gen Pbf se induce por GA, efecto que se revierte por ABA, mientras que el gen Sad no responde a tratamientos con ninguna de las dos hormonas.

Tanto SAD como BPBF reconocen el motivo 5'-CCTTT-3' (caja de Pirimidinas) presente en el complejo GARC. Los resultados de los ensayos de retardo en electroforesis en gel (EMSA) demuestran que ambos factores DOF se unen específicamente al mencionado motivo presente tanto en el promotor del gen gen Al21 que codifica una cistein-proteasa tipo catepsina B como en el del gen Amy2/32b que codifica una  $\alpha$ -amilasa de bajo pl, ambos inducidos por GA en aleurona de cebada. La relevancia funcional de la mencionada unión se ha investigado in vivo mediante experimentos de expresión transitoria en capas de aleuronas de cebada, observándose un comportamiento antagónico de ambos factores, BPBF reprime la transcripción del gen Al21, mientras que SAD la induce. Estos resultados sugieren un papel de las proteínas SAD y BPBF en el control de la expresión de los genes de hidrolasas durante la germinación a través de interacciones con la caja de pirimidinas. Actualmente, se está analizando la posible interacción entre ambos factores transcripcionales en este proceso.

## Bibliografía

- Carbonero, P., Vicente-Carbajosa, J., Mena, M., Oñate, L., Lara, P., Diaz, I.** (2000) En: *Seed Biology: Advances and Applications*. (Black M, Bradford KJ, Vazquez-Ramos J eds) Pp 27-41. CAB Publishing
- Cercos, M., Gomez-Cadenas, A., Ho, T.D.H.** (1999) *Plant J* **19**:107-118
- Dominguez F y Cejudo FJ (1996) *Plant Physiol* **112**:1211-1217
- Gubler, F., Raventos, D., Keys, M., Watts, R., Mundy, J., Jacobsen, J.V.** (1999) *Plant J* **17**:1-9.
- Hoecker, U., Vasil, I.K., McCarty, D.M.** (1995) *Genes & Development* **9**:2459-2469
- Jacobsen, J.V., Gubler, F., Chandler, P.M.** (1995) En. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. (Davies PJ ed) Pp 246-271. Kluwer Academic Publishers
- Mena, M., Vicente-Carbajosa, J., Schmidt, R.J., Carbonero, P.** (1998) *Plant J* **16**:53-62
- Mena, M., Cejudo, F.J., Isabel-LaMoneda, I., Carbonero, P.** (2002) *Plant Physiol* (en prensa)
- Rastogi, V. y Oaks, A.** (1986) *Plant Physiol* **81**:901-906
- Yanagisawa, S.** (1996) *Trends Plant Sci* **1**:213-214



## ENDONUCLEASAS INDUCIDAS POR GA<sub>3</sub>: IMPLICACIÓN EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DE LA ALEURONA DE TRIGO

*Fernando Domínguez y Francisco Javier Cejudo*

**Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Centro de Investigaciones Científicas 'Isla de la Cartuja', Avda. Américo Vespucio s/n, 41092-Sevilla**

### Resumen

La capa de aleurona de la semilla de trigo es el único tejido que, junto al eje embrionario, permanece vivo tras el proceso de desecación que tiene lugar en las fases finales del desarrollo. Tras implicarse activamente en los procesos posgerminativos, la capa de aleurona entra en un proceso de muerte celular programada. Tanto la activación metabólica como la muerte celular están controladas hormonalmente por giberelinas. En este trabajo se ha estudiado la muerte celular programada de la capa de aleurona, en especial, la fragmentación internucleosómica del ADN genómico característica de la misma, y se ha identificado una nucleasa posiblemente relacionada con ese proceso. Dicha nucleasa es inducible por GA<sub>3</sub> y se localiza en núcleos de células de aleurona que han empezado el programa de muerte.

### Introducción

El ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) coordina muchos de los fenómenos que tienen lugar tras la germinación de la semilla de trigo: acidificación del endospermo, síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas, degradación de sustancias de reserva y muerte celular de la capa de aleurona (Domínguez y Cejudo, 1995, 1999; Cejudo et al, 2001). Esta coordinación es necesaria para el suministro de nutrientes a la nueva plántula durante la fase de crecimiento heterótrofa y hasta que la plántula empieza a hacer fotosíntesis.

El último proceso activado por el GA<sub>3</sub> en la célula de aleurona es su propia muerte celular. La muerte celular programada es un proceso de eliminación selectiva y ordenada de células innecesarias, potencialmente dañinas o de función transitoria, controlado por un programa genético. Así se eliminan en las plantas, por ejemplo, las

## Bibliografía

**Cejudo et al** (2001) *Recent Res Devel Plant Physiol* 2, 57-65

**Dominguez y Cejudo** (1995) *Physiol Plant* 95, 253-259

**Dominguez y Cejudo** (1999) *Plant Physiol* 119, 81-87

**Dominguez et al** (2001) *Planta* 213, 352-360

**Kuo et al** (1996) *Plant Cell* 8, 259-269

**Pennell y Lamb** (1997) *Plant Cell* 9, 1157-1168

**Young y Gallie** (1999) *Plant Mol Biol* 39, 915-926

## CONFERENCIA DE CLAUSURA



## REGULATION OF SOURCE/SINK RELATIONS BY PHYTOHORMONES

T. Roitsch, M. E. Balibrea, R. Ehneß, M. Goetz

*Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Julius-von-Sachs Institute,  
Julius-von-Sachs-Platz 2, Universität Würzburg, D-97082 Würzburg, Germany*

**Email: [Roitsch@biozentrum.uni-wuerzburg.de](mailto:Roitsch@biozentrum.uni-wuerzburg.de)**

Higher plants develop from a heterotrophic embryo and differentiate into a physiological mosaic. This consists of photosynthetically active source-tissues, such as mature leaves, and photosynthetically less active or inactive sink-tissues, such as seeds, flowers and roots. However, the pattern is not static. Plant development is accompanied by changes with respect to sink strength of individual organs, the number of competing sinks and sink-source transitions. Thus complex regulatory mechanisms have to be assumed which integrate the expression of the different enzymes involved in carbohydrate partitioning and sink metabolism. Insight into the mechanisms is not only important for understanding plant growth and development, but is also a prerequisite for manipulating sink-source relations in transgenic plants in order to increase crop yield.

The long distance transport of carbohydrates, in most plants in the form of sucrose, occurs in the phloem and is driven by differences in solute concentrations and osmotic potentials. Since the removal of sucrose steepens the sucrose gradient and thus enhances the flow to sinks, sucrose cleaving enzymes are expected to be important for phloem unloading and sink metabolism. Extracellular invertase is a cell wall bound enzyme that catalyses the irreversible cleavage of sucrose released into the apoplast via sucrose transporters. The resulting hexose monomers are then imported into the sink cell by monosaccharide transporters. Supplying carbohydrates via an apoplasmic phloem unloading pathway provides a mechanism for flexible and fast adjustment of the carbohydrate supply according to wide variations in demand. Due to inclusion of protein mediated steps, the process of assimilate partitioning can be efficiently regulated according to the current metabolic requirements. The tremendously large surface area of the total apoplasmic space surrounding all sink cells provides the possibility to allow very high uptake rates if required.

Plant hormones play an integral role in controlling growth, differentiation and development of plants. It has been speculated for long that specific plant growth regulators are particularly involved in regulating sink strength, carbohydrate partitioning, and phloem unloading. There is accumulating evidence that regulation of extracellular invertase, as the key enzyme of an apoplasmic phloem unloading pathway, by various phytohormones, provides an important mechanism to link phytohormone action to primary metabolism.

Cytokinins are a group of phytohormones that promote cell division and play a major role in the regulation of various processes associated with active growth and thus an enhanced demand for carbohydrates. In autotrophic cell cultures, the extracellular invertases from *Chenopodium rubrum* CIN1 and from tomato Lin6 (*Lycopersicon esculentum*) are highly upregulated in response to physiological concentrations of different cytokinins. The physiological significance of this regulation is supported by the fact that tissues with elevated activities of extracellular invertase, such as rapidly growing tissues, are known to contain elevated cytokinin concentrations. Cytokinins are also considered as key components of plant senescence based on the ability to delay senescence by modification of sink-source relations. The upregulation of extracellular invertase by cytokinin could provide the molecular basis for such a localised induction of sink metabolism which is supported by transgenic approaches where a cell wall invertase has been expressed under control of a senescence inducible promoter. A relation between extracellular invertase and cytokinin mediated growth responses is supported by a transgenic tobacco line (BIK62) expressing the *ipt* cytokinin biosynthetic gene under control of a tagged-promoter in auxiliary buds. These data support the hypothesis of links between morphological cytokinin responses and extracellular invertases by influencing source/sink relations and sugar signals known to regulate the cell cycle.

Brassinosteroids (BRs) are a group of growth-promoting substances in plants with high structural similarity to animal steroid hormones and induce a variety of growth responses. Addition of BRs to autotrophic tomato suspension culture cells (*Lycopersicon peruvianum*) specifically elevates the activity of cell-wall-bound invertase, whereas the intracellular invertase activities were not affected. This enhanced enzyme activity correlated with the induction of the mRNA of extracellular invertase Lin6, whereas the mRNA levels of the other three extracellular invertase isoenzymes were not affected. A correlation between a localised growth response of the hypocotyl of tomato seedlings and a specific induction of Lin6 mRNA in this tissue support the physiological significance of the regulation of extracellular invertase by BRs as a prerequisite for BR induced growth responses. This finding demonstrates a role of BRs in tissue-specific source/sink regulation.

A number of studies support that gibberelic acid plays a significant role in regulating invertase levels. Gibberelic acid promotes cell elongation, is important for flower

induction and has been reported to increase invertase activity in various organs of different species. Experimental evidence for the transcriptional regulation of invertase genes was obtained for pea and a heterologously expressed flower specific invertase of tomato.

A correlation between the stimulation of growth and of extracellular invertase activity has been obtained for different species. Gravi-stimulated auxin redistribution seems to be involved in asymmetric induction of invertase mRNAs in oat and maize.

The stress hormone abscisic acid as was shown to increase the activity of extracellular invertase in seed tissues of avocado and to induce a tomato invertase gene, in agreement with the identification of abscisic acid responsive cis elements in the corresponding promoter.

Ethylene, in contrast with the previous hormones, was shown to represses the mRNA level for extracellular invertase CIN1 in autotrophic *C. rubrum* in parallel with a reduction in their specific activity. A general physiological significance can be a down regulation of enzymes associated with active growth, such as extracellular invertase, in favour of induction of enzymes required for fruit maturation and ripening by ethylene. Ethylene is the only stimulus known to down regulate the expression of extracellular invertase.

The finding that extracellular invertases are also regulated by sugars is also of particular significance for the regulation by phytohormones. This mechanism allows the cell to maintain or to amplify the stimulation by other signals –such as phytohormone– via a feed-forward regulation: upregulation of extracellular invertase by any stimulus enhances sink strength and thus results in an elevated sugar concentration that will function as signal to further induce the extracellular invertase.

The induction of extracellular invertases by the various phytohormones can in most cases be related to the increased carbohydrate demand of growth stimulated tissues. These findings indicate an important link between primary metabolism and phytohormone action. Thus elucidation of the relation between extracellular invertases and phytohormones will be important to unravel the molecular mechanisms of physiological phytohormone responses.



AGRICULTURA

GANADERÍA

PESCA Y ACUICULTURA

POLÍTICA, ECONOMÍA Y SOCIOLOGÍA AGRARIAS

FORMACIÓN AGRARIA

CONGRESOS Y JORNADAS

R.A.E.A.

ISBN 84-8474-060-9



9 788484 740605

P. V. P. 19€



JUNTA DE ANDALUCÍA

*Consejería de Agricultura y Pesca*

AGRICULTURA

GANADERÍA

PESCA Y ACUICULTURA

POLÍTICA, ECONOMÍA Y SOCIOLOGÍA AGRARIAS

FORMACIÓN AGRARIA

CONGRESOS Y JORNADAS

R.A.E.A.

ISBN 84-8474-060-9



9 788484 740605

P. V. P. 19€



JUNTA DE ANDALUCÍA

*Consejería de Agricultura y Pesca*