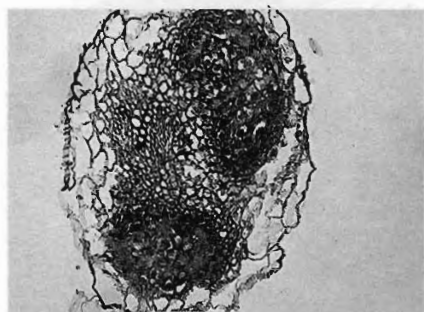
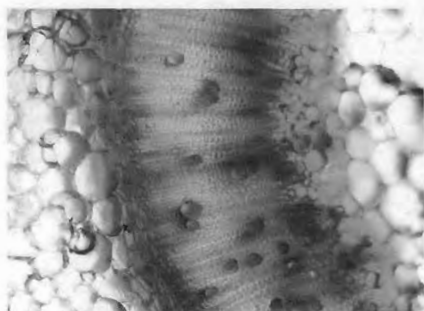


34/95  
CONGRESOS Y  
Y JORNADAS

# III REUNION DE BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS



**JUNTA DE ANDALUCIA**  
*Consejería de Agricultura y Pesca*

DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGRARIA

# III REUNION DE BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS

21 - 23 Noviembre 1995

SEVILLA

## **Organizadores**

A.J. Palomares Díaz (Univ Sevilla)

J.A. Pintor Toro (CSIC)



## **Entidades y Organismos Colaboradores**

Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía  
Universidad de Sevilla  
Fundación FOCUS  
Consejería de Educación de la Junta de Andalucía  
Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Boehringer-Manheim, S.A.

Serie: Congresos y Jornadas 34/95  
Edita: © JUNTA DE ANDALUCÍA. Consejería de Agricultura y Pesca  
Publica: Dirección General de Investigación Agraria  
Colección: Congresos y Jornadas 34/95  
Organiza: Universidad de Sevilla y C.S.I.C.  
Coordina: A. J. Palomares Díaz y J. A. Pintor Toro  
ISBN: 84-87564-34-8  
Depósito Legal: SE-1798/95  
Imprime: Tecnographic, S.L.

# INDICE

## Regulación de la expresión génica

Características funcionales de una proteína RNA-binding de maíz ..... <i>M M. Albá y M. Pagés</i>	19
Estudio de la expresión del gen de la poligalacturonasa en nódulos de alfalfa mediante hibridación <i>in situ</i> ..... <i>C. Coronado, J.A. Muñoz y A. J. Palomares</i>	20
Plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase of maize coleoptiles and bean symbiotic nodules: regulation and tissue localization ..... <i>F. A. Culiñez-Maciá, J. R. Pérez-Castiñeira, M. T. Caldeira, F. Campos, J. M. Villalba, I. Frias, T. Jahn, F. Sánchez, O. Kupinger, M. Pagés* y R. Serrano</i>	22
Expresión diferencial de la familia de inhibidores de proteasas II (pin2) durante el desarrollo de patata. .... <i>C. Dammann, M. de Torres, P. M. Sánchez y J. J. Sánchez-Serrano</i>	24
Un intrón de plantas del grupo I con extensas deleciones en 5' se acumula como for- mas circulares <i>in vivo</i> ..... <i>J. A. Darós y R. Flores</i>	25
Análisis de la expresión de genes relacionados con procesos morfogénicos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en lenteja..... <i>M. Fernández, M. I Peláez, M. L. Ruiz y F. Vaquero,</i>	27
Aislamiento y caracterización de la familia de genes MADS de guisante..... <i>C. Ferrándiz y J. P. Beltrán.</i>	28
Caracterización bioquímica y molecular de una Ca <sup>2+</sup> -ATPasa de tomate..... <i>N. Ferrol*, L. E. Wimmers y A. B. Bennett</i>	29
Expresión de los genes <i>nfe</i> en nódulos de alfalfa..... <i>F. M. García-Rodríguez, Y. Wei-Cai; T. Bisseling y N.Toro</i>	31
Estudio molecular de PA27, una proteína específica de anteras de guisante ..... <i>M.D. Gómez, M. Rodríguez-Concepción, J.P. Beltrán, L.A. Cañas</i>	33

Biosíntesis de cisteína en <i>Arabidopsis</i> . Clonación y regulación de O-acetilserina(tiol)liasa .....	34
<i>C. Gotor, C. Barroso, F.J. Cejudo y J.M. Vega</i>	
Regulación de genes que codifican proteínas ricas en prolina en el embrión de maíz.....	36
<i>M. José-Estanyol y P. Puigdomènech</i>	
Regulación transcripcional y posttranscripcional de la HMG-CoA reductasa de <i>Arabidopsis Thaliana</i> .....	37
<i>V. Lumbreras, C. Marín1, N. Campos, V. González, M. Arró, A. Ferrer y A. Boronat</i>	
Genes de sacarosa sintasa <i>Ss1</i> y <i>Ss2</i> en cebada: caracterización de promotores.....	39
<i>O. Martínez de Ilárduya, P. Sánchez de la Hoz, F. Acevedo, P. Carbonero e I. Díaz.</i>	
El patrón espaciotemporal de expresión del gen <i>hrgp</i> de maíz y sus secuencias reguladoras en <i>cis</i> analizados mediante el bombardeo con microproyectiles.....	40
<i>M. Menossi, P. Puigdomènech y J. A. Martínez-Izquierdo</i>	
Estudio del papel del gen de la poligalacturonasa en la simbiosis <i>Rhizobium meliloti</i> -alfalfa .....	42
<i>J.A. Muñoz, C. Coronado y A.J. Palomares</i>	
Estructura y análisis del promotor de la dehidrina TAS14 de tomate. ....	44
<i>M.M. Parra, O. del Pozo, J. A. Godoy, R. Luna y J. A. Pintor-Toro</i>	
La expresión de la arginina descarboxilasa se induce durante el desarrollo temprano del fruto y de otros órganos de guisante .....	45
<i>M. A Pérez-Amador, A. Granell, J. Carbonell.</i>	
Análisis de la regulación transcripcional del gen <i>Tsw12</i> de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) .....	46
<i>O. del Pozo, R. M. Luna y J. A. Pintor Toro.</i>	
Actividad en tejidos en lignificación del promotor del gen de la O-metiltransferasa del maíz en plantas de tabaco transgénicos .....	47
<i>J. Rigau, M. Capellades, M. A. Torres, I. Bastisch, F. Vignols, W. B. Bruce y P. Puigdomènech.</i>	
La familia de genes reguladores <i>myb</i> de <i>Arabidopsis</i> . Estimación del tamaño e identificación de mutantes .....	48
<i>I. Romero, A. Fuertes, A Leyva, J Paz-Ares</i>	
Análisis de la expresión de los genes estructurales de la hidrogenasa( <i>hupSL</i> ) de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> en nódulos de leguminosas .....	49
<i>T. Ruiz-Argueso, B. Brito, D. Fernández, L. Rey, J. Imperial y J. M. Palacios</i>	
Estudio de la regulación por MeJA de la expresión de los genes <i>lap</i> de tomate .....	50
<i>O. J. Ruiz R. y S. Prat M.</i>	

Expresión y acumulación de g-zeinas ricas en lisina en endospermo de maíz .....	52
<i>M. Torrent, I. Alvarez y D. Ludevid</i>	
DD1, a Light-Regulated Arabidopsis Gene .....	54
<i>G. Vancanneyt y José J. Sánchez-Serrano</i>	
Estructura cromatínica del gen <i>Adh</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	55
<i>M. A. Vega-Palas y R. J. Ferl</i>	
Regulación de la transcripción de genes de mantenimiento de cloroplasto mediante el uso de promotores alternativos.....	56
<i>A. Vera1 y M. Sugiura</i>	
Caracterización molecular de <i>Blz1</i> , un factor transcripcional de cebada con afinidad por el promotor del gen <i>Itr-1</i> específico de endospermo. ....	58
<i>J. Vicente-Carbajosa, L. Oñate y P. Carbonero.</i>	
Caracterización de distintas MAP quinasas de tabaco y evidencia de la implicación de estas proteínas en la reactivación del ciclo de división celular en plantas .....	59
<i>C. Wilson, E. Heberle-Bors y O. Vicente</i>	
<b>Desarrollo</b>	
Senescencia foliar en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	63
<i>L. Abarca, M. Roldán, I. Cabeza, M. Martín y B. Sabater</i>	
Análisis de mutantes letales embrionarios para el estudio de la embriogénesis en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	64
<i>M. Aguilar y R. L. Fischer.</i>	
Análisis de las tioredoxinas h en los procesos de germinación y maduración de semillas de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) .....	66
<i>J.L. Crespo, F.J. Cejudo y F.J. Florencio.</i>	
Expresión de una tiol-proteasa durante el desarrollo de la semilla de trigo .....	68
<i>F. Domínguez y F. J. Cejudo</i>	
Fosforilación in vitro e in vivo de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de semillas de trigo durante la germinación .....	70
<i>C. Echevarría, L. Osuna, M. C. González, J. Vidal y J. Cejudo</i>	
Aislamiento y caracterización de cDNAs correspondientes a genes de expresión específica en meristemos reproductivos de coliflor ( <i>Brassica oleracea</i> , var. <i>botrytis</i> ) .....	71
<i>J.M. Franco, F. Madueño*, J.M. Martínez-Zapater y J. Salinas.</i>	
Identificación genética de loci de <i>Arabidopsis</i> responsables de la respuesta al fotoperíodo y su posible papel en el desarrollo de tolerancia a la helada .....	72
<i>C. Gómez-Mena, L. Ruiz-García, J. Salinas y J.M. Martínez-Zapater</i>	



Efecto de la temperatura en el desarrollo floral y expresion de genes homeóticos de tomate.....	73
<i>R. Lozano, T. Angosto, P. Huijser, J. Capel, P. Gómez,, C. Payán, F. Madueño, J. Salinas y J. M. Martínez-Zapater.</i>	
Interacciones genéticas que regulan el proceso de iniciación de los meristemas florales en <i>Arabidopsis</i> .....	74
<i>F.Madueño, L. Ruiz-García, J. Salinas y J. M. Martínez-Zapater</i>	
Clonación e identificación por un método de MAST-PCR-SDS de cDNAs relacionados con el proceso de maduración de fresa.....	75
<i>N. Medina-Escobar, J. Cárdenas , V. Valpuesta , J.L. Caballero., y J. Muñoz-Blanco</i>	
Expresión de dos clones de cDNA relacionados con el crecimiento de epicotilos de <i>Cicer arietinum</i> .....	77
<i>F.J. Muñoz, B. Dopico y E. Labrador</i>	
Clonación y caracterización de un gen específico de la maduración en frutos de fresa que presenta homología con un gen inducible por etileno en el tomate .....	79
<i>A. Pedraza, J. Cárdenas y A. R. Franco</i>	
Clonación de una proteína específica del embrión de guisante.....	80
<i>M.I. Rodrigo, E. Ballestar, J. Castillo, y L. Franco</i>	
Disección genética de la morfogénesis de la hoja en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	81
<i>J. Serrano, G. Berna, P. Robles, H. Candela, A. Martínez-Laborda, y J.L. Micol</i>	
Análisis del desarrollo del embrión en maíz.....	83
<i>V. Stiefel, R. Roca, E. Graziano, E. López y P. Puigdomenech</i>	

### **Transformación y análisis funcional de plantas**

Análisis de <i>Arabidopsis</i> transgénicas para el gen de la proteína de movimiento del tobamovirus del mosaico de la colza (ORMV).....	87
<i>I. Aguilar, D. Martinez-Herrera, F. Sanchez y F. Ponz</i>	
Transformación y regeneración de plantas de guisante .....	88
<i>G. Antón, J. P. Beltrán y L. Cañas.</i>	
Obtención de plantas transgénicas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) que sobreexpresan genes que se inducen en vegetales superiores, como respuesta a estrés salino.....	89
<i>I Arrillaga, C. Gisbert, E. Sales, J.A. Pintor-Toro L.Roig y V. Moreno</i>	
Plantas transgénicas en la defensa frente a plagas de insectos: Nuevos clones cDNA correspondientes a inhibidores de tripsina de cebada.....	90
<i>K. Gaddour, J. Vicente-Carbajosa, J. Royo y P. Carbonero.</i>	

Expresión del gen <i>chit42</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> en plantas de tabaco..... I. García, L. C. Romero, T. Benítez <sup>1</sup> y J. A. Pintor Toro.	91
Transformación genética de distintos cultivares de tomate con los genes de levadura HAL 1 y HAL 2 ..... C. Gisbert , I. Arrillaga , I. Vila , R. Serrano , L. Roig y V. Moreno	92
Expresión de genes foráneos en cotiledones de <i>Pinus nigra</i> , <i>P. radiata</i> y <i>P. pinea</i> mediante bombardeo de micropartículas. .... M. López, J.M. Humara, M.V. González, M. Rey, R. Tavazza, G. Ancora, R. Rodríguez, y R.J. Ordás	93
Expresión génica transitoria en protoplastos electroporados de <i>Pinus nigra</i> Arn. .... M. López, J.M. Humara, M. Rey, J.C. Pacheco, R. Rodríguez, R.J. Ordás	94
Papel de defensa en plantas de las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) ..... A. Molina, A. Segura, M. Moreno y F. García-Olmedo.	95
Mecanismos moleculares implicados en el control fotoperiódico de tuberización en plantas de patata ..... E. Monte, S. Jackson y S. Prat.	97
Arginina descarboxilasa: regulación por estrés osmótico, localización intracelular y sobreexpresión inducible en plantas transgénicas ..... A.F. Tiburcio, A. Borrell, F. Culiáñez-Maciá, T. Altabella, C. Masgrau, D. Flores y R.T. Besford	99
<b>Estrés Abiótico</b>	
Regulación de la expresión y posible función de una proteína cloroplástica inducida por desecación en <i>Craterostigma plantagineum</i> ..... J.M. Alamillo*, F. Salamini y D. Bartels	103
Expresión de sHSPs en semillas de girasol y en tejidos vegetativos de plantas de resurrección <i>Craterostigma plantagineum</i> : Correlaciones con la tolerancia a la desecación y posibles funciones. .... C. Almoguera, M.Coca, R. Carranco y J. Jordano	104
Caracterización molecular de dos genes de <i>Arabidopsis</i> cuya expresión se induce por temperaturas bajas y que codifican proteínas muy hidrófobas ..... J. Capel, J. A. Jarillo, J. M. Martínez-Zapater y J. Salinas	106
Inducción por herida y estrés físico de la actividad GUS bajo el control del promotor del gen ACO1 (1-aminociclopropano-carboxilato oxidasa) en hojas y epicotilos de petunia ..... L. Gómez-Gómez y W. R. Woodson.	107
Aislamiento de secuencias de DNA hipervariables en centeno a través de la técnica de cultivo <i>in vitro</i> ..... R. Linacero, J.J. Muñoz y A.M. Vázquez	108

Estudio de la interacción de la dehidrina TAS14 con macromoléculas.....	109
<i>R. Luna, J.A. Godoy, S. Barroso, O. del Pozo y J.A. Pintor-Toro</i>	
Aislamiento y caracterización de un mutante de <i>Arabidopsis</i> afectado en su capacidad de tolerancia a la helada.....	110
<i>F. Llorente, J.M. Martínez-Zapater y J. Salinas</i>	
Caracterización de dos enzimas inducibles por deficiencia de fosfato en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	111
<i>C. del Pozol, J. Iglesias, C. Avilal, Allona, C. Aragoncillo, A. de la Peña, J. Paz-Ares y A. Leyva.</i>	
Aislamiento y caracterización de mutantes halotolerantes en <i>Arabidopsis thaliana</i> ....	112
<i>V. Quesada, A. Contreras y J.L. Micol</i>	
Expresión de genes asociados al estrés por frío en frutos de mandarina "Fortune"....	113
<i>M.T. Sanchez-Ballesta, J.M. Alonso, M.T. Lafuente, L. Zacarias y A. Granell</i>	
Identificación y caracterización de genes inducibles por frío en <i>Arabidopsis</i> .....	114
<i>E. Santos, F. Llorente, J. Salinas y J.M. Martínez-Zapater</i>	
La respuesta frente a herida en <i>Arabidopsis thaliana</i> : aislamiento de genes inducibles y caracterización de la vía de transducción de señal. ....	115
<i>E. Titarenko, E. Rojo y J. J. Sánchez Serrano.</i>	

### Estrés Biótico

Purificación, clonaje, actividad antifúngica y posible mecanismo catalítico de Ch3, una endoquitinasa de la clase Ib mayoritaria en las semillas del castaño europeo.....	119
<i>I. Allona, C. Collada, L. Gómez, R. Casado, J. Paz-Ares y C. Aragoncillo</i>	
Aislamiento, caracterización y análisis funcional de un gen constitutivo de quitinasa de patata .....	121
<i>G. Ancillo, E. Hoegen, B. Witte y E. Kombrink.</i>	
Sobreexpresión de la enzima HMG-CoA reductasa inducida por nematodos en raíces de tabaco y <i>Arabidopsis</i> .....	123
<i>F. Aristizábal, V. Lumbreras, A. Boronat, T. Blevé-Zacheo, M. Arró, A. Ferrer y Carmen Fenoll</i>	
Papel de los oligosacáridos en la reactividad alérgica de glicoproteínas de cereales .....	125
<i>G. García-Casado, R. Sánchez-Monge, L. Gómez y G. Salcedo</i>	
Identificación rápida de razas patogénicas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> mediante PCR.....	126
<i>A. I. González, M. L. Ruiz, C. G. Polanco</i>	

BA2H, un citocromo P450 soluble de tabaco que cataliza la síntesis de ácido salicílico en respuesta a la infección por el virus del mosaico del tabaco..... <i>J. León y I. Raskin</i>	127
Estudio de los mecanismos moleculares que controlan la activación de la respuesta de defensa vegetal frente a microorganismos patógenos..... <i>J. I. Moreno, A. Sanz, P. Obregón, E. Alonso y C. Castresana</i>	128
Expresión de genes de defensa en maíz en respuesta a infección por hongos..... <i>I. Murillo, L. Cavallarín and B. San Segundo</i>	129
Efecto de la inducción de la resistencia sistémica adquirida por ácido salicílico sobre el establecimiento de la simbiosis Rhizobium-leguminosa..... <i>J. Olivares, F. Martínez-Pastor, J. Sanjuan y T. Bisseling</i>	131
Péptidos antimicrobianos en la interacción planta-patógeno..... <i>P. Rodríguez-Palenzuela, A. Molina, E. Titarenko, E. López Solanilla, M. Moreno, A. Segura y F. García-Olmedo.</i>	133
Elementos de respuesta a nematodos en promotores de genes vegetales..... <i>S. Sanz-Alfárez, L. Serna, F. Aristizábal, B. Santamaría, F. F. del Campo y C. Fenoll</i>	135
Caracterización de la familia de genes Bet v 1, que codifican alérgenos de polen y proteínas relacionadas con patogénesis..... <i>I. Swoboda, E. Heberle-Bors y O. Vicente</i>	137
Pérdida de patogenicidad en mutantes sensibles a péptidos anticicrobianos..... <i>E. Titarenko, E. López-Solanilla, F. García-Olmedo y P. Rodríguez-Palenzuela.</i>	139
Caracterización de LRP, una proteína de tomate asociada a la matriz extracelular y que pertenece a la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR). .... <i>P. Tornero, M. E. Mayda, V. Conejero y P. Vera</i>	140

### **Metabolismo y Reguladores**

Inserción y topología de la HMGR de plantas en la membrana del retículo endoplasmático. <i>N. Campos y A. Boronat.</i>	143
Análisis molecular de la biosíntesis de glutamina y glutamato en coníferas..... <i>F. M. Cánovas, F. R. Cantón, A. García-Gutiérrez y F. Gallardo</i>	145
Expresión del gen que codifica una <i>L-asparaginasa</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> ..... <i>A. Casado, A.R. Franco, E. Moyano, J. Cárdenas y J. Muñoz-Blanco</i>	146
Caracterización molecular de las enzimas mevalonato quinasa y farnesilpírofosfato sintasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> ..... <i>N. Cunillera, M.A. Lluch, D. Delourme, C. Riou, A. Masferrer, M. Arró, F. Karst, A. Boronat y A. Ferrer.</i>	147

Función del gen <i>narl</i> relacionado con la asimilación de nitrato en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ..... A. Galván, J. Rexarch y E. Fernández	149
Genes de Giberelina 20-oxidasa de guisante y judía..... J. L. García-Martínez e I. López-Díaz.	150
Regulación diferencial por etileno de la expresión del gen de la S-adenosilmetionina sintasa en flores polinizadas de clavel ..... L. Gómez-Gómez y W. R. Woodson*.	151
Caracterización de los enzimas del metabolismo energético del pirofosfato de microorganismos fotosintéticos y su utilidad como sistemas modelo en Bioenergética..... M. R. Gómez, M. Losada y A. Serrano	152
Purificación y caracterización del enzima sacarosa sintasa de cebada..... J. Guerin y P. Carbonero.	154
Bases moleculares de la interacción fructosa-1,6-bifosfatasa/tiorredoxina en cloroplastos de plantas superiores..... R. Hermoso, F.J. López Jaramillo, A. Reche, M. Sahrawy, M. Castillo, J.J. Lázaro, E. Ocón, A. Chueca y J. López Gorgé	155
Análisis de la expresión génica durante la embriogénesis somática y en tratamiento con ABA y sequía ..... R. Linacero, M. Candela, M. López-Bilbao y A.M. Vázquez	157
Caracterización del gen de la S-adenosilmetionina descarboxilasa de guisante ( <i>Pisum sativum</i> . L.) ..... F. Marco y P. Carrasco.	158
Caracterización molecular de enzimas implicadas en la biosíntesis de ácido jasmónico en patata..... M. Martín, J. Royo Cárcamo, G. Vancanneyt y J. J. Sánchez-Serrano.	159
Alcohol dehidrogenasa clase III (formaldehído deshidrogenasa) de <i>Arabidopsis thaliana</i> : clonaje del cDNA, y estudio de sus propiedades moleculares y funcionales..... M. Caren Martínez, H. Achkhor, R. Fernández, J. Farrés y X. Parés.	160
Clonación y características de expresión de un ADNc de fresas que presenta homología con la pectato liasa de plantas..... N. Medina-Escobar, J. Cárdenas, V. Valpuesta, J. Muñoz-Blanco y J.L. Caballero	162
Caracterización y expresión de clones de cDNA regulados por ABA en semillas durmientes de <i>Fagus sylvatica</i> . ..... C. Nicolás, O. Lorenzo, G. Nicolás y D. Rodríguez.	163
Estudio de tres genes cuya expresión aumenta durante la fructificación inducida por giberelinas en guisante..... A. Pérez-García, M. Rodríguez-Concepción y J. P. Beltrán	165

Amplificación de secuencias inéditas de glutamina sintetasa de plantas superiores mediante PCR con cebadores degenerados.....	166
<i>R. Pérez Vicente, G. Dorado* y J.M. Maldonado.</i>	
Identificación y caracterización molecular de dos nuevos genes relacionados con la asimilación de nitrato en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	168
<i>A. Quesada y E. Fernández.</i>	
Clonación del gen de la urato oxidasa de <i>Cicer arietinum</i> .....	170
<i>J. Redondo Nevado, J. Cárdenas, M. Pineda y J. L. Caballero1.</i>	
Caracterización de la asimilación de nitrato en <i>Antirrhinum majus</i> .....	171
<i>J. M. Romero.</i>	
Characterization of plant genes able to promote auxin independent growth in tobacco protoplasts. ....	173
<i>M.J. Soto, H. Harling, J. Schell y R. Walden</i>	
Heterogeneidad molecular del polipéptido maduro de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa cloroplástica de distintas eucariotas fotosintéticas .....	174
<i>F. Valverde y A. Serrano</i>	

### Virus y Viroides

Interferencia entre los tobamovirus del mosaico verde atenuado del tabaco (TMGMV) y del mosaico de la colza (ORMV) en <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.....	179
<i>I. Aguilar, F. Sánchez y F. Ponz</i>	
Varabilidad genómica del retrotransposon Tnt1 de tabaco.....	180
<i>J. M. Casacuberta, S. Vernhettes, P. Puigdomenech y M.A. Grandbastien</i>	
Proteínas de geminivirus que interactúan con la proteína supresora tumoral del retinoblastoma .....	181
<i>S. Collin, M. Fernández-Lobato, P. Mullineaux, N. Muñoz-Martín y C. Fenoll</i>	
<i>Nicotiana benthamiana</i> plants transformed with fragments of the plum pox potyvirus genome showing different responses to virus inoculation .....	183
<i>H.S. Guo, M. T. Cervera, E. Dominguez and J. A. García</i>	
Caracterización de formas naturales de delección del RNA 2 del virus del cascabeleo del tabaco .....	185
<i>C. Hernández y J. F. Bol.</i>	
Posible existencia de múltiples RNAs defectivos derivados del RNA del virus de la tristeza de los cítricos .....	186
<i>C. López, P. Moreno, J. Guerri y R. Flores</i>	

Patrones de movimiento de un tobamovirus (ORMV) y un potyvirus (TuMV) en dos huéspedes diferentes .....	188
<i>A. Martín Martín, H.L. Cabrera y Poch y F. Ponz.</i>	
Varabilidad en la respuesta de <i>Arabidopsis</i> frente a la infección de un tobamovirus (CRMV) y de un potyvirus (TuMV).....	189
<i>A. Martín Martín, D. Martínez Herrera, H.L. Cabrera y Poch y F. Ponz.</i>	
Movimiento a larga distancia del virus del enrollado de la hoja del cerezo (CRLV) en plantas de tabaco .....	190
<i>P. Más, M. A. Sánchez-Pina y V. Pallás.</i>	
Determinados análogos de sustitución del péptido sintético melitina inhiben la infectividad del virus del mosaico del tabaco .....	192
<i>J. F. Marcos, R. N. Beachy, R. A. Houghten, S.E. Blondelle y E. Pérez-Payá</i>	
Una mutación que anula a la función de movimiento se mantiene en el virus de la aspermia del tomate (TAV) asociada a una mayor replicación .....	194
<i>I. Moreno, J. J. Bernal, E. Rodríguez-Cerezo, F. García-Arenal</i>	
Estudios del grado de adaptación en experimentos de competencia de distintas razas de PVY.....	195
<i>A. Romero y F. Ponz</i>	
Análisis de la región 5' no codificante del virus de la sharka .....	197
<i>L. Simón, H.S. Guo y J. A. García</i>	
El DNA de un elemento extracromosómico de tipo retroviroidal de plantas se integra en diferentes puntos del genoma de un caulimovirus .....	199
<i>A. Vera, J. A. Darós y R. Flores</i>	
Grande1: un nuevo tipo de retrotransposón del género <i>Zea</i> .....	201
<i>C. M. Vicient, A. Monfort y J. A. Martínez-Izquierdo.</i>	

## **Regulación de la expresión génica**





## Características funcionales de una proteína RNA-binding de maíz

M M. Albá y M. Pagés

Dpto. de Genética Molecular.C.I.D. (C.S.I.C.) Jordi Girona 18-26 08034 Barcelona

La proteína MA16 de maíz contiene en su secuencia un dominio de unión a RNA (RBD) y un extremo carboxi terminal rico en glicinas y aminoácidos aromáticos que forman de modo imperfecto un dominio GAR propio de las proteínas nucleolares (1,2,3). Estudios de localización subcelular han indicado que la proteína MA16 se localiza en el nucleolo y se encuentra ampliamente distribuida en los distintos tejidos del maíz (3).

La propiedad de unión a RNA se estudió mediante análisis *in vitro* de unión a ribonucleopolímeros de la proteína y los resultados indicaron que la proteína MA16 es una proteína RNA-binding que une preferencialmente RNAs ricos en poliG y poliU (2).

Como un primer paso para conocer las especies de RNA con las que la proteína interacciona *in vivo* hemos analizado las distintas afinidades de unión de la proteína al RNA utilizando una proteína recombinante expresada en *E.coli* (4). También se han realizado experimentos de coimmunoprecipitación de extractos totales de maíz y posterior análisis de los RNAs. Entre los RNAs asociados a la proteína hemos detectado el mRNA codificando la propia proteína MA16 indicando que la expresión de la MA16 puede ser autoregulada. Los estudios de inmunoprecipitación *in vivo* han mostrado que la proteína MA16 está fosforilada y que la interacción con el RNA se produce en asociación con distintas proteínas. Estos resultados sugieren que la fosforilación de la proteína MA16 así como su interacción con otras proteínas pueden determinar la especificidad de unión de la proteína a su RNA específico dentro de la célula.

### Referencias

1. Gómez et al. 1988. Nature, 334, 262-264
2. Ludevid et al 1992 Plant Journal, 2, 999-1003
3. Albá et al 1994. Plant Journal, 6, 825-834
4. Freire et al 1995. Plant Mol Biol. (en prensa)

## Estudio de la expresión del gen de la poligalacturonasa en nódulos de alfalfa mediante hibridación *in situ*

C. Coronado, J.A. Muñoz y A. J. Palomares

*Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 41012 Sevilla.*

La técnica de hibridación *in situ* permite determinar la localización espacial precisa de la expresión de un gen a nivel de célula individual. En sus comienzos, esta técnica se utilizó para localización de ARNm en tejidos animales, y para situar en mapas cromosómicos distintos fragmentos de ADN clonados. Actualmente la aplicación de la hibridación *in situ* para la localización de mensajeros específicos en tejidos vegetales está siendo muy utilizada, especialmente en el estudio de la organogénesis de nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de leguminosas (Franssen y col. 1992). Básicamente la técnica consiste en la síntesis de transcritos antisentido marcados radiactivamente ( $^{35}\text{S}$ -UTP), que se hibridan frente a los ARN mensajeros en cortes de entre 7 y 10  $\mu\text{m}$  de material embebido en parafina. Tras la hibridación y lavados posteriores, los cortes se cubren con una emulsión fotográfica y se revelan. Entre los principales problemas de esta técnica se encuentra el largo período de incubación con la emulsión fotográfica (entre una y seis semanas) en el caso de genes cuyo nivel de expresión es muy bajo, al que podemos añadir la necesidad del uso de compuestos radiactivos que genera residuos molestos. Bochenek y Hirsch (1994) han desarrollado un protocolo para hibridación *in situ* en nódulos de leguminosas utilizando el sistema de digoxigenina (Boehringer Mannheim) como sistema de detección no radiactivo. Además de tratarse de un sistema más seguro en el laboratorio por evitar el uso de radiactividad, la principal ventaja del método es la enorme reducción del tiempo necesario para la obtención del resultado, ya que la reacción coloreada es visible desde 10 minutos a uno o dos días después de la adición del sustrato. En este trabajo se ha utilizado esta técnica no radiactiva para la localización de los transcritos del gen de poligalacturonasa (PG) en nódulos de alfalfa (ver comunicación de Muñoz y col.). La distribución de los transcritos de PG en el tejido del nódulo se ha estudiado en secciones en serie de primordios nodulares de 4 días, nódulos de 7 días y nódulos de 20 días. Dado que los nódulos de alfalfa presentan un meristemo apical persistente, en una sección longitudinal de un nódulo se puede observar una gradación en la "edad" o etapa en el desarrollo del tejido desde el meristemo apical hasta el punto de unión del nódulo a la raíz. La parte central de un nódulo se puede dividir en distintas zonas (Newcomb, 1976). El meristemo en la zona apical, la zona adyacente al meristemo o zona de invasión donde prolifera el cordón de infección y se liberan las bacterias, y la zona simbiótica que puede dividirse a su vez en temprana y tardía en función del grado de diferenciación de los bacteroides. Las secciones se han analizado por hibridación con sondas ARN antisentido y sentido transcritas a partir de un clon de ADNc de PG y marcadas con digoxigenina. La sonda sentido no hibridó con las secciones a niveles detectables mientras que la sonda antisentido hibridó con ARN presente en la región central del nódulo. Se ha detectado la presencia de transcritos de PG en los primordios nodulares y en nódulos de 7 y 20 días en la parte que incluye desde las células más jóvenes de la zona de invasión, directamente adyacentes al meristemo apical, hasta las primeras líneas de células de la zona simbiótica temprana. Estos datos de expresión indican que el gen de poligalacturonasa se expresa en momentos muy tempranos del proceso de infección en los que se expresan algunas nodulinas tempranas como ENOD12 y ENOD5 (Scheres y col. 1990).

## Referencia

- Bochenek, B., y Hirsch. (1994). *Plant Mol. Biol. Report* 8:237-248.
- Franssen, H.J., Vijn, I., Yang, W.C., y T. Bisseling. (1992). *Plant Mol. Biol.* 19:89-107.
- Newcomb, W. (1976). *Can. J. Bot.* 54:2163-2186.
- Scheres, B., van Engelen, F., van der Knaap, E., van de Wiel, C., van Kammen, A., y T. Bisseling. (1990). *The Plant Cell* 2:687-700.

## Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of maize coleoptiles and bean symbiotic nodules: regulation and tissue localization

F. A. Culiñán-Maciá, J. R. Pérez-Castiñeira, M. T. Caldeira, F. Campos, J. M. Villalba, I. Frías, T. Jahn, F. Sánchez, O. Kupinger, M. Pagés\* y R. Serrano

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas Universidad Politécnica de Valencia-C.S.I.C. Camino de Vera s/n. 46022 Valencia, Spain.

\*Departament de Genètica Molecular, Centre d'Investigació y Desenvolupament C.S.I.C. Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

A cDNA encoding the major expressed isoform of maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase (MHA2) has been isolated by screening a *lgt11* expression library with a monoclonal antibody specific for the ATPase. MHA2 was shown to be quite different to MHA1, the other maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isolated so far and which has a low expression level (1). MHA2 belongs to the subfamily of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases defined by the *Arabidopsis* AHA1, AHA2 and AHA3 and the tobacco PMA4 genes while MHA1 belong to the second subfamily defined by the tobacco PMA1, PMA2 and PMA3, the tomato TOM1 and the rice OSA1 genes. Northern analysis indicates that MHA2 is mainly expressed in roots and coleoptiles, with less expression in leaves and flowers. *In situ* hybridization in different maize seedling tissues indicate increased expression of MHA2 in stomata guard cells, coleoptile parenchyma cells, shoot and root phloem tissue and root epidermis. No significant change (<10%) in either MHA2 mRNA level or in ATPase protein detected with monoclonal or polyclonal antibodies was observed in coleoptile segments treated with auxin respect to untreated controls. Auxin treatment, however, induced a small increase (30-35%) in H<sup>+</sup>-translocation activity of plasma membrane-enriched vesicles. It is concluded that increased membrane potential and acidification induced by auxin in coleoptile segments is not mediated by increased expression of this major isoform of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. These auxin effects, crucial for the acid-growth mechanism of auxin action (2), could be mediated by labile, reversible effects at the ATPase protein level or/and by indirect activation of the enzyme for example by increased metabolic acid production. The 80% increase in ATPase protein triggered by auxin in maize coleoptiles reported by Hager et al. 1991 (3) could not be reproduced in our experimental conditions and it may not be of general relevance for the mechanism of auxin action. Biochemical studies with partially purified membrane fractions have suggested that symbiotic root nodules contain a variant form of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase located at the peribacteroid membrane (4, 5). However, immunolocalization of the enzyme in *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* nodules with specific antibodies indicates that the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is mostly located at the non-infected cells of the symbiotic nodules. This result was confirmed by cloning a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene (designated BHA1) from a nodule cDNA library and localization of the corresponding mRNA at non-infected cells by *in situ* hybridization. BHA1 was not nodule-specific but expressed in leaves and roots of non-infected plants. It belongs to the subfamily of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases defined by the *Arabidopsis* AHA1, AHA2 and AHA3 and the tobacco PMA4 genes. The low expression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Rhizobium*-infected cells and the high ATPase content of non-infected nodule cells put a note of caution on the origin of the ATPase described in partially purified preparations of peribacteroid membranes.

## References

1. Jin and Bennetzen (1994). *Plant Cell* 6, 1177-1186.
2. Rayle and Cleland (1992). *Plant Physiol.* 99, 1271-1274.
3. Hager et al. (1991). *Planta* 185, 527-537.
4. Blumwald et al. (1985). *Plant Physiol.* 78, 665-672.
5. Domigan et al. (1988). *Arch. Biochem. Biophys.* 264, 564-573.

## Expresión diferencial de la familia de inhibidores de proteasas II (pin<sup>2</sup>) durante el desarrollo de patata.

C. Dammann, M. de Torres, P. M. Sánchez y J. J. Sánchez-Serrano

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), UAM Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid.

La familia génica que codifica el inhibidor de proteinasas II (pin<sup>2</sup>) de patata, constituye un excelente modelo para el estudio de la regulación de la expresión génica en plantas. En primer lugar, la expresión de sus miembros es específica de tejido y esta ligada al desarrollo de la planta. En segundo lugar, la expresión de algunos de sus miembros, esta regulada por factores medioambientales, tales como el daño mecánico. En nuestro laboratorio hemos abordado un estudio detallado a distintos niveles de tres componentes de la familia pin<sup>2</sup>: pin<sup>2</sup>-t (expresado en hojas y tubérculos), pin<sup>2</sup>-r (hallado en raíces) y pin<sup>2</sup>-f (en flores). Nuestro objetivo es elucidar las bases moleculares que regulan la expresión génica durante el desarrollo así como en respuesta a herida. El gen Pin<sup>2</sup> más ampliamente estudiado, el pin<sup>2</sup>-t, se induce durante el desarrollo de los tubérculos así como en hojas heridas. Esta inducción puede ser reproducida mediante tratamiento con las hormonas ácido jasmónico o ácido abscísico. El análisis de su promotor demuestra que la región comprendida entre los nucleótidos -600 a -400 es necesaria y suficiente para la correcta regulación de este gen. Este fragmento contiene dos elementos reguladores "G-box" cuya función en el control de la expresión en tubérculo y hoja herida estamos dilucidando mediante análisis por footprinting *in vivo*. En raíces, no se expresa ningún miembro de esta familia en condiciones basales ni en respuesta a herida, pero la aplicación directa de ácido jasmónico induce un gen distinto pero muy similar al de hojas y tubérculos, el pin<sup>2</sup>-r, específico de este órgano. La no inducibilidad por herida de ningún pin<sup>2</sup> en raíces puede deberse a la carencia en éstas de un enzima clave en la síntesis de ácido jasmónico. En los estadios iniciales del desarrollo de los pétalos hemos demostrado la acumulación de un mRNA codificado por un nuevo miembro de la familia Pin<sup>2</sup>, el pin<sup>2</sup>-f. Su cDNA es similar al Pin<sup>2</sup> de tubérculo y hojas pero, a diferencia de éste, no responde a ácido jasmónico ni a herida. Una vez clonado el promotor de este nuevo gen, hemos abordado el estudio comparado del mismo, el cual nos podrá revelar las regiones cis del promotor responsables de su expresión en pétalos así como el o los factores nucleares que interaccionan con ellas.

## Un intrón de plantas del grupo I con extensas deleciones en 5' se acumula como formas circulares *in vivo*

J. A. Darós y R. Flores

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera 14, 46022 Valencia.

La generación de RNAs circulares intrónicos es una característica general de los intrones del grupo I potencialmente capaces de autoprocesarse mediante un mecanismo ribozimático. En la mayoría de los casos la circularización conlleva la pérdida de una pequeña región del extremo 5', que en el caso del sistema modelo de este grupo, el intrón del pre-rRNA de *Tetrahymena thermophila*, es de 15 a 19 nt (1). En plantas, únicamente el gen del tRNA<sup>LeU</sup> (UAA) cloroplástico contiene un intrón del grupo 1. La presencia de este mismo intrón en cianobacterias es una sólida evidencia en favor de su existencia en el correspondiente gen del ancestro cianobacteriano de los plastidios. Estudios de nuestro laboratorio encaminados inicialmente en otra dirección, nos condujeron a detectar en chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) un pequeño RNA aparentemente circular que se acumula *in vivo* a altos niveles. La caracterización molecular de este RNA mostro que es efectivamente una molécula circular con un tamaño de 281 nt y una secuencia muy similar a la región 3' del intrón del tRNA<sup>LeU</sup> (UAA) cloroplástico de tabaco (cuya longitud total es de 503 nt). Presumiendo que este RNA circular era el resultado de un procesamiento del intrón homólogo de chirimoyo, procedimos a amplificar el DNA de este último mediante PCR y dos cebadores homólogos y complementarios a secuencias del tRNA<sup>LeU</sup> (UAA) de plantas superiores que flanquean los extremos del intrón. El análisis molecular del mismo reveló una secuencia de 494 nt cuyos 281 nt 3' terminales son idénticos a los del RNA circular previamente descrito.

Con el fin de determinar si existen *in vivo* otros RNAs con la misma secuencia que el RNA circular de 281 nt, una preparación de RNAs de chirimoyo se fraccionó mediante dos electroforesis consecutivas y perpendiculares en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y desnaturalizantes. Al hibridar los RNAs transferidos a una membrana con una sonda de secuencia complementaria al RNA circular de 281 nt observamos, además de la señal prominente que cabría esperar para dicho RNA circular, otras dos intensas señales que por su movilidad deben corresponder a dos moléculas lineales de 281 y 494 nt. Así pues en chirimoyo coexisten *in vivo* el intrón lineal completo junto a las formas circulares y lineales de un RNA con una deleción que comprende casi la mitad 5' del intrón.

El siguiente paso fue establecer si las observaciones efectuadas en chirimoyo son de carácter general en plantas. Con este objeto se aplicó la misma aproximación experimental al caso de tabaco, con la única salvedad de que la sonda empleada fue un RNA de secuencia completa y complementaria al intrón tRNA<sup>LeU</sup> (UAA) de tabaco. Los resultados obtenidos mostraron que mientras que el intrón lineal completo se acumula a concentraciones similares al homólogo de chirimoyo, en tabaco no existen niveles detectables de formas circulares delecionadas de este intrón.

¿Cuál es la posible base molecular de este comportamiento diferencial del intrón tRNA<sup>LeU</sup> (UAA) de chirimoyo y tabaco?. El autoprocesamiento ribozimático de los intrones del grupo 1, catalizado por una conformación tridimensional específica de los mismos, transcurre a través de dos reacciones consecutivas: i) el corte en 5' que requiere la intervención de una secuencia guía interna (IGS) próxima al extremo 5' y de un cofactor derivado de la guanosina, y ii) el corte en 3' en el que participa asimismo la IGS y que paralelamente conduce a la ligación de los exones. Una vez liberado el intrón puede ocurrir una tercera reac-



ción, similar a la segunda, en la que el extremo 3' del intrón ataca posiciones internas del mismo generando un fragmento lineal que contiene el extremo 5' del intrón y otro circular compuesto por el resto de la secuencia. La inspección de las secuencias del intrón tRNA-LeU (UAA) de chirimoyo situadas en 5' y 3' respecto al sitio de ciclación que genera el RNA de 281 nt muestra que son complementarias a la IGS y a la secuencia adyacente en 5' a la misma. Sin embargo, esta complementariedad no se observa en tabaco, lo que explica que sólo en el primer caso el intrón liberado sea capaz de sufrir un segundo procesamiento. Este modelo da cuenta también de la generación de otros dos RNAs circulares de 216 y 156 nt, asimismo derivados del intrón tRNA-LeU (UAA) de chirimoyo, que se acumulan *in vivo* a concentraciones muy inferiores a las del RNA de 281 nt. La complementariedad de las secuencias mencionadas más arriba en torno al sitio de ciclación correspondiente al RNA de 281 nt, es menos extensa en torno a los sitios de ciclación que generan los RNAs de 216 y 156 nt, lo que implica unos autoprosesamientos menos efectivos y en último término unos niveles de acumulación notablemente menores.

Los tres sitios de ciclación observados en el intrón tRNA-LeU (UAA) de chirimoyo son insólitos en el sentido de que se encuentran en el bucle L8, muy distantes de la región 5' terminal que es donde generalmente se producen las ciclaciones en los intrones del grupo I. Sin embargo, el mecanismo que parece operar es muy similar en todos los casos y es independiente de la distancia. Esto lleva a postular que el bucle L8 y en particular determinadas regiones del mismo, a pesar de estar muy alejadas en la estructura primaria del extremo 5' (en torno al cual se localizan la IGS y una secuencia adyacente), están físicamente próximas y en orientación adecuada respecto a estas últimas como resultado de la estructura tridimensional del intrón. Es posible que adicionalmente una o más proteínas faciliten la estabilización de esta estructura.

#### Referencias

- (1) Cech, T.R. (1990). *Annu. Rev. Biochem.* 59: 543-568.

## **Análisis de la expresión de genes relacionados con procesos morfogénicos *in vivo* e *in vitro* en lenteja**

M. Fernández, M. I Peláez, M. L. Ruiz y F. Vaquero.

Area de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León, 24071 León.

Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten reproducir de forma controlada los procesos básicos de la morfogénesis vegetal: la organogénesis y la embriogénesis. En lenteja (*Lens culinaris* Medik.) estudios *in vitro* realizados con semillas en distintos estados de desarrollo han mostrado que la capacidad para producir múltiples tallos a partir de cada semilla se induce a los 3 ó 7 días, dependiendo del medio de cultivo.

Es este trabajo se trata de identificar la expresión de genes relacionados con los procesos morfogénicos inducidos durante y como consecuencia del cultivo *in vitro*. Igualmente se ha intentado determinar el momento de la expresión de genes relacionados con la embriogénesis en el proceso de formación de la semilla. Para ello se han cultivado *in vitro* durante distintos períodos de tiempo semillas inmaduras; extrayéndose el RNA total tanto de estas semillas como de semillas inmaduras no cultivadas. Los RNAs se utilizaron como moldes para obtener los correspondientes cDNAs mediante transcripción inversa por PCR. Como cebadores se utilizaron oligo-dT y secuencias cortas diseñadas a partir de secuencias de genes implicados en embriogénesis en otras especies vegetales. Mediante esta técnica se ha conseguido amplificar cDNAs específicos de embriogénesis de lenteja.

Los resultados sobre expresión génica se relacionan con cambios morfológicos mediante un estudio histológico.

## Aislamiento y caracterización de la familia de genes MADS de guisante.

C. Ferrándiz y J. P. Beltrán.

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. CSIC-UPV. Camino de Vera, 14.  
46022, Valencia.*

El estudio de los procesos de iniciación de la floración y de morfogénesis floral ha experimentado un desarrollo muy importante durante los últimos años. Basándose en el análisis genético de mutantes homeóticos primero y mediante el aislamiento de varios de los genes implicados después, se han elaborado modelos que describen el proceso de especificación de los meristemas inflorescentes y de los órganos florales. Varios de los genes aislados hasta el momento pertenecen a la denominada familia MADS. Sus miembros comparten una estructura básica común, con un dominio Nterminal, altamente conservado, de unión a DNA (la caja-MADS), y un dominio central, con capacidad para formar helices anfipáticas, posiblemente implicado en procesos de dimerización (la caja-K). Actualmente, la extensión de este tipo de estudios a diferentes especies, principalmente tomate, petunia y maíz, está dando lugar a una mejor comprensión del proceso, dando validez a sus características generales y poniendo de manifiesto las diferencias particulares.

Uno de los objetivos del trabajo que se presenta es ahondar en este aspecto, mediante la realización de estudios en *Pisum sativum*. Para ello, disponemos de una serie de mutantes homeóticos florales, que, como primer paso, han sido caracterizado fenotípicamente. Por las características observadas, parece probable que los genes responsables de estas mutaciones correspondan a miembros de la familia MADS. Por ello se ha intentado el aislamiento de ésta, realizando el escrutinio de una genoteca de cDNA de flores, utilizando como sonda el cDNA de DefA de *Antirrhinum majus*. Hasta el momento se han clonado y secuenciado seis mensajes diferentes, denominados pM1 a pM6, y se han realizado estudios de expresión temporal y espacial de todos ellos. Como medio para correlacionarlos con las mutaciones conocidas, se ha procedido a su localización en el mapa genético mediante técnicas de RFLP. La posición correspondiente a pM6 coincide con la de Veg-1, cuya mutación produce la ausencia completa de la iniciación floral en todas las condiciones ambientales ensayadas. En estos momentos, estamos intentando corroborar una posible relación directa entre pM6 y Veg-1, mediante la utilización de poblaciones segregantes para el fenotipo mutante y estudios de expresión de pM6 en los diferentes mutantes homeóticos disponibles que puedan permitir elaborar un modelo de interacción entre ellos que explique los efectos observados.

## Caracterización bioquímica y molecular de una $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de tomate

N. Ferrol\*, L. E. Wimmers y A. B. Bennett

Department of Vegetable Crops. Mann. Laboratory. University of California, Davis. USA.

\*Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín. C.S.I.C. Granada.

Los enzimas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas de las células vegetales son las principales responsables del mantenimiento de los niveles citosólicos de calcio en el rango submicromolar, lo cual es fundamental para que este elemento ejerza su función como segundo mensajero (Evans y col., 1991). Debido a la gran importancia otorgada a las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas en la célula vegetal, durante los últimos años se han desarrollado numerosas investigaciones a fin de caracterizar la actividad transportadora de calcio asociada con dichas proteínas (Chanson, 1993). Sin embargo, estos estudios se han visto dificultados, tanto por la presencia de altos niveles de otras bombas iónicas ( $\text{H}^{+}$ -ATPasas) asociadas con las membranas celulares, como por la dificultad de obtener fracciones de membrana suficientemente puras. Para paliar este problema, inherente al estudio de las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas, ha sido necesario definir estos sistemas desde un punto de vista bioquímico y molecular, con el objeto de obtener información sobre su estructura, funcionalidad y regulación metabólica en la célula. De aquí, que el objetivo primario de este trabajo haya sido el aislamiento de un cDNA (LCA1) y de un clon genómico (gLCA13) que codifican una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de tomate. Del análisis de la secuencia aminoacídica codificada por estos genes, deducida de la secuencia de nucleótidos, se ha comprobado que consta de 1048 aminoácidos que conforman un polipéptido de 116 kD, el cual contiene ocho dominios transmembranarios y todos los dominios funcionales con los centros activos, que están conservados en todas las ATPasas de tipo P (Serrano, 1989). La secuencia de LCA presenta un 50% de identidad con las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas del retículo endoplásmico y sarcoplásmico de animales y un 25% con las  $\text{H}^{+}$ -ATPasas de vegetales. Además, tres de las regiones transmembranarias de LCA contienen dominios que, en la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo de conejo, han sido identificados como dominios esenciales para que el calcio se una a la proteína (Andersen y Vilsen, 1990). Ello, nos ha llevado a proponer que LCA codifica una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de tomate. Para el estudio de la localización subcelular de la proteína codificada por LCA, se han obtenido anticuerpos policlonales tras expresión en bacterias y purificación de un dominio no conservado de LCA como proteína de fusión. Tras la inmunización de conejos con la proteína de fusión purificada, el suero obtenido reaccionó específicamente con dos proteínas de membrana de raíces de tomate de 116 y 120 kD, localizadas en el tonoplasto y en la membrana plasmática, respectivamente. Además, la inhibición por los anticuerpos de la actividad transportadora de calcio dependiente de ATP asociada con fracciones de membrana enriquecidas en tonoplasto y membrana plasmática, indicaba la presencia de dos  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas diferentes en raíces de tomate que están inmunológicamente relacionadas. El análisis del DNA genómico de tomate, mediante técnicas de Southern blot con LCA1 y el dominio de LCA usado para obtener los anticuerpos, ha puesto de manifiesto la existencia de un único fragmento de restricción, lo que indica la existencia de un único gen en tomate. Estos resultados nos permiten sugerir que un único gen (LCA) puede codificar dos distintas isoenzimas de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, diferencialmente localizadas en raíces de tomate. El análisis de la estructura y abundancia del mRNA de LCA se llevó a cabo mediante hibridación de poli(A<sup>+</sup>)RNA de hojas y raíces de tomate con LCA1. En raíces, dicha sonda hibridó con tres transcritos de 3.5, 4.2 y 6.5 kb y en hojas con uno de 4.2. La existencia de múltiples transcritos en raíces, hace pensar en la posibilidad de que un procesamiento diferencial del RNA de LCA puede dar lugar a diferentes iso-

formas de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, como ha sido descrito para las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas del retículo sarcoplásmico de animales (Lytton y MacLennan, 1988). También es posible que la diferencia en el tamaño y localización subcelular de las dos  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas inmunológicamente identificadas en raíces de tomate, sea el resultado de modificaciones post-transduccionales.

#### Referencias

- Andersen, J.P. y Vilsen, B. 1990. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 722-730.  
Chanson, A. 1993. *Plant Physiol. Biochem.* 31, 943-955.  
Evans, D.E., Briars, S.A. y Williams, L.E. 1991. *J. Exp. Bot.* 42, 285-303.  
Lytton, J. y MacLennan, D.H. 1988. *J. Biol. Chem.* 263, 15024-15031.  
Serrano, R. 1989. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 40, 61-94.

## Expresión de los genes *nfe* en nódulos de alfalfa

F. M. García-Rodríguez<sup>1</sup>, Y. Wei-Cai<sup>2</sup>; T. Bisseling<sup>2</sup> y N. Toro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín. CSIC. C/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada.

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Agricultural University of Wageningen, Dreijenlaan 3, 6703 HA Wageningen, The Netherlands.

Los genes *nfe* (nodule formation efficiency) A, B, D son responsables de la alta competitividad en la nodulación que presenta la cepa *Rhizobium meliloti* GR4. Los análisis de secuencia han puesto de manifiesto la existencia de promotores, tipo NifA/RpoN que controlan la expresión de los genes *nfeA* y *nfeB*.

Para comprobar el patrón de expresión de los genes *nfe*, en el nódulo se han construido fusiones transcripcionales entre los promotores de estos genes y el gen de la  $\beta$ -Glucuronidasa (GusA), las construcciones resultantes GUS1, GUS2, y GUS3 llevan los promotores *pnfeA*, *pnfeB* y *pnfeD* respectivamente.

Se quería ver la expresión de estos genes en dos fondos genéticos diferentes, y se utilizaron para ello las cepas GRM8 y 2011 de *Rhizobium meliloti*. Con estas cepas transportando cada una de las construcciones, se inocularon plantas con la técnica de Spot Inoculation para obtener nódulos, en los que se realizó una tinción histoquímica para GUS.

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto la existencia de ciertas diferencias en la expresión de estos genes en función de la cepa utilizada:

-*nfeA* comienza su expresión en la interzona II-III, independientemente de cual sea la cepa utilizada.

-En los nódulos producidos por GRM8 transportando la fusión *pnfeB*::GUS la expresión comienza intensamente en la interzona II-III y se mantiene a lo largo de la zona III. Sin embargo, en 2011 con la misma fusión se observa la expresión en la zona III y no en la interzona II-III.

-Con respecto a la fusión *pnfeD*::GUS también existen diferencias entre una cepa y otra, mientras que cuando es la cepa 2011 con el plásmido GUS3 la que formó los nódulos la expresión de GUS se observa en la interzona II-III, continuando a lo largo de la zona III, con los nódulos formados por GRM8 GUS3 la expresión comienza en la zona III.

La interzona II-III consiste en una región de 2-3 capas de células ricas en amiloplastos que separan la zona de fijación o zona II y la zona fijadora de nitrógeno o zona III. La interzona II-III es una zona con una función destacada en la diferenciación del nódulo, varios genes clave de la simbiosis incluyendo genes bacterianos de la fijación como, *nifA*, *nifH*, *fixK* y nodulinas como la Leghemoglobina y NOD6 se activan precisamente en esta interzona II-III.

Cual o cuales son las señales que actúan a este nivel y disparan la expresión de estos y otros genes, no se sabe, pero uno de los posibles candidatos es la concentración de oxígeno, que a nivel de la interzona es aproximadamente de  $1\mu\text{M}$ . Para determinar si es el oxígeno, el que activa la transcripción de estos genes a través del sistema FixLJ o NifA como parece indicar el que estos genes tengan promotores tipo Nif, estamos intentando determinar la expresión de los genes *nfe* en nódulos producidos por cepas mutantes en los genes reguladores y que lleven las fusiones con GUS.

## Referencias

- W. Yang, B. Horvath, J. Hontelez, A. Van Kammen and T. Bisseling (1991). *MPMI*. vol. 4 N° 5:464-468.
- M.J. Soto, A. Zorzano, J. Mercado-Blanco, V. Lepek, J. Olivares y N. Toro (1993). *J. Mol. Biol.* 229:570-576.
- E. Soupene, M. Foussard, P. Boistad, G. Truchet and J. Batut. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 3759-3763.

## Estudio molecular de PA27, una proteína específica de anteras de guisante

M.D. Gómez, M. Rodríguez-Concepción, J.P. Beltrán, L.A. Cañas

*Departamento de Biología del Desarrollo. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (C.S.I.C.- U.P.V.). Campus de la Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n., 46022 Valencia. Telef.: (96) 3 87 78 70. Fax: (96) 3 87 78 59.*

Mediante un proceso inmunosustractivo utilizando extractos de los cuatro órganos florales del guisante, hemos obtenido un anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína de unos 27kD específica de anteras. Dicha proteína (PA27) se inmunolocalizó en el citosol de células pertenecientes a tejidos que conforman el saco polínico (conectivo, endotecio, tapetum,...) a lo largo de su desarrollo. El monoclonal resultó especialmente útil como marcador de tejidos de antera en el estudio inmunohistoquímico de órganos florales que presentaban mezclas de tejidos (antera-carpelo) como consecuencia de una mutación homeótica.

Utilizando dicho monoclonal en cromatografía de afinidad, se purificó una cierta cantidad de la proteína a partir de extractos de antera y se microsecuenció su extremo N-terminal (20 AAs). La introducción en el banco de datos de dicha secuencia, nos indicó que la PA27 presentaba una alta homología en esa región con la de una albúmina (ALB2) específica de cotiledones y previamente descrita. La ALB2 también se localiza en el citosol y no se moviliza durante la germinación de la semilla, por lo que no puede considerarse como una típica proteína de reserva, siendo su función biológica desconocida hasta la fecha.

Con el fin de aislar el gen responsable de la producción de PA27 en anteras, hemos utilizado el gen de la ALB2 como sonda en el escrutinio de una genoteca de cDNA de flores de guisante. El resultado fué el aislamiento de un clon que contiene la secuencia codificante completa (908 pb) y que presenta una homología de un 72% con la correspondiente a la ALB2. Mediante ensayos de northern comprobamos su especificidad de expresión en extractos de antera ya que la sonda no hibridaba con ningún otro órgano floral ni con otros tejidos de la planta (cotiledones, hojas, raíz, tallo,...). Experimentos de hibridación *in situ* sobre secciones de flores en desarrollo corroboraron dicha especificidad, ya que únicamente dos de los tejidos que conforman el saco polínico de la antera (conectivo y endotecio) aparecían marcados. La homología de PA27 con proteínas del grupo de las hemopexinas y sus implicaciones evolutivas, así como el potencial interés del estudio del promotor de este gen, serán objeto de discusión.



## Biosíntesis de cisteína en *Arabidopsis*. Clonación y regulación de O-acetilserina(tiol)liasa

C. Gotor, C. Barroso, F.J. Cejudo y J.M. Vega

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Facultad de Química, Universidad de Sevilla y CSIC, Sevilla.

El azufre tiene un papel fundamental en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta. En su forma reducida participa en la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios y en la síntesis de coenzimas; y en su forma oxidada es utilizado en la síntesis de los sulfolípidos de la membrana del cloroplasto. L-Cisteína es el metabolito orgánico inicial en la síntesis de otros metabolitos azufrados. La última etapa de la biosíntesis de L-cisteína a partir de O-acetilserina y sulfuro está catalizada por la enzima O-acetilserina(tiol)liasa (también denominada O-acetilserina sulfhidrilasa, OASSasa, EC 4.2.99.8). La enzima es un homodímero de 60-70 kD y contiene dos moléculas de piridoxal-5'-fosfato como cofactor (1). Dos isoenzimas OASSasa, denominadas A y B, han sido detectadas en bacteria, codificadas por los genes *cysK* y *cysM*, respectivamente (2-3). Ambos genes se activan a nivel transcripcional en condiciones de limitación de azufre y en presencia del inductor O-acetilserina (4). En plantas superiores, la actividad O-acetilserina(tiol)liasa ha sido detectada en los tres compartimentos celulares en los que existe síntesis de proteína. Recientemente, se han aislado y caracterizado diferentes genes de planta que codifican para las isoformas citoplasmática (5-7), plastídica (7-11), y mitocondrial (12). Nuestro grupo está interesado en caracterizar los niveles de regulación de la biosíntesis de cisteína en organismos fotosintéticos. Para ello, inicialmente aislamos un cDNA de *Arabidopsis thaliana*, denominado *Atcys-3A*, que codifica para la forma citosólica de O-acetilserina(tiol)liasa. La secuencia deducida de aminoácidos muestra un alto nivel de similitud con la proteína de bacteria, y un gran porcentaje de identidad con otras OASSasa de plantas (13). El nivel de expresión de *Atcys-3A* y la actividad OASSasa se activan por limitación nutricional de azufre, requiriendo una fuente de carbono y nitrógeno para alcanzar la máxima activación (13). Este modelo de regulación es similar a la activación transcripcional que sufren los genes *cysK* y *cysM* en bacteria (4). Para caracterizar la regulación de la O-acetilserina(tiol)liasa en diferentes tejidos de *Arabidopsis*, primero analizamos el modelo de expresión de *Atcys-3A* en los órganos de plantas maduras. El transcrito está presente en todos los órganos, siendo sustancialmente más abundante en raíces, lo que es esperable ya que el producto de este gen es la isoforma citosólica. El mismo tipo de expresión se ha observado para otro miembro de la familia génica correspondiente a la forma citosólica de *Arabidopsis* (7). Sin embargo, la expresión del gen *cysA* que codifica para la enzima citosólica de espinaca es constitutiva en hojas y raíces (5). La distribución espacial del transcrito *Atcys-3A* ha sido posteriormente examinada en tejidos de raíz y roseta mediante hibridación *in situ*. Una señal fuerte se observa en los elementos vasculares y en la epidermis de la raíz. Por el contrario en hoja, el transcrito aparece distribuido a lo largo de todo el tejido, con una mayor expresión en el tejido vascular y en los tricomas. Estos estudios de hibridación *in situ* parecen indicar que la biosíntesis de cisteína por la isoenzima citosólica O-acetilserina(tiol)liasa tiene lugar predominantemente en el tejido vascular.

## Referencias

1. León, J, Romero, LC, Galván, F, Vega, JM (1987) *Plant Sci.* 53:93-99
2. Byrne, CR, Monroe, RS, Ward, KA, Kredich, NM (1988) *J. Bact* 170:3150-3157
3. Sirko, A, Hryniewicz, M, Hulanicka, D, Bock, A (1990) *J. Bact.* 172:3351-3357
4. Ostrowski, J y Kredich, NM (1990) *J. Bacteriol.* 172:779-785
5. Saito, K, Miura, N, Yamazaki, M, Hirano, H, Murakoshi, I (1992) *Proc.Acad. Sci.USA* 89:8078-8082
6. Noji, M, Murakoshi, I, Saito, K (1994), *Mol Gen.Genet.* 244: 57-66
7. Hell, R, Bork, C, Bogdanova, N, Frolov, I, Hauschild, R (1994) *FEBS Lett.* 351:257-262
8. Römer, S, d'Harlingue, A, Camara, B, Schantz, R, Kuntz, M (1992) *J. Biol.Chem.*267:17966-17970
9. Rolland, N, Droux, M, Lebrun, M, Douce, R (1993) *Arch. Biochem.Biophys* 300:213-222
10. Saito, K, Tatsuguchi, K, Murakoshi, I, Hirano, H (1993) *FEBS Lett.* 324:247-252
11. Youssefian, S, Nakamura, M, Sano, H (1993) *Plant J.* 4:759-769
12. Saito, K, Tatsuguchi, K, Takagi, Y, Murakoshi, I (1994) *J. Biol. Chem* 269:28187-28192
13. Barroso, C, Vega, JM, Gotor, C (1995) *FEBS Lett.* 363:1-5

## Regulación de genes que codifican proteínas ricas en prolina en el embrión de maíz

*M. José-Estanyol y P. Puigdomènech*

*Departamento de Genética Molecular. Centro de Investigación y Desarrollo (CSIC). c/Jordi Girona Salgado 18-26. 08034-BARCELONA.*

Las proteínas ricas en prolina como las extensinas y las proteínas ricas en prolina (PRPs) son componentes de la pared celular de plantas. En nuestro laboratorio hemos clonado dos genes correspondientes a una extensina (zmHRGP) y a una proteína rica en prolina (zmHyPRP). zmHyPRP pertenece a un subgrupo denominado proteínas híbridas ricas en prolina que se caracterizan por presentar dos dominios distintos en su región codificante. El primero corresponde a la región repetitiva rica en prolina, mientras que el segundo es no repetitivo, hidrofóbico y no presenta un especial contenido en prolina, pero sí 8 cys ubicadas de manera similar en todos los miembros del mismo subgrupo de proteínas híbridas.

Hemos analizado el patrón específico de expresión de zmHyPRP y zmHRGP durante los primeros estadios de la embriogénesis del maíz y de la morfogénesis del ovario. También ha sido analizada la respuesta de ambos genes a distintos estímulos externos como hormonas, estrés, inducción de calogénesis e inducción de embriogénesis somática a partir de callos indiferenciados. Los resultados han indicado que zmHyPRP es un marcador muy específico de parénquima durante la embriogénesis dado que al ser modificado el citado programa el gen deja de expresarse. Sin embargo, zmHRGP demuestra ser un marcador de división celular y de respuesta a estrés.

## Regulación transcripcional y posttranscripcional de la HMG-CoA reductasa de *Arabidopsis Thaliana*

V. Lumbreras<sup>1</sup>, C. Marín<sup>1</sup>, N. Campos<sup>1</sup>, V. González<sup>1</sup>, M. Arró<sup>2</sup>, A. Ferrer<sup>2</sup> y A. Boronat<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Universitat de Barcelona

<sup>2</sup> Unitat de Bioquímica, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona

La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa cataliza la síntesis de mevalonato a partir de HMG-CoA y se considera una enzima clave en el control de la biosíntesis de isoprenoides en plantas (1,2). En *Arabidopsis thaliana* existen dos genes que codifican para esta enzima, *HMG1* y *HMG2* (3). Los genes *HMG1* y *HMG2* presentan un patrón de expresión diferencial. El gen *HMG1* se expresa de forma generalizada en todas las partes de la planta, mientras que la expresión del gen *HMG2* está restringida a tejidos meristemáticos y florales (4). Recientemente, se ha observado que la utilización de dos promotores alternativos en el gen *HMG1* da lugar a dos transcritos (mRNA HMGR1S y HMGR1L) que codifican para isoformas de la enzima que difieren en su extremo N-terminal (5). Los mRNAs HMGR1S y HMGR1L presentan a su vez un patrón de expresión diferencial. Mientras que el mRNA HMGR1S se detecta a niveles elevados en todas las partes de la planta, el mRNA HMGR1L está presente a niveles relativamente bajos y su expresión está restringida mayoritariamente a plántulas, raíces e inflorescencias (5).

La expresión de los genes *HMG1* y *HMG2* se ha analizado mediante la expresión de construcciones quiméricas *HMG-GUS* en plantas transgénicas y en protoplastos. La secuencia comprendida entre los nucleótidos -192 y +70 contiene los elementos *cis* necesarios para la expresión cuantitativa y cualitativa del gen *HMG1*. La región comprendida entre los nucleótidos -857 y +64 del gen *HMG2* es suficiente para conferir altos niveles de expresión tanto en tejidos florales como meristemáticos. No obstante, la delección hasta el nucleótido -503 resulta en la pérdida casi completa de la expresión del gen *HMG2*. Esta región contiene la secuencia GGTGGATATA, que es similar a la presente en *enhancers* virales en la región promotora de otros genes de plantas. En la región 5' proximal del gen *HMG2* se ha detectado también la presencia de una secuencia consenso de unión al factor HBP1/TGA1b (6).

Se ha comprobado que la región líder de los genes *HMG1* y *HMG2* es esencial para su expresión. La región líder del gen *HMG1* se ha implicado en el control transcripcional del gen en base a las siguientes observaciones: i) su capacidad de activar la expresión del promotor 35S CaMV independientemente de su posición pero no de su orientación, ii) identificación de al menos un factor nuclear proteico que interacciona de forma específica con la región líder del gen *HMG1* y iii) ausencia de acumulación de mRNA y de actividad GUS en plantas transgénicas portadoras de la construcción (-724/+3)HMG1-GUS, en la que se delecionó la región líder del gen *HMG1*. Los genes *HMG1* y *HMG2* tienen en común la presencia de una secuencia polipirimidínica, denominada elemento CT, en la región líder. Esta secuencia está también presente en la región líder de numerosos genes de plantas. La comparación de estas secuencias polipirimidínicas ha revelado la existencia del motivo consenso conservado (C/T)TCCTCT(T/C). Experimentos de mutagénesis dirigida han demostrado que el elemento CT está directamente implicado en el control transcripcional del gen *HMG1*. Además, se ha comprobado que el elemento CT es reconocido específicamente por el factor nuclear proteico identificado previamente. Datos preliminares indican que la región líder del gen *HMG1* podría modular la eficiencia de traducción de los mRNAs correspondientes. Estos resultados muestran que la región líder del gen *HMG1* contiene

elementos *cis* implicados tanto en el control transcripcional del gen como en la eficiencia de la traducción del mRNA correspondiente.

Estudios previos habían sugerido que la actividad HMGR de plantas podría estar regulada mediante fosforilación reversible. El dominio catalítico de la isoforma HMGR1 (HMGR1cd) se ha expresado en *E. coli* y purificado a homogeneidad. La preparación purificada de HMGR1cd se inactiva por fosforilación en el residuo Ser577 por acción de la HMGR quinasa A de *Brassica oleracea*. La inactivación es reversible mediante defosforilación mediada por una proteína fosfatasa (7). La HMGR quinasa A está relacionada funcionalmente con la familia de proteína quinasas Snf1/Rkin1/AMPK. Esta familia de proteína quinasas se han implicado en procesos de adaptación metabólica en respuesta a condiciones de estrés (8)

#### Referencias

- 1) Gray, J. (1987) Adv. Botan. Res. 14: 25-91.
- 2) McGarvey, D.G. y Croteau, R. (1995) Plant Cell 7: 1015-1026.
- 3) Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arró, M. y Boronat, A. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 927-931.
- 4) Enjuto, M., Lumbreras, V., Marín, C. y Boronat, A. (1995) Plant Cell 7: 517-527. 5) Lumbreras, V., Campos, N. y Boronat, A. (1995) Plant J., en prensa.
- 6) Katagiri, F. y Chua, N-H. (1992) Trends Genet. 8: 22-27
- 7) Dale, S., Arró, M., Becerra, B., Morrice, N.G., Boronat, A., Hardie, D.G. y Ferrer, A. (1995) Eur. J. Biochem., en prensa
- 8) Hardie, D.G., Carling y Halford, N (1994) Seminars Cell Biol. 5: SCE/604/1-8.

## Genes de sacarosa sintasa *Ss1* y *Ss2* en cebada: caracterización de promotores

O. Martínez de Ilárduya, P. Sánchez de la Hoz, F. Acevedo, P. Carbonero e I. Díaz.

Lab. de Bioquímica y Biología Molecular. Dpto. de Biotecnología-UPM. E.T.S.I. Agrónomos.  
28040 Madrid.

El enzima sacarosa sintasa (UDP-glucosa:D-fructosa glucosil transferasa, E.C.2.4.1.13) cataliza la reacción



Este enzima es crucial en el metabolismo del almidón en plantas. El gen que lo codifica aparece duplicado en distintas monocotiledóneas. A partir de una genoteca cDNA de endospermo en desarrollo de cebada, por hibridación con una mezcla de cDNAs truncados de sacarosa sintasa de los tipos 1 y 2 de trigo, se obtuvieron clones truncados de *Ss1* y *Ss2*. La amplificación por PCR nos permitió clonar unos cDNAs de un tamaño de 2.667 y 2.688 pb, respectivamente, que incluían toda la zona codificante. Las proteínas codificadas presentan una identidad a nivel de aminoácidos del 79,7%. En contraste, las zonas 3' no codificantes de los cDNAs presentan sólo un 41% de nucleótidos coincidentes. La identidad que muestran con otras sacarosa sintasas de cereales ronda el 90% para las de cada tipo entre sí. El uso de los extremos 3' no codificantes de los cDNAs nos permitió disponer de sondas específicas, que no mostraban hibridación cruzada y que hicieron posible el análisis de la expresión de ambos genes en distintos tejidos y frente a distintos factores abióticos y hormonales. *Ss1* se expresa abundantemente en endospermo en desarrollo y en menor medida en raíces y hojas, así como en cariopsis, gluma, pedúnculo de la espiga y embrión en germinación. *Ss2*, por el contrario, se expresa mayoritariamente en el endospermo en desarrollo. Se han obtenido clones genómicos completos de ambos genes de sacarosa sintasa de cebada y se han secuenciado los promotores y los primeros exones e intrones correspondientes hasta los codones ATG de inicio de la traducción. Se ha llevado a cabo una caracterización funcional de estos promotores por medio de estudios de expresión transitoria en protoplastos de cebada utilizando construcciones fusionadas al gen delator de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Estos análisis se complementan con experimentos de retardo en gel y *footprinting*. Se discutirán los distintos motivos en *cis* presuntamente implicados en la diferente regulación de ambos genes de sacarosa sintasa en cebada.

## El patrón espaciotemporal de expresión del gen *hrgp* de maíz y sus secuencias reguladoras en *cis* analizados mediante el bombardeo con microproyectiles

M. Menossi, P. Puigdoménech y J. A. Martínez-Izquierdo

Departamento de Genética Molecular, CID-CSIC, Jordi Girona Salgado 18-26, 08034 Barcelona. Tfno.: 93-400 6127. Fax: 93-204 59 04. E-mail: JAMGMJ@CID.CSIC.ES

El gen *hrgp* de maíz codifica una glicoproteína rica en hidroxiprolina que está presente en la pared celular. La estructura del gen se caracteriza por una región codificante con motivos que se repiten a lo largo de la proteína, rasgo típico de proteínas estructurales. El rasgo más singular del gen, es la presencia de un intrón en la región 3' no traducida (Raz *et al.*, 1992). Por otra parte, existen una serie de motivos en el promotor del gen con similitud de secuencia a cajas funcionales ya definidas en otros genes. La más relevante es una posible caja de respuesta a etileno (Raz *et al.*, 1992). La expresión del gen está asociada transitoriamente a células vasculares y es alta en tejidos meristemáticos como los nudos y la punta de la raíz. La expresión del gen es particularmente alta en coleoptilo, que es el tejido de donde se clonó el cDNA *hrgp* (Stiefel *et al.*, 1988). Por último, la acumulación de mRNA del gen *hrgp* se incrementa en respuesta a la herida mecánica y a la hormona etileno (Tagu *et al.*, 1992).

Por otra parte, el sistema de bombardeo con microproyectiles o biolística, es el último sistema generalizado de transferencia de material genético que permite la transformación de células, incluso con pared celular como las vegetales, de forma estable o transitoria. La transferencia se realiza mediante partículas sobre las que se ha precipitado el DNA a transferir, lanzadas a alta velocidad sobre el material vivo (Klein *et al.*, 1987).

La puesta a punto para el gen *hrgp* del método de transformación de células de maíz para el estudio de la expresión transitoria de genes basado en el bombardeo con microproyectiles, ha permitido la obtención de un protocolo eficiente y que permite la obtención de datos homogéneos y reproducibles. Esto ha sido posible, en parte a las mejoras metodológicas y al uso de tres sistemas de genes informadores: la ruta de las antocianinas, la luciferasa y la  $\beta$ -glucuronidasa que aportan ventajas significativas en los análisis de la expresión génica por bombardeo con microproyectiles en células de maíz, que se refleja en una mayor homogeneización de los datos.

En concordancia con el posible papel del producto génico en la estructura de la pared celular y a los resultados obtenidos por hibridaciones *northern* del gen endógeno, la expresión del promotor *hrgp* observada por bombardeo, está asociada en general a tejidos con formación de nuevas células, confirmando por otra parte la bondad del protocolo de transformación por bombardeo para el estudio de la expresión del gen. Por ejemplo, durante el proceso de maduración de la semilla se observa una paulatina disminución de la actividad del promotor, asociada al cese de la división celular. No obstante, el patrón de expresión obtenido por bombardeo en brotes de 7 DAG (días después de la germinación), se corresponde a un patrón de elongación celular, no observado previamente con el gen endógeno, que se resume en alta expresión en regiones de alta elongación, aunque no opuesto al anterior de división celular, pues existe también alta expresión en el nudo. Por lo tanto, se puede concluir que el patrón de expresión del promotor *hrgp*, se corresponde a un patrón de crecimiento celular que engloba los dos componentes de división y elongación celular.

Del bombardeo de los distintos órganos de la planta de maíz, se observó que el promotor del gen *hrgp* es más activo en la región ligular y vasos de hojas adultas, cofia de la raíz, pericarpio de semilla y en los estijos (sedas). La particular abundancia de la proteína HRGP en estos tejidos, se podría explicar por su papel en el reforzamiento de la pared de las célu-

las de los mismos, en consonancia con su naturaleza y/o función de resistencia o protección. Dentro de los estilos, existe una actividad del promotor con preferencia en los vellos (por donde entra el polen en maíz) frente al cuerpo del estilo, lo que sugiere que la HRGP puede estar relacionada con la formación del tubo polínico.

La actividad transcripcional controlada por las distintas regiones del promotor *hrgp* está influenciada por el tipo de tejido. Esto se puso de manifiesto a nivel cuantitativo, donde la expresión en brotes de 2 DAG, por ejemplo, es muy superior a embriones de 14 DAP (días después de la polinización). Las regiones cuya delección tienen un mayor efecto negativo sobre la expresión génica tanto en embriones de 14 DAP como en brotes de 2 DAG están delimitadas por los nucleótidos -719/-510 y -297/-160. Por otra parte, la expresión dirigida por tres tipos de construcciones: transcripcional, traduccional y mixta (promotor truncado del 35S y región 5' del gen) indica la existencia de elementos cuantitativos y cualitativos relevantes, localizados en la región proximal del promotor *hrgp*.

El intrón de la región 3' no traducida del gen *hrgp* provoca un incremento de la actividad GUS dirigida por los promotores *hrgp*, 35S1 y 35S en brotes bombardeados de 2 DAG, frente a construcciones con los mismos promotores que no contienen el intrón. Fenómeno que se observa por primera vez para un intrón en dicha posición. Este efecto del intrón sobre la expresión de GUS es dependiente de tejido y especie y es probablemente consecuencia de una mayor eficiencia en el procesamiento del RNA como se ha descrito para algunos intrones de animales y plantas. No obstante, no se puede descartar completamente la presencia de un intensificador en el intrón.

El etileno que produce un incremento en la acumulación del mensajero *hrgp*, tiene un efecto variable, en buena parte de los casos positivo, sobre la actividad GUS dirigida por el promotor *hrgp* (p719), en mesocótilos y coleóptilos. Este efecto es atribuible a la variabilidad del sistema (bombardeo, tratamiento y detección), que incluye un efecto senescente provocado por la hormona, que se refleja en una caída en la actividad del promotor constitutivo 35S del CaMV.

El efecto del activador del etileno sobre el promotor *hrgp*, se observa mejor en células de maíz transformadas establemente mediante bombardeo, utilizando como agente de selección el antibiótico higromicina. No obstante, los transgenes con los promotores *hrgp* y 35S del CaMV, responden de una forma previsible a etileno si se tiene en cuenta dicho efecto senescente. Por otra parte, el jasmonato de metilo inhibe la actividad de los promotores *hrgp* y 35S en células BMS transgénicas, inhibición probablemente secundaria también a un efecto de senescencia. Sólo la administración conjunta de MeJ y ACC que produjo un gran aumento de etileno en dichas células, es capaz de revertir el efecto inhibitorio del jasmonato de metilo sobre el promotor *hrgp*, pero no sobre el 35S. Se concluye, en primer lugar, que la activación por herida de la expresión del gen *hrgp* endógeno, no está mediada como para otros genes inducidos por herida, a través de la ruta de transducción de señales de los ácidos octadecanoicos, de la que el metil jasmonato forma parte. En segundo lugar, que la activación del gen observada tras la herida de la planta, está mediada muy probablemente por etileno, ya que se sabe que la biosíntesis de etileno se incrementa tras la herida y esta hormona provoca también una activación del promotor *hrgp*.

## Referencias

- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C. (1987) *Nature* 327: 70-73.  
Raz, R., Jose, M., Moya, A., Martínez-Izquierdo, J.A. y Puigdomènech, P. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 233: 252-259.  
Stiefel, V., Pérez-Grau, L., Albericio, F., Giralt, E., Ruiz-Avila, L., Ludevid, M.D. y Puigdomènech, P. (1988) *Plant Mol. Biol.* 11: 483-493.  
Tagu, D., Walker, N., Ruiz-Avila, L., Burgess, S., Martínez-Izquierdo, J.A., Leguay, J.-J., Netter, P. y Puigdomènech, P. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20: 529-538.



## Estudio del papel del gen de la poligalacturonasa en la simbiosis *Rhizobium meliloti*-alfalfa

J.A. Muñoz, C. Coronado y A.J. Palomares

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 41012 Sevilla.

La asociación simbiótica entre bacterias del género *Rhizobium* y plantas leguminosas induce la formación de unas estructuras especializadas, denominadas nódulos, donde el microsimbionte convierte el nitrógeno atmosférico en nitrógeno combinado que puede ser utilizado por la planta. En las primeras etapas de esta interacción se produce un intercambio de señales entre los dos simbioses que implica la regulación espacial y temporal de la expresión de genes específicos (Nap y Bisseling, 1990). Uno de los primeros eventos del establecimiento de la simbiosis es la penetración de la bacteria a través de la pared del pelo radical. Mediante estudios de microscopía electrónica se ha demostrado que la bacteria penetra mediante una degradación localizada que no se logra por simple invaginación (Callaham y Torrey, 1981). En este mecanismo de entrada parecen estar implicados enzimas hidrolíticos que degradan la pared celular y que serían producidos por la bacteria, por la planta o bien por ambos. El pelo radical debe mantenerse intacto y viable a lo largo del proceso de invasión, que debe estar finamente regulado, de manera que no se produzca una progresiva y completa degradación de la pared celular. El objetivo de este trabajo ha sido investigar la presencia del gen de poligalacturonasa (PG), uno de los genes pécticos asociados con la degradación de la pared celular vegetal, en el genoma de *Medicago* así como estudiar su papel en la simbiosis *Rhizobium-leguminosa*. Mediante el uso de cebadores correspondientes a regiones conservadas entre diferentes genes de PG descritos (Grierson y col., 1986; Brown y Crouch, 1990; Niogret y col., 1991) se han aislado y secuenciado tres productos de PCR, con homología a las regiones equivalentes en los diferentes genes de PGs de plantas. A partir de ADN genómico de *M. truncatula* se aislaron los clones E2 y E3, y a partir de ADNc de polen de *M. sativa* se aisló el clon PII. E2 y PII pertenecen a un gen de PG que forma parte de una pequeña familia génica y que se expresa fuertemente en flores maduras y no en raíces o nódulos. E3 pertenece a un gen de PG que se encuentra en una sola copia y se expresa en raíces inoculadas con la cepa silvestre de *R. meliloti* y muy débilmente en raíces no inoculadas o inoculadas con un mutante Nod<sup>-</sup>. La expresión se detecta en raíces un día después de la inoculación. Los transcritos no se detectan en flores y sí en nódulos inducidos por la cepa silvestre. Se ha detectado una inducción en nódulos de 31 días inducidos por la cepa silvestre con respecto a nódulos de 7 días y, además, una mayor expresión en nódulos inducidos por un mutante Fix- Exo- con respecto a los nódulos inducidos por la cepa silvestre. También se ha detectado una ligera inducción de la expresión en raíces heridas e inoculadas con *Pseudomonas* 17 horas después de haberse tratado. Se ha clonado y secuenciado parcialmente el gen de PG de *M. sativa* de expresión en nódulo y raíz. Este fragmento presenta tres intrones, codificando el ORF identificado una proteína de 352 aminoácidos y un peso molecular de 38 kDa truncada en el extremo N-terminal. El producto génico deducido presenta tres sitios potenciales de glicosilación y una histidina en posición 197, presente en todos los genes de PG descritos, posiblemente implicada en la actividad catalítica del enzima. Se han realizado estudios de expresión mediante hibridación *in situ* en primordios nodulares y nódulos de 7 y 20 días localizándose la expresión del gen de la PG en regiones donde el fenómeno de invasión esta teniendo lugar.

## Referencias

- Brown, S.M. y Crouch, M.L. (1990). *Plant Cell* 2: 263-274.
- Callaham, D.A. y Torrey, J.G. (1981). *Can. J. Bot.* 59: 1647-1664.
- Grierson, D., Tucker, G.A., Keen, J., Ray, J., Bird, C.R. y Scuch, W. (1986). *Nucleic. Acids. Res.* 14: 8595-8603.
- Nap, J.P. y Bisseling, T. (1990). In: *Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation* (Gresshoff, P.M., ed.), pp. 181-229. CRC Press, Boca Raton.
- Niogret, M.F., Dubald, M., Mandaron, P. y Mache, R. (1991). *Plant Mol. Biol.* 17: 1155-1164.

## Estructura y análisis del promotor de la dehidrina TAS14 de tomate.

M.M. Parra, O. del Pozo, J. A. Godoy, R. Luna y J. A. Pintor-Toro

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. IRNA.CSIC. Avda. Reina Mercedes s/n.  
41080 Sevilla

El gen *Tas14* de tomate codifica una proteína perteneciente a la familia de las dehidri-  
nas, que se acumula en tejido vegetativo por estrés salino o tratamiento con ácido abscísico  
(ABA). Se ha aislado un clon genómico que contiene 2591 pb *upstream* del sitio de ini-  
ciación de la transcripción y la secuencia codificante completa. El promotor *Tas14* confiere  
inducibilidad del gen marcador  $\beta$ -glucuronidasa en raíces, tallos y hojas de plantas transgé-  
nicas de tabaco tratadas con ABA o con NaCl. Este promotor también confiere expresión  
durante el desarrollo en distintos órganos de la flor, embriones y polen. La expresión floral  
de *Tas14* se confirmó en flores de tomate mediante análisis *northern*. La secuencia promo-  
tora, a diferencia de la mayoría de los genes inducidos por ABA o estrés salino/hídrico, no  
contiene cajas ABRE (ABA-responsive element). Ensayos histoquímicos indican que el pro-  
motor *Tas14* es inactivo en la mayoría de los tejidos de plantas crecidas en condiciones  
control y que es activado por toda la planta tras el tratamiento hormonal y salino. Los teji-  
dos que mostraban actividad  $\beta$ -glucuronidasa tras la adición de ABA o NaCl eran los mis-  
mos.

## La expresión de la arginina descarboxilasa se induce durante el desarrollo temprano del fruto y de otros órganos de guisante

M. A Pérez-Amador, A. Granell, J. Carbonell.

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, CSIC-UPVA). Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera 14, 46022 Valencia.*

La arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19) es un enzima característico de plantas y bacterias que, junto a la ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17), cataliza la síntesis de la diamina putrescina. La actividad ADC presenta un aumento transitorio durante las primeras fases del desarrollo del fruto de guisante (*Pisum sativum* cv. Alaska (L.)), en ausencia de la actividad ODC (Pérez-Amador y Carbonell, 1995). En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización de un cDNA que codifica una ADC, a partir de una genoteca de frutos partenocárpicos de guisante a las 12 horas de desarrollo (Pérez-Amador, Carbonell y Granell, 1995). El cDNA aislado posee 3161 pb, con una pauta abierta de lectura desde la posición 558 hasta la 2471, que codificaría un polipéptido de 728 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 79 kDa. La región 5' no traducida es extremadamente larga, muy superior a la de la mayoría de regiones 5' de otros cDNAs de eucariotas aislados hasta el momento. La secuencia de aminoácidos deducida es idéntica en un 74%, 46% y 35%, respectivamente, a la de las ADCs de tomate, avena y *Escherichia coli*. Cuando este cDNA, excepto la región 5' no codificante, se puso bajo el control de un promotor de levaduras, inducible por galactosa y reprimible con glucosa (CYC1-Gal 10), y esta construcción se introdujo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se determinaron elevados niveles de actividad ADC en presencia del inductor. La actividad ADC inducida en levadura fué inhibida en un 99% con  $\alpha$ -DLdifluorometilarginina, un inhibidor específico e irreversible de esta descarboxilasa. No se detectó actividad ADC en la levadura no transformada o en la transformada con el cDNA en sentido opuesto al de su transcripción, tanto en condiciones de inducción como de represión. Estos resultados indican que el cDNA aislado de frutos jóvenes de guisante corresponde a una ADC, y que la levadura es capaz no sólo de traducirla sino de procesarla, si ello fuera necesario. En la planta de guisante, los niveles del mRNA para la ADC son muy altos en tejidos jóvenes o en desarrollo, como los brotes apicales o las hojas, flores y frutos jóvenes, mientras que son muy bajos o indetectables en tejidos adultos, como folíolos totalmente expandidos o raíces. En los ovarios y frutos de guisante, donde el crecimiento se debe fundamentalmente a la expansión de las células del mesocarpo, los niveles de este mRNA están regulados, observándose niveles altos durante los estadios tempranos del desarrollo del fruto, de forma muy similar a la de la actividad enzimática. La expresión espacial de este gen dentro de las diferentes estructuras que componen el fruto se está abordando mediante experimentos de hibridación *in situ*. Al mismo tiempo, se está estudiando la inmunolocalización de la proteína, tanto en los diferentes tejidos del fruto como a nivel subcelular.

### Referencias:

- Pérez-Amador MA, Carbonell J, (1995): Arginine decarboxylase and putrescine oxidase in *Pisum sativum*. Changes during ovary senescence and early stages of fruit development. *Plant Physiol* 107: 865-872.
- Pérez-Amador MA, Carbonell J, Granell A, (1995): Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.). *Plant Mol Biol* (en prensa).

## Análisis de la regulación transcripcional del gen *Tswl2* de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

O. del Pozo, R. M. Luna y J. A. Pintor Toro.

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla. C.S.I.C.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se aisló el clon de cDNA *tsw12* por hibridación diferencial de una genoteca realizada a partir de ARNm de plantulas de tomate tratadas con sal y con ABA. La secuencia de aminoácidos deducida del cDNA *tsw12* presenta un porcentaje de identidad alto con la de proteínas transportadoras de lípidos (PLTPs). Estas proteínas se han aislado en numerosas especies de plantas y tienen la capacidad de transferir *in vitro* lípidos entre membranas, aunque aún no se ha confirmado dicha función *in vivo*. El mensajero *tsw12* se acumula durante la germinación de la plantula y en peciolo, tallos y hojas de planta adulta de tomate tratadas con sal, ABA o manitol. Mediante experimentos de impresión de secciones de tejidos sobre membranas de nitrocelulosa, se localizó la proteína TSW12 en la epidermis y en el tejido vascular de tallos y peciolo de plantas de tomate tratadas con sal. Se ha descrito la localización de otros miembros de la familia de las PLTPs en distintas especies. La expresión es preferentemente epidérmica, concretamente en la pared celular. Combinando esta localización y la capacidad de transferir lípidos *in vitro*, se ha propuesto que estas proteínas transporten monómeros apolares componentes de la cutícula (cutina y ceras) al exterior de la célula.

En este trabajo se presenta la secuencia y la caracterización del clon genómico correspondiente al cDNA *tsw12*. La región promotora del gen *Tswl2* carece de las secuencias en *cis* implicadas en la respuesta a ABA (ABRE) descritas en otros promotores de plantas inducibles por ABA. Distintas delecciones del promotor *Tswl2* realizadas desde el extremo 5' se han fusionado transcripcionalmente al gen de la 13-glucuronidasa (GUS). Estas construcciones se han introducido en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) via *Agrobacterium tumefaciens*. La actividad GUS conferida por los distintos fragmentos del promotor se ha determinado en raíces, tallos, hojas y peciolo de las plantas transgénicas, tanto en condiciones control como tratadas con sal y con ABA. Estos resultados han permitido localizar fragmentos del promotor *Tswl2* que contienen las regiones en *cis* responsables de la respuesta a ABA y al estrés salino. El análisis histoquímico de la actividad GUS en las plantas transgénicas ha permitido describir con detalle el patrón de expresión espacial y temporal determinado por el promotor *Tswl2*; así mismo mediante el análisis histoquímico de las plantas transformadas con las delecciones del promotor se han podido identificar las secuencias en *cis* imprescindibles para determinar dicho patrón de expresión.

## Actividad en tejidos en lignificación del promotor del gen de la O-metiltransferasa del maíz en plantas de tabaco transgénicos

J. Rigau, M. Capellades, M. A. Torres, I. Bastisch, F. Vignols, W. B. Bruce y P. Puigdomènech.

*Departamento de Genética Molecular, CID-CSIC. Jordi Girona 18-26. 08034-Barcelona.*

Se ha aislado y secuenciado un clon de cDNA y uno genómico, que codifica para la cafeico-O-metiltransferasa (COMI) del maíz. Se ha probado su actividad enzimática como mediador de la biosíntesis de la lignina. Se ha estudiado el patrón de expresión dirigido por su promotor, fusionado al gen testigo GUS, en plantas transgénicas de maíz y tabaco. Los análisis se han llevado a cabo tanto a nivel histoquímico como fluorimétrico para el GUS. El promotor de la COMT dirige la expresión del GUS al protoxilema, así como a todos los tejidos en lignificación. Además responde tanto a herida como a elicitores. En plantas de maíz transgénico la expresión del GUS se corresponde a la acumulación de mRNA detectada por análisis por "northern" y por hibridaciones "in situ". En las plantas transgénicas de tabaco se observa claramente por la secuencias promotora del maíz es correctamente reconocida por los factores transcripcionales del tabaco presentes en los tejidos en lignificación, a pesar de la enorme distancia evolutiva habida entre ambas especies. Estos resultados sugieren que las señales más significativas del promotor que inducen la expresión específica de la COMT de la vía de síntesis de la lignina, están conservadas entre las diferentes especies y dependen del estado de desarrollo de los tejidos lignificantes. Analizando diferentes mutantes del maíz, con alteraciones en la composición de la lignina, ha sido posible encontrar que los mutantes *bm3* tienen una delección en el gen de la COMT. Se ha aislado y secuenciado un cDNA de un mutante *bm3* en el que se ha encontrado que el gen de la COMT está interrumpido con un retrotrasposon con homología con el elemento B5, insertado en la parte 3' de la región codificante, produciendo un mRNA mucho más corto y por consiguiente una enzima no funcional. En otro mutante *bm3* no se detecta el gen por "northern" ni "southern", probablemente por una delección del gen. En estos momentos se está trabajando en la construcción de un gen antisentido para emular el fenotipo de estos mutantes.

## La familia de genes reguladores *myb* de *Arabidopsis*. Estimación del tamaño e identificación de mutantes

I. Romero, A. Fuertes, A. Leyva, J. Paz-Ares

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC; Campus de Cantoblanco, 28049-Madrid

Los genes *myb* codifican factores transcripcionales con un dominio de unión a DNA característico, consistente en dos motivos hélice-giro-hélice relacionados entre sí. En plantas, la familia de los genes *myb* es de gran tamaño, desconociéndose la función de la mayoría de sus miembros. No obstante, se ha demostrado la implicación de algunos genes *myb* en la regulación de la síntesis de flavonoides y compuestos relacionados así como en el control de la diferenciación celular. En nuestro laboratorio pretendemos determinar el rango de funciones asociadas a la familia *myb* mediante una aproximación genética: identificación y estudio de plantas de *A. thaliana* con mutaciones en genes *myb*. En este trabajo se ha estimado el tamaño de la familia *myb* en *Arabidopsis* y se ha definido la estrategia para la identificación de mutantes.

Para estimar el tamaño, y para disponer de sondas para el mayor número posible de gen *myb* de *Arabidopsis*, se prepararon genotecas (genómicas y cDNA) enriquecidas en genes *myb*, mediante PCR con mezclas de oligonucleótidos correspondientes a regiones altamente conservadas del dominio MYB. Se han identificado 37 clones cDNA y 75 clones genómicos que representan a 80 genes *myb* distintos, ya que 32 genes *myb* están representados en las 2 genotecas. Por tanto, el número (mínimo) de genes *myb* en *Arabidopsis* es del orden de 93 ( $80 \times 37 / 32$ ), lo que representa la familia de genes reguladores de mayor tamaño hasta ahora descrita en una especie vegetal. La búsqueda de mutantes se ha realizado en poblaciones de *Arabidopsis* mutagenizadas con T-DNA, mediante PCR con dos tipos oligonucleótidos, unos específicos de genes *myb* y otros de TDNA, de forma que sólo los genes *myb* en los que ha habido una inserción de T-DNA se amplificasen selectivamente. Con objeto de reducir al mínimo el número de PCR, se ha comprobado que éstas se pueden realizar con DNAs de grupos de 200 plantas y con mezclas de hasta 32 oligonucleótidos sin comprometer la sensibilidad del método. En estas condiciones se requieren aprox. 115 PCRs para identificar una planta con una mutación en un gen *myb*.

## **Análisis de la expresión de los genes estructurales de la hidrogenasa(*hupSL*) de *Rhizobium leguminosarum* bv viciae en nódulos de leguminosas**

T. Ruiz-Argueso<sup>1</sup>, B. Brito<sup>1</sup>, D. Fernández<sup>1</sup>, L. Rey<sup>1</sup>, J. Imperial<sup>2</sup> y J. M. Palacios<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología

<sup>2</sup>C.S.I.C; ETS de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040-Madrid.

Los determinantes genéticos del sistema de oxidación de H<sub>2</sub> (*hup*) de *Rhizobium leguminosarum* bv viciae UPM791 han sido caracterizados en nuestro laboratorio (1-4). Al menos 18 genes son necesarios para la síntesis, ensamblaje y regulación de la expresión de una hidrogenasa funcional, responsable del reciclado de H<sub>2</sub> generado por la nitrogenasa. Los primeros 12 genes (*hupSLCDEFGHIJK hypA*) se expresan sólo en simbiosis con la leguminosa hospedadora. Los genes estructurales (*hupSL*) se transcriben desde un promotor (P1) tipo -24/-12. Mediante análisis de delección se identificó una región de 85 pb (posición -87 a -172) esencial para la activación (elemento *cis*). Dentro de esta región se encuentra un motivo de unión a proteínas IHF, y se pudo demostrar unión de la misma a proteínas IHF de *E. coli*. Así mismo, se identificó una secuencia (¥UAS) similar a la secuencia consenso de unión a NifA (UAS) que pudiera constituir el elemento en *cis* necesario para la activación.

Se han seguido tres estrategias para analizar la regulación de la expresión de P1: 1.- Estudio del modelo de expresión temporal/espacial de P1 en nódulos de guisantes mediante ensayos de hibridación *in situ*. Se pudo demostrar que *hupSL* se coexpresaba exactamente con los genes *nif* sugiriendo que ambos responden a los mismos estímulos ambientales y a las mismas proteínas activadoras. 2.- Estudio del efecto de NifA en la expresión del promotor P1. Usando fusiones *hupL::lacZ*, se demostró una activación de P1 dependiente de NifA en *Klebsiella pneumoniae* y en *E. coli*. Estos resultados firmemente indican que en *R. leguminosarum* la expresión de los genes *hupSL* está bajo el control de NifA. La mutagénesis de los nucleótidos conservados en las ¥UAS identificadas, no alteró la activación por NifA del promotor P1. El sitio exacto de unión de esta proteína a la región promotora (elemento en *cis*) se desconoce. 3.- Estudio del efecto de la leguminosa hospedadora en la expresión de actividad hidrogenasa. Para una cepa dada de *Rhizobium*, ciertas leguminosas hospedadoras, como guisantes, permiten la expresión de la hidrogenasa, mientras que otras, como lentejas, no son permisivas. Mediante análisis inmunológicos se vió que el nivel de proteínas HupSL era menor en lentejas que en guisantes, sugiriendo que el control de la planta se ejerce al nivel de transcripción de *hupSL*. El mecanismo por el que la planta controla la expresión de los genes *hup* se está investigando actualmente.

### Referencias

1. Hidalgo et. al. (1990). Plant Mol. Biol. 15: 367-370
2. Hidalgo et al. (1992). J. Bacteriol. 171: 4130-4139
3. Rey et al. (1992). J. Mol. Biol. 228: 998-1002
4. Rey et al. (1993). Mol. Microbiol. 8: 471-481.



## Estudio de la regulación por MeJA de la expresión de los genes *lap* de tomate

O. J. Ruíz R. y S. Prat M.

C.S.I.C., Centro de Investigación y Desarrollo, Dpto. Genética Molecular, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, España. E-mail: ojrgms~cid.csic.es

El ácido jasmónico (JA) y su éster metílico (MeJA) son fitoreguladores que se hallan ampliamente distribuidos en las plantas vasculares. Son muchos los efectos que se han atribuido a la acción de los jasmonatos, bien inhibiendo o induciendo cambios morfológicos y fisiológicos durante el crecimiento y desarrollo vegetal. Entre ellos, los jasmonatos exhiben algunas funciones similares a las del ácido abscísico (ABA), los cuales incluyen las respuestas al estrés hídrico y la inducción de la senescencia foliar. Además de estas funciones, se ha propuesto que el JA es una molécula clave en la transmisión de la señal intracelular de inducción de los mecanismos de defensa vegetal contra el ataque de patógenos e insectos. Estos mecanismos están relacionados con la inducción *de novo* de la síntesis de proteínas, de las cuales los inhibidores de proteinasa (PI) I y II de patata y tomate son el mejor ejemplo. Se ha postulado que el ABA y el MeJA son responsables de la inducción de los PI, ya que la aplicación exógena de estas hormonas induce una fuerte acumulación de los mRNAs correspondientes a estas proteínas de defensa. Por otra parte, mutantes de patata deficientes en la síntesis de ABA no sintetizan la proteína PI II y su correspondiente mRNA en respuesta a herida. Además, se ha demostrado que el MeJA induce una fuerte acumulación de los mRNAs de los PI, tanto en plantas silvestres de patata y tomate como en plantas de ambas especies deficientes en la síntesis de ABA. Estos resultados sugieren que existe una ruta común de transmisión de la señal de herida responsable de la inducción de estas proteínas, en la cual el MeJA actuaría como señal intermediaria posterior a ABA, durante el proceso de inducción.

Mediante cribaje diferencial para genes inducibles por herida mecánica y ABA en hojas de plantas de patata, se aisló un clon de cDNA que codifica para una leucinaaminopeptidasa (LAP). Las aminopeptidasas son enzimas activas, en general, contra péptidos pequeños (di y tripéptidos), catalizando la hidrólisis de aminoácidos a partir del extremo amino-terminal. Aunque las aminopeptidasas purificadas a partir de semillas de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas parecen tener una función bien definida en la movilización de proteínas de reserva durante la germinación de las semillas, queda aún por definir la posible función de la proteína codificada por el gen *lap* en el mecanismo de defensa de las plantas.

Con la finalidad de estudiar la regulación de la expresión del gen *lap* por MeJA, y poder identificar las posibles secuencias reguladoras en el promotor de este gen que responden a la acción del MeJA, se aislaron dos clones genómicos de tomate utilizando como sonda el cDNA del gen *lap* de patata. Uno de los clones aislados contenía un solo gen, mientras el segundo clon contenía dos genes en tandem. Los tres genes fueron subclonados, secuenciados y delimitadas sus regiones promotoras y codificante.

Para determinar cual era la región mínima necesaria del promotor de los genes *lap* que respondía al MeJA, se realizaron diferentes fusiones del promotor de estos genes al casete *gus*. Posteriormente, estas fusiones fueron transferidas mediante transformación estable a plantas de patata. Los análisis de northern y de actividad GUS en hojas de plantas transgénicas de patata que portaban los genes quiméricos *Plap-gus*, mostró que estos promotores eran activos, expresándose como consecuencia de la inducción por herida mecánica o el tratamiento con MeJA. Mediante deleciones del promotor del gen *lap* se localizó un dominio de 221 pb (-309 a -88), el cual fué suficiente para inducir la actividad GUS por MeJA cuan-

do éste se fusionó al casete -90 35S CaMV-*gus*. Experimentos de *in vivo* footprinting han permitido identificar dentro de esta región, secuencias reguladoras que responden a la acción del MeJA. Estos resultados actualmente están siendo confirmados mediante estudios de retardación en gel (Band-shift) utilizando extractos nucleares preparados a partir de hojas de plantas de tomate controles y plantas tratadas con MeJA, y en el futuro se intentará aislar el o los putativos factores de transcripción involucrados en la inducción por MeJA de la expresión de los genes *lap* de tomate.

## Expresión y acumulación de g-zeínas ricas en lisina en endospermo de maíz

M. Torrent, I. Alvarez y D. Ludevid

Depto de Genética Molecular. Centro de Investigación y Desarrollo. CSIC. Jordi Girona 18-26 08034 Barcelona

Durante el desarrollo de la semilla de maíz, las células del endospermo sintetizan gran cantidad de proteínas de reserva (a-, b- y g-zeínas) que se acumulan en cuerpos proteicos, orgánulos derivados del retículo endoplasmático (RE). La ausencia del aminoácido esencial lisina en todas las zeínas determina un desequilibrio nutricional del grano del maíz. Durante décadas, muchos laboratorios han realizado enormes esfuerzos centrados en la mejora nutricional del grano de maíz utilizando diferentes aproximaciones experimentales. La aproximación genética permitió la obtención de mutantes tales como apaco-2(o2) y floury (fl2) que incrementaban el contenido de lisina en el grano (1). Sin embargo, los citados mutantes contenían semillas con bajo contenido en proteína y fenotipos inadecuados para su explotación. Actualmente se está trabajando en la selección de mutantes o2 en fondos genéticos (modificadores de o2) que eliminen el fenotipo pernicioso antes citado (2). Otra interesante estrategia se basa en el incremento de lisina libre en la semilla alterando la actividad enzimática de enzimas implicados en la ruta de biosíntesis de este aminoácido (3). Estudios realizados en dicotiledóneas, no en cereales, indican que mediante esta aproximación puede incrementarse hasta cinco veces el contenido de lisina libre en la semilla. La incorporación de secuencias ricas en lisina en proteínas de reserva de maíz es otra de las aproximaciones utilizadas (4) y en la que este trabajo se incluye.

El objetivo esencial es la modificación de g-zeína mediante inserción de secuencias ricas en lisina y su expresión en endospermo de maíz. La g-zeína es una proteína de 28kD rica en cisteína, que representa el 15% de la proteína total del endospermo, se acumula en cuerpos proteicos junto con a-zeínas (5) y está codificada por uno o dos genes por genoma haploide (6). En este trabajo se han construido genes de g-zeína modificados mediante la introducción en la región codificante de oligonucleótidos sintéticos que codifican secuencias (Pro-Lys)<sub>n</sub>. Teniendo en cuenta los dominios de la proteína esenciales para su retención en el RE y la formación de cuerpos proteicos (7), las inserciones se han efectuado en dos regiones diferentes consideradas "inertes" desde el punto de vista de transporte y de estabilidad. Así, en la construcción P20gZ las secuencias Pro-Lys fueron introducidas a continuación del dominio Pro-X de g-zeína en las construcciones H30gZ y H45gZ la inserción sustituía el dominio Pro-X y en la construcción N13gZ se explora la posibilidad de modificación de la región C-terminal de la proteína insertando las secuencias ricas en lisina a cinco aminoácidos del extremo C-terminal. Las secuencias codificantes modificadas se han colocado bajo el control de dos promotores: 1.7 Kb del promotor propio de g-zeína (específico de endospermo) y el promotor constitutivo 35S CaMV. Todas las construcciones fueron comprobadas por experimentos de transcripción-traducción *in vitro* e inmunoprecipitación utilizando un suero anti-zeína (αG2). Para poder diferenciar la g-zeína endógena de las g-zeínas modificadas ricas en lisina, en los experimentos de expresión en endospermos de maíz, se preparó un anticuerpo (αPL) contra un péptido sintético de secuencia FE(KP)<sub>8</sub>KFE que reconocía únicamente las proteínas modificadas.

La actividad y especificidad de los promotores (gZ y 35S CaMV) se determinó mediante fusión de las correspondientes secuencias 5' a genes marcadores (GUS y luciferasa), bombardeo de partículas sobre diferentes tejidos de maíz y la posterior determinación de activi-

dades enzimáticas. Los resultados indican que ambos promotores son muy activos en endospermo y que el promotor gZ es específico de este tejido.

La expresión y acumulación de las g-zeínas ricas en lisina se ha estudiado mediante la transformación de endospermos por técnicas de biolística utilizando microproyectiles recubiertos con las construcciones P20gZ, H30gZ, H45gZ y N13gZ. Las proteínas extraídas de los endospermos transformados se analizaron por electroforesis e inmunoblot utilizando el suero aPL. Los resultados indican que las proteínas resultantes de la inserción de secuencias (Pro-lys) contiguas a o en sustitución del dominio Pro-X de g-zeína (P20gZ, H30gZ y H45gZ) se expresan correctamente y se acumulan en grandes cantidades. Sin embargo, no se pudo observar acumulación de la proteína N13gZ resultante de la inserción de secuencias ricas en lisina en la cola C-terminal de g-zeína. Experimentos de northern indican que el transcrito está presente y en cantidades similares a las correspondientes a otras construcciones. Este resultado parece demostrar que la proteína N13gZ es inestable en este tejido y que por lo tanto únicamente un posicionamiento concreto de las secuencias ricas en lisina en g-zeína nos puede garantizar su correcta estructura y estabilidad.

Asimismo se han realizado estudios de fraccionamiento subcelular que indican que todas las g-zeínas ricas en lisina (P20gZ, H30gZ, H45gZ) acumuladas en el endospermo, se localizan en la fracción de cuerpos proteicos. Pruebas de digestión con proteasas muestran, además, que las nuevas proteínas se hallan protegidas por membranas. Finalmente se ha podido demostrar la co-localización de las g-zeínas ricas en lisina con gzeínas y azeínas endógenas en los cuerpos proteicos. Para ello se han realizado experimentos de inmunocitoquímica al microscopio electrónico sobre la fracción de cuerpos proteicos purificada de endospermos transformados con P20gZ. Cortes ultrafinos de cuerpos proteicos incubados con el suero aPL muestran que la proteína P20gZ se localiza en algunos cuerpos proteicos, muy pocos. Hay que tener en cuenta que el sistema de transformación utilizado transforma como media 150 células por endospermo bombardeado y que por consiguiente la fracción de cuerpos proteicos purificada de estos endospermos contiene en su gran mayoría orgánulos provenientes de células no transformadas. El estudio de co-localización se consiguió mediante doble-marcaje con dos tamaños de oro y utilizando los sueros aPL con aZ y aPL con aZ (anticuerpo contra a-zeínas). En ambos experimentos se observa que P20aZ colocaliza con g-zeínas y con a-zeínas y que la disposición de los granos de oro correspondientes a P20gZ parece indicar que esta g-zeína modificada se localiza alrededor de los cuerpos proteicos tal y como lo hace la gzeína endógena.

Con esta aproximación, aunque se esté lejos de incrementar substancialmente el contenido de lisina del grano, se podría explorar el número máximo de incorporación de lisinas permitido por este sistema y por otro lado explorar, mediante transformación estable, las posibilidades de aunar en una misma planta de maíz dos estrategias: incremento de lisina libre (3) y de lisina incorporada a proteína

#### Referencias

- 1.- Mertz et al. (1964) *Science* 145, 279-280
- 2.- Darnenhoffer et al. (1995) *PNAS* 92, 1931-1935
- 3.- Falco et al. (1995) *Bio/technology* 13, 577-581
- 4.- Othani et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 16, 117-128
- 5.- Ludevid et al. (1984) *Plant Mol. Biol.* 3, 227-234
- 6.- Boronat et al. (1986) *Plant Sci.* 47, 95-102
- 7.- Geli et al. (1994) *Plant Cell*, 6, 1911-1922

## DD1, a Light-Regulated *Arabidopsis* Gene

G. Vancanneyt y José J. Sánchez-Serrano

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), UAM Campus Cantoblanco, E-28049 Madrid.

Numerous environmental factors, such as light, temperature, gravity, etc., influence plant development. Light not only plays an important role in photosynthesis but is a major stimulus for many developmental processes, such as floral induction and chloroplast biogenesis. A whole range of chloroplast-encoded and nuclear-encoded genes have been shown to be responsive to light. Typical examples in this respect are the genes encoding the small subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RbcS) and the Chlorophyll a/b binding protein (Cab).

We have been studying a novel light-responsive gene in *Arabidopsis thaliana*. The clone, DD1 (Down in the Dark), was isolated from a leaf cDNA library of *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia. It is encoded by a single copy gene, located on chromosome 4. Its 2 Kb transcript reveals a open reading frame of 443 amino acids, which shows no similarity to any known protein in the databases. This potential polypeptide does not contain any obvious targeting signal. The gene corresponding to the DD1 transcript was isolated from a genomic *Arabidopsis* library. The DD1 gene reveals at least two introns in the coding region, whereas the 500 bp untranslated RNA-leader does not contain any introns. DD1 is highly expressed in all green *Arabidopsis* tissues. However steady state mRNA levels are very rapidly reduced upon transfer of plants from light to dark, and also rapidly accumulates upon transfer from dark to light. A detailed expression analysis has been performed with respect to its light regulation in green and etiolated plants. No crosshybridisation was observed in other plant species. The complete DD1 gene was introduced in a heterologous plant system: tobacco. Interestingly the transgene is similarly regulated in tobacco plants with respect to its downregulation in the dark. Moreover promoter-GUS fusion were prepared and introduced in tobacco and *Arabidopsis*. These transgenic plants will be used to address the transcriptional and/or post-transcriptional regulation of the DD1 gene.

## Estructura cromatinica del gen *Adh* de *Arabidopsis thaliana*

M. A. Vega-Palas y R. J. Ferl

Departamento de Ciencias de la Horticultura, Universidad de Florida, EEUU.

El gen *Adh* de *Arabidopsis thaliana* constituye un pequeño dominio cromosómico que muestra mayor sensibilidad a DNasa I cuando es transcripcionalmente activo. El incremento de la sensibilidad a DNasa I está delimitado por las posiciones -500 en el extremo 5' del gen y por el final de la transcripción en el extremo 3'. Esta ajustada correspondencia entre unidad transcripcional y dominio sensible a DNasa I supone una novedad en el campo de la estructura cromatínica ya que otros dominios previamente descritos incluyen grandes porciones de ADN que no se transcriben.

La región codificadora del gen *Adh* contiene nucleosomas en células que expresan el gen, lo que sugiere que el proceso de elongación transcripcional causa el desplazamiento más que la eliminación de nucleosomas de las secuencias transcritas. Además, el primer nucleosoma de la región codificadora, que se encuentra adjacente al sitio de inicio de la transcripción, está claramente posicionado con respecto a la secuencia de ADN. Ello podría ser debido a la interacción del complejo de preiniciación de la transcripción con la región promotora del gen.

La región reguladora del gen *Adh* es hipersensible a DNasa I y contiene nucleosomas específicamente posicionados cuando el gen es transcrito. Esta región se puede dividir en dos secciones claramente diferenciadas. Una de ellas se extiende desde la posición -30 a la posición -350 y está asociada con un nucleosoma parcialmente posicionado. La segunda, desde -350 hasta -500, no está asociada con nucleosomas. Ambas regiones contienen secuencias que interaccionan *in vivo* con factores de transcripción y podrían contribuir al establecimiento de la peculiar organización cromatínica en la región 5' del gen *Adh*.

## Regulación de la transcripción de genes de mantenimiento de cloroplasto mediante el uso de promotores alternativos

A. Vera<sup>1</sup> y M. Sugiura

Center for Gene Research, Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan

<sup>1</sup>Dirección actual: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPVCSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia.

La biogénesis de los cloroplastos tiene lugar como resultado de la interacción de dos genomas separados. Los mecanismos que gobiernan la expresión coordinada de los genes nucleares y plastidiales todavía se desconocen ampliamente. Además, la mayoría de los estudios se han realizado sobre genes que codifican elementos de la maquinaria fotosintética. Por contra, se tiene muy poca información sobre la regulación de los genes de "mantenimiento" (*housekeeping*) que codifican elementos del aparato de transcripción/traducción, como los componentes ribosomales. La formación de los ribosomas plastidiales es un proceso complejo que requiere la expresión coordinada de más de 50 genes de proteínas ribosomales (codificadas en el núcleo y en el plastoma) y 4 genes de RNA ribosomales (rRNA), todos ellos situados en el DNA del orgánulo (1). Las modificaciones de la expresión de estos genes deben preceder a los cambios que conducen a las diversas formas estructurales y funcionales que adoptan los plastidios (cloroplastos, cromoplastos, amiloplastos, leucoplastos).

Nosotros hemos centrado nuestro interés en los componentes ribosomales codificados en el genoma del plastidio. Por regla general, se entiende que la regulación de los genes localizados en el DNA plastidial tiene lugar fundamentalmente mediante procesos transcripcionales (2). No obstante, mediante el uso de marcaje de RNA con guanilil transferasa, hemos detectado en plantas de tabaco la presencia de promotores alternativos en las unidades de transcripción correspondientes a los RNAs ribosomales (rRNA) y al gen *rp132*, que codifica la proteína CL32 de la subunidad 50S del ribosoma (3-5).

En ambos casos, un promotor relativamente alejado del codón de iniciación es particularmente activo en cloroplastos. Estos promotores, denominados genericamente "P1", presentan la estructura típica de las regiones promotoras de cloroplastos, con motivos de los denominados -10 y -35 de tipo bacteriano. En plastidios no fotosintéticos se incrementa o se induce la transcripción a partir de un segundo promotor "P2", más próximo al codón de iniciación. Tanto frente a *rp132* como en el caso del operón rRNA, las regiones promotoras P2 son completamente diferentes de los motivos consenso -10 y -35 de cloroplastos. Ambos promotores P2 muestran, sin embargo, una considerable homología entre sí. El alineamiento de la región P2 del operón rRNA del DNA de cloroplastos de tabaco con las regiones equivalentes en diferentes plantas vasculares, muestra un alto nivel de conservación entre dicotiledóneas y monocotiledóneas (4). Así mismo, la secuencia de DNA de las regiones promotoras de otros genes de mantenimiento de cloroplastos (que codifican otras proteínas ribosomales y subunidades de la RNA polimerasa) muestran una gran similitud con los promotores P2 (5).

Ensayos preliminares indican la existencia de factores polipeptídicos que se unen diferencialmente a la región P2 del gen *rp132* dependiendo del tipo de plastidio (5). Por otro lado, la maduración de los rRNAs puede verse afectada por la presencia de su promotor P2. La secuencia líder derivada de este carece de secuencias anteriores necesarias para la formación de estructuras secundarias susceptibles de ataque por la ribonucleasa III, de forma análoga a como sucede en bacterias. Por tanto, este transcrito requeriría una ruta alternativa de procesamiento (4, 6).

Por todo ello proponemos que estas nuevas regiones promotoras podrían formar parte de un conjunto de secuencias responsable de la actividad basal en plastidios no fotosintéticos, mientras que en la transición a cloroplastos se activarían (o incrementaría el uso de) promotores del tipo consenso -10/-35. El hallazgo de diversos ejemplos de genes de mantenimiento plastidiales cuya transcripción se halla dirigida por promotores en tandem, estructuralmente diferentes, también sugiere la existencia de una arquitectura particular para sus regiones promotoras.

La identificación de los elementos funcionales de estas regiones promotoras mediante la transformación del genoma plastidial, es una tarea en curso.

#### Referencias

- 1) Sugiura, M. (1989). *Ann. Rev. Cell Biol.* 5:51-70
- 2) Rochaix, J.D. (1992) *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:1-28
- 3) Vera, A., Matsubayashi, T. y Sugiura, M. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 233:151 -1 56
- 4) Vera, A. y Sugiura, M. (1995) *Curr. Genet.* 27:280-284
- 5) Vera, A., Hirose, T. y Sugiura (1995) Enviado para su publicación
- 6) Vera, A. y Sugiura, M. (1994) *EMBO. J.*, 13: 2211-2217



## **Caracterización molecular de *Blz1*, un factor transcripcional de cebada con afinidad por el promotor del gen *ltr-1* específico de endospermo.**

J. Vicente-Carbajosa, L. Oñate y P. Carbonero.

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Departamento de Biotecnología-UPM  
E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

El gen *Opaco-2* de maíz codifica un factor transcripcional del tipo bZIP, específico de endospermo, que regula la expresión de zeínas de 22 KDa. Estos factores contienen una región básica por la que se unen al DNA y una cremallera de leucinas que les permite dimerizar. El gen *Lys3a* de cebada, regula en *trans* la transcripción de ciertos genes, entre otros los que codifican B-hordeínas y el inhibidor de tripsina BTI-CMe (gen *ltr-1*).

Para aislar genes relacionados con *Opaco-2* expresados en el endospermo de cebada se adoptó una estrategia de PCR. Se amplificó un fragmento de cDNA de 300pb utilizando oligonucleótidos derivados de regiones conservadas de la familia *Opaco-2*. Este fragmento contenía la zona básica y la cremallera de leucinas típica de estos factores y se utilizó para el escrutinio de genotecas genómicas y de cDNA de endospermo en desarrollo de cebada. Se aislaron varios clones positivos y se ha realizado la caracterización molecular de uno de ellos, denominado *Bk1* (secuenciación, organización genómica, mapeo cromosómico, patrón de expresión etc.).

Los ensayos de retardo en gel con una proteína truncada expresada en *E.coli* que contenía el dominio básico de unión a DNA y el dominio de dimerización de *Blz1* indican que *Blz1* se une a una secuencia del DNA presente en el promotor del gen *ltr-1*, específico de endospermo, que codifica al inhibidor de tripsina BTI-CMe. Se discutirá la implicación de este factor transcripcional en el control de proteínas de endospermo y su papel en los mutantes altos en lisina.

## Caracterización de distintas MAP quinasas de tabaco y evidencia de la implicación de estas proteínas en la reactivación del ciclo de división celular en plantas

C. Wilson, E. Heberle-Bors y O. Vicente

Instituto de Microbiología y Genética, Universidad de Viena, Dr. Bohr-Gasse 9, A-1030 Viena, Austria

Las MAP (mitogen-activated-protein) quinasas son una familia de proteínas quinasas con especificidad por serina/treonina, conservadas durante la evolución, que están implicadas en la transducción de una gran variedad de estímulos extracelulares, incluyendo hormonas y factores de crecimiento, tratamientos de estrés o señales de diferenciación específicas. Incluso en el mismo organismo, distintas MAP quinasas pueden participar en cascadas de fosforilación independientes, mediando los efectos de diferentes señales. Dada la conservación de estas proteínas parece lógico suponer que las MAP quinasas pueden estar implicadas, también en plantas, en la mediación de estímulos que conducen a la regulación del ciclo de división celular, inducen la proliferación celular o controlan distintos procesos de desarrollo. Sin embargo, aunque en los últimos años se han aislado clones que codifican por putativas MAP quinasas de distintas especies vegetales, aun no se ha demostrado la participación de estas proteínas en ninguno de estos procesos. Como paso previo en nuestros estudios encaminados a dilucidar las posibles funciones biológicas de las MAP quinasas en plantas, hemos aislado y caracterizado tres clones completos de cDNA, *Ntf3*, *Ntf4* y *Ntf6*, a partir de una genoteca de células de tabaco en cultivos en suspensión, usando como sondas fragmentos previamente amplificados por PCR con oligonucleótidos correspondientes a péptidos conservados en MAP quinasas de animales y levaduras. Las secuencias deducidas de estos clones muestran homología con las de MAP quinasas de otros organismos y contienen todos los aminoácidos y péptidos característicos de esta familia de proteínas. Los tres cDNAs se han clonado en vectores de expresión, fusionados con el gen de la glutatión-S-transferasa (GST) y se han expresado en *E. coli*. La digestión con trombina de las proteínas recombinantes aisladas separa la molécula de GST y resulta en tres polipéptidos con las masas moleculares esperadas, 43 - 45 kDa, que se han denominado p43Ntf3, p45Ntf4 y p43Ntf6, respectivamente. Las tres proteínas se autofosforilan, *in vitro* y durante su expresión en bacterias, y al menos parte de esta fosforilación tiene lugar en tirosina, ya que son reconocidas en western blots por un anticuerpo anti-fosfotirosina; la especificidad de este anticuerpo se ha demostrado al inhibirse la reacción en presencia de fosfotirosina, pero no de fosfoserina o fosfotreonina. Las proteínas recombinantes fosforilan *in vitro* MBP (myelin basic protein), un sustrato típico de MAP quinasas, sobre la que muestran una actividad específica mucho mayor que con otros sustratos ensayados (caseína, histona H1). Las dos reacciones, de autofosforilación y de fosforilación de MBP, se estimulan dramáticamente cuando se añade a la mezcla de incubación  $Mn^{2+}$  en lugar de  $Mg^{2+}$ , lo que también sucede con otras MAP quinasas. Finalmente, las tres proteínas reaccionan en western blots con dos anticuerpos comerciales preparados contra MAP quinasas de mamíferos. Todos estos datos demuestran que los clones aislados codifican, en efecto, por MAP quinasas activas de tabaco. Recientemente hemos producido un anticuerpo policlonal dirigido contra un fragmento carboxiterminal de p45Ntf47 expresado como proteína recombinante en *E. coli*. Este anticuerpo, una vez purificado, reconoce en western blots e inmunoprecipita específicamente p45Ntf4, sin inhibir su actividad quinasa. Anticuerpos contra los extremos C-terminales de p43Ntf3 y p43Ntf6 están siendo preparados actualmente. Así mismo, hemos obtenido por mutagenesis *in vitro* una forma inactiva de

p43Nff37 sustituyendo una lisina, conservada en todas las proteínas quinasas e implicada en la reacción de transferencia de fosfato, por arginina. La correspondiente proteína recombinante mutada (K61R)p43Nff3, expresada en *E. coli*, no muestra actividad quinasa en ensayos de autofosforilación o de fosforilación de MBP, y no es reconocida por el anticuerpo anti-fosfotirosina. Formas mutantes análogas, correspondientes a p45Nff4 y p43Nff6 están en proceso de preparación en el laboratorio. Estos anticuerpos y quinasas inactivas pueden ser utilizados para investigar la posible activación de cada una de las MAP quinasas aisladas de tabaco en respuesta a estímulos específicos, como fitohormonas o distintas condiciones de estrés, o durante procesos de desarrollo particulares. Células quiescentes de mamífero en cultivos *in vitro* son inducidas a proliferar por adición de hormonas, factores de crecimiento u otros agentes mitogénicos; en todos estos casos la reactivación del ciclo celular está mediada por la rápida activación de MAP quinasas. A fin de investigar si las MAP quinasas están similarmente implicadas en el control del ciclo celular en plantas, hemos establecido un sistema de cultivos en suspensión de células de tabaco en los que más de un 90% de las células se bloquean y sincronizan en la fase G1 del ciclo celular (estadio G0) por cultivo prolongado en ausencia de fosfato; la readición de fosfato al medio induce a las células a reentrar en el ciclo celular y dividirse, como se ha demostrado por citofotometría de flujo. Se han preparado extractos de proteínas de muestras recogidas a distintos tiempos después de la adición de fosfato, y antes de que pudiera detectarse la replicación del DNA. Experimentos de fosforilación *in vitro* en inmunoprecipitados de estos extractos, obtenidos con distintos anticuerpos anti-MAP quinasa, indican la activación rápida y transitoria de una actividad fosforilante de MBP en las muestras. También hemos utilizado ensayos de fosforilación in-gel, en los que la MBP se incorpora en el gel antes de polimerizarlo y, después de separar las muestras por electroforesis, el ensayo de quinasas se lleva a cabo directamente en el gel; estos experimentos mostraron el mismo incremento transitorio en la fosforilación de MBP por una quinasa de 40 - 45 kDa, lo que está de acuerdo con que una MAP quinasa sea responsable de esta actividad. Estos resultados proporcionan la primera evidencia experimental de que la reactivación del ciclo celular en plantas puede estar mediada por la activación de MAP quinasas, como está demostrado en el caso de sistemas animales.

## **Desarrollo**



## Senescencia foliar en *Arabidopsis thaliana*

L. Abarca, M. Roldán, I. Cabeza, M. Martín y B. Sabater

Depto. de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá de Henares, 28871 Madrid

En las plantas de hábito monocárpico, como *Arabidopsis thaliana*, el inicio de la etapa reproductiva va asociado a una pérdida progresiva de los tejidos vegetativos. Este proceso, que se conoce como senescencia, permite a la planta recuperar hacia estructuras reproductoras parte de los componentes de las hojas y culmina con la muerte de éstas.

Además de la transición floral, hay factores exógenos y endógenos que controlan la senescencia foliar en *A.thaliana*. Así, se sabe que las condiciones ambientales pueden inducirla, acelerarla o retrasarla (1). Por otra parte, se ha visto que la duración de la vida de cada hoja tiene un límite intrínseco que es independiente del estado global de la planta (2).

Estamos interesados en comprender los mecanismos básicos que controlan la inducción de la senescencia foliar dentro del programa de desarrollo de la planta. Como un primer paso, nos hemos planteado el seguimiento de una serie de marcadores conocidos de senescencia como son, entre otros, la pérdida de clorofilas y los cambios en la expresión de genes implicados en el envejecimiento foliar. Los resultados obtenidos nos han permitido definir una serie de estadios a lo largo de la vida de la hoja y, en particular, delimitar el inicio de la senescencia foliar en *A.thaliana* en nuestras condiciones experimentales.

La identificación de un gen cuya expresión se induzca en hojas senescentes de *A.thaliana* permitirá seleccionar mutantes alterados en la regulación del envejecimiento foliar. Con ese objeto, hemos abordado el estudio de los genes que codifican isozimas de la superóxido dismutasa. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la actividad de los distintos isozimas disminuye en hojas senescentes de cebada (3). En el caso de *A.thaliana* hemos comprobado que esto es así para todas las isoformas excepto una, que parece ser específica de hojas senescentes, por lo que podría ser utilizada como marcador de senescencia foliar. Con ese propósito, hemos emprendido el aislamiento del gen que codifica esa isoforma y la caracterización de su expresión.

Otro posible marcador de senescencia foliar es el enzima glutamina sintetasa, que tiene un papel fundamental en la asimilación del nitrógeno y la reutilización del amonio procedente de la degradación de proteínas. Se sabe que la expresión en rosetas de *A.thaliana* de los genes que codifican para algunos de los isozimas varía a lo largo del desarrollo (4). Hemos analizado en hojas de diferentes edades de dos ecotipos de *A.thaliana* la expresión de los genes correspondientes a cuatro de las isozimas.

### Referencias

- (1) Stoddard, J. L. y Thomas, H. (1982). En D. Boulter, Parthier B., eds, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 14A. Springer, Berlin, pp 592-636.
- (2) Hensel, L.L., Grbic, V., Baumgarten, D.A. y Bleecker, A.B. (1993). Plant Cell 5:553-564.
- (3) Casano, L.M., Marffa, M. y Sabater, B. (1994). Plant Physiol. 106:1033-1039.
- (4) Bernhard, W.R. y Matile, P. (1994). Plant Science 98:7-14.

## Análisis de las tiorredoxinas h en los procesos de germinación y maduración de semillas de trigo (*Triticum aestivum*)

J.L. Crespo, F.J. Cejudo y F.J. Florencio.

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Universidad de Sevilla-CSIC. Apdo. 1113, Sevilla.

Las tiorredoxinas son proteínas de bajo peso molecular (10-14 kDa) cuya característica principal es la presencia de dos cisteínas en su centro activo, el cual presenta la secuencia *Cys-Gly-Pro-Cys* en la mayoría de estas proteínas. Estas cisteínas pueden estar en forma reducida, con los grupos sulfidrilos libres, o en forma oxidada formando un puente disulfuro interno. Desde un punto de vista catalítico, las tiorredoxinas actúan como proteínas redox, siendo capaces de oxidar o reducir grupos sulfidrilos de otras proteínas.

En plantas se ha descrito la existencia de tres tipos de tiorredoxinas atendiendo tanto a su localización intracelular como a sus funciones específicas. Estos tres tipos de tiorredoxinas se denominan *td m* y *td f*, que se encuentran en el cloroplasto y regulan enzimas del metabolismo del carbono, y *td h*, localizadas en el citosol y en mitocondrias y cuya función no está claramente definida, aunque en procesos como la germinación de semillas pudiera funcionar reduciendo a otras proteínas para facilitar su movilización, como sucede con las gliadinas y gluteninas en el caso del trigo, o también para activar ciertas proteasas que actúan durante este proceso (Buchanan *et al.*, 1994). Recientemente se ha descrito la presencia de cinco *td h* diferentes en *A. thaliana* las cuales se expresan en distintos tejidos y órganos de la planta, aunque no se ha podido determinar una función específica para cada una de ellas (R. Rivera-Madrid *et al.*, 1995). Por otro lado, en arroz se ha descrito la presencia mayoritaria de una *td h* en la savia del floema, y que podría estar funcionando como reductor de grupos sulfidrilos de proteínas que se transportan a través de él, o bien relacionada con la respuesta al estrés oxidativo en plantas (Ishiwatari *et al.*, 1995).

Mediante la utilización de anticuerpos contra la *td h* de trigo, previamente obtenidos a partir de la proteína purificada (Florencio *et al.*, 1988), se ha llevado a cabo la clonación de dos genes que codifican para la *td h* a partir de una genoteca de ADNc de semilla de trigo, y por otro lado, se ha analizado la expresión de estas proteínas en los procesos de germinación y maduración. Se han detectado mediante Western tres *td h* diferentes (*td h<sub>1</sub>*, *td h<sub>2</sub>* y *td h<sub>3</sub>*), apareciendo desde las fases más tempranas a lo largo de todo el proceso de germinación en todos los tejidos, salvo en el endospermo, donde no aparece la *td h<sub>1</sub>*. Los niveles de tiorredoxinas que se detectan en vástago y raíz parecen ser menores que los que se dan en los tejidos de la semilla, llegando a ser casi indetectables en los tejidos fotosintéticos más maduros. Se ha analizado además la expresión de estos genes, encontrándose también que se transcriben en todos los tejidos. La luz no parece intervenir en la regulación de la expresión de las *td h* durante la germinación, ya que semillas germinadas tanto en luz como en oscuridad muestran los mismos niveles de *td h*.

En el transcurso de la maduración de la semilla se aprecia una progresiva acumulación de las tres *td h* hasta llegar a los niveles de la semilla completamente madura. Por otra parte, también se ha estudiado la expresión de la NADPH-tiorredoxina Reductasa (NTR) en germinación y maduración con el uso de anticuerpos contra la NTR purificada a partir de espinaca (Florencio *et al.*, 1988), y se ha detectado una única banda mediante Western que aparece también en todos los tejidos, siendo menos abundante en los tejidos fotosintéticos más maduros, al igual que ocurre con las *td h*.

Los resultados obtenidos muestran que, en general, las *td h* son proteínas que están presentes en todos los tejidos metabólicamente activos de la planta, aunque en menor cantidad en los tejidos fotosintéticos, siendo apenas detectable en los más maduros. El hecho de que algunas tiorredoxinas aparezcan sólo en ciertos tejidos podría apuntar a una posible función específica para cada una de ellas, aunque hasta ahora se desconocen. La *td h1* es la única de las tres tiorredoxinas detectadas que presenta un patrón diferencial de expresión, y su ausencia en el endospermo de la semilla podría deberse a una mayor sensibilidad de esta proteína a la proteólisis que se da en este tejido, o que pueda ser un precursor de otras *td h* que se secretan al endospermo durante la germinación, y por tanto sólo se detectan en otros tejidos como aleurona o escutelo. La alta resistencia a la proteólisis que presentan las *td h2* y *td h3*, y su elevada presencia en el endospermo puede apoyar la idea de que son proteínas necesarias para la activación de proteasas, presentes en una alta proporción en este tejido.

#### Referencias

- B.B. Buchanan, P. Schurmann, P. Decottignies, R.M. Lozano (1994). Thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine. *Arch Biochem Biophys*, 314:267-260.
- F.J. Florencio, B.C. Yee, T.C. Johnson, B.B. Buchanan (1988). An NADP/Thioredoxin system in leaves: purification and characterization of NADP/Thioredoxin reductase and thioredoxin *h* from spinach. *Arch Biochem Biophys*, 266:16135-16140.
- Y. Ishiwatari, C. Honda, I. Kawashima, S. Nakamura, H. Hirano, S. Mori, T. Fujiwara, H. Hayashi, M. Chino (1995). Thioredoxin *h* is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta*, 195:456-463.
- R. Rivera-Madrid, D. Mestres, P. marinho, J.P. Jacquot, P. Decottignies, Y. Meyer (1995). Evidence for five divergent thioredoxin *h* sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci*, 92:5620-5624.



## Expresión de una tiol-proteasa durante el desarrollo de la semilla de trigo

F. Domínguez y F. J. Cejudo

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Universidad de Sevilla y CSIC. Apdo 553.  
41080-Sevilla

La germinación de las semillas de los cereales y la implicación de proteasas en dicho proceso es un fenómeno muy estudiado. Sin embargo, es poco conocida la proteólisis durante el desarrollo y la maduración de la semilla. Mediante ensayos de actividad en geles de poliácridamida copolimerizada con gelatina, nosotros hemos estudiado las endoproteasas que participan en el desarrollo de la semilla de trigo, identificando dos grupos de serin-proteasas neutras, cuya actividad se separa en el tiempo (un grupo muestra actividad entre 5-15 días post-antesis (DPA) y otro entre 20-30 DPA). Igualmente, a los 20 DPA se detecta un grupo de tiol-proteasas ácidas, cuya actividad es minoritaria (Domínguez y Cejudo, en preparación).

En este trabajo presentamos un estudio de la localización espacial de estas proteasas. Entre 10-20 DPA es posible separar la porción periférica de la semilla, que incluye embrión, aleurona y testa; y la porción interna, que consta de endospermo de reserva y subaleurona. La actividad proteolítica en solución (hidrólisis de azocaseína) es 3 veces mayor en la fracción periférica (embrión, aleurona y testa), respecto de la interna (endospermo y subaleurona). La tinción de actividad en gel localiza preferentemente 9 bandas de serin-proteasas neutras, mayoritarias, en la fracción aleurona-testa-embrión, y 6 bandas de tiol-proteasas ácidas, minoritarias, en el endospermo donde, en esta fase, se empiezan a acumular las proteínas de reserva.

En ensayos de actividad por difusión radial en placas de gliadina-agarosa, se observa que los extractos obtenidos a los 20 DPA son capaces de degradar gliadina a pH 4,0, pero no a pH 6,5. Esta actividad es sensible a inhibidores específicos de tiol- y serin-proteasas. Si las serin- y las tiol-proteasas, presentes durante la maduración, son capaces de degradar *in vitro* las gliadinas, se deduce que el pH del endospermo (entre 6,5 y 5,5 a lo largo de toda la maduración) sería el responsable de que las proteínas de reserva no fueran degradadas *in vivo*. Es posible que ambos tipos de proteasas se acumulen en la semilla durante el desarrollo con objeto de que estén presentes durante los primeros estadios de la germinación; aparte del pH, la presencia de inhibidores de proteasas endógenos garantizaría la estabilidad de las proteínas de reserva.

Las proteasas ácidas no parecen jugar un papel predominante en la maduración a diferencia de lo que ocurre en la germinación. Se han llevado a cabo experimentos de northern-blot y dot-blot usando como sonda el cDNA de una tiol-proteasa que es muy abundante durante la germinación (Cejudo et al, 1992), con objeto de analizar su expresión durante la maduración. Este RNA está presente en el inicio del desarrollo (0-10 DPA), a partir de 15 DPA no se detecta, y vuelve a detectarse a los 30 DPA. Dado que hay un pico de producción de ABA en la fase intermedia de la maduración (Rock y Quatrano, 1995), es posible que la expresión de este gen esté regulada negativamente por ABA.

Para completar estos experimentos, se diseccionaron semillas de 10-15 DPA, y se analizó la expresión de esta tiol-proteasa por dot-blot en las fracciones embrión-aleurona-testa y endospermo-subaleurona. La expresión siempre es mayor en aleurona-testa-embrión; dado que las tiol-proteasas se encuentran en el endospermo, es posible que estas enzimas se sintetizen predominantemente en la aleurona y se excreten al endospermo.

Con todos estos datos se puede dar una visión de conjunto de como se regula la proteólisis durante el desarrollo de la semilla de trigo. Hay un período, el comprendido entre 10-

20 DPA, en el que ocurren varios procesos importantes: (I) empiezan a acumularse las proteínas de reserva, (II) se produce una transición de un grupo de serín-proteasas neutras a otro, (III) aumentan los niveles de ABA (Rock y Quatrano, 1995; Skriver y Mundy, 1990), (IV) se expresan inhibidores endógenos de proteasas (fundamentalmente de serín-proteasas) (García-Olmedo et al, 1987), y (V) deja de expresarse la tiol-proteasa cuya expresión hemos estudiado.

El nexo de todos estos fenómenos puede ser el ABA que estaría controlando positivamente la expresión de las proteínas de reserva y de los inhibidores de proteasas (Skriver y Mundy, 1990), e inhibiendo la expresión de la tiol-proteasa. En cuanto a las serín-proteasas, su actividad parece controlada por los inhibidores endógenos que se sintetizan en la semilla.

La proteólisis, por tanto, está muy controlada durante el desarrollo de la semilla, con objeto de que las proteínas de reserva no sufran una degradación inespecífica.

#### Referencias

- Cejudo et al (1992) *Plant J.* 2: 937-948.  
García-Olmedo et al (1987) *Oxf. Sur. Plant Mol. Cell Biol.* 4, 275-334  
Rock y Quatrano (1995) En: *Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology.* P.J. Davies (ed.), Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 671-697  
Skriver y Mundy (1990) *Plant Cell* 2, 503-512.

## Fosforilación *in vitro* e *in vivo* de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de semillas de trigo durante la germinación

C. Echevarría<sup>1</sup>, L. Osuna<sup>1</sup>, M. C. González<sup>2</sup>, J. Vidal<sup>3</sup> y J. Cejudo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dpto. de Biología Vegetal e <sup>2</sup> Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla. <sup>3</sup> Institute de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris-sud, Francia.

La fosforilación reversible de la PEPC de hojas ha sido descrita en plantas C4 y CAM. Este mecanismo de regulación asociado a un ritmo circadiano, en el que la enzima se encuentra fosforilada y más activa coincidiendo con la fase activa de fijación de CO<sub>2</sub> (día para las C4 y noche para las CAM), afecta a las propiedades de la enzima: Km para el PEP y la sensibilidad respecto de los efectores negativo y positivo L-málico y glucosa-6-P, respectivamente. La fosforilación de la PEPC también se ha puesto de manifiesto en órganos de tipo C3: en hojas, en el estoma y en nódulos. En este trabajo se presenta la fosforilación de la PEPC de semillas de trigo durante el proceso de germinación. Los datos obtenidos muestran un incremento de la actividad durante los 4 primeros días de imbibición. Las medidas realizadas a un pH óptimo de 8 y la acumulación de mRNA, detectada mediante northern-blot, muestran síntesis *de novo* de la proteína con un máximo a las 48 h de imbibición. Un estudio de inmunolocalización *in situ* de la PEPC en los diferentes tejidos de la semilla revelan su presencia en la aleurona, el endospermo y el escutelo, así como en la radícula y en la hoja, estando ausente en el coleóptilo y la coleorriza. Experimentos de western-blot utilizando anticuerpos específicos contra el sitio de fosforilación ponen de manifiesto la existencia de un motivo de fosforilación similar al encontrado en otras PEPC de plantas. Experimentos de fosforilación *in vitro* muestran que tanto la PEPC endógena como una PEPC recombinante de hojas de sorgo pueden ser fosforiladas en extractos crudos y desalados de semillas por una quinasa Ser/Thr que fosforila la Ser fisiológica. Esto se demuestra por inhibición total de la reacción en presencia de anticuerpos específicos antisitio de fosforilación. Una disminución en la relación entre la actividad PEPC a pH8 y a pH7,3 y entre pH8 y pH7,1 (Echevarría y col., 1994, A.B.B., 315, 2: 425-430) evidencian un proceso de fosforilación durante los 4 primeros días de imbibición. Por último, la incorporación *in vivo* de <sup>32</sup>P por la PEPC de la aleurona y el escutelo de semillas imbibidas en <sup>32</sup>P[Pi] confirman los resultados anteriores y nos permiten asegurar que todos los elementos necesarios para la regulación de la PEPC por fosforilación reversible están presentes y son funcionales durante el proceso de germinación.

**Aislamiento y caracterización de cDNAs correspondientes a genes de expresión específica en meristemos reproductivos de coliflor (*Brassica oleracea*, var. *botrytis*)**

J.M. Franco, F. Madueño\*, J.M. Martínez-Zapater y J. Salinas.

Laboratorio Biología Molecular y Virología Vegetal. CIT-INIA, Carretera La Coruña, km 7. 28040, Madrid.

\*Departamento de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid.

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares responsables del proceso de transición floral a nivel del meristemo apical, hemos llevado a cabo el aislamiento de clones de cDNA correspondientes a genes que se expresan específica o preferencialmente en meristemos reproductivos. Para ello, hemos seguido una aproximación consistente en la hibridación sustractiva, empleando un método basado en la PCR. En una primera fase de sustracción, se emplearon ápices de coliflor y coles de Bruselas, dos variedades comerciales de *Brassica oleracea* (var. *botrytis* y var. *gemmifera*, respectivamente), como fuentes de meristemos reproductivos y vegetativos. Tras seis rondas de sustracción, se sometió la población de cDNAs de meristemos de coliflor a una segunda fase de sustracción, empleando en este caso cDNAs de meristemos de col de Bruselas así como de flor, raíz, tallo y tallo de la pella de la coliflor. Tras dos rondas de sustracción, la población obtenida resultó enriquecida en cDNAs de meristemos de la coliflor. El rastreo de la genoteca obtenida, nos permitió identificar 13 clones correspondientes a genes de expresión preferencial en meristemos reproductivos. Una caracterización más detallada de dichos clones, mediante el análisis de sus secuencias nucleotídicas, así como mediante hibridaciones tipo northern y Southern, nos ha llevado a identificar dos de ellos, que muestran una gran homología con el gen *APETALA1* de *Arabidopsis*. El resto no han resultado homólogos a ningún gen conocido. En esta comunicación se presentarán los resultados obtenidos de la caracterización de los clones identificados en lo referente a sus secuencias y a sus patrones de expresión.

## Identificación genética de loci de *Arabidopsis* responsables de la respuesta al fotoperíodo y su posible papel en el desarrollo de tolerancia a la helada

C. Gómez-Mena, L. Ruiz-García, J. Salinas y J.M. Martínez-Zapater

Laboratorio de Biología Molecular y Virología Vegetal. CIT-INIA, Ctra. de la Coruña Km. 7, 28040 Madrid

El hábito de crecimiento en las plantas viene determinado por el genotipo y por las condiciones ambientales. *Arabidopsis* es una especie de día largo que responde a la longitud del fotoperíodo floreciendo más tempranamente en fotoperíodos largos. En el ecotipo Landsberg *erecta*, se ha observado que la capacidad para desarrollar tolerancia a la congelación, en el proceso denominado aclimatación, es mayor en plantas crecidas en fotoperíodo corto en el que muestran hábito de crecimiento de invierno. Con objeto de identificar genes de *Arabidopsis* implicados en la determinación del hábito de crecimiento se ha caracterizado la capacidad de desarrollar tolerancia a la congelación en poblaciones naturales con diferentes hábitos de crecimiento. En general los ecotipos sensibles al día corto tienen mayor capacidad para aclimatar que otros como Cvi que presentan hábito de primavera aún en fotoperíodos cortos. Por otra parte, se llevó a cabo la selección de mutantes de floración temprana en día largo a partir de poblaciones M2 de semillas mutagenizadas con EMS y neutrones rápidos. Se aislaron inicialmente 11 mutantes que luego fueron estudiados en condiciones de día corto. De este modo se establecieron dos grupos fenotípicos en cuanto a su sensibilidad al día corto: mutantes insensibles al día corto y mutantes con sensibilidad reducida al día corto. En el primer grupo se incluye dos líneas que contienen mutación en el mismo locus (*pi1*). Fenotípicamente, estos mutantes muestran un tamaño pequeño y hojas con los bordes curvados. Se ha mapeado esta mutación en el cromosoma 2. En el grupo de los mutantes con reducida sensibilidad al día corto se están analizando tres líneas mutantes Lr2, Lr5 y el LI-30 que contienen mutaciones en tres loci independientes. Las mutaciones Lr2 y LI-30 tienen carácter recesivo, mientras que Lr5 es semidominante y mapean en los cromosomas 3, 2 y 4 respectivamente. El análisis de la capacidad de desarrollar tolerancia a temperaturas de congelación de estos mutantes sugiere que caracteres como el tiempo de floración y la capacidad de tolerar temperaturas de congelación podrían venir determinados, al menos en parte, por los mismos genes.

## Efecto de la temperatura en el desarrollo floral y expresión de genes homeóticos de tomate

R. Lozano<sup>1</sup>, T. Angosto<sup>2</sup>, P. Huijser<sup>3</sup>, J. Capel<sup>1,3</sup>, P. Gómez<sup>1</sup>, C. Payán, F. Madueño<sup>4</sup>, J. Salinas<sup>4</sup> y J. M. Martínez-Zapater<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Dpto. de Biología Aplicada y <sup>2</sup> Dpto. Biología Vegetal, E. Politécnica Superior, Univ. de Almería. 04120 Almería. <sup>3</sup> Max-Planck Institut für Züchtungsforschung, 50829 Köln (Germany), <sup>4</sup> Área de Biología Molecular y Virología Vegetal, CIT-INIA, 28040 Madrid.

Las temperaturas bajas, especialmente las temperaturas nocturnas inferiores a 10°C, provocan anomalías en el desarrollo floral de tomate que posteriormente se traduce en malformaciones severas de los frutos, disminuyendo su valor comercial y con ello la rentabilidad del cultivo de esta especie. La caracterización morfológica de tales anomalías, las cuales pueden ser reproducidas mediante el tratamiento exógeno con giberelinas (GA<sub>3</sub>), indica que éstas son de dos tipos. Las primeras, de naturaleza homeótica, suponen la aparición de órganos florales (sépalos-pétalos-estambres-carpelos) en posiciones incorrectas según el programa normal de desarrollo de una flor angiosperma, así como la formación de órganos mixtos constituidos por tipos celulares distintos, propios de órganos situados en verticilos adyacente (sépalos petaloideos, estambres carpeloideos, etc.).

El segundo tipo de anomalías, de naturaleza merística, promueven el desarrollo de un número anormal de órganos, diferente del que le correspondería a cada verticilo floral concreto. A juzgar por los datos de microscopía, tales cambios parecen venir determinados por un aumento en el tamaño del meristemo floral a partir del cual, conjuntos de células se diferencian para conformar los distintos órganos de la flor. No obstante se desconoce por el momento si dicho aumento se debe a la proliferación de un mayor número de células o al incremento del volumen celular.

Los análisis fenotípicos sugieren que las transformaciones observadas pueden ser el resultado de cambios en la expresión de algunos de los genes de la familia MADS que controlan la identidad y número de órganos en cada verticilo floral. Con el fin de probar esta hipótesis, plantas de tomate fueron crecidas a temperaturas bajas (18°C día/7°C noche), descritos sus patrones de desarrollo y analizados los niveles de expresión de algunos de estos genes, concretamente TM4 (homólogo de AP1 y SQUAMOSA), TM5, TM6 (similar a DEFICIENS) y TAG1 (homólogo de AGAMOUS) (Pnueli *et al.*, 1991, 1994). Así, los resultados de las hibridaciones tipo Northern e hibridaciones *in situ* indican que las transformaciones homeóticas observadas están relacionadas con fenómenos de sobreexpresión de TM4 y TAG1 así como con niveles excepcionalmente bajos de transcritos TM5 y TM6. De igual forma, flores con dichas anomalías presentan cambios en los patrones de especificidad tisular de dichos genes, promovidos en cualquier caso por las temperaturas bajas.

En este trabajo se discute el papel regulador de los genes homeóticos de tomate, así como las implicaciones en el desarrollo floral de esta especie a distintas temperaturas. Posibles interacciones de estos genes con factores hormonales o bien con otros genes como los que controlan los procesos de división y crecimiento celular y cuya expresión podría estar relacionada con la determinación del número de primordios y órganos a desarrollar en cada verticilo, son asimismo objeto de consideración en el presente estudio.

### Referencias

- Pnueli *et al.* The Plant Journal, 1(2): 255-266 (1991).  
Pnueli *et al.* The Plant Cell, 6: 163-173 (1994)

## Interacciones genéticas que regulan el proceso de iniciación de los meristemas florales en *Arabidopsis*

F. Madueño\*, L. Ruiz-García, J. Salinas y J. M. Martínez-Zapater

Laboratorio de Biología Molecular y Virología Vegetal. CIT-INIA, Ctra. de la Coruña Km.7, 28040 Madrid.

\*Departamento de Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica, Madrid

Durante el ciclo de vida de las plantas el meristemo apical va produciendo una sucesión de nodos en los que se generan distintas estructuras laterales dependiendo de la fase de crecimiento por la que atraviese el ápice. En *Arabidopsis*, tanto los nodos de la fase de crecimiento vegetativo como los de la inflorescencia temprana se caracterizan por la producción de hojas en cuyas axilas se generan meristemas que, eventualmente, se desarrollarán como inflorescencias secundarias. En la siguiente fase, de inflorescencia madura, se producen, como único tipo de estructuras laterales, meristemas que se desarrollarán produciendo exclusivamente flores. Estudios genéticos y moleculares han permitido identificar algunos de los genes necesarios para que estos meristemas laterales adquieran la identidad de meristemas florales. Entre estos genes, *LEAFY (LFY)* y *APETALA 1 (AP1)* son los que juegan un papel fundamental en el proceso de identificación. Por otra parte, *TERMINAL FLOWER (TFL)* parece jugar un papel opuesto siendo necesario para el mantenimiento del patrón de crecimiento indeterminado del meristemo de inflorescencia. Los productos de estos genes interaccionan de manera compleja para especificar, por tanto, la identidad del meristemo floral. El aislamiento de mutantes con fenotipos de floración tardía y floración temprana han permitido identificar *loci* cuyos productos se encuentran probablemente implicados en la activación o represión, respectivamente, del proceso de transición floral (paso de fase de crecimiento vegetativo a reproductivo). Entre las mutaciones de floración tardía, las de los *loci FCA, FVE, FPA, y FY* provocan un retraso en la floración independiente de las condiciones de fotoperíodo, mientras que las de *CO, Gl FWA y FT* provocan un fenotipo de floración tardía sólo en día largo. Con el fin de estudiar el papel de los *loci* de floración tardía en la especificación de la identidad del meristemo floral hemos construido y analizado dobles mutantes entre cuatro *loci* de floración tardía, que representan a estos dos grupos, y mutaciones en los genes de identidad del meristemo floral *LFY, AP1 y TFL*. En todos los casos, las mutaciones de floración tardía resultaron ser epistáticas a la mutación en el gen *TFL*, lo que indica que *TFL* y estos *loci* están implicados en la misma ruta de desarrollo. Por tanto *TFL* podría actuar reprimiendo la función activadora de los *loci* de floración tardía en la transición floral. Los fenotipos de los dobles mutantes en los *loci FPA o FVE y AP1 o LFY* sugieren que la función de estos genes de floración tardía es más relevante para la actividad de *LFY* que para la de *AP1*. Mientras que las mutaciones en los *loci FWA y FT* tienen un efecto mucho mayor sobre el fenotipo de los mutantes *lfy* impidiendo completamente la formación de flores. Estos resultados sugieren la existencia de, al menos, dos rutas de especificación de la identidad del meristemo floral.

## Clonación e identificación por un método de MAST-PCR-SDS de cDNAs relacionados con el proceso de maduración de fresa

N. Medina-Escobar<sup>1</sup>, J. Cárdenas<sup>1</sup>, V. Valpuesta<sup>2</sup>, J.L. Caballero<sup>1</sup>, y J. Muñoz-Blanco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>.-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular/Fac.Ciencias/Univ. Córdoba

<sup>2</sup>.-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular/Fac.Ciencias/Univ. Málaga

El desarrollo del fruto de la fresa (pseudofruto) parece ser un proceso continuo que incluye fases que se solapan de división celular, expansión celular y senescencia. En fresa, el proceso de maduración del fruto se ha correlacionado con modificaciones en las actividades de algunas enzimas. Así, se ha descrito un incremento del contenido de antocianinas y de las actividades enzimáticas PAL y UDPGFT, dos enzimas relacionadas con la vía de biosíntesis de antocianinas, a lo largo del proceso de maduración del fruto de fresa. También se ha observado un aumento de la actividad celulasa en los estadios maduros del fruto de la fresa. Otras enzimas cuyas actividades aumentan con el proceso de maduración son la pectin metil esterasa, la poligalacturonasa y la sacarosa sintasa (1-5, 7-9).

La maduración del fruto de la fresa va precedida y acompañada de numerosos cambios moleculares. Se han observado variaciones de las poblaciones de ARNm a lo largo del proceso de maduración del fruto de fresa. Los análisis de los productos de traducción *in vitro* han mostrado cambios diferenciales durante la maduración de los frutos, que corresponden a tres modelos diferentes de expresión génica. Una primera población de ARNm que desaparece durante el proceso de maduración de la fresa, una segunda población de ARNm que aumenta conforme se acerca el proceso al estadio de maduración intermedia para a continuación sufrir una disminución de sus niveles, y una población de ARNm cuyos niveles aumentan con la maduración del fruto (6).

Al contrario de lo que ocurre para el caso de frutos climatéricos, los eventos moleculares que se relacionan con la maduración de frutos no-climatéricos no han sido suficientemente estudiados hasta la fecha. La elucidación de estos mecanismos pueden tener importancia económica y ayudar a esclarecer las vías fisiológicas fundamentales en el proceso de maduración de la fresa.

Con el objeto de contribuir al esclarecimiento de los mecanismos moleculares que subyacen al proceso de maduración de fresa, hemos procedido a construir una genoteca sustractiva de ADNc mediante una técnica de MAST-PCR modificada. Aunque se recomiendan más de tres ciclos de sustracción en la generación de genotecas sustractivas, en nuestro caso sólo fueron necesarios dos ciclos, después de los cuales no se observaron más sustracciones al aumentar el número de ciclos. La genoteca presentó un buen título primario ( $0.95 \times 10^6$  pfu) así como un alto número de recombinantes (91%). Se procedió a realizar un escrutinio diferencial primario convencional de la genoteca sustractiva (50.000 pfu) así como escrutinios diferenciales secundarios y terciarios mediante un método de PCR-SDS. Se aislaron así 116 ARNm que al parecer se expresan de manera diferencial a lo largo del proceso de maduración. De ellos 45 han sido escindidos y secuenciados parcialmente. Mediante la utilización del programa FASTA (GCG; Wisconsin University) se encontraron homologías para 15 de los 45 clones secuenciados. Estas homologías incluyen ARNm que corresponden a pruninas, proteínas transportadoras de acilos, cianamil alcoholdehidrogenasa, proteínas de choque térmico, ciclofilinas, proteínas relacionadas con los procesos de turgor (MIP), fosfolípidos transferasas, proteína de maduración de tomate E4, dihidro flavonol-4 reductasa (DHFR), proteínas inducibles por giberelinas e inhibidas por ABA (GAST) y polipéptido de 14 KDa, de plantas, reprimible por auxinas e inducible por sacarosa. Los



estudios de expresión (northern) realizados hasta la fecha y en los que se utilizaron como sondas los ADNc correspondientes a los clones aislados indicaron una expresión diferencial a lo largo de la maduración del fruto de fresa para los clones homólogos con las proteínas de choque térmico, DHFR, pectato liasa, cianamil alcohol deshidrogenasa y proteína de 14 KDa. Por otra parte, tanto el clon homólogo al de la ciclofilina como el homólogo al de la proteína MIP parecen tener un patrón bifásico de inducción que podría correlacionarse con el crecimiento bifásico del fruto de la fresa. Finalmente, el clon homólogo a la fosfolípido transferasa presenta un modelo de expresión constitutivo en el fruto de fresa. También se observó en raíz una expresión débil de los clones homólogos a los de la proteína MIP y la ciclofilina. En hojas, se observó una expresión débil del clon homólogo al de la proteína de turgor, una expresión moderada del homólogo de las ciclofilinas así como una fuerte expresión en hojas. En flores, se produjo una fuerte expresión de los clones homólogos al de la proteína de turgor y de la ciclofilina, mientras que el clon homólogo al de la fosfolípido transferasa presentó una fuerte expresión. Finalmente, en estolones se observó una baja expresión para el clon homólogo al de la proteína de choque térmico, una expresión moderada de los clones homólogos al de la proteínas de turgor y la ciclofilinas y una fuerte expresión del clon homólogo al de la fosfolípido transferasa.

Los resultados se discuten en función del modelo de expresión de cada uno de los clones y el papel fisiológico que desempeñan cada una de las proteínas homólogas a dichos clones

#### Referencias

1. Abeles F.B. and Takeda F. (1990) *Sci.Hort.*42, 269-275.
2. Barnes,M.F. and Patchett B.J. (1976) *J.Food Sci.*41, 1392-1395.
3. Given N.K, Venis M.A. and Grierson, D. (1988) *Plant Sci.*133, 25-30.
4. Knee M., Sargent J.A. and Osborne D.J. (1977) *J.Exp.Bot.* 28, 377-396.
5. Mannin~ K. (1993).En *Biochemistry of Fruit Ripening*. Seymour, G.B., Taylor J.E. y Tucker,G.A., eds. Chapman and Hall, pp 347-373.
6. Manning K. (1994) *Planta* 194, 62-68.
7. Neal G.E .(1965) *J.Sci.Food.Agric.* 16,604-611.
8. Perkin-Veazie P. and Huber D.J. ( 1987) *Proc. Fl. St. Hort. Soc.* 100, 253-256.
9. Woodward J.R. (1972) *J. Sci.Food and Agric.* 23, 465-473.

## Expresión de dos clones de cDNA relacionados con el crecimiento de epicotilos de *Cicer arietinum*

F.J. Muñoz, B. Dopico y E. Labrador

Dpto. de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal), Fac. de Biología, U. de Salamanca. Avda. Campo Charro s/n. 37007 Salamanca.

Los epicotilos de plántulas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), presentan la máxima capacidad de crecimiento entre 4 y 5 días de germinación. Este crecimiento es debido fundamentalmente a la elongación de las células y no a la división celular. En los últimos años hemos estudiado los acontecimientos bioquímicos que ocurren durante el alargamiento celular.

Actualmente nos proponemos estudiar las posibles variaciones en la expresión génica que tienen lugar durante el crecimiento de los epicotilos. Para ello construimos una genoteca de cDNA en el vector Uni-ZAP XR a partir de mRNA aislado de epicotilos de 5 días. Una vez construida la genoteca realizamos un *screening* diferencial utilizando sondas sintetizadas a partir de mRNA de epicotilos de 5 y 2 días (estos últimos apenas presentan crecimiento). Estudiamos 150.000 recombinantes y obtuvimos un elevado número de positivos. Consideramos positivos los recombinantes que hibridan con la sonda obtenida a partir del mRNA de 5 días pero no con la sonda de 2 días.

Entre estos positivos aislamos dos clones de cDNA denominados CAN 16 y CAN 23 que, al compararlos con otras secuencias almacenadas en la base de datos GENEMBL, presentan homología con tres genes específicos de tejidos presentes en guisante. El clon CAN 16 presenta una homología del 61 % en 354 pb con un cDNA específico de tallos jóvenes, del 60 % en 326 pb con un gen específico de tallos y del 60 % en 324 pb con un gen específico de vainas.

El clon CAN 16 tiene un tamaño de 1 210 pb y contiene una pauta de lectura abierta de 1.035 nucleótidos que codifican para un péptido de 345 aminoácidos con un peso molecular de 36 kD. La proteína codificada por este clon contiene en la región amino-terminal, una zona hidrofóbica que sirve para su transporte.

La expresión de estos clones fué analizada mediante experimentos de slot-blot y northerrn-blot. Nuestro interés se centra en el estudio de su expresión durante el crecimiento natural de los epicotilos, y cuando existen modificaciones del crecimiento, bien por inhibición en condiciones de estrés o por inducción mediante la aplicación de ácido indolacético (IAA). En los epicotilos de plántulas

germinadas en agua durante un período de 2 a 8 días, podemos apreciar un aumento progresivo en la expresión del CAN 16 hasta alcanzar una máxima a los 5 días para descender posteriormente. Si inhibimos el crecimiento de los epicotilos por estrés hídrico con polietilenglicol (PEG), no se produce un aumento en la expresión de este clon y se mantiene en los valores que presentaban los epicotilos antes de someterlos a condiciones de estrés. La inhibición del crecimiento por PEG se puede revertir colocando las plántulas de nuevo en agua. En estos epicotilos revertidos la expresión del CAN 16 vuelve a aumentar con la edad, aunque con cierto retraso frente a los epicotilos normales. Este retraso coincide con el tiempo que las plántulas han estado en PEG.

Estudiamos el efecto del IAA sobre el crecimiento, para lo cual incubamos secciones subapicales de epicotilos de 10 mm en IAA durante diferentes tiempos. Sorprendentemente se aprecia una disminución de la expresión del CAN 16 en los segmentos incubados en IAA en comparación con los controles. Esta disminución es más drástica cuando el período de incubación es más largo (8 h), correspondiendo con secciones más envejecidas.

Dado que este clon presenta homología con genes específicos de tejidos, estudiamos si se expresaba en alguna otra parte de la plántula además de en los epicotilos. El CAN 16 se expresa en el epicotilo, mesocotilo y raíz (tejidos elongantes) con unos valores muy similares. No se expresa ni en el gancho plumular (tejido meristemático) ni en los cotiledones (tejido de reserva). En cuanto a la expresión del CAN 16 en plantas adultas (con 5 entrenudos), podemos señalar que no aparece en hojas y su distribución a lo largo del tallo varía. Apenas se expresa en el 1<sup>er</sup> entrenudo que se corresponde con el tejido más envejecido. La mayor expresión se produce en el 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> entrenudos y no hay expresión en el 5<sup>o</sup> entrenudo, la parte más cercana al tejido meristemático. La expresión es por tanto mayor en los tejidos que están elongándose.

El otro clon estudiado, el CAN 23, tiene 900 pb aunque estimaciones por northern blot indican que la longitud total del transcrito es de 1200 pb, por lo que el clon no se corresponde con el transcrito total. Las zonas secuenciadas del CAN 23 presentan homología con los mismos genes específicos de tejidos que el CAN 16. Esta homología es del 68 % en 323 pb con un gen específico de vainas, del 65 % en 222 pb con un gen específico de tallos y del 60 % en 222 pb con un cDNA específico de tallos jóvenes.

En relación a su expresión podemos señalar que durante los primeros días de crecimiento normal del epicotilo apenas si se expresa este clon. A medida que la plántula va creciendo la expresión en el epicotilo aumenta hasta el quinto día y después permanece constante. Cuando el crecimiento está inhibido por PEG la expresión disminuye en las primeras horas de tratamiento, manteniéndose luego constante en los mismos valores que presentaban los epicotilos antes de ser sometidos a las condiciones de estrés hídrico. Al revertir este estrés la expresión del CAN 23 aumenta e incluso supera los valores de expresión que aparecían en condiciones normales. Dentro de la plántula el CAN 23 únicamente se expresa en el epicotilo, mesocotilo y raíz, siendo la expresión mayor en estas dos últimas. En plantas adultas el CAN 23 no se expresa en hojas. En el tallo la máxima expresión se aprecia en los tres primeros entrenudos disminuyendo en los dos siguientes. A diferencia del CAN 16 este clon se expresa ligeramente en el quinto entrenudo.

## **Clonación y caracterización de un gen específico de la maduración en frutos de fresa que presenta homología con un gen inducible por etileno en el tomate**

A. Pedraza, J. Cárdenas y A. R. Franco

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias.  
Universidad de Córdoba. 14071 Córdoba.

Los frutos climatéricos como el tomate (*Lycopersicon esculentum*), son aquellos en los que tiene lugar una producción autocatalítica de etileno y un incremento brusco en la tasa de respiración (climaterio) durante el proceso de maduración. Estos dos procesos no tienen lugar en los frutos no climatéricos. El etileno es una hormona que provoca la síntesis de numerosas proteínas y enzimas, muchas de las cuales han sido clonadas y caracterizadas. En la maduración de los frutos no climatéricos, sin embargo, parecen intervenir otras hormonas como las auxinas.

Hemos escogido el fruto del fresón (*Fragaria x ananassa*) como organismo modelo para estudiar, a nivel molecular, el proceso de maduración en frutos no climatéricos. Para ello, se ha utilizado una genoteca sustractiva enriquecida en secuencias de ADNc que específicamente se inducen en el estadio final de la maduración del fruto. Mediante escrutinios diferenciales, se han aislado diversos genes que se expresan en los distintos estadios de maduración.

Se ha aislado y secuenciado uno de estos genes. Al comparar su secuencia con las bases de datos de ácidos nucleicos, hemos encontrado homología con el gen E4 de tomate (63% de identidad a nivel de nucleótidos) y con el de nabo (*Brassica napus*). En tomate, este gen E4 es activado transcripcionalmente al principio del proceso de maduración, coincidiendo con un incremento en la biosíntesis de etileno. Mediante análisis por transferencia de ARN total (northern), se ha comprobado que el ARNm es abundante en frutos maduros e indetectable en inmaduros. El norbodiéno, un inhibidor competitivo de la acción del etileno, inhibe fuertemente la expresión del gen E4 durante la maduración. Por el contrario, al tratar con etileno aumentó rápidamente la cantidad de transcritos de E4.

En el fresón, los estudios de expresión mediante análisis de northern, demostraron que la expresión del gen E4 también tiene lugar de manera específica en el fruto en la etapa final del proceso de maduración, siendo indetectable en los estadios iniciales e intermedios del mismo. El tamaño aproximado de los ARNm es de 0.9 Kb, lo que coincide prácticamente con el tamaño del ADNc clonado. Mediante el análisis de la secuencia, se ha encontrado además homología con la protein-metionina-S-oxido reductasa de *E. coli*, que se ha postulado cataliza la reducción de residuos de metionina de proteínas que se han oxidado a sulfoxido de metionina, lo que restauraría la actividad biológica de dichas proteínas.

## Clonación de una proteína específica del embrión de guisante

M.I. Rodrigo, E. Ballestar, J. Castillo, y L. Franco

Dpto de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Biológicas. Dr. Moliner 50. Burjassot  
46100.Valencia

La proteína de 16 Kd (P16) es específica del embrión de guisante y se obtiene junto con las histonas en extractos ácidos de cromatina o núcleos.

Se ha construido una genoteca de cDNA obtenido a partir de mRNA de ejes embrionarios de guisante. La genoteca se ha rastreado con el anticuerpo frente a la proteína de 16 Kd. Se han obtenido varios clones con un tamaño aproximado de 1.7 kb. Después de la caracterización inicial, dos clones han sido escindidos *in vivo*, propagados en el plásmido pBluescript SK y secuenciados. Los dos clones tienen la misma secuencia, el más largo tiene una pauta abierta de lectura de 1446 pb que codifica una proteína de 482 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 54.5 Kd. Para confirmar que estos cDNAs codifican la proteína de 16 Kd se secuenció el extremo N-terminal de la proteína y un péptido obtenido mediante digestión con tripsina. Ambas microsecuencias pueden alinearse con la secuencia de aminoácidos deducida de los clones.

Aunque la masa molecular deducida a partir de la secuencia de cDNA es de 54.5 Kd, el anticuerpo sólo detecta en guisante la proteína de 16 Kd, lo que indica probablemente que la proteína es procesada durante su maduración.

El clon entero presenta homología con una proteína de soja asociada a la cara extracelular de la membrana plasmática y cuya función podría estar relacionada con el transporte de sacarosa (Grimes y col. (1992) Plant Cell 4,1561-1574).

Estudios previos con la proteína P16 muestran que ésta se encuentra localizada en cuerpos proteicos y núcleos y aunque su función no es conocida hemos observado que cuando P16 se incubaba con nucleosomas se produce un aumento en la movilidad electroforética de los mismos. Estos resultados junto con la observación de que P16 se sintetiza al final de la embriogénesis cuando la semilla pierde agua para entrar en el período de latencia podrían implicar a la proteína P16 en procesos relacionados con la desactivación y protección del genoma, así como de otros componentes celulares.

## Dissección genética de la morfogénesis de la hoja en *Arabidopsis thaliana*

J. Serrano, G. Berna, P. Robles, H. Candela, A. Martínez-Laborda, y J.L. Micol

División de Genética. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad de Alicante.  
Campus de San Juan. 03080 Alicante.

Mientras que se conocen con detalle numerosos aspectos del control genético del desarrollo animal, especialmente en el insecto *Drosophila melanogaster* y en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, no ocurre otro tanto con el desarrollo vegetal. Sólo recientemente se ha comenzado a acumular información en este campo, gracias a que la Biología del desarrollo vegetal ha evolucionado a lo largo de la última década desde un planteamiento fundamentalmente descriptivo hasta otro centrado en la Genética como método que posibilita un análisis causal de la ontogénesis. Este cambio metodológico ha progresado paralelamente a otro, consistente en la concentración de esfuerzos en sistemas modelo como *Arabidopsis thaliana*, cuya utilización se ha revelado fructífera en la disección de varios aspectos del desarrollo vegetal, como el embrionario, el de la flor, la raíz y los tricomas. Varios de los grupos que han llevado a cabo estas investigaciones han aplicado aproximaciones experimentales similares: partiendo de una mutagénesis de saturación, realizada con el fin de obtener el máximo número posible de mutaciones que perturben el proceso a estudio, han pasado al análisis de sus interacciones en dobles mutantes, lo que ha permitido la formulación de modelos que han sido finalmente verificados o refutados mediante la caracterización molecular de algunos de los genes implicados.

Pretendemos contribuir a la comprensión de la morfogénesis vegetal en términos de los genes que la controlan, fundamentalmente a dos niveles: la toma de decisiones en el seno de las células en cuanto a la determinación de destinos en el desarrollo, y la coordinación de esas decisiones entre grupos de células vecinas. Como aproximación al problema hemos elegido un órgano, la hoja, sobre cuyo desarrollo se dispone de muy poca información. En *Arabidopsis thaliana* existen dos tipos de hojas: las que genera el meristemo vegetativo en sus fases juvenil y adulta, que se concentran en la parte inferior del tallo, constituyendo una roseta basal, y las que comienzan a aparecer inmediatamente antes de producirse la transición floral, denominadas hojas caulinares. La estructura de las hojas de *Arabidopsis* es simple, pudiendo destacarse como elementos de patrón la distribución de los tricomas y estomas, cuya densidad es diferente en el haz y en el envés, y la venación, que corresponde a un sistema vascular reticulado.

Con el fin de analizar en primer lugar la variabilidad natural en la arquitectura de la hoja, estamos estudiando 194 ecotipos, estirpes silvestres de *Arabidopsis thaliana* obtenidas del Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC). Hemos clasificado estos ecotipos en grupos fenotípicos en función de la morfología de sus hojas o la estructura de su roseta basal. Estamos llevando a cabo cruzamientos entre parejas de ecotipos que difieren sustancialmente en un determinado carácter morfológico, para establecer si sus fenotipos corresponden a variaciones en uno o más genes. Estamos procediendo a la descripción morfométrica de la evolución, a lo largo de los primeros 32 días de desarrollo, de la forma y el tamaño de las hojas de tres ecotipos de uso común (Enkheim 2, Landsberg *erecta* y Columbia).

Estamos estudiando 153 mutantes con hojas anormales que no habían recibido gran atención con anterioridad y formaban parte de la colección del NASC. Los hemos clasificado en grupos fenotípicos en función de la morfología de sus hojas o la estructura de su roseta basal, sometiendo a 83 de ellos a análisis de complementación y de ligamiento.

Estamos llevando a cabo una mutagénesis de saturación encaminada a la obtención del máximo número posible de mutantes con hojas anormales, para (a) definir el espectro de posibles anomalías en la morfogénesis de la hoja, (b) determinar el número de genes diferentes cuyas mutaciones perturban el proceso, (c) elegir aquellos cuyo fenotipo o interacciones genéticas con otros sugieran que participan en el control del desarrollo de la hoja, sin prestar, de momento, mayor atención a los que parezcan corresponder a funciones no relacionadas con el desarrollo, y (d) proceder a la clonación y caracterización estructural y funcional de alguno de ellos. De un total de 46.159 semillas M2 procedentes de 5.770 líneas parentales M1 mutagenizadas con EMS, se han obtenido 856 presuntos mutantes fértiles, así como otros 520 de 23.610 semillas M2 procedentes de 2.951 líneas parentales M, mutagenizadas con neutrones rápidos. Estamos retrocruzando todos los mutantes con la estirpe silvestre de la que derivan y comprobando la heredabilidad de sus fenotipos. Estamos sometiendo a análisis de complementación y de ligamiento a 63 de los mutantes obtenidos mediante neutrones rápidos y a 131 de los obtenidos mediante EMS.

Por último, hemos desarrollado un método que permite la visualización rápida y eficaz de los tejidos vasculares de la hoja sin necesidad de efectuar tinciones ni cortes histológicos. Haciendo uso de dicho método, estamos describiendo detalladamente los rasgos que definen la evolución temporal del patrón de venación de las ocho primeras hojas de la roseta basal en el ecotipo Landsberg *erecta*. Esta caracterización del desarrollo normal se tomará como referencia para establecer la anomalía de los mutantes que puedan obtenerse en una búsqueda que iniciaremos a continuación. Asimismo, con el fin de estudiar la posible existencia de variabilidad natural, estamos analizando el patrón de venación de las dos primeras hojas de 275 ecotipos pertenecientes a la colección del NASC.

## Análisis del desarrollo del embrión en maíz

V. Stiefel, R. Roca, E. Graziano, E. López y P. Puigdomenech

Departamento de Genética Molecular. C.I.D.-C.S.I.C.  
Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona.

El problema central en la biología del desarrollo de las plantas es el llegar a comprender el papel de los genes durante la morfogénesis. La morfogénesis ocurre durante tres fases en la vida de una planta con flor: 1) desarrollo embrionario, desde la fertilización hasta la madurez del embrión; 2) desarrollo post-embrionario de la planta, desde la germinación hasta la floración y meiosis; y 3) desarrollo del gametofito, desde la formación de las esporas hasta la producción de gametos. El período de la embriogénesis es particularmente interesante pues incluye el período durante el cual una única célula, el cigoto, se desarrolla para dar lugar a una estructura multicelular y bipolar con meristemos y primordios, el embrión.

El propósito de nuestro proyecto es llegar a comprender cuales son los fenómenos moleculares que controlan el desarrollo del embrión, cuales son las moléculas que coordinan las interacciones celulares y la expresión específica de los genes durante la embriogénesis. Para ello se están siguiendo dos aproximaciones distintas: 1. El estudio de mutantes de embriogénesis creados por transposición del elemento Ac. 2. La caracterización de genes específicos de la embriogénesis clonados mediante hibridaciones cruzadas con diferentes sondas de cDNAs.

Se han descrito una serie de mutantes que alteran la embriogénesis en el maíz. Estos mutantes son los denominados *dek* (defective kernel), que afectan tanto el desarrollo del embrión como el del endospermo; y los mutantes *emb* (embryo-specific) que alteran el desarrollo del embrión pero no el del endospermo. Estos mutantes son letales y están bloqueados en puntos muy específicos del desarrollo. Por ejemplo el mutante *dek1* está bloqueado en el estadio proembrión, *dek22* está bloqueado en el estadio de transición, *dek23* en la fase coleoptilar, y lo mismo sucede con los diferentes mutantes *emb* descritos. Estos resultados indican que la regulación genética de los diferentes procesos celulares cruciales en la morfogénesis, se pueden diseccionar mediante el análisis de mutantes. El análisis genético y morfológico de estos genes que desempeñan un papel esencial en la morfogénesis puede llevarse a cabo mediante el estudio de las mutaciones. Sin embargo, la caracterización molecular de estos loci requiere el aislamiento y clonaje de cada uno de estos genes de interés. Generalmente, esto puede llevarse a cabo mediante *transposon-tagging*.

Se dispone de varias familias de mutantes *dek* y *emb* creados por transposición del elemento Ac (colaboración con el laboratorio de Steve Dellaporta, Biology Department, Yale University). El elemento transponible Ac se ha utilizado como mutágeno con el objetivo de que los mutantes que resulten de esta mutagénesis puedan ser caracterizados a nivel molecular. Se han analizado a nivel molecular unas 200 familias de mutantes *dek* y unas 100 familias de mutantes *emb*. Entre las familias *dek* estudiadas, la presencia de un elemento Ac transpuesto corresponde con el fenotipo mutante en 2 de estas familias. A estos 2 tipos diferentes de mutantes se les ha denominado *dekA* y *dekB*. *dekA* está bloqueado en el estadio de transición de la embriogénesis y *dekB* está bloqueado en el estadio de proembrión. Utilizando enzimas de restricción que cortan fuera del elemento Ac, se generaron fragmentos de DNA que contenían el elemento Ac y las secuencias genómicas flanqueantes a éste. Se utilizó el Ac como sonda para clonar estos fragmentos. Se han secuenciado los clones genómicos salvajes correspondientes a *dekA* y *dekB*, no presentando homología



con ninguna secuencia existente en los bancos de datos. Se han realizado estudios de expresión con ambos genes y se ha visto que son muy específicos de unos estadios determinados de la embriogénesis temprana de maíz, teniendo ambos también una expresión basal durante la germinación de la semilla. Estudios de hibridación *in situ* muestran una expresión restringida al eje embrionario con el gen *dekB* y una expresión en el eje pero también en el endospermo con el gen *dekA*. Se han identificado y caracterizado además una colección de clones que presentan un patrón diferente de expresión en el embrión inmaduro y que resultan ser muy buenos marcadores del desarrollo embrionario tanto en individuos salvajes como mutantes.

## **Transformación y análisis funcional de plantas**



## Análisis de *Arabidopsis* transgénicas para el gen de la proteína de movimiento del tobamovirus del mosaico de la colza (ORMV)

I. Aguilar, D. Martínez-Herrera, F. Sánchez y F. Ponz

Laboratorio de Biología Molecular y Virología Vegetal. CIT-INIA. Autopista A-6, Km 7.  
28040 Madrid.

Después de que un virus ha sido introducido en el interior de una célula vegetal, y se ha replicado hasta alcanzar un título suficiente, se enfrenta al problema de dispersar la infección a células vecinas y sistémicamente. La caracterización del movimiento viral desde una célula infectada a sus vecinas ha recibido bastante atención en los últimos años. En muchos casos, se ha puesto de manifiesto el papel primordial que juega un producto génico viral característico (la proteína de movimiento, MP) en la mediación de este tipo de movimiento (a menudo referido como movimiento a corta distancia). Las características y funciones de esta proteína en varios géneros de virus es en la actualidad un área de intensa actividad investigadora.

Muchos de los fenómenos de resistencia de plantas a la infección por determinados virus, operan mediante un confinamiento del patógeno a la(s) célula(s) inicialmente infectada(s): el virus es capaz de replicarse, pero incapaz de moverse de una célula a la adyacente. La no funcionalidad de la MP viral de los virus así localizados, no parece ser la razón general del mismo, pues a menudo el mismo virus es capaz de establecer una infección sistémica en otro huésped. De esta situación cabe concluir que factores específicos de huéspedes determinados juegan también un importante papel en el establecimiento del movimiento a corta distancia. Desgraciadamente, el grado de caracterización de estos presuntos factores es prácticamente nulo.

Con el fin de estudiar el fenómeno de movimiento a corta distancia desde el punto de vista del huésped, el sistema modelo que estamos utilizando es *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh y el tobamovirus del mosaico de la colza (ORMV) capaz de infectar esta especie. Hemos obtenido plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con un cDNA correspondiente a la ORF de la proteína de movimiento de ORMV. Se transformaron raíces del ecotipo RLD de *Arabidopsis* con construcciones sentido y antisentido, y las plantas M1 se analizaron para la resistencia a kanamicina. Se obtuvieron para cada construcción distintas líneas que difieren en la dosis génica. El análisis molecular mediante hibridaciones tipo Southern reveló la presencia del transgen íntegro en todas las líneas, pero el análisis tipo Northern puso de manifiesto muy diversos grados de su expresión.

Estas plantas transgénicas han sido objeto de diferentes tipos de análisis en lo referente a su capacidad de interaccionar con varios virus vegetales, así como en algunas otras características fisiológicas. Los resultados obtenidos en estos análisis han puesto de manifiesto la utilidad de este material para ulteriores caracterizaciones moleculares del papel del huésped en el movimiento viral a corta distancia.

## Transformación y regeneración de plantas de guisante

G. Antón, J. P. Beltrán y L. Cañas.

*Departamento de Biología del Desarrollo. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (C.S.I.C.- U.P.V.). Campus de la Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n., 46022 Valencia. Telef.: (96) 3 87 78 70. Fax: (96) 3 87 78 59.*

El guisante (*Pisum sativum* L.) es una leguminosa de gran importancia desde el punto de vista agronómico ya que supone una importante fuente de proteínas para la nutrición animal y humana. La productividad y valor nutritivo del guisante podrían incrementarse mediante la introducción en su genoma de caracteres estables y hereditarios como la resistencia a determinadas plagas y enfermedades (inhibidor de  $\alpha$ -amilasa en semillas, tóxica para larvas de insectos; Shade *etal.*, *Biotechnology* 12: 793-796, 1994), resistencia a herbicidas (glufosinato; Schroeder *etal.*, *Plant Physiol.* 101: 751-757, 1993) y mejora de la calidad de sus proteínas de reserva en semillas (enriquecer en AAs azufrados Met + Cys; Tabe *et al.*, *Genética* 90: 181-200, 1993). Los últimos avances producidos en la ingeniería genética y en general en la biotecnología de plantas permiten plantear la consecución de dichos objetivos, conjugando las técnicas de biología molecular con las de regeneración de plantas *in vitro* para la obtención de plantas transgénicas. Nuestros objetivos a corto y medio plazo suponen la utilización de construcciones "sense / antisense" en plantas transgénicas de guisante (cvs. Alaska, Victoria y Greenfeast) para el seguimiento de la expresión de diferentes genes previamente clonados en nuestro laboratorio y relacionados con el desarrollo de los órganos reproductivos de la flor (p.e. lipoxigenasa de carpelo reprimida por GA3, genes homeóticos MADS que controlan morfogénesis floral, etc.). Actualmente, estamos produciendo plantas transgénicas de guisante regeneradas a partir de segmentos embrionarios, introduciendo en las mismas un gen quimérico (CaMv 35S-Bar~ que confiere resistencia a un herbicida (fosfotricina o glufosinato) y un gen marcador (Gus). En cualquier caso y si bien la eficacia de transformación no es muy elevada (2.5%), la integración de ambos genes en la planta es estable y la frecuencia de ambos caracteres en la primera generación sigue una distribución Mendeliana. La duración total del método es de unos 9 meses y en ningún caso se han observado alteraciones fenotípicas. El protocolo utilizado es el descrito por Schroeder *et al.* (1993) mediante el cocultivo de los explantados con *A. tumefaciens* AGL1 (con pVir). Los vectores usados son el pTAB 10 y el pTAB 16 (binarios) que portan el gen de la resistencia al herbicida glufosinato (Bar), el gen Gus, así como diferentes sitios de clonaje entre los bordes izquierdo y derecho del T- DNA de *A. tumefaciens*. La selección de las plantas transformadas se realiza introduciendo el herbicida en el medio de cultivo y la expresión del gen Bar en las plantas transgénicas se analiza mediante ensayos de actividad PAT (fosfotricin acetil transferasa). Especialmente importante es la fase de acondicionamiento al suelo de las plantas regeneradas, ya que esta fase es muy crítica para la obtención de plantas maduras que permitan el seguimiento de la expresión de los nuevos genes introducidos en la F1.

## Obtención de plantas transgénicas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) que sobreexpresan genes que se inducen en vegetales superiores, como respuesta a estrés salino

I Arrillaga<sup>1</sup>, C. Gisbert<sup>1</sup>, E. Sales<sup>1</sup>, J.A. Pintor-Toro<sup>2</sup>, L.Roig<sup>1</sup> y V. Moreno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. de Cultivos de Células Vegetales, Dpto. Biotecnología, IBMCP.  
Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, 46022, Valencia.

<sup>2</sup> Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Apartado 1052, 41080, Sevilla

La disminución de los recursos hídricos junto con la progresiva salinización de los suelos, hacen necesaria la aplicación de nuevas estrategias para obtener variedades capaces de crecer en estas condiciones. Los genes TAS14 (Godoy y col., 1994) y TSW12 (Torres-Schumann y col., 1992), se inducen, en vegetales superiores, como respuesta a estrés salino. Se pretende conocer si la sobreexpresión de estos genes, en el genoma de las plantas de tomate, puede mejorar la tolerancia a estrés en esta especie. En este trabajo se presentan los primeros resultados obtenidos en experimentos de transformación de dos variedades de tomate, UC82B y P73. Ambos genes se han introducido en UC82B y TSW12 solo en P73. La transformación se realizó utilizando el método de cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* siguiendo el protocolo descrito por Fillati y col. (1987) con algunas modificaciones, dependiendo de la variedad de tomate. Cotiledones de 8-10 días obtenidos en condiciones estériles, fueron cocultivados en presencia de *A. tumefaciens* LBA4404 que contenía el vector binario Bin19 con cada uno de los dos genes anteriormente citados (TAS14 o TSW12). El gen NPTII del vector facilitó la selección de transformantes en presencia de Kanamicina. La eficacia de selección, medida en porcentaje de cotiledones que produjeron tallos capaces de ser enraizados en presencia de kanamicina, fue semejante en ambas variedades y construcciones (3-5%). El número medio de tallos/cotiledón transformado fue, sin embargo, muy variable (1-20 tallos/cotiledón). En la actualidad, las plantas que, una vez analizadas, confirman la integración y expresión de los genes deseados, están siendo pasadas al invernadero para obtener la descendencia de autofecundación que, además de servir para confirmar la segregación de los genes, será utilizada posteriormente para los ensayos de tolerancia a estrés.

### Referencias

- Fillati J.A., Kiser J., Rose R., Comai L. 1987. *Biotechnology* 5: 726-730.  
Godoy J.A., Luna R., Torres-Schumann S., Moreno J., Rodrigo R.M., Pintor-Toro J.A. 1994. *Plant Mol. Biol.* 26:1 921 -1 934.  
Torres-Schumann S., Godoy J.A., Pintor-Toro J.A. 1992. *Plant Mol. Biol.* 18: 749757.

## **Plantas transgénicas en la defensa frente a plagas de insectos: Nuevos clones cDNA correspondientes a inhibidores de tripsina de cebada.**

*K. Gaddour, J. Vicente-Carbajosa, J. Royo y P. Carbonero.*

*Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Dpto. de Biotecnología. UPM  
E.T.S.I. Agrónomos. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid*

En cereales, se han descrito varias familias de proteínas inhibidoras de hidrolasas que pudieran jugar un papel de defensa frente a ataques de insectos fitófagos. Los inhibidores de tripsina y  $\alpha$ -amilasa pertenecen a una única familia multigénica. En trigo y cebada se han descrito alrededor de 20 miembros de esta familia; sus genes están dispersos en al menos 5 de los 7 grupos de homeología de estas *Triticeae*, carecen de intrones y las proteínas se sintetizan como precursores dotados de péptidos señal típicos.

La expresión transgénica de ciertos miembros de esta familia en tabaco tales como el inhibidor de  $\alpha$ -amilasa de trigo WMAI-1, del inhibidor de tripsina de cebada BTI-CMe aumenta la resistencia de estas plantas transgénicas frente a lepidópteros de los géneros *Agrotis* y *Spodoptera*.

Con vistas a su futura utilización en una estrategia integrada de defensa frente a plagas se han clonado nuevos cDNAs correspondientes a los inhibidores de tripsina BTI-CMc, BTI-CMe2.1 y BTI-CMe2.2. También se han caracterizado sus correspondientes promotores .

## Expresión del gen *chit42* de *Trichoderma harzianum* en plantas de tabaco.

I. García, L. C. Romero, T. Benítez<sup>1</sup> y J. A. Pintor Toro.

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla. CSIC.

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

*T. harzianum* es un hongo micoparásito utilizado como agente de control biológico contra hongos fitopatógenos. Uno de los mecanismos mediante el cual ejerce su acción es la producción de una serie de enzimas hidrolíticas (quitinasas, glucanasas y proteasas) que degradan la pared de los hongos a los que parasita. La quitinasa CHIT 42 se excreta al medio de cultivo en condiciones de micoparasitismo simulado, y es la única capaz de producir halos de lisis en paredes aisladas de *Botrytis cinerea*. Mediante experimentos de PCR a partir de secuencias de péptidos de la proteína CHIT42 purificada, se ha aislado y caracterizado el gen que la codifica. Se han realizado construcciones para expresar constitutivamente el gen *chit42* en plantas de tabaco con el objetivo de estudiar si esta quitinasa les confiere mayor resistencia a los ataques por hongos fitopatógenos.

Se han analizado las plantas transformadas con el cDNA CHIT42 completo, que incluye el péptido señal y la posible secuencia de activación. Asimismo se han obtenido plantas transgénicas que expresan la construcción del péptido señal de una proteína PR de tomate fusionado con la zona codificante correspondiente a la quitinasa CHIT42 procesada. Actualmente se están realizando ensayos funcionales para determinar el nivel de resistencia a fitopatógenos de las plantas transgénicas.



## Transformación genética de distintos cultivares de tomate con los genes de levadura HAL 1 y HAL 2

C. Gisbert <sup>1</sup>, I. Arrillaga <sup>1</sup>, I. Vila <sup>1</sup>, R. Serrano <sup>2</sup>, L. Roig <sup>1</sup> y V. Moreno <sup>1</sup>

Labs. de (1) "Cultivo in vitro de células vegetales" y (2) "Tolerancia a estrés salino".  
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universidad Politécnica de Valencia-  
C.S.I.C. C/Camino de Vera-14. 46022-Valencia

Se presentan los resultados preliminares de distintos experimentos de transformación genética en tomate con los genes de levadura HAL 1 y HAL 2. El modo de acción de estos genes es distinto - HAL 1 afecta a la modulación del transporte iónico (Gaxiola y cols. 1992) mientras que HAL 2 codifica una enzima, la 3' (2'),5'-bifosfato nucleotidasa, que participa en la ruta biosintética de la metionina (Murguía y cols. 1995) - pero ambos genes, por sobreexpresión, confluyen un alto nivel de tolerancia a la sal en levaduras. Nuestro objetivo es determinar si la sobreexpresión de estos genes en plantas transgénicas de tomate conduce a un incremento detectable de su tolerancia a la sal.

En los experimentos de transformación, realizados mediante la técnica del cocultivo de explantes primarios con *Agrobacterium tumefaciens*, se han utilizado como explantes primarios cotiledones de los cultivares p73, UC82B, Volvogradskij y el cultivar autóctono RP tipo Marmande.

En los primeros experimentos de transformación, realizados con la construcción portadora del gen HAL 2, empleamos todos los cultivares antes mencionados a fin de observar si existían diferencias en la susceptibilidad a esta cepa de *Agrobacterium* así como la influencia del potencial morfogénico de cada cultivar sobre la eficacia de selección y la tasa de transformación. Además, nos interesaba evaluar la existencia o no de efectos genotípicos sobre la tasa de escapes y, sobre todo, obtener colecciones de plantas transgénicas que permitieran determinar el efecto del gen HAL 2 en diferentes contextos genéticos de la misma especie. Observamos un importante efecto del cultivar en la eficacia de selección: 11 % en p73, 10 % en RP, 5 % en UC82B y 0,9 % en Volvogradskij. Estas diferencias no parecen deberse a la susceptibilidad frente a la infección sino, más bien, al potencial morfogénico intrínseco de cada cultivar.

En otros experimentos se infectaron cotiledones de p73 con la cepa portadora del gen HAL 1. Los resultados obtenidos fueron comparables a los anteriores.

Las plantas transgénicas (caracterizadas por PCR e hibridación Southern) se han pasado al invernadero para obtener sus descendencias, a fin de realizar con éstas los ensayos de tolerancia a la salinidad.

### Referencias

- Gaxiola R., Larrinoa., Vifalba J.M., Serrano R. 1992. EMBO J. 11: 3157-3164  
Murguía J.R., Bellés J.M., Serrano R. 1995. Science 267: 232-234.

**Expresión de genes foráneos en cotiledones de *Pinus nigra*, *P. radiata* y *P. pinea* mediante bombardeo de micropartículas.**

M. López<sup>1</sup>, J.M. Humara<sup>1,2</sup>, M.V. González<sup>3</sup>, M. Rey<sup>1,2</sup>, R. Tavazza<sup>4</sup>, G. Ancora<sup>4</sup>, R. Rodríguez<sup>1,2</sup>, y R.J. Ordás<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Lab. Fisiología Vegetal, Dept B.O.S., Universidad de Oviedo, c/ Catedrático Rodrigo Uría s/n, E-33071 Oviedo

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias-CSIC, E-33071 Oviedo

<sup>3</sup> Instituto de Experimentación y Promoción Agraria, Principado de Asturias, E-33300 Villaviciosa

<sup>4</sup> Div. Biochimica, Biofisica Biologia Molecolare, Sett. Biotecnol. e Agricolt., ENEA C.R. Casaccia, I-00060 S. Maria di Galeria, Roma, Italia

Nuestro grupo ha desarrollado protocolos eficientes para la expresión transitoria de genes en cotiledones aislados de tres especies de pino, *Pinus nigra* Arn. ssp. *salzmannii* (Dunal) Franco, *P. radiata* D. Don y *P. pinea* L., utilizando bombardeo de micropartículas (aparato Biolistic<sup>®</sup> PDS 1000/He, Bio-Rad). Hemos utilizado el plásmido pBI121.1 para establecer los parámetros de bombardeo óptimos para la expresión transitoria de genes foráneos, mediante ensayos histoquímicos de la  $\beta$ -glucuronidasa, realizados 24 h después del bombardeo. Aunque se ha obtenido expresión del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en todas las especies de pino estudiadas, los parámetros de bombardeo óptimos fueron diferentes para cada una. Los mejores resultados en *P. nigra* se obtuvieron utilizando partículas de oro de 1  $\mu\text{m}$  recubiertas con 0.8  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico por cada bombardeo, realizado a 650 psi de presión de helio y con 6 cm de recorrido de las micropartículas hasta los tejidos vegetales. En *P. pinea*, los mejores resultados se obtuvieron utilizando partículas de oro de 1  $\mu\text{m}$ , 0.8  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico, 900 psi y 6 cm. Por el contrario, en *P. radiata* se obtuvieron mejores resultados con partículas de oro de 1.6  $\mu\text{m}$ , 0.8  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico, 1100 psi y 6 cm. Además, cotiledones de *P. radiata* cultivados durante 8 días antes del bombardeo dieron mejores niveles de expresión transitoria del gen GUS que cotiledones más jóvenes. Una vez establecidos estos protocolos, hemos estudiado el efecto de diferentes promotores sobre la expresión del gen GUS en cotiledones de pino. Los promotores estudiados, además del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S), fueron los de los genes de la ubiquitina de girasol, la alcohol deshidrogenasa de maíz y la actina de arroz. El promotor del gen de la ubiquitina de girasol proporcionó los mejores niveles de expresión del gen GUS, tanto mediante ensayo histoquímico como fluorimétrico. Por otra parte, el uso de este promotor nos permitió observar expresión del gen GUS en cotiledones cultivados de *P. radiata*, hasta 20 días después del bombardeo. Dado que los protocolos descritos son perfectamente compatibles con sistemas eficientes de regeneración de plantas para las especies citadas, este estudio abre la posibilidad de obtener plantas de pino transgénicas.

## Expresión génica transitoria en protoplastos electroporados de *Pinus nigra* Arn.

M. López<sup>1</sup>, J.M. Humara<sup>1,2</sup>, M. Rey<sup>1,2</sup>, J.C. Pacheco<sup>1,2</sup>, R. Rodríguez<sup>1,2</sup>, R.J. Ordás<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Lab. Fisiología Vegetal, Dept B.O.S., Universidad de Oviedo, c/ Catedrático Rodrigo Uría s/n, E-33071 Oviedo

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias-CSIC, E-33071 Oviedo

Actualmente, es posible transferir y expresar genes foráneos en distintas especies de pináceas utilizando *Agrobacterium* u otras técnicas. Sin embargo, aún no se han conseguido regenerar plantas transgénicas, debido tanto a la carencia de sistemas eficientes y reproducibles de regeneración adventicia "in vitro", como a la existencia de escasos estudios sobre expresión génica en dichas plantas. Así, se está demostrando que los promotores normalmente utilizados en otras especies presentan una baja eficiencia de expresión en coníferas, como es el caso del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMv35S). Por ello, se precisa un estudio más profundo de la expresión génica diferencial en gimnospermas.

En este trabajo se pretende analizar la expresión del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) bajo el control de diferentes promotores en protoplastos de pino laricio (*Pinus nigra* Arn). Para ello, a partir de cotiledones procedentes de plantulas de 8 días de edad germinadas en condiciones asépticas, se ha puesto a punto la obtención, cultivo y transfección de protoplastos. La evaluación de las mejores condiciones de electroporación se ha realizado analizando la expresión transitoria del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) bajo el control del promotor del gen UbB1 de girasol (pCGU $\Delta$ 1, Binet et al. 1991), tras 24 h de cultivo.

### Referencias

Binet, M-N.; Weil, J-H & Tessier, L-H. (1991). Structure and expression of sunflower ubiquitin genes. Plant Mol. Biol. 17: 395-407.

## Papel de defensa en plantas de las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs)

A. Molina, A. Segura, M. Moreno y F. García-Olmedo.

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Departamento de Biotecnología. E.T.S. Ingenieros Agrónomos - UPM. 28040 Madrid.

Las plantas acumulan a menudo proteínas que son tóxicas o inhibitorias para sistemas heterólogos, tales como patógenos, predadores y plagas. Una familia de estas proteínas son las denominadas proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) que han sido implicadas recientemente en defensa (1-5). Las LTPs de plantas son polipeptidos de 90-95 aminoácidos que se han identificado (a nivel de proteína o ADN) en una gran variedad de tejidos de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas (6). Inicialmente se pensó que las LTPs estaban implicadas en la transferencia de lípidos entre distintos orgánulos (6,7) sin embargo, diversas líneas de evidencia ponen en duda dicha función.

Las propiedades antibióticas de las LTPs se descubrieron en el transcurso de una búsqueda de nuevas proteínas y genes de defensa, cuyo primer paso consistió en la purificación de proteínas a partir de preparaciones brutas de paredes celulares de diferentes especies vegetales (1-4). Cuatro proteínas (LTP2-LTP5) aisladas de hojas de cebada eran activas contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ( $EC_{50} = 1-3 \times 10^{-7}$  M) y sus secuencias eran homólogas a las de LTPs previamente caracterizadas (1,2). Estas proteínas también tenían actividad antibiótica contra otras bacterias y hongos fitopatógenos. Todas las LTPs estudiadas hasta el momento, incluidas las de maíz, espinaca, *Arabidopsis*, brócoli y rábano, poseen propiedades antibióticas (1-3,5,8). La toxicidad de las diferentes LTPs varía para cada patógeno, lo que indica la existencia de una cierta especificidad (2). Además, se ha observado variabilidad en la susceptibilidad de distintas cepas de una misma especie de patógeno frente a una proteína dada (9). Las LTPs y las tioninas actúan *in vitro* de forma aditiva contra *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, y sinérgicamente contra *Fusarium solani* (2).

Las LTPs están codificadas por familias multigénicas divergentes (1-4,10 y otras). En cebada se han identificado al menos seis genes que se expresan por toda la planta, preferencialmente en las epidermis de las superficies expuestas, en el tejido vascular y en el embrión (4). Una fracción substancial de estas proteínas se puede extraer de una hoja simplemente sumergiéndola en un tampón salino concentrado, lo que indica una localización externa (4). La distribución de otras LTPs en otras especies tales como *Arabidopsis* y brócoli es similar a la observada en cebada (8,11,12). Además, la concentración de las LTPs en estos tejidos es mayor que la requerida para la inhibición de patógenos *in vitro*. Por lo tanto, las LTPs parecen proporcionar a la planta un escudo protector de naturaleza proteica.

Los genes *Ltp* responden, como otros genes de defensa, de una manera compleja a estreses abióticos y bióticos. La expresión de los genes *Ltp* de cebada (especialmente *Ltp4*) aumenta en respuesta a la infección causada por los hongos *Erysiphe graminis* y *Rhynchosporium secalis*, y la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (4,9). Además, el tipo de respuesta observada es consistente con la función de defensa propuesta para las LTPs.

Se han obtenido plantas transgénicas homocigóticas de tabaco y *Arabidopsis* que expresan la LTP2 de cebada bajo el control del promotor constitutivo 35S de CaMV, y se ha ensayado su resistencia frente a patógenos bacterianos y fúngicos. En tabaco transgénico se observan reducciones significativas de síntomas para los siguientes patógenos: *P. syringae* pv. *tabaci*, *Phytophthora parasitica*, *Cercospora nicotianae*, y *Botrytis cinerea*.

Adicionalmente se ha observado un efecto sobre alimento consumido y peso/larva del insecto *Heliothis virescens*. Igualmente, en *Arabidopsis* transgénico, los síntomas causados por *P.syringae* pv. *tomato* mostraron una reducción significativa.

#### Referencias

1. Molina, A. and García-Olmedo, F. (1991) Patent Application P9101258 PCT/EP92/01 130
2. Molina, A., Segura, A. and García-Olmedo, F. (1993). FEBS Lett. 316, 119-122
3. Segura, A., Moreno, M: and García-Olmedo, F. (1993). FEBS Lett. 332, 243-246
4. Molina, A. García-Olmedo F. (1993). Plant J. 4, 983-991
5. Terras, F.R.G. *et al.*, (1992) Plant Physiol. 100, 1055-1058
6. Yamada, M. (1992) Plant Cell Physiol. 33, 1-6
7. Arondel, V. and Kada, J-C. (1990) Experientia 46, 579-585
8. Pyee, J., Yu, H. and Kolattukudy, P.E. (1994) Arch. Biochem. Biophys. 311,460-468
9. García-Olmedo *et al.* Field Crops Res. (en prensa)
10. Tsuboi, S. *et al.* (1991) J. Biochem. (Tokyo) 110, 823-831.
11. Sterk, P. *et al.* (1991) PLant Cell 3, 907-921
12. Thoma, S., Kaneko, Y. and Somerville, C. (1993) Plant J. 3, 427-436

## Mecanismos moleculares implicados en el control fotoperiódico de tuberización en plantas de patata

E. Monte, S. Jackson y S. Prat.

Dpto. de Genética Molecular. Centro de Investigación y Desarrollo, C.S.I.C.  
Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona. E-mail: spmgms@cid.csic.es

El proceso de tuberización está bajo fuerte control de factores ambientales como el fotoperíodo, la temperatura y el aporte de nitrógeno. De entre estos factores ambientales, el más importante y conocido con relación a su papel en la tuberización, es el fotoperíodo. La luz es un factor crítico para las plantas ya que además de proporcionar la energía suficiente para la fotosíntesis, es también la señal que éstas utilizan para adaptar y optimizar su desarrollo y crecimiento al medio ambiente. Un gran número de procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas superiores, tales como la germinación, la floración o la misma tuberización, están regulados por la luz. Los responsables de la percepción, interpretación y transducción de la señal luminosa son los fotorreceptores. De entre ellos, el más abundante y conocido es el fitocromo, o fotorreceptor de luz roja. La función fotosensora de este receptor se basa en su capacidad de conversión reversible entre 2 formas, una capaz de absorber luz roja (forma Pr o inactiva), y otra que absorbe luz del rojo lejano (forma Pfr o activa). Las respuestas inducidas por la forma Pfr biológicamente activa, pueden ser anuladas si la planta se expone a luz del rojo lejano inmediatamente después de la irradiación con luz roja. Muchas especies de patata, principalmente las variedades andinas, son estrictamente dependientes del fotoperíodo y sólo tuberizan en días cortos, con periodos de luz de 8h/día. Cuando estas variedades se someten a días largos, con periodos de luz de 16 h/día, no forman tubérculos. Tampoco tuberizan si se exponen a días cortos pero con una interrupción del período oscuro denominada *night break* (NB). La longitud de onda más efectiva para el NB es la luz roja, y su efecto inhibitorio sobre la tuberización puede revertirse si inmediatamente después la planta recibe luz del rojo lejano. Estos resultados son similares a los obtenidos en experimentos de floración y demuestran que es el fitocromo el receptor de luz implicado en el control fotoperiódico de tuberización. En la actualidad se conoce la existencia de dos tipos distintos de fitocromo (I y II) en el guisante, y de 5 genes (AE) que codifican para el fitocromo en *Arabidopsis*. En base a su patrón de expresión y estabilidad a la luz, se ha demostrado que el gen A de *Arabidopsis* corresponde a una forma inestable a la luz, mientras que los genes B-E corresponden a formas estables. Por otra parte, se ha clonado recientemente el fitocromo B de patata, el cual es un posible candidato a estar involucrado en la percepción del fotoperíodo debido a su estabilidad a la luz.

Con el propósito de determinar si el fitocromo B está implicado en la respuesta de las plantas de patata al fotoperíodo, se han transformado plantas de patata (*Solanum tuberosum ssp andigena*) con la construcción antisentido del fitocromo B. A diferencia de las plantas salvajes de *andigena*, variedad que requiere días cortos para tuberizar, las plantas transgénicas se comportan de modo independiente respecto del fotoperíodo. Así, estas plantas, con niveles muy reducidos de fitocromo B, tuberizan tanto en días cortos como en días largos. Estos resultados sugieren que el fitocromo B está implicado en la percepción del fotoperíodo y, por tanto, en el control de la tuberización. Los resultados obtenidos también indican que el efecto del fitocromo B sobre el proceso de formación de tubérculos es un efecto inhibitorio de la tuberización en condiciones no inductoras.

Si bien estos resultados demuestran la implicación del fitocromo en el control de respuestas fotoperiódicas como la tuberización, aún se desconoce el mecanismo por el cual la

planta de patata, en condiciones ambientales favorables, resulta inducida iniciando el proceso de formación de tubérculos. En 1956 se demostró la existencia de un estímulo transmisible inductor de tuberización, que se sintetiza en la hoja de la planta de patata en condiciones ambientales favorables. Los estudios actuales parecen indicar que esta señal inductora se podría tratar en realidad de un balance entre diferentes compuestos, algunos de ellos de tipo hormonal. Aunque algunas de las hormonas conocidas (como el ácido jasmónico o el ácido giberélico), parece que podrían estar implicadas en el proceso, aún no se conoce cual es el compuesto (o compuestos) directamente implicados en la inducción. Con el propósito de identificar y aislar genes implicados en la síntesis del estímulo inductor de tuberización, se han analizado los cambios en la expresión génica en hoja de plantas inducidas para tuberizar respecto de plantas no inducidas, mediante "RNA Display". Esta técnica ha permitido detectar y aislar genes diferencialmente expresados en la hoja de plantas inducidas para tuberizar. El patrón de expresión diferencial se ha comprobado posteriormente por northern blot. Los genes de interés se están actualmente identificando por secuenciación y búsqueda de homologías.

## Arginina descarboxilasa: regulación por estrés osmótico, localización intracelular y sobreexpresión inducible en plantas transgénicas

A.F. Tiburcio<sup>1</sup>, A. Borrell<sup>1</sup>, F. Culiáñez-Maciá<sup>2</sup>, T. Altabella<sup>1</sup>, C. Masgrau<sup>1</sup>, D. Flores<sup>1</sup>  
y R.T. Besford<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia, U.B., 08028-Barcelona.

<sup>2</sup> Inst. Biol. Mol. y Celular de Plantas, CSIC-UPV, 46022-Valencia.

<sup>3</sup> H.R.I. Littlehampton, West Sussex, BN 17 6LP, UK.

Desde hace tiempo, se sabe que la deshidratación producida por estrés osmótico o hídrico conduce a un aumento de los niveles de la diamina putrescina (1). El clonaje del gen que codifica el enzima biosintético arginina descarboxilasa (ADC) (2), y la obtención de anticuerpos específicos para ADC de avena (3,4), han permitido realizar estudios a nivel molecular. Cuando hojas de avena se incuban en la oscuridad en presencia de 0.6M de sorbitol se produce un aumento de los niveles de putrescina y de actividad ADC, que se traducen en una senescencia de la hoja. Dicho proceso es retrasado por la aplicación de espermina ya que preserva la integridad de los cloroplastos al estabilizar las membranas tilacoidales. Este efecto antisenescente de la espermina coincide con un descenso de los niveles de putrescina y de actividad ADC (3). Estudios realizados por northern y western blot revelan que el estrés osmótico incrementa los niveles de ADC a nivel del ARNm y de enzima-proteína, lo cual está de acuerdo con el aumento de actividad enzimática y acúmulo de putrescina. La regulación de la expresión de ADC por espermina se realiza a nivel post-traduccional ya que inhibe el paso de pre-proteína a proteína madura. La presencia de una única secuencia N-glicosilada en el lugar de procesamiento de ADC sugiere que la espermina pueda desempeñar alguna función en el reconocimiento de dicha secuencia (4). La disponibilidad de anticuerpos frente a ADC nos ha permitido realizar estudios de localización de la proteína. Mediante análisis por western y por técnicas inmunocitoquímicas, se ha demostrado que la ADC se distribuye fundamentalmente en hojas. Por fraccionamiento celular e inmunocitoquímica al microscopio electrónico, se ha comprobado que la ADC está localizada en los cloroplastos asociada principalmente a las membranas tilacoidales. Estos resultados nos han permitido proponer un modelo de compartimentalización de la ruta de biosíntesis de Arg y putrescina en tejidos fotosintéticos. La localización subcelular de la ADC en el cloroplasto tiene un gran interés evolutivo ya que permite explicar que (a) las plantas posean dos rutas alternativas de formación de putrescina, y (b) que los animales carezcan de la ruta ADC (5).

Con el objeto de estudiar los efectos de la sobreexpresión de la ADC se han producido plantas transgénicas de tabaco que contienen el gen que codifica la ADC de avena bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina (6). La transformación se realizó utilizando la técnica de la infección de discos de hoja con *Agrobacterium*. La selección de las plantas transgénicas se realizó a partir de la capacidad de resistencia a higromicina. La inserción del T-DNA en tabaco se confirmó por PCR y Southern. La modulación de la expresión del gen que codifica para la ADC de avena por la presencia de tetraciclina se demostró por northern. De las 36 plantas transgénicas obtenidas se demostró que en algunas de ellas la presencia de tetraciclina producía una importante sobreexpresión de los niveles de ARNm y de actividad enzimática, y un acúmulo de putrescina que se traducía en una inhibición del crecimiento de los meristemos aéreos y de raíz. Estos efectos negativos producidos por la sobreexpresión de ADC en tabaco eran similares a los observados en avena en respuesta a estrés osmótico. En la actualidad se están analizando los efectos en plantas Fl.



## Referencias

- (1) Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Galston AW (1990) In: Milfin BJ, Lea PJ, eds. *The Biochemistry of Plants*. Intermediary N metabolism. New York: Academic Press, Vol. 16, 283-325.
- (2) Bell E, Malmberg RL (1990) *Mol Gen Genet* 224:431-436.
- (3) Tiburcio AF, Besford RT, Capell T, Borrell A, Testillano PS, Risueño, MC (1994a) *J Exp Bot* 45: 1789-1800.
- (4) Tiburcio AF, Besford RT, Borrell A (1994b) *Biochem Soc Trans* 22: 455S
- (5) Borrell A, Culiñez-Maciá F, Altabella T, Besford RT, Flores D, Tiburcio AF (1995) *Plant Physiol* (In press).
- (6) Gatz C, Kaiser, A and Wenderburg R (1992) *Mol Gen Genet* 227:229-239.

## **Estrés Abiótico**



## Regulación de la expresión y posible función de una proteína cloroplástica inducida por desecación en *Craterostigma plantagineum*

J.M. Alamillo\*, F. Salamini y D. Bartels

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung. Carl von Linné Weg 10  
D-50829 Colonia. Alemania

\* E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Dpto. Biotecnología. Avda. Complutense sn. 28040 Madrid

Las plantas de resurrección son capaces de soportar períodos largos de sequía en los que pierden la mayor parte de su contenido en agua y se recuperan, sin daño aparente, una vez comienzan los períodos de lluvia. Por este motivo, estas plantas son extremadamente útiles para estudiar los mecanismos responsables de la tolerancia a la desecación. En nuestro grupo se están investigando las bases moleculares de la resistencia a la desecación usando para ello un miembro representativo de las plantas de resurrección, *Craterostigma plantagineum* (Scrophulariaceae), capaz de soportar pérdidas de su contenido en agua superiores al 90%, y recuperarse completamente del estado seco en tan sólo unas horas en contacto con el agua. La desecación conlleva la expresión diferencial de un elevado número de genes, cuyos productos se supone que protegen a la planta de los daños causados por la sequía. Muchos de estos genes se han clonado y caracterizado y su inducción puede provocarse mediante la aplicación exógena de ácido abscísico (ABA). En *Craterostigma*, la mayoría de estos genes codifican proteínas citosólicas que son homólogas a proteínas que se inducen en los últimos estadios del desarrollo de las semillas, las llamadas Lea (de "late embryogenesis abundant"). No obstante, tres de los genes clonados codifican proteínas cloroplásticas. Una de estas proteínas es homóloga a las denominadas Elips (de "early light induced proteins"), que son proteínas que se inducen rápidamente al exponer plantas etioladas a la luz, y también a una proteína del alga *Dunaliella* cuya síntesis se asocia con los procesos de carotenogénesis. El estrés hídrico y el ácido abscísico son factores importantes en la regulación de los genes que se inducen por sequía, sin embargo, en este estudio hemos demostrado que otros factores como son la presencia o ausencia de luz, y el estado de desarrollo de la planta juegan también un papel crucial en la regulación. De hecho, el estudio de la expresión de los genes de desecación en diversas condiciones nos ha llevado a concluir que su inducción no siempre está mediada por ácido abscísico. La regulación es extremadamente compleja en el caso concreto de la proteína con homología a las Elips. La expresión de este gen no sólo está regulada por la luz y por el desarrollo, sino que además se modula por relojes internos del tipo circadiano. Esta proteína está asociada *in vivo* a componentes de la membrana tilacoidal y hemos visto que en geles no desnaturalizantes aparece junto con los complejos pigmento-proteína de migración más rápida. Además, la inducción por ABA de esta proteína no tiene lugar cuando se protege la planta del estrés oxidativo mediante la adición de agentes reductores. Por otra parte, las condiciones que dan lugar a la acumulación de esta proteína también inducen un aumento en los niveles del pigmento zeaxantina, típicamente involucrado en la protección del aparato fotosintético frente a los fenómenos de fotoinhibición. Fraccionando los complejos pigmento-proteína del fotosistema II, hemos observado que la proteína de desecación aparece precisamente en las fracciones con mayor contenido en zeaxantina. Basándonos en estos resultados, sugerimos que esta proteína inducida por desecación funciona uniendo o estabilizando el pigmento zeaxantina para proteger a la planta de la fotoinhibición causada por la pérdida de agua.

**Expresión de sHSPs en semillas de girasol y en tejidos vegetativos de plantas de resurrección *Craterostigma plantagineum*: Correlaciones con la tolerancia a la desecación y posibles funciones.**

C. Almoguera, M.Coca, R. Carranco y J. Jordano

*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC. Apartado 1052. 41080 Sevilla*

Nuestro laboratorio, y otros grupos, han demostrado recientemente la expresión en semillas de determinadas "proteínas de choque térmico" (*small heat shock proteins*, sHSPs), durante la embriogénesis zigótica y a temperaturas normales de crecimiento (Coca *et al.*, 1994 y referencias citadas en dicho trabajo). Estas sHSPs pertenecen a dos grupos distintos (clase I y clase II), considerados como proteínas citoplásmicas. En el girasol, las sHSP embrionarias pueden distinguirse electroforéticamente de otras proteínas similares inducibles por calor, y presentan una distribución espacial característica (homogénea y abundante en todos los órganos) que se mantiene durante las fases de tolerancia a la desecación de la embriogénesis, y de la germinación (hasta 3 dpi). En tejidos vegetativos de plantas adultas de girasol (no tolerantes a la desecación) sólo se detectan sHSPs bien en respuesta al calor, o en respuesta a déficits de agua moderados (en ausencia de estrés térmico). Las proteínas inducidas en respuesta a déficit de agua (Almoguera *et al.*, 1993) son indistinguibles de las embrionarias, pero a diferencia de éstas presentan una distribución mucho más restringida y específica: están presentes sólo en tallos y raíces, y fundamentalmente en los meristemos laterales (cambium). Basándonos en estos resultados, hemos propuesto la existencia de sHSPs especializadas que, entre otras hipótesis, pudieran estar implicadas en la protección y adaptación, de las plantas a la desecación. En plantas normales, estas funciones se limitarían a determinadas fases del desarrollo embrionario y vegetativo. La persistencia de las sHSPs acumuladas en la semilla (e inducidas por desecación en tejidos vegetativos), comparable al menos a la descrita para las sHSPs inducidas por choque térmico, sugiere además la participación de estas proteínas en procesos de reparación de daños celulares ocasionados por la desecación. Las hipótesis de implicación funcional de determinadas sHSPs en la tolerancia a la desecación (Almoguera *et al.* 1993; Coca *et al.* 1994); han sido reforzadas recientemente por nuestro hallazgo, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Dorothea Bartels (Instituto Max Planck, Colonia), de sHSPs expresadas constitutivamente, abundantemente, y homogéneamente en tejidos vegetativos de la "planta de resurrección" *Craterostigma plantagineum* (Alamillo *et al.* en prensa). Esta especie tolera condiciones de desecación muy extremas durante todo su crecimiento vegetativo; y las sHSPs detectadas en condiciones normales de crecimiento están relacionadas inmunológicamente, y presentan una distribución parecida a la observada para las sHSPs presentes durante las fases tolerantes a la desecación de la embriogénesis zigótica en plantas no tolerantes. Más aún, en callos de *Craterostigma*, que no toleran la desecación a no ser que se les pretrate con ácido abscísico, la detección de sHSPs a temperaturas normales de crecimiento se puede corregir una vez más con su tolerancia a la desecación.

Sin embargo, los resultados de nuestros experimentos de sobreexpresión de una sHSP embrionaria de girasol de clase II (HSP17.9) en suspensiones celulares y plantas transgénicas de tabaco no son, hasta el momento, concluyentes. La expresión constitutiva de un único gen sHSP, a temperaturas normales de crecimiento, no parece tener grandes efectos sobre el crecimiento o la viabilidad celular en situaciones de estrés osmótico. Sin embargo, no podemos descartar completamente que dicha proteína realice funciones relacionadas

con la tolerancia a la desecación, aunque dichas funciones probablemente necesitan complementarse con las de otros genes para lograr efectos fenotípicos "evidentes". La búsqueda de otros efectos fenotípicos más sutiles pudiera ayudar a resolver el problema de la determinación de la función de HSP17.9. La caracterización molecular de plantas transgénicas de tabaco indican que, en ausencia de estrés, HSP17.9 se traduce muy eficientemente, pero de forma preferencial en tallos y raíces. La especificidad de órgano observada para la traducción de HSP17.9 en las plantas transgénicas estaría determinada por secuencias nucleotídicas en la región 5'-flanqueante y/o codificante del cDNA. Este resultado nos sugiere además que en plantas transgénicas, la búsqueda de efectos fenotípicos producidos por la sobreexpresión de HSP17.9 debiera dirigirse fundamentalmente a estos dos órganos. Muy posiblemente el diseño de nuevos experimentos para la búsqueda de otros efectos fenotípicos producidos por la sobre-expresión de HSP17.9 requiera la obtención de información adicional que puede ser crítica: por ej., la inmunolocalización de dicha proteína a nivel subcelular.

#### Referencias:

- Almoguera, C., Coca M. A. and Jordano J. "Tissue-specific expression of heat-shock proteins in response to water stress". *The Plant Journal* 4: 947-958. (1993).
- Coca M. A., Almoguera, C., and Jordano J. "Expression of sunflower low molecular weight heat shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implicationsn. *Plant Molecular Biology*. 5: 47-492 (1994).
- Alamillo, J., Almoguera, C., Bartels D., and Jordano J., "Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetatives tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineun-*. *Plant Molecular Biology*. *In press*. (1995).

## Caracterización molecular de dos genes de *Arabidopsis* cuya expresión se induce por temperaturas bajas y que codifican proteínas muy hidrófobas

J. Capel, J. A. Jarillo, J. M. Martínez-Zapater y J. Salinas

Area de Biología Molecular y Virología Vegetal, CIT-INIA, Carretera de la Coruña, Km. 7, 28040, Madrid

*Arabidopsis thaliana* incrementa su tolerancia a la congelación después de un período de exposición a temperaturas bajas (0-10°C), que se ha denominado proceso de aclimatación. Con el fin de avanzar en el conocimiento de las bases moleculares de este proceso, hemos caracterizado varios cDNAs correspondientes a genes cuya expresión se induce en respuesta a las temperaturas bajas. Se presentará la caracterización de dos de esos cDNAs, *RC12A* y *RC12B*. Las proteínas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de *RC12A* y *RC12B* predicen dos polipéptidos pequeños y muy similares, que son además muy hidrófobos. La comparación de las secuencias de *RC12A* y *RC12B* con todas las bases de secuencias de datos de secuencias aminoacídicas reveló que son similares a proteínas de gramíneas relacionadas con diferentes tipos de estrés abiótico. El análisis de su organización genómica indicó que *RC12A* y *RC12B* se encuentran duplicados en tandem. A pesar de su origen común, estos genes muestran diferencias en sus patrones de expresión. En plántulas etioladas, los mRNAs correspondientes a ambos genes se acumulan en respuesta a las bajas temperaturas de forma muy similar. Sin embargo, en plantas adultas, los mRNAs *RC12A* y *RC12B* se acumulan de forma diferencial en distintos órganos, tanto a temperatura ambiente como en respuesta a las bajas temperaturas. Los mensajeros de ambos genes se acumulan también en respuesta a tratamientos de estrés hídrico como de ABA. Experimentos con líneas ABA-deficientes e -insensibles indica que la acumulación de los mRNAs de los genes *RC12* en respuesta a las temperaturas bajas está regulada por vías de transmisión de señales ABA-dependientes e -independientes. También se discutirá la posible función de esos genes en el incremento de tolerancia a la congelación.

## **Inducción por herida y estrés físico de la actividad GUS bajo el control del promotor del gen ACO1 (1-aminociclopropano-carboxilato oxidasa) en hojas y epicotilos de petunia**

*L. Gómez-Gómez y W. R. Woodson.*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de C. Biológicas, Universidad de Valencia, Dr Moliner 50 46100 Burjasot*  
*Department of Horticulture, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907-1165*

La producción de etileno en tejidos vegetativos es normalmente baja, pero puede incrementarse mediante diversos estímulos, incluyendo herida y IAA. En muchos casos, el incremento en la producción de etileno está asociado a un incremento en los niveles de transcritos y en la actividad de la ACCsintasa. Sin embargo, hay evidencias de que cambios en los niveles de actividad de la ACCoxidasa contribuyen al incremento global de la velocidad de producción de etileno generado por herida o estrés mecánico.

En petunia, la ACCoxidasa está representada por una familia génica de cuatro genes, tres de ellos son activos: ACO1, ACO3 y ACO4, mientras que el gen ACO2 es inactivo. Estos genes están sujetos a una regulación diferencial. Con objeto de conocer el patrón de expresión espacial y temporal en hojas y semillas en crecimiento sometidas a estrés mecánico y físico, se construyó un gen quimérico portador del promotor completo del gen ACO1, asociado al gen marcador  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS), y esta construcción fue empleada para la transformación de plantas de petunia.

Las hojas y semillas en crecimiento intactas, sólo producen cantidades traza de etileno. En respuesta al choque mecánico o a herida, las hojas de petunia responden con un incremento importante en la producción de etileno a la hora de producirse la herida, sufriendo una caída y una posterior recuperación, alcanzándose un máximo a las 24 horas. Esta evolución en la producción de etileno está relacionada directamente con los cambios en la actividad GUS, que se detecta a los 30 minutos de producirse la herida, y alcanza su valor máximo a las 24 horas. Al cabo de una hora de producirse la herida sólo en una región de la hoja, se observa que la expresión del gen GUS es homogénea en toda la hoja, no sólo en la parte afectada, lo que indica la existencia de una respuesta sistémica a la herida. Esta inducción de la actividad GUS por herida no se ve inhibida por la aplicación de NBD, sino que se ve incrementada.

Debido a que las semillas germinan bajo condiciones de estrés físico, con el objeto de conocer la relación de la actividad de la ACCoxidasa en la producción del etileno generado durante este proceso, se crecieron semillas de petunia en la oscuridad en presencia de una barrera mecánica. La presencia de esta barrera produce un incremento en la actividad GUS, que perdura y se incrementa mientras dicha barrera persiste. La actividad GUS se localiza a nivel de la plúmula, lo cual está de acuerdo con la producción de más del 90% de etileno en esta región, medido en otras especies.



## Aislamiento de secuencias de DNA hipervariables en centeno a través de la técnica de cultivo *in vitro*

R. Linacero, J.J. Muñoz y A.M. Vázquez

*Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense . Madrid.*

El cultivo *in vitro* en vegetales puede inducir mutaciones siendo el centeno (*Secale cereale* L.) una de las especies en que se ha descrito una mayor frecuencia de mutación (Linacero y Vázquez 1993). En el presente trabajo se aislan mediante la técnica de RAPDs algunas de las secuencias implicadas en estos cambios.

Se estudió el patrón de RAPDs, utilizando 60 cebadores (10mers), en 23 plantas regeneradas a partir de inflorescencias inmaduras de dos cultivares. De estos cebadores se seleccionaron 30, 10 de los cuales amplificaban bandas polimórficas. Se analizaron 180 bandas y 11 (6%) fueron polimórficas. Los fragmentos polimórficos se usaron como sondas y se comprobó mediante los correspondientes Southern que, bandas polimórficas amplificadas con el mismo cebador aparecidas en diferentes plantas y en diferentes cultivares, correspondían a la misma secuencia.

Cien plantas regeneradas a partir de embrión inmaduro de dos cultivares se utilizaron para comprobar si los cebadores que originaban bandas polimórficas en las plantas obtenidas a partir de inflorescencias también lo hacían en plantas regeneradas de otro origen. Hemos estudiado cinco cebadores (OpF: 02,13,17 y 20), que de nuevo originaron polimorfismos. Se comprobó, mediante Southern, que las bandas diferenciales correspondían a las mismas secuencias anteriormente encontradas.

Por tanto podemos concluir que en el centeno parecen existir regiones de DNA con alta frecuencia de cambio en las condiciones *in vitro* puesto que se modifican en diferentes plantas con independencia del explante de origen o del cultivar.

Las bandas variables se clonaron y se determinó su número de copias en el genoma del centeno: corresponden a secuencias únicas, baja, moderada o altamente repetidas. El análisis de estas secuencias reveló algunas homologías con otras anteriormente descritas en otras especies. El clon OpF13 presenta una región interna de 48pb con más de un 70% de homología con la región MOR76 V-J (región Ig kappa) de un hibridoma de ratón. Esta región contiene el *loop* L1 hipervariable. En el caso del clon OpF17 restringiendo el análisis de la secuencia a los extremos de la banda (30pb) encontramos homologías, (82-96%) con diferentes clones humanos y de *Caenorhabditis* de función desconocida.

Para verificar si estas secuencias hipervariables de centeno se encuentran presentes en otros organismos se fabricaron cebadores (19-20-mers) de las zonas teóricamente homólogas. Estos cebadores se utilizaron para amplificar mediante PCR en condiciones restrictivas, no de RAPDs, DNAs de diferentes especies incluyendo mamíferos, peces, insectos y plantas. En todos los casos aparecieron un considerable número de bandas amplificadas, lo que parece indicar que estas secuencias se encuentran representadas en el genoma de numerosos organismos.

## Estudio de la interacción de la dehidrina TAS14 con macromoléculas

R. Luna, J.A. Godoy, S. Barroso, O. del Pozo y J.A. Pintor-Toro

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. C.S.I.C. Avda. Reina Mercedes, s/n. Apartado de Correos 1052. 41080-Sevilla.

La proteína TAS14 se acumula en tomate (*Lycopersicon esculentum*), por estrés salino, osmótico y por adición exógena de ácido abscísico. Esta proteína presenta dos repeticiones del dominio rico en lisina conservado en todas las dehidrinas, así como otras características típicas de este grupo de proteínas, como por ejemplo un *cluster* de serinas que contiene la secuencia consenso para la fosforilación por caseína quinasa II. Además, en su secuencia se encuentran motivos ricos en aminoácidos básicos que presentan gran homología con las secuencias de localización nuclear descritas en proteínas nucleares.

En estudios previos se ha localizado la proteína TAS14 en el citoplasma y en el núcleo, fundamentalmente asociada a eucromatina y nucleolo. También se ha determinado que esta proteína se fosforila *in vitro* con caseína quinasa II y proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.

Se ha sugerido que el dominio conservado de las dehidrinas tiene una estructura de helice anfipática, y que podría estar implicada en la formación de complejos supramoleculares. Teniendo en cuenta la localización y características estructurales de la proteína TAS14, en el presente trabajo se ha estudiado la posible interacción de esta proteína con ADN y/o proteínas. Mediante ensayos de retardación de ADN en geles de poliacrilamida se ha determinado que la proteína TAS14 no se une de forma específica a ADN. Para el estudio de la interacción con proteínas se han seguido diferentes estrategias.

Se ha analizado el estado de agregación de la proteína TAS14, mediante cromatografía de filtración en gel y ensayos con agentes de entrecruzamiento. Así mismo, se ha estudiado la interacción de la proteína TAS14 con otras proteínas mediante cromatografía de afinidad, coimmunoprecipitación y experimentos de *ligand blot*. Los resultados obtenidos parecen indicar que la proteína TAS14 interacciona con otros polipéptidos. Actualmente se están realizando diversos estudios para conocer la identidad de estas proteínas.

## Aislamiento y caracterización de un mutante de *Arabidopsis* afectado en su capacidad de tolerancia a la helada

F. Llorente, J.M. Martínez-Zapater y J. Salinas

Laboratorio de Biología Molecular y Virología Vegetal. CIT-INIA, Ctra. de la Coruña Km.7, 28040, Madrid.

Uno de los factores principales que limitan la producción de los cultivos en el mundo son las bajas temperaturas y las heladas fuera de temporada. Estos efectos varían mucho entre las distintas especies. La mayoría de las plantas resistentes a las temperaturas de congelación tras un período previo a temperaturas bajas, llamado aclimatación, aumentan su capacidad de resistencia a las heladas. Aunque mediante técnicas moleculares se han identificado distintos genes cuya expresión se induce durante la exposición a temperaturas bajas, no se ha podido demostrar en ningún caso la implicación de dichos genes en el desarrollo de tolerancia a la helada. *Arabidopsis thaliana* es una especie resistente a la helada que presenta capacidad de aclimatación.

Con el fin de identificar genes que se requieren en el proceso de aclimatación de *Arabidopsis*, hemos iniciado la identificación de mutantes afectados en su capacidad para tolerar temperaturas de congelación. De esta manera pretendemos aislar loci implicados, y a partir de su identificación posicional en el genoma de *Arabidopsis* sentar las bases para su futuro clonaje. Mediante el análisis de poblaciones mutagenizadas con EMS hemos identificado mutantes afectados en la tolerancia a la congelación. En el presente trabajo presentamos la caracterización genética, morfológica y fisiológica de una de estas líneas mutantes, denominada "155". A nivel genético esta línea está provocada por una mutación puntual de carácter recesivo que parece estar ligada a marcadores moleculares localizados en el cromosoma 1. Esta mutación, además de provocar una disminución en la capacidad de aclimatar, disminuye la capacidad intrínseca de la planta para resistir la congelación. A nivel morfológico, provoca que las plantas sean más pequeñas que las de genotipo silvestre y que las hojas sean de un color verde más oscuro, así mismo desarrolla un mayor desarrollo radicular. A nivel fisiológico, las plantas mutantes son sensibles a la deshidratación y muestran, en condiciones normales, síntomas de marchitez, lo que podría indicar que el mutante "155" se encuentra afectado en su capacidad para resistir temperaturas de congelación por tener disminuida su capacidad para retener agua. En la presente comunicación se presentarán estos resultados y se discutirá la implicación de este mutante en la resistencia a las temperaturas de congelación.

## Caracterización de dos enzimas inducibles por deficiencia de fosfato en *Arabidopsis thaliana*

C. del Pozol<sup>1,2</sup>, J. Iglesias<sup>1</sup>, C. Avilal,<sup>1</sup> Allona<sup>3</sup>, C. Aragoncillo<sup>3</sup>, A. de la Peña<sup>2</sup>, J. Paz-Ares<sup>1</sup> y A. Leyva<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro Nacional de Biotecnología-CSIC; Campus de Cantoblanco, 28049-Madrid. <sup>2</sup>Facultad de Biología-UCM, Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid. <sup>3</sup>E.T.S.I.Montes-UPM, Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid.

Las plantas, así como otros organismos que obtienen sus nutrientes del suelo, han desarrollado sistemas de respuesta que les permiten adaptar su crecimiento a suelos pobres en nutrientes. Así, cuando el contenido en fosfato es limitante, se inducen un conjunto de genes que codifican por ejemplo enzimas movilizadoras de fosfato (fosfatasas y RNasas) y proteínas transportadoras de fosfato, que incrementan su absorción por las raíces. Además, esta respuesta va acompañada de alteraciones en el programa de desarrollo como por ejemplo el incremento del sistema radicular.

En esta comunicación se describe la purificación de dos enzimas, una RNasa y una fosfatasa, que se inducen en respuesta a ayuno de fosfato y la caracterización de sus correspondientes cDNAs. Así mismo, se muestra que estos genes también se inducen en respuesta a otros tipos de estrés y por ABA, mientras que otros genes, como el de un (posible) transportador de fosfato, se induce específicamente por ayuno de fosfato. La existencia de dos respuestas, una general, posiblemente mediada por ABA, y otra más específica, es una característica común de los sistemas de adaptación de las plantas a diferentes tipos de estrés.

## Aislamiento y caracterización de mutantes halotolerantes en *Arabidopsis thaliana*

V. Quesada, A. Contreras y J.L. Micol

División de Genética. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad de Alicante.  
Campus de San Juan. 03080 Alicante.

Tres de los mecanismos de adaptación al estrés salino que se conocen en especies vegetales implican complejas interacciones y son, por tanto, de difícil disección molecular: algunos aspectos del desarrollo (por ejemplo, el momento de la floración), determinadas características estructurales (como la permeabilidad de la superficie de la hoja) y ciertos procesos fisiológicos (como la compartimentación de iones en vacuolas). Sólo un cuarto recurso adaptativo, el de las respuestas metabólicas (como las modificaciones del metabolismo fotosintético o la acumulación de sustancias osmoprotectoras) parece implicar un número menor de productos génicos y, en consecuencia, ser susceptible de ser abordado con perspectivas de éxito a medio plazo.

En la última década se han puesto en marcha diferentes estudios encaminados a la comprensión de la halotolerancia en las plantas por la vía de la identificación de los genes implicados en su control. Una de tales aproximaciones experimentales parte del aislamiento de proteínas vegetales cuya síntesis sea inducida por el incremento de la salinidad del medio. Una segunda aproximación consiste en el estudio de los genes que intervienen en el metabolismo de determinadas sustancias osmoprotectoras, cuya acumulación se ha observado en plantas que toleran niveles altos de sales en su entorno. Otro procedimiento es la identificación de genes implicados en la halotolerancia en organismos unicelulares, con el fin de transferirlos a plantas o intentar hallar en éstas a sus homólogos. La cuarta aproximación consiste en la obtención de plantas mutantes capaces de sobrevivir en condiciones de salinidad intolerables para las estirpes silvestres. Con el objetivo de identificar funciones relacionadas con la respuesta a estrés salino en *Arabidopsis thaliana*, estamos siguiendo una aproximación genética basada en el aislamiento y caracterización de mutantes halotolerantes. Hemos llevado a cabo una búsqueda de mutantes mediante selección en medio GM en presencia de NaCl 250 mM. En estas condiciones no se observa germinación de los ecotipos Landsberg erecta, Columbia y Wassilewskija. Hemos sometido a selección 100.000 semillas M2 (correspondientes a 13.180 líneas parentales M1) derivadas de mutagénesis con EMS del ecotipo Landsberg erecta, 20.000 semillas M2 (correspondientes a 2.600 líneas parentales M1) derivadas de mutagénesis mediante bombardeo con neutrones rápidos del ecotipo Landsberg erecta, 90.000 semillas M3 (correspondientes a 4.900 líneas parentales M1) derivadas de la mutagénesis con ADN-T del ecotipo Wassilewskija, 363.000 semillas M2 (correspondientes a 45.452 líneas parentales M1) derivadas de mutagénesis con neutrones rápidos del ecotipo Columbia, y 45.000 semillas F5 (correspondientes a 186 líneas F4) derivadas de mutagénesis con el sistema *Ac/Ds* del ecotipo Landsberg erecta. Hasta el momento se ha confirmado la halotolerancia en 23 líneas mutantes, que están siendo estudiadas con respecto al modo de herencia de su capacidad de germinar en NaCl 250 mM y a su pertenencia a grupos de complementación. Hemos estudiado la capacidad de germinación en presencia de NaCl de 102 ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, constatando una gran variabilidad natural. Los ecotipos más tolerantes a la salinidad están siendo cruzados por los más sensibles con el fin de intentar establecer en su F3 el número de genes de los que depende cada uno de los dos fenotipos.

## Expresión de genes asociados al estrés por frío en frutos de mandarina "Fortune"

M.T. Sanchez-Ballesta<sup>1</sup>, J.M. Alonso<sup>2</sup>, M.T. Lafuente<sup>1</sup>, L. Zacarias<sup>1</sup> y A. Granell<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). Polígono de la Coma s/n,  
46980 Paterna

<sup>2</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Camino de Vera s/n,  
46020 Valencia

Diversas variedades de frutos cítricos pueden soportar períodos prolongados de almacenamiento a bajas temperaturas (en el rango de 1-10 °C) sin sufrir daños. Existen en cambio variedades sensibles al frío, como la "Fortune" que experimenta la aparición de manchas necróticas cuando se somete a 2 °C durante períodos de tiempo superiores a 10 días. El almacenamiento durante 3 días a 37 °C (curado) de los frutos de esta variedad reduce considerablemente la aparición de estas alteraciones durante la posterior conservación en frío.

Se desconoce cuales son las bases de la susceptibilidad o resistencia de las diferentes variedades al almacenamiento por frío, ni cual es el mecanismo por el que actúan los procedimientos de curado. Para intentar entender estos procesos hemos iniciado un estudio que nos permitira: (1) Averiguar si las alteraciones fenotípicas (manchado) van acompañadas de cambios en la expresión génica, así como la naturaleza de dichos cambios y (2) el efecto del curado sobre los mismos.

Para ello hemos estudiado por electroforesis bidimensional, los cambios en el patrón de los productos de traducción *in vitro* de las poblaciones de polyA<sup>+</sup> correspondientes a frutos en diferentes condiciones de almacenamiento/curado. Hemos podido observar que ambos procesos producen cambios en los niveles de ciertos polipéptidos/mRNAs. Basados en estos resultados hemos construido una genoteca de cDNA correspondiente a frutos almacenados a 2 °C y otra de frutos previamente acondicionados. Dichas genotecas han sido sometidas a escrutinio diferencial con objeto de aislar mRNAs específicamente inducidos o reprimidos durante el proceso de almacenamiento. En esta comunicación se presentarán y analizarán los patrones de expresión de diferentes mRNAs aislados. También se presentarán los resultados de los análisis de expresión de ciertos mRNA del flavedo de los cítricos cuyos niveles se sabe son constitutivos en unos casos o que se inducen durante la maduración natural del fruto en otros.

## Identificación y caracterización de genes inducibles por frío en *Arabidopsis*

E. Santos, F. Llorente, J Salinas y J.M. Martínez-Zapater

Laboratorio de Biología Molecular y Virología. C.I.T. I.N.I.A. Ctra. de la Coruña km 7, 28040, Madrid.

*Arabidopsis* desarrolla tolerancia a la congelación cuando se expone a temperaturas bajas por encima de cero grados, en un proceso que se denomina aclimatación. Este proceso está asociado a numerosos cambios metabólicos, bioquímicos y moleculares. Con el fin de conocer los mecanismos moleculares implicados en este proceso, a partir de una genoteca sustraída de cDNA de plántulas de *A. thaliana* etioladas y aclimatadas, se han aislado cuatro cDNAs correspondientes a genes cuya expresión se induce por temperaturas bajas. Estos cDNAs han sido denominados genéricamente como RCIs (Rare Cold Inducible) ya que se detectan fundamentalmente en preparaciones de RNAm poli A<sup>+</sup>. Su secuenciación ha puesto de manifiesto que uno de ellos, el RCI 3A, presenta una elevada homología con dos genes que codifican peroxidasas de tomate. Este resultado es interesante si se tiene en cuenta que otros autores han descrito la existencia de una relación directa entre el daño causado por el frío y la fotooxidación, de forma que las especies o variedades resistentes al frío disponen de sistemas antioxidantes más eficientes que las sensibles. El resto de los clones secuenciados, RCI 4A, RCI 5A y RCI 6A no muestran similitud con ninguna de las secuencias presentes en las bases de datos. En plántulas etioladas expuestas a 4°C, los genes RCI 3A y RCI 4A aumentan su expresión rápidamente, alcanzando el punto máximo a las 24 horas, momento a partir del cual disminuye gradualmente. En esta comunicación se presentará el estudio de los patrones de expresión de los cuatro genes, bajo condiciones normales y de estrés en distintos tejidos durante el desarrollo, y se discutirá su posible implicación en la resistencia a la helada de *Arabidopsis*.

## La respuesta frente a herida en *Arabidopsis thaliana*: aislamiento de genes inducibles y caracterización de la vía de transducción de señal.

E. Titarenko, E. Rojo y J. J. Sánchez Serrano.

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), UAM, Cantoblanco, Madrid 28049

La respuesta de las plantas frente al daño mecánico incluye la inducción transcripcional de una serie de genes y la síntesis de nuevas proteínas como los inhibidores de proteinasas. Un modelo para la vía de transducción de señal de herida, desarrollado a partir de datos obtenidos en patata y tomate, sugiere que la síntesis *de novo* de ácido jasmónico (JA) es requerida para la inducción de estos genes. Las señales que activan la inducción génica en respuesta al aumento de la concentración de JA no se conocen. Para sacar partido de las ventajas de trabajar con *Arabidopsis* y comprobar si son válidos los modelos desarrollados, hemos comenzado el aislamiento de genes inducidos por JA y herida en esta planta. Utilizando la técnica del differential display hemos aislado 8 clones inducibles por herida o JA. Todos los clones inducibles por JA son inducibles por herida pero algunos clones inducibles por herida no lo son por JA, lo que indicaría una bifurcación de la señal de herida. Los patrones temporal y espacial de inducción de estos clones en respuesta a herida son diferentes. Unos alcanzan el máximo de inducción en tiempos muy cortos (2 horas) retornando al nivel basal a las 8 horas, mientras otros mantienen su expresión a las 48 horas. Además, mientras algunos se inducen sólo localmente, otros alcanzan su mayor nivel de inducción en tejido sistémico. Estamos usando estos clones para estudiar la transducción de la señal de herida. En patata y tomate se ha demostrado que el ácido abscísico (ABA) interviene en la cadena de transducción que conecta la herida con el aumento de los niveles endógenos de JA. En *Arabidopsis* hemos visto que al menos dos de los genes inducibles por JA lo son también por ABA. Estamos estudiando la respuesta de los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la síntesis de ABA para comprobar la participación de esta hormona en el control de los niveles de JA en *Arabidopsis* heridas. Se está realizando una aproximación bioquímica para determinar como el aumento de los niveles endógenos de JA en plantas heridas provoca la activación transcripcional de los genes caracterizados. Hemos identificado un paso de esta vía que implica la fosforilación-defosforilación de una proteína en un residuo serina-treonina. Con la información que obtengamos pretendemos aislar componentes de esta vía, ya sea por homología con los de otros sistemas o por rastreo de mutantes.





## **Estrés Biótico**



## **Purificación, clonaje, actividad antifúngica y posible mecanismo catalítico de Ch3, una endoquitinasa de la clase Ib mayoritaria en las semillas del castaño europeo**

I Allona, C Collada, L Gómez, R Casado, J Paz-Ares<sup>1</sup> y C Aragoncillo

Departamento de Biotecnología, ETSI Montes, UPM, 28040 Madrid

<sup>1</sup>Centro Nacional de Biotecnología, Cantoblanco, Madrid

En la semilla del castaño europeo, *Castanea sativa* Mill, se acumulan constitutivamente enzimas capaces de degradar paredes fúngicas y/o bacterianas, tales como quitinasas y glucanasas [1]. Estas proteínas forman parte de un complejo sistema defensivo que protege a las semillas frente al posible ataque de organismos fitopatógenos, particularmente durante el proceso de germinación. En tejidos vegetativos se han descrito sistemas análogos inducibles por infección o tratamiento con elicitores o etileno [2].

En un trabajo previo se han descrito tres quitinasas constitutivas (Ch1, Ch2 y Ch3) en las semillas de *C. sativa* [1]. Se trata de proteínas abundantes de 25-32 kD y puntos isoeléctricos entre 8 y 9,5. Los datos obtenidos sobre Ch1 y Ch2 indican que ambas proteínas son endoquitinasas de la clase II. En esta comunicación se presenta la purificación y caracterización de Ch3, una endoquitinasa típica de la clase I. Ch3 tiene un dominio rico en cisteína responsable de su unión a quitina (dominio heveína), y un dominio carboxiterminal, de mayor tamaño, responsable de su actividad catalítica.

La obtención de un clon cDNA correspondiente a Ch3 revela que esta proteína se sintetiza como un precursor con una extensión amino terminal cuyas características coinciden con las de un típico péptido señal. Tras su paso por el sistema secretor es muy probable que Ch3 se acumule extracelularmente, al carecer su estructura primaria de señales de localización vacuolar. Estas características convierten a Ch3 en la primera endoquitinasa de la clase Ib descrita en *C. sativa*.

La expresión heteróloga de Ch3 en *E.coli* BL21(DE3) nos ha permitido confirmar su actividad endoquitinasa *in vitro*, utilizando como sustrato un derivado coloreado de quitina (CM-quitina RBV, Loewe). Análogamente, hemos comprobado el efecto inhibitorio de Ch3 sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Trichoderma viride* y *Fusarium solani*. Por otra parte, Ch3 presenta actividad lisozima cuando se ensaya con células de *Micrococcus lysodeikticus*.

La secuencia completa de aminoácidos de Ch3, deducida del correspondiente cDNA, nos ha permitido modelar su estructura tridimensional, utilizando como patrón la quitinasa de cebada Horv2, el único miembro de esta familia para el que existen datos cristalográficos [3]. Para el modelo inicial se empleó la utilidad ProMod dentro del programa Swiss-Model [4], refinándose después la estructura global mediante varios ciclos de minimización con el programa CHARMM. La comparación del modelo obtenido para Ch3 con la estructura tridimensional de varias lisozimas de mamíferos y fagos apoya la existencia de una conexión evolutiva entre quitinasas y lisozimas, propuesta inicialmente por Holms y Sander [5].

Por otra parte, la similitud estructural entre ambos tipos de enzimas, unida al hecho de que algunas endoquitinasas tengan actividad lisozima, como Ch3, nos han llevado a proponer un posible mecanismo catalítico para la hidrólisis de quitina (datos sin publicar). Esta hipótesis está basada, en buena medida, en la extensa información disponible en el caso de la lisozima y en el hecho de que ambos enzimas hidrolizan enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 [6]. Para investigar la validez del mecanismo propuesto se han generado mediante mutagénesis dirigida varias formas de Ch3 con alteraciones en su hipotético centro activo. El clo-

naje y la expresión en *E. coli* de estas fornas mutantes, que se está realizando en la actualidad, permitirán identificar los residuos directamente implicados en el mecanismo catalítico de Ch3 y contribuirán a definir con más precisión el potencial biotecnológico de esta familia de proteínas antifitopatogénicas.

#### Referencias

- [1] Collada et al. (1992) *Plant Physiol.* 100, 778-783.
- [2] Lamb et al. (1989) *Cell* 56, 215-224. [3] Hart et al. (1995) *J. Mol. Biol.* 246, 402-413.
- [4] Peitsch (1995) *Bio/Technology* 13, 658-660.
- [5] Holms & Sander (1994) *FEBS Lett.* 340, 129-132.
- [6] Stryer (1995) *Biochemistry*, WH Freeman, NY.

## Aislamiento, caracterización y análisis funcional de un gen constitutivo de quitinasa de patata

G. Ancillo, E. Hoegen, B. Witte y E. Kombrink.

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abteilung Biochemie, Carl-von-Linne Weg 10, D-50829 Köln (Germany)

Las plantas han desarrollado mecanismos efectivos de defensa frente a microorganismos patógenos. Uno de estos mecanismos es la síntesis en respuesta al ataque del patógeno de una serie de proteínas específicas, conocidas como proteínas relacionadas con patogénesis o proteínas PR. Entre ellas se han identificado quitinasas y 1,3- $\beta$ -glucanasas. Ambas enzimas son capaces de degradar la pared celular de diferentes hongos y restringir su crecimiento *in vitro*, especialmente si actúan de modo simultáneo. Tanto quitinasas como 1,3- $\beta$ -glucanasas existen en múltiples y diferentes isoformas, y están codificadas por familias multigénicas, a menudo de considerable complejidad. Así ocurre en patata (*Solanum tuberosum*), donde pueden distinguirse tres grupos de quitinasas atendiendo a sus propiedades físicas, químicas y funcionales: las quitinasas de tipo A (Clase II) y B (Clase I) son fuertemente inducidas como consecuencia de la infección por el hongo *Phytophthora infestans*, o por tratamiento con un elicitor consistente en un preparado de la pared celular del hongo. Asimismo, muestran inducción por tratamiento con etileno o por herida. La inducción de estas quitinasas tiene lugar en coordinación con la de 1,3- $\beta$ -glucanasas y otras proteínas PR. Por el contrario, las quitinasas de tipo C se expresan de modo constitutivo en hoja y tallo, y se localizan específicamente en células epidérmicas. Este tipo de quitinasas podría así estar implicado en el reconocimiento del patógeno y la liberación de elicitores, como punto de partida de la vía de transducción de señal que conduciría a la inducción de otros mecanismos de defensa.

Usando como sonda un clon de cDNA de una quitinasa básica de patata, pudo aislarse un clon de cDNA que codifica una quitinasa del tipo C. La secuencia de aminoácidos deducida para la proteína indica que ésta posee la estructura típica de las quitinasas pertenecientes a la clase I, con un péptido señal de 19 aminoácidos, seguido por un dominio "hevein" de 39 aminoácidos, una región rica en prolina y glicina de 16 aminoácidos, una región catalítica conformada por 247 aminoácidos, y una extensión terminal de 7 aminoácidos. En posición 286 se ha detectado igualmente un presunto sitio de glicosilación. El clon de cDNA aislado ha sido usado como sonda para aislar un clon genómico. La región codificante del gen comprende tres exones separados por dos intrones. Nuestro mayor interés se centra, sin embargo, en el análisis de la región 5' no codificante, y en la identificación de los elementos promotores responsables de la expresión constitutiva y específica de tejido de este gen. La región proximal del promotor contiene elementos típicos, como una caja TATA y una caja CAAT. Se ha identificado también una secuencia rica en GC, idéntica a la ya descrita en algunos genes de quitinasas de tabaco y judía, responsable de la inducción por etileno de la expresión de estos genes. Finalmente, se han encontrado tres elementos palindrómicos, de los que se desconoce cuál puede ser su función.

A fin de abordar el análisis funcional de la región promotora de este gen constitutivo de quitinasa de patata, se han construido genes quiméricos fusionando la región promotora del gen, y la misma región más la correspondiente al péptido señal, a la región codificante del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Estas construcciones se han usado para la transformación estable, mediada por *Agrobacterium*, de plantas de patata. En un futuro próximo esperamos poder realizar el estudio de los transformantes. Versiones mutadas de este pro-

motor, que se hallan en este momento en construcción, serán asimismo usadas para transformar nuevas plantas de patata.

Paralelamente, se están ensayando medios alternativos de análisis funcional de la región promotora de este gen, que permitan estudiar la expresión transgénica en patata sin la gran demora que supone su transformación estable, tales como el bombardeo con partículas portadoras de DNA.

Con objeto de poder estudiar el patrón de expresión específico de cada tipo de gen de quitinasa, hemos diseñado sondas específicas que permiten diferenciar entre los tipos B, C y X (un posible nuevo tipo de quitinasa, con propiedades diferentes al resto), los cuales presentan un elevado grado de homología entre ellos. Estas sondas específicas se han usado en ensayos Northern, en los que el mRNA correspondiente al tipo C se ha localizado solamente en hoja y tallo jóvenes. La proteína ha sido encontrada por western-blot también en tejido adulto, lo que sugiere una gran estabilidad. Por su parte, el mRNA correspondiente a quitinasas de tipo B ha sido detectado mayoritariamente en hoja, pero también en tallo y en raíz. En este caso, el patrón observado para la proteína en western-blot es similar al del mRNA. Por último, el mRNA correspondiente al tipo X no ha podido ser detectado en planta sana, y por el momento desconocemos si la proteína es expresada o no. Uno de nuestros objetivos inmediatos es analizar la expresión de los tipos X y B de quitinasas en plantas infectadas.

## Sobreexpresión de la enzima HMG-CoA reductasa inducida por nematodos en raíces de tabaco y *Arabidopsis*

F. Aristizábal<sup>1</sup>, V. Lumbreras<sup>2</sup>, A. Boronat<sup>2</sup>, T. Bleve-Zacheo<sup>3</sup>, M. Aró<sup>4</sup>, A. Ferrer<sup>4</sup>  
y Carmen Fenoll<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid

<sup>2</sup>Unitat de Bioquímica y Biología Molecular, Facultat de Química, Universitat de Barcelona

<sup>3</sup>Dipartimento di Nematologia Agraria, CNRI, Bari, Italia

<sup>4</sup>Unitat de Bioquímica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

La parásitos biotróficos se caracterizan por una dependencia absoluta de la fisiología del hospedador para completar su ciclo vital. Esta dependencia a menudo supone el requerimiento por parte del parásito de nutrientes esenciales que son suministrados por el hospedador, que se debe mantener metabólicamente activo. En ocasiones, el parásito ha perdido incluso la capacidad de síntesis de alguno de estos nutrientes. Esto es lo que ocurre con respecto a los esteroides en los nematodos endoparasitarios de plantas. Estos nematodos son incapaces de sintetizar esteroides, que deben tomar necesariamente de las células gigantes que inducen en el cilindro vascular de las raíces de las plantas que infectan.

En plantas, los esteroides se sintetizan en una ramificación de la ruta que produce isoprenoides a partir de mevalonato. La enzima que se encuentra en el comienzo de esta compleja ruta es la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-Rasa), que cataliza la síntesis de mevalonato. Boronat y cols. han identificado en *Arabidopsis* dos genes, HMG1 y HMG2, con capacidad para codificar varias isoformas de la enzima, y han demostrado que ambos genes presentan un patrón de expresión diferente: HMG1 se expresa moderadamente en muchos tejidos de la planta, y con mayor intensidad en unos pocos tipos celulares, mientras que HMG2 parece ser específico de meristemos radiculares e inflorescencias. Estos estudios se han efectuado en plantas de tabaco que contienen fusiones a GUS de ambos promotores.

El rápido crecimiento de los nematodos a expensas de la planta debe requerir cantidades masivas de esteroides para su inclusión en membranas celulares y para la síntesis de otros componentes esenciales para su desarrollo (notablemente, hormonas esteroideas), que las células gigantes suministrarían a velocidad adecuada para el parásito gracias a la sobreproducción de enzimas clave de la ruta biosintética. Hemos analizado esta hipótesis estudiando el efecto de la infección con *Meloidogyne* spp. sobre la regulación de HMG en células gigantes tanto a nivel de expresión génica como a nivel de proteína.

La inducción de la expresión génica se ha estudiado en plantas de tabaco transformadas con fusiones a GUS de los promotores de los dos genes de *Arabidopsis*. Ambas fusiones son claramente inducidas en células gigantes, aunque es más aparente la inducción del gen HMG1. El análisis de diversas plantas que contenían delecciones de ambos promotores ha determinado que en el caso del gen HMG1, tan sólo 400 bp del promotor son suficientes para conferir a éste completa inducibilidad por nematodos, mientras que la inducción del gen HMG2 requiere al menos 800 bp. El promotor del gen HMG1 contiene varias cajas E, que en otros promotores (como el del gen *lemmi9* de tomate) se suponen implicadas en la inducción de genes por nematodos; una de estas cajas está incluida en el fragmento mínimo inducible de HMG1.

La inducción de los promotores en células gigantes no implica necesariamente una acumulación real de la enzima HMG, necesaria para incrementar la producción de esteroides. Para confirmar que esta acumulación ocurría, se analizó la presencia de la proteína en raíz



ces infectadas de *Arabidopsis* mediante técnicas de inmunolocalización con anticuerpos policlonales. Los resultados del análisis por microscopía óptica demuestran la acumulación de la proteína en células gigantes, muy por encima de los niveles detectables en las células próximas de la raíz que no están bajo la influencia directa del nematodo y que, en las plantas de tabaco transgénicas, no mostraban inducción de los promotores. Estudios previos habían indicado una localización microsomal para la proteína. Resultados preliminares obtenidos en secciones semifinas analizadas por microscopía electrónica indican una distribución no uniforme del enzima en todo el retículo endoplásmico. Esta localización asimétrica podría estar relacionada con la alimentación del nematodo, o reflejar alguna propiedad intrínseca de la proteína.

## Papel de los oligosacáridos en la reactividad alérgica de glicoproteínas de cereales

G. García-Casado<sup>1</sup>, R. Sánchez-Monge<sup>1</sup>, L. Gómez<sup>2</sup> y G. Salcedo<sup>1</sup>

Unidad de Bioquímica, Departamento de Biotecnología

<sup>1</sup>E.T.S.Ingenieros Agrónomos y <sup>2</sup>E.T.S.Ingenieros de Montes, U.P.M, Madrid.

El asma del panadero es una alergia ocupacional mediada por IgE y producida por inhalación de harina, que representa un problema importante en todo el mundo entre la población expuesta. En los últimos años han sido purificados y caracterizados a partir de harina de trigo, cebada y centeno un grupo de alérgenos de 12-15kD asociados con esta alergia. Todos ellos pertenecen a la familia de inhibidores de  $\alpha$ -amilasa/tripsina, y, en su mayoría, ligan IgE y producen respuestas positivas en ensayos cutáneos en pacientes alérgicos [1-5]. Sin embargo estos componentes muestran reactividades muy diferentes tanto en ensayos "*in vivo*" como "*in vitro*", siendo las proteínas glicosiladas de la familia las más reactivas: las subunidades homologas del inhibidor tetramérico de trigo (CM16\* ) y cebada (CMb\*), y el inhibidor monomérico de cebada BMAI-1 [2,6]. Mientras que las subunidades del tetrámero también aparecen como especies no glicosiladas que tienen mucha menor reactividad alérgica, no se han encontrado hasta ahora formas no glicosiladas de BMAI-1. Estos datos, junto con el hecho de que también otras glicoproteínas de plantas han sido implicadas en enfermedades alérgicas en los últimos años [7,8 y otros] sugieren que los azúcares de algunas glicoproteínas vegetales pueden tener un papel importante en la reactividad de estos alérgenos.

En este contexto se han realizado una serie de aproximaciones para determinar: i/ el tipo de estructura del oligosacárido ligado a las glicoproteínas de esta familia y ii/ el papel de los azúcares en la unión a IgE de pacientes alérgicos. Se ha determinado que las glicoproteínas CM16\*, CMb\* y BMAI-1 poseen un azúcar complejo con un residuo  $\beta$ 1m2 xilosa y otro  $\alpha$ 1m3 fucosa ligados a un único sitio de N-glicosilación. Se han obtenido péptidos de la glicoproteína BMAI-1 con la enzima Endo-Lys, siendo el único péptido glicosilado el que muestra mayor capacidad de ligar IgE de pacientes alérgicos. Así mismo se ha observado que la capacidad reactiva desaparece al realizar tratamientos químicos de desglucosilación, aunque la estructura global de la proteína parece también afectada tras las severas condiciones del proceso. Además, la IgE de pacientes alérgicos reconoce otras glicoproteínas no relacionadas, que poseen N-oligosacáridos complejos con residuos de  $\beta$ 1m2 xilosa. Todos estos datos indican que los oligosacáridos juegan un papel importante en la reactividad de estos alérgenos ya sea manteniendo la estructura de algún epítipo, o constituyendo uno por sí mismos.

### Referencias

1. Barber D. et al. (1989). FEBS Lett. 248: 119-122.
2. Sánchez-Monge R. et al. (1992). Biochem.J. 281: 401-405.
3. Armentia A. et al. (1993). Clin. Exp. Allergy. 23: 410-415.
4. García-Casado G. et al. (1995). FEBS Lett. 364: 36-40.
5. García-Casado G. et al. (1995). Clin. Exp. Allergy. (en prensa).
6. Mena M. et al. (1992). Plant Mol. Biol. 20: 451-458.
7. Batanero E. et al. (1994). Mol. Immunol. 31: 31-37.
7. Hijikata A. et al. (1994). Int. Arch. Allergy Immunol. 105: 198-202.

## Identificación rápida de razas patogénicas de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* mediante PCR

A. I. González<sup>1</sup>, M.L. Ruiz<sup>1</sup>, C. G. Polanco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Area de Genética, Facultad de Biología, Universidad de León, E-24071 León

<sup>2</sup>Department of Genetics, University of Leicester, LE1 7RH U.K.

El patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* produce en la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) la enfermedad denominada "grasa" que se caracteriza por la aparición de manchas acuosas en hojas y vainas principalmente, lo que produce pérdidas de rendimiento en las cosechas que pueden alcanzar el 100%. Diversos autores han caracterizado la variación patogénica de aislamientos de esta bacteria observándose mayoritariamente la presencia de dos razas denominadas raza-1 y raza-2. La tipificación de estas razas se realiza tradicionalmente por medio de infecciones controladas *in vivo* en variedades testigo con resistencia y susceptibilidad conocidas. Estos procedimientos son costosos tanto en tiempo como trabajo, por lo que supone una gran ventaja disponer de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que requiere poco tiempo para la obtención de resultados.

Se han recogido muestras de esta bacteria de diversas variedades locales afectadas con "grasa" y con ellas se realizaron infecciones controladas en las variedades testigo, Palmaña (susceptible a todas las razas) y Red Mexican (resistente a la raza 1 y susceptible a la raza 2) caracterizándose así los distintos aislados.

A partir de un estudio previo en estas muestras utilizando la técnica RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) se aisló y clonó una banda específica para la raza-1. Fueron secuenciados los extremos 5' y 3' y se diseñaron una pareja de primers compatibles para la amplificación específica del inserto.

Utilizando estos primers en DNA obtenido de 14 aislados independientes de raza-1 se observó la presencia de una banda de 1260 pb correspondiente a la banda de RAPDs clonada. Por otra parte se analizaron 12 aislados independientes de raza-2 utilizando los mismos primers, obteniéndose en todos ellos una banda de 2760 pb.

Se realizó un mapa de restricción con las enzimas *ApaI*, *EcoRI*, *PstI* y *SphI*, tanto en el producto de PCR de la raza-1 como de la raza-2. La presencia de puntos comunes indica que el producto de la raza-2 corresponde al de la raza-1 junto con una inserción de 1500 pb localizada en un fragmento de 240 pb situado entre dos puntos de corte para *EcoRI* y *PstI*.

Con la finalidad de minimizar el tiempo necesario en la tipificación de los aislados se repitieron los experimentos utilizando suspensiones de bacterias en agua tratadas durante 15 minutos a 97°C en lugar de DNA, obteniéndose las mismas bandas específicas para cada raza, lo que nos permite disponer de un método rápido de tipificación en el que no es necesario esperar al desarrollo de la infección en plantas control ni incluso realizar extracciones de ácidos nucleicos.

## **BA2H, un citocromo P450 soluble de tabaco que cataliza la síntesis de ácido salicílico en respuesta a la infección por el virus del mosaico del tabaco**

J. León\* y I. Raskin

AgBiotech Center, Rutgers Univ., New Brunswick, NJ 08903, USA

\*Dirección actual: Centro Nacional de Biotecnología, Dpto de Genética Molecular de Plantas, Campus de Cantoblanco, 28049-Madrid

El ácido salicílico (AS) es una molécula señal en el desarrollo en plantas de resistencia sistémica frente a patógenos. En tabaco, el AS se sintetiza a partir de ácido cinámico mediante descarboxilación hasta ácido benzoico y posterior hidroxilación en posición 2 del anillo aromático. Esta hidroxilación está específicamente catalizada por una proteína soluble de 160 kDa a la que hemos denominado ácido benzoico 2-hidroxilasa (BA2H). La enzima se ha purificado mediante un procedimiento que incluye el aislamiento de la fracción soluble de proteínas de hoja, el fraccionamiento con sulfato amónico, y FPLC en Mono Q y Superosa 12. La enzima se induce localmente por la inoculación con el virus del mosaico del tabaco (TMV), asociada a la respuesta hipersensible, por aplicación exógena de ácido benzoico o también por irradiación con luz ultravioleta o incubación con ozono, dos tratamientos generadores de especies activas de oxígeno. La síntesis de AS se estimula también localmente por tratamiento exógeno con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un producto de las especies activas de oxígeno generadas durante la respuesta hipersensible, a través de un doble mecanismo: una rápida activación de la molécula de BA2H y la inducción más lenta de la síntesis de proteína mediada por la acumulación de ácido benzoico. La actividad BA2H se inhibe *in vitro* por inhibidores típicos de citocromos P450 a concentraciones inferiores a 30  $\mu$ M y de manera fotoreversible por CO. Además, la actividad BA2H soluble se inmunodepleta por inmunoprecipitación con anticuerpos anti-SU2, obtenidos frente a un citocromo P450 soluble de *Streptomyces griseolus*. Preparaciones de enzima purificada muestran un espectro diferencial en presencia de CO con máximo de absorción a 457 nm. Estos datos sugieren que BA2H es un citocromo P450 de características únicas en células eucarióticas por su naturaleza soluble, su alto peso molecular y su autosuficiencia catalítica. La secuenciación del extremo aminoterminal así como de secuencias internas ha permitido abordar el clonaje del gen que codifica a BA2H. Experimentos *in vivo* de marcaje no invasivo con <sup>13</sup>O<sub>2</sub> han demostrado que BA2H actúa como una oxigenasa, catalizando la incorporación de un átomo de oxígeno procedente de oxígeno molecular al grupo hidroxilo del AS. Basándonos en la capacidad de marcar el AS con <sup>13</sup>O y en su aislamiento mediante HPLC y su posterior detección mediante GC-MS, así como en experimentos con [<sup>14</sup>C]-AS, hemos demostrado que el AS se transporta, vía floema, desde la hoja inoculada con TMV hasta hojas superiores donde se desarrolla resistencia sistémica.

## Estudio de los mecanismos moleculares que controlan la activación de la respuesta de defensa vegetal frente a microorganismos patógenos

J. I. Moreno, A. Sanz, P. Obregón, E. Alonso y C. Castresana

Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C., Cantoblanco, Madrid 28049

La respuesta de defensa vegetal frente a la infección por microorganismos patógenos es un proceso activo, en el que la planta sintetiza un amplio espectro de compuestos, cuya función se supone destinada a impedir el desarrollo del patógeno. La mayor parte de dichos compuestos aparecen como consecuencia del aumento en los niveles de transcripción de los genes correspondientes, que ocurre tanto a nivel local, alrededor de la zona de infección (respuesta local), como en tejidos de la planta alejados de dicho área (respuesta sistémica). La respuesta local va acompañada, además, de la formación de pequeñas lesiones necróticas, denominadas reacción hipersensible. Muchos genes relacionados con la defensa de la planta han sido identificados y caracterizados en diversas especies vegetales; sin embargo, se desconocen casi en su totalidad los mecanismos de transmisión de señal que activan su expresión.

Con objeto de profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que controlan la activación de una reacción de defensa vegetal hemos desarrollado dos sistemas experimentales diferentes: (i) Identificación, mediante *differential display*, de genes de la planta cuya activación ocurra en las primeras etapas de la infección. Este estudio se ha realizado utilizando plantas de tabaco inoculadas con una proteína bacteriana (HRPN), procedente de la bacteria *Erwinia amylovora*, que induce lesiones hipersensibles en la planta. La técnica utilizada nos ha permitido detectar cambios significativos y reproducibles, al comparar el patrón de fragmentos de cDNAs obtenido mediante amplificación de RNA procedente de plantas sanas o de plantas en las que se ha activado la reacción de defensa. Parte de los cDNAs inducidos han sido clonados y analizados mediante secuenciación y determinación de sus características de expresión. (ii) Identificación de plantas mutantes en la respuesta de defensa; en concreto, plantas que expresen constitutivamente al menos parte de los genes relacionados con la defensa vegetal. Los mutantes de interés han sido seleccionados utilizando plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con dos marcadores bacterianos, el gen  $\beta$ -glucuronidasa y el gen SPT que confiere resistencia al antibiótico estreptomycin. Ambos marcadores han sido clonados bajo el control de las secuencias reguladoras del gen *gnl*, que codifica una enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa básica, cuya expresión se induce durante la reacción de defensa vegetal. Las plantas transgénicas obtenidas han sido examinadas y las semillas de la línea p238, seleccionada en base a las características de expresión de los marcadores introducidos, han sido mutagenizadas. Un total de aproximadamente 80000 semillas M2 han sido germinadas *in vitro* en medio MS con estreptomycin, de las que 67 plantas fueron resistentes al antibiótico y, por lo tanto, seleccionadas como posibles mutantes constitutivos para su posterior caracterización.

## Expresión de genes de defensa en maíz en respuesta a infección por hongos

I. Murillo, L. Cavallarín and B. San Segundo

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación y Desarrollo de Barcelona (CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona.

La adaptación de una planta ante una agresión ambiental, sea de origen biótico o de origen abiótico, requiere la expresión rápida y coordinada de genes cuyos productos están directa o indirectamente implicados en la defensa y protección de la misma. La germinación es una etapa del ciclo vital de una planta en la que está especialmente vulnerable y en la que se encuentra constantemente expuesta al contacto con patógenos del suelo. Con objeto de caracterizar la respuesta de defensa durante la etapa de germinación de semillas de maíz, se está analizando la expresión de genes que codifican proteínas PR (Pathogenesis-Related proteins) en semillas infectadas por el hongo *Fusarium moniliforme*, patógeno natural de esta planta. Las proteínas PR se definen como proteínas que la planta huésped produce, y cuya expresión se induce en situaciones patológicas y otras situaciones de estrés (tratamiento por agentes químicos, herida, radiación UV, etc.) (1-3). Estos productos de defensa aparecen como resultado de un aumento en los niveles de transcripción de sus genes correspondientes. En esta interacción hongo-huésped, se ha caracterizado la expresión de quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas, habiéndose encontrado una expresión diferencial de varios isoenzimas para ambos tipos de hidrolasas, tanto en respuesta a infección como en los diferentes tejidos de la plántula infectada (4). Se ha estudiado con más profundidad la expresión de los genes *PRms* (*Pathogenesis Related protein from maize seeds*), y del gen *MPI* (*Maize Proteinase Inhibitor*), clonados a partir de una genoteca de embriones de maíz en germinación infectados con *F. moniliforme* (5-7). El nivel de acumulación de los mRNAs correspondientes a cada uno de estos genes se incrementa en tejidos infectados, aunque por mecanismos o rutas de activación transcripcional diferentes: la activación del gen *MPI* es una respuesta al efecto de herida que el patógeno produce al penetrar en los tejidos que infecta, mientras que la del gen *PRms* se debe al reconocimiento molecular de algún componente estructural del patógeno (respuesta al tratamiento por elicitores del hongo). En el caso del gen *PRms*, se han identificado las secuencias del DNA dentro del promotor de este gen que son directamente responsables de la inducción de la expresión de este gen por la presencia de elicitores fúngicos, y se ha descrito una posible secuencia de respuesta a elicitores (ERE, *Elicitor Responsive Element*) que se encuentra presente en genes que codifican para proteínas PR de otras especies (8). La proteína *PRms* se ha expresado en *E. coli*, y se han obtenido anticuerpos policlonales en conejos. Estos anticuerpos han sido utilizados para la localización de la proteína *PRms* en tejidos infectados. La proteína se localiza en la pared de la célula de la planta huésped, en las zonas de contacto con el hongo. Se acumula asimismo en papilas (estructuras características que se observan en diferentes interacciones hongo-planta), y en las células del hongo. Los niveles de acumulación de la proteína *PRms* son especialmente elevados en la capa de células más externas del tejido infectado, tales como en la aleurona de semillas enteras, o en las células epiteliales del escutelo de embriones aislados en germinación. Los resultados de inmunolocalización de la proteína *PRms*, si bien no confirman, sí que apuntan a una posible actividad antifúngica de la misma y a su participación dentro de la respuesta de defensa durante la etapa de germinación de semillas de maíz.

## Referencias

1. Linhorst, H.J.M. (1991) *Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 123-150.
2. White, R.F. and Antoniw, J.F. (1991) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 9, 443-455.
3. van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, Th. and Conejero, V. (1994) *Plant Mol. Biol. Rep.* 12, 245-264.
4. Cordero, M.J., Raventós, D., San Segundo, B. (1994) *Mol. Plant-Microb. Interact.* 7, 23-31.
5. Casacuberta, J.M., Raventós, D., Puigdomenech, P. and San Segundo, B. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 234, 97-104.
6. Raventós, D., Cordero, M.J., San Segundo, B. (1994) *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 45, 349-358.
7. Cordero, M.J., Raventós, D. and San Segundo, B. (1994) *Plant J.* 6, 141-150. 8. Raventós, D., Jensen, A., Rask, M., Casacuberta, J.M., Mundy, J. and San Segundo, B. (1995) *Plant J.* 7, 147-155.

## Efecto de la inducción de la resistencia sistémica adquirida por ácido salicílico sobre el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

J. Olivares<sup>1</sup>, F. Martínez-Pastor<sup>2</sup>, J. Sanjuan<sup>1</sup> y T. Bisseling<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Sistemas Simbióticos.

Estación Experimental del Zaidín. CSIC. 18008 Granada.

<sup>2</sup> Department of Molecular Biology. Wageningen Agricultural University.

6703BD Wageningen. Holanda

La implicación del ácido salicílico (SA) endógeno en la inducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR) en plantas está bien establecida, especialmente después de los ensayos realizados con plantas transgénicas que expresan el gen bacteriano de la salcilito deshidrogenasa que convierte el SA en catecol inactivo y no son capaces de expresar la SAR. También se reconoce que la resistencia a patógenos y la producción de proteínas PR pueden ser inducidos en plantas por SA en ausencia de patógenos. La interacción microbio-planta en el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es un caso especial, en el sentido de que de la propia interacción no se deduce una respuesta defensiva del hospedador ni un verdadero estado patológico. Aunque hay algunos hechos comunes a otras interacciones, como la liberación de etileno poco después de la entrada en contacto de los dos organismos, en la simbiosis ocurre una infección controlada con los mecanismos de defensa de la planta neutralizados, lo que permite que el proceso de infección llegue a su término. Los estudios realizados con mutantes *nod*, *exo*, *lps*, etc. han movido a sospechar la implicación de los productos de algunos de estos genes en el control de los mecanismos de defensa. Durante el proceso de reconocimiento, la planta tiene, por tanto, que diferenciar la bacteria simbiótica de la patógena, o alternativamente, la bacteria tiene que eludir 109 mecanismos de defensa de la planta.

Para contribuir al conocimiento de a qué niveles pudieran estar relacionadas las interacciones patógeno-planta y *Rhizobium*-leguminosa, se comenzó a estudiar el efecto de la inducción de la SAR por SA sobre el establecimiento de esta simbiosis. Inicialmente se consideraron dos parámetros relacionados con la asociación *R. meliloti*-alfalfa: cinética de la nodulación y número de nódulos a lo largo del tiempo. Para ello se eligió un sistema de cultivo axénico para la alfalfa, previamente diseñado, para poder observar la respuesta de la planta con rapidez y de forma continua. Antes de utilizar bacterias fue necesario ajustar la concentración máxima de SA que no afectara el buen desarrollo y funcionamiento de la planta, para lo que se consideró el peso de la parte aérea y raíz, así como el nivel de clorofila. En la misma línea, y teniendo en cuenta la cinética de entrada del SA en las células, se hicieron también ensayos para conocer el tiempo óptimo de la adición del SA en relación con la inoculación. Estos experimentos a largo plazo, hasta 7 días después de la inoculación, se complementaron más tarde con otros a corto plazo y con observación microscópica de las modificaciones habidas en las raíces tratadas. Los resultados obtenidos de los experimentos de cinética y número de nódulos han indicado que la adición a la solución mineral de SA 25  $\mu\text{M}$ , al mismo tiempo que las bacterias o 24 h después, determina un retraso en la nodulación y una reducción en el número de nódulos formados. La aplicación de SA en hoja, a falta de confirmar los datos obtenidos, no tuvo ningún efecto aparente, por lo que o bien no hubo un buen transporte del SA o de la señal correspondiente, o no se dio la correcta concordancia en tiempo entre el tratamiento con SA y la inoculación con *Rhizobium*. La aplicación al sistema *R. meliloti*-alfalfa utilizado aquí, de las condiciones de experimentación descritas para otras interacciones microbio-planta es difícil dado que, salvo con-



tadas excepciones, todos los experimentos descritos en la bibliografía se han llevado a cabo utilizando partes de plantas, generalmente hojas o trozos de hoja, y concentraciones de SA hasta 100 veces más altas que las manifestadas como tóxicas para el sistema usado en este modelo de ensayo. En los estudios microscópicos complementarios utilizando factores Nod purificados (de *R. leguminosarum* bv. *viciae*) y plantas de veza, en un sistema libre de células, se ha podido concluir que la inducción de la SAR por SA interrumpe la formación del primordio nodular pero no la deformación de los pelos radicales. Estos resultados, los pendientes de la expresión de nodulinas, así como los previstos de la utilización de *R. meliloti* productor de SA, una vez que se consiga la clonación y expresión de los genes correspondientes, contribuirán a conocer algo más de la especial respuesta de las leguminosas a la infección por *Rhizobium*.

## Péptidos antimicrobianos en la interacción planta-patógeno

P. Rodríguez-Palenzuela, A. Molina, E. Titarenko, E. López Solanilla, M. Moreno, A. Segura y F. García-Olmedo.

Dpto Biotecnología. ETSI Agrónomos. UPM, 28040 Madrid

Plantas y animales se desenvuelven en un ambiente lleno de microorganismos capaces de producir enfermedades. Uno de los mecanismos de defensa frente a patógenos consiste en la liberación de proteínas de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana. Distintas familias de péptidos antimicrobianos han sido aisladas y caracterizadas en animales, tales como las cercropinas de insectos (1), las defensinas (2), presentes en mamíferos e insectos, o las magaininas (3) en anfibios.

Dentro del reino vegetal, hemos estudiado cinco familias distintas de péptidos antimicrobianos en distintas especies: tioninas (4), proteínas de transferencia de lípidos (5), proteínas similares a defensinas, desintegrinas y PAPs (6). Se han investigado los siguientes aspectos: 1) la actividad *in vitro* de estas proteínas contra distintos patógenos bacterianos y fúngicos; 2) la expresión de estos genes durante el desarrollo normal de la planta y su estimulación o inhibición como respuesta a la infección por patógenos; 3) localización tisular; 4) aumento de la resistencia a patógenos en plantas transgénicas que sobreexpresan algunos de estos genes.

Las principales conclusiones de estos trabajos son: 1) aunque estos péptidos son activos frente a diferentes patógenos fúngicos o bacterianos, se observa cierto grado de especificidad. 2) tanto la localización como la abundancia de estos péptidos es congruente con su papel de defensa. 3) Plantas transgénicas de tabaco y *Arabidopsis* que sobreexpresan tioninas o LTPs, presentan un mayor nivel de resistencia a patógenos bacterianos. 4) La expresión de estos genes frente a patógenos responde a un modelo combinatorio, según el cual cada patógeno estimula la expresión de un subconjunto particular de genes de defensa.

Un patógeno vegetal capaz de causar enfermedad en una especie determinada debe ser, por tanto, capaz de resistir o evitar la acción de estos péptidos antimicrobianos. Recientemente, hemos comenzado a caracterizar los mecanismos genéticos que determinan la resistencia a dichos péptidos, en bacterias fitopatógenas (8). El abordaje empleado consiste en: 1) purificación a gran escala (mg) péptidos antimicrobianos; 2) selección de mutantes de TnS que muestren mayor sensibilidad a dichos péptidos; 3) estudio de los cambios producidos en la virulencia de estos mutantes; 4) caracterización de los genes implicados en el cambio de sensibilidad a péptidos/virulencia.

Se han aislado mutantes en la bacteria *Pseudomonas solanacearum*, seleccionados por su sensibilidad a tioninas. Estos mutantes tienen alterada la estructura de lipopolisacáridos de la membrana externa, como consecuencia de la inserción de TnS en un gen que presenta homología con una heptosil-transferasa de *Escherichia coli*. Esta enzima está implicada en la síntesis del núcleo del lipopolisacárido en *E. coli*. Diversos ensayos de patogenicidad demostraron que estos mutantes, aunque crecen normalmente en medio sintético, son incapaces de multiplicarse y de producir enfermedad en plantas de tabaco.

## Referencias

- (1) Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H. and Boman H.G. (1981). *Nature*, 292, 246-248.
- (2) Lehrer R.I., Ganz T., and Selsted M.E. (1991). *Cell* 64:229-230. (3) Zasloff M. (1987). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 84, 5449-S4S3.
- (4) García-Olmedo F., Rodríguez-Palenzuela P., Hernández-Lucas C., Ponz F., Marañón C., Carmona M.J., López-Fando J., Fernández J.A. and Carbonero P.(1989). *Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology*. Vol.6, 31-60.
- (5) García-Olmedo F., Molina A., Segura A. and Moreno, M. (1995). *Trends in microbiology* Vol.3 n2 72-74.
- (6) Manuel Moreno Fernández, Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Junio 1995.
- (7) Manuel Moreno Fernández, Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Junio 1995.
- (8) Titarenko, E., Piñeiro, M., Díaz, I., García-Olmedo, F. and P. Rodríguez Palenzuela. Seventh International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions. Edinburgh, Scotland. June 1994.

## Elementos de respuesta a nematodos en promotores de genes vegetales

S. Sanz-Alfárez, L. Serna, F. Aristizábal, B. Santamaría, F. F. del Campo y C. Fenoll\*

Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid  
Teléfono: 91-397 8198; Telefax: 91- 397 8344 Email: fenoll@ccuam3.sdi.uam.es

Los nematodos de los nódulos (*Meloidogyne* spp.) son un numeroso grupo de endoparásitos biotróficos y polífagos constituyen una importante amenaza para muchos cultivos diferentes, sobre todo en las regiones cálidas del globo. Hay muy pocos nematocidas disponibles en el mercado, que además estarán probablemente prohibidos para finales del milenio. La resistencia natural sólo está descrita para algunas de las especies vegetales afectadas, y aún en estas no siempre confiere niveles de protección comercialmente aceptables. La alternativa, pues, al problema agronómico de los nematodos es la construcción de plantas resistentes mediante ingeniería genética. La estrategia concreta que se está utilizando consiste en la destrucción selectiva de las células vegetales especializadas, denominadas células gigantes, de las que el nematodo depende absolutamente para su desarrollo. Esto puede conseguirse introduciendo en la planta genes citotóxicos o nematocidas bajo el control de promotores específicos inducibles por nematodos. La búsqueda de estos promotores y de genes regulados diferencialmente en células gigantes para su uso práctico ha permitido comenzar a definir molecularmente en qué consiste una célula gigante, abriendo un apasionante panorama que involucra fenómenos de reprogramación genética y diferenciación celular, en conexión con cambios en el ciclo celular.

Las larvas infectivas, que aparecen en el suelo por eclosión espontánea de los huevos liberados de plantas infectadas, invaden la raíz intercelularmente y, tras una compleja migración hasta la estela, seleccionan una célula del parénquima del xilema, en la que inyectan saliva de composición desconocida. Esto conduce, mediante mecanismos desconocidos, a la rediferenciación de esta célula, que se convierte en una célula multinucleada y adquiere las características ultraestructurales asociadas a un activo metabolismo y a un intenso tráfico de sustancias. Mientras el nematodo se desarrolla y produce finalmente huevos partenogénéticos, la célula gigante sigue activa; el tejido circundante se hipertrofia, produciéndose un abultamiento o nódulo en la raíz denominado agalla. Por el momento sólo sabemos que ocurre una profunda reprogramación de la expresión genética, que se evidencia por la inducción de algunos promotores específicos y el silenciamiento de otros, tanto en las células gigantes como en la agalla. Estos cambios parecen iniciarse a través de la interferencia con la maquinaria que coordina la expresión génica con el ciclo celular. Una forma de comprender los mecanismos que subyacen a esta compleja transformación celular es la identificación de los elementos *cis* en los promotores responsables de la reprogramación. Estas secuencias de regulación por nematodos deben cumplir su función a través de la interacción con factores de transcripción específicos cuya actividad se ve de algún modo alterada durante el proceso de diferenciación de las células gigantes.

El análisis funcional detallado de estos elementos *cis* es el paso limitante en esta estrategia, pues implica la construcción de plantas transgénicas conteniendo series de deleciones y otras mutaciones y su posterior estudio tras la infección con nematodos. Una forma de acelerar este proceso es el desarrollo de un sistema de expresión transitoria en células gigantes, que en la actualidad estamos acometiendo mediante microinyección (en colaboración con el Departamento de Nematología de la Universidad de Kiel). La otra forma de facilitar el análisis funcional sería restringir el rastreo mutacional a las secuencias del promotor con mayor probabilidad de estar involucradas en la regulación. Estamos identificando este tipo de secuencias

por su capacidad para unirse específicamente a proteínas nucleares de raíces infectadas, que podrían estar directamente implicadas en la regulación del promotor.

Uno de los promotores que estamos analizando es el promotor del gen de tomate *lemmi9*, que se induce en raíces infectadas por *Meloidogyne incognita*. Mediante ensayos de retardo en gel, hemos demostrado que el promotor interacciona específicamente con proteínas nucleares procedentes de raíces infectadas, mientras que las raíces control no presentan dicha actividad de unión a DNA. Un análisis de los diferentes fragmentos del promotor identificaron un fragmento de 100 pares de base inmediatamente 5' del comienzo de la transcripción como responsable de la interacción. Actualmente hemos identificado, mediante ensayos de retardo en gel y competición con oligonucleótidos sintéticos una corta secuencia en el promotor que corresponde a una repetición en *tandem* dentro de la cual está contenido un elemento conservado en otros promotores inducibles por nematodos. En plantas no infectadas, la distribución de esta actividad de unión coincide con el patrón descrito de acumulación de mRNAs del gen *lemmi9*. Aunque se desconoce la función del gen *lemmi9*, la proteína que se deduce de su secuencia presenta una gran homología con la proteína LEA4 de algodón, que se induce por estrés salino. Los complejos DNA-proteínas formados entre el promotor *lemmi9* y los extractos de raíces infectadas mostraron una alta estabilidad frente a concentraciones elevadas de NaCl *in vitro*. Es atractivo sugerir una correlación entre la expresión del gen en células gigantes y en semillas en desarrollo y la expresión inducible por estrés hídrico, como ocurre para otras LEAs. En la actualidad estamos analizando la funcionalidad del elemento, que se parece a la caja E de genes de animales y que está presente también en otros promotores de diferentes especies vegetales regulados por nematodos, mediante expresión transitoria y transformación estable en *Arabidopsis*.

Con una aproximación similar, estamos identificando posibles elementos responsables del silenciamiento génico inducido por nematodos en el promotor 35S. Se ha descrito que las 90 bases anteriores a la posición + 1 del promotor son suficientes para conferir silenciamiento dependiente de nematodos a un gen testigo en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, tabaco y tomate. Sin embargo, mutaciones en el motivo as- 1, el elemento de activación transcripcional más aparente que se encuentra en estos 90 pb no afectan a la capacidad silenciadora del promotor. Nosotros hemos encontrado que ASF-1, la proteína nuclear que reconoce al elemento as-1, está ausente en raíces no infectadas, así como en agallas. En estas últimas, sin embargo, hemos detectado la presencia de otra actividad de unión a DNA, asociada de modo específico al fragmento de 90 bp responsable del silenciamiento. La actividad de unión provoca un retardo no muy acusado de la sonda en ensayos de retardo en gel, lo que sugiere la unión de una proteína pequeña o de alta movilidad electroforética en condiciones nativas. Para definir el sitio de unión a este factor nuclear, que hemos encontrado también en frutos inmaduros y en plántulas muy jóvenes de diferentes especies vegetales, hemos diseñado 3 oligonucleótidos para efectuar ensayos de competición por la unión de estas proteínas nucleares. Nuestros resultados indican que el sitio de unión mapea fuera de los elementos reguladores descritos hasta ahora para el promotor 35S. Resultados preliminares involucran una estructura secundaria en la zona de la caja TATA y la región situada hacia 3' como posible diana de unión de esta proteína que podría estar asociada con el silenciamiento del promotor.

La secuencia identificada en *lemmi9* por su unión a proteínas nucleares coincide con el sitio de unión de proteínas de tipo HLH en genes de animales, a menudo asociadas con importantes decisiones durante el desarrollo en *Drosophila* y en mamíferos. Los promotores silenciados también contienen cajas parecidas, lo que sugiere que los procesos de inducción y silenciamiento de genes específicos por nematodos podrían ocurrir a través de un único mecanismo, que probablemente involucre la interferencia del nematodo con algún factor celular clave para la regulación del ciclo celular y del proceso de diferenciación. Para estudiar esta hipótesis hemos iniciado la identificación de posibles genes que codifiquen HLHs implicadas en el proceso, mediante la amplificación por PCR de secuencias en cDNAs de *Arabidopsis* de diferentes procedencias.

## Caracterización de la familia de genes *Bet v 1*, que codifican alérgenos de polen y proteínas relacionadas con patogénesis

I. Swoboda, E. Heberle-Bors y O. Vicente

Instituto de Microbiología y Genética, Universidad de Viena, Dr. Bohr-Gasse 9, A-1030 Viena, Austria

Las proteínas *Bet v 1* son un grupo de isoformas de 17 kDa de masa molecular que en su conjunto representan el principal alérgeno del polen de abedul. Un clon de cDNA, correspondiente a la isoforma más abundante, *Bet v 1a*, fue aislado a partir de una biblioteca de expresión mediante inmunoscreening con el suero de un paciente alérgico (1), y más recientemente nosotros hemos clonado por PCR varios cDNAs adicionales, correspondientes a las isoformas minoritarias (2). La secuencia de *Bet v 1a*, deducida del clon de cDNA, presenta una homología significativa con una familia de proteínas relacionadas con patogénesis (proteínas PR) identificadas durante los últimos años en otras especies vegetales, tanto dicotiledoneas como monocotiledoneas. En base a esta homología, *Bet v 1* fue incluida en este grupo de proteínas PR. En nuestro laboratorio obtuvimos los primeros datos sobre la activación de genes *Bet v 1* en presencia de patógenos microbianos. En cultivos en suspensión de células de abedul, distintos hongos y bacterias inducen la síntesis de una proteína de 17 kDa, que es reconocida en Western blots por un anticuerpo monoclonal preparado contra *Bet v 1* de polen. Asimismo, en Northern blots detectamos la inducción por microorganismos de RNAs relacionados con *Bet v 1*. Sin embargo, experimentos de protección contra digestión por RNasas indicaron que este RNA no correspondía al del clon *Bet v 1a* de polen utilizado como sonda (3). Estos datos sugerían que la familia génica de *Bet v 1* incluye un subgrupo de genes que son inducidos por patógenos en células somáticas. Recientemente hemos demostrado directamente esta hipótesis, con el aislamiento y caracterización de dichos genes. Tres clones de cDNA, *Bet v 1-Sc1*, *Sc2* y *Sc3*, han sido aislados de una biblioteca preparada a partir de células en suspensión incubadas en presencia de *Pseudomonas syringae*. *Bet v 1-Sc1* y *Sc2* son casi idénticos, presentando 14 diferencias en la secuencia de nucleótidos, 6 de ellas en la región codificante que dan lugar a tan solo en dos aminoácidos distintos a nivel de proteína; estos dos clones podrían por tanto corresponder a formas alélicas del mismo gen. *Bet v 1-Sc3*, por su parte, es claramente distinto de los otros dos (73% de identidad a nivel de aminoácidos). Estas putativas proteínas PR son altamente homólogas, pero distintas de los isoalérgenos de polen aislados con anterioridad (70-88% aminoácidos idénticos, para los distintos pares). Northern blots y experimentos de protección contra RNasas, utilizando sondas específicas para cada uno de los clones, indican que los tres genes se inducen en los cultivos de células en suspensión de forma coordinada y rápida, pero solo transitoria, en presencia de bacterias (*Pseudomonas syringae*, *Escherichia coli*) u hongos (*Fusarium solani*, *Taphrina betulina*), y que ninguno de los tres se expresa constitutivamente en polen. De los microorganismos ensayados, tan solo el hongo *T. betulina* es un patógeno natural del abedul, pero no se han encontrado diferencias significativas entre ellos por lo que respecta a la intensidad o cinética de inducción de los tres genes.

Esto sugiere que *Bet v 1* se induce de forma inespecífica por interacción de las células con microorganismos, independientemente de que sean patógenos o no en condiciones naturales, otros mecanismos de defensa, constitutivos o inducibles, deben ser responsables de la discriminación entre patógenos y no patógenos, y entre interacciones compatibles e incompatibles. De acuerdo con esta idea, hemos comprobado que los tres genes *Bet*

v I-Sc se inducen asimismo en una interacción natural planta-patógeno, en hojas de abedul infectadas con *T. betulina*, pero no con *F. solani*, proporcionando evidencia en favor de la significación biológica de la síntesis de estas proteínas PR en la reacción de defensa de la planta contra patógenos.

La investigación de la función biológica de Bet v 1 (y de las proteínas PR homólogas de otras especies) se ha visto dificultada por la ausencia de información sobre su posible actividad enzimática, dado que no presentaban homología con ninguna proteína conocida. La caracterización bioquímica reciente de un nuevo tipo de ribonucleasa, purificada de ginseng, y su secuenciación parcial (40 aa) reveló una homología significativa (40-70%) con miembros de esta familia de proteínas PR (4), sugiriendo que podían asimismo ser RNasas. Utilizando preparaciones aparentemente homogéneas de Bet v 1 natural (una mezcla de los diferentes alérgenos) purificada de polen de abedul, así como de Bet v 1a recombinante purificada a partir de extractos de *E. coli*, hemos podido demostrar que Bet v 1 presenta de hecho una actividad nucleasa específica por RNA. Estas fracciones digieren *in vitro* tanto tRNA como rRNA o un RNA producido por transcripción *in vitro*, pero no muestran actividad alguna sobre distintos sustratos de DNA, de banda simple o doble. Aún no está claro si los miembros de esta familia de proteínas PR poseen una actividad antimicrobiana directa, pero su localización intracelular y el hecho de que Bet v 1 no inhibe el crecimiento de bacterias u hongos *in vitro*, hacen muy improbable que RNAs de estos patógenos sean los sustratos fisiológicos de estas RNasas. En cambio, si puede pensarse que degraden *in vivo* RNAs de virus o viroides, que son normalmente patógenos intracelulares; desafortunadamente, que sepamos, no se ha ensayado la posible activación de ninguno de los miembros de la familia en presencia de patógenos virales o viroidales. Alternativamente, y nosotros favorecemos esta hipótesis, las proteínas Bet v 1, sintetizadas en la zona de infección en respuesta al ataque microbiano, podrían degradar RNAs celulares y contribuir así a la reacción de hipersensitividad, es decir la muerte celular localizada que impide la extensión sistémica del patógeno por la planta.

#### Referencias

1. Breiteneder et al. (1989). *EMBOJ.* 8, 1935-1938.
2. Swoboda et al. (1995). *J Biol. Chem.* 270, 2607-2613.
3. Swoboda et al. (1994). *Biochim. Biophys. Acta* 1219, 457-464.
4. Moiseyev et al. (1994). *Planta* 193, 470-472.

## Pérdida de patogenicidad en mutantes sensibles a péptidos anticribianos

E. Titarenko, E. López-Solanilla, F. García-Olmedo y P. Rodríguez-Palenzuela.

Dpto Biotecnología. ETSI Agrónomos. UPM, 28040 Madrid

Tanto en plantas como en animales han sido descritas proteínas de bajo peso molecular con propiedades antipatogénicas, que suponen una potente respuesta frente a la invasión de microorganismos. En animales han sido aisladas diferentes familias de péptidos antimicrobianos, como defensinas en fagocitos de mamíferos (1), cercropas en insectos (2) o magaininas en anfibios (3). En plantas también han sido descritos distintos tipos de proteínas de bajo peso molecular, p.e. tioninas (4) y LTPs (5), con un posible papel en defensa frente a microorganismos. Los patógenos bacterianos virulentos necesitan, no sólo los mecanismos necesarios para causar enfermedad, sino también aquellos que les permitan evitar o resistir la respuesta de defensa desencadenada en el huésped. En *Salmonella typhimurium*, un patógeno animal, se han identificado mutantes sensibles a defensinas en ensayos *in vitro* que resultan ser avirulentos frente a su huésped natural (6). Sin embargo, se sabe aun muy poco a cerca del mecanismo mediante el cual las bacterias fitopatógenas resisten a la acción tóxica de las proteínas de defensa de las plantas. Con el fin de estudiar este aspecto, hemos aislado mediante inserción de Tn5 dos mutantes de *Pseudomonas solanacearum*, M2 y M88, sensibles a tioninas. Ambos mutantes son incapaces de producir marchitez en tabaco (uno de sus huéspedes naturales) ni ningún síntoma cuando son inoculados en hoja, mientras que el tipo silvestre produce marchitez y necrosis. Los mutantes M2 y M88 presentan una inserción del elemento Tn5 en el mismo gen (separada por 35 nucleótidos). La secuencia de la proteína deducida del gen mutado presenta una clara homología con los genes *rfaF* de *Escherichia coli* y *S.typhimurium*. Este gen codifica una heptosil transferasa implicada en la síntesis de lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa en bacterias Gram (-). De hecho, estos mutantes presentan un patrón electroforético de LPS alterado.

En *Erwinia chrysanthemii* estamos llevando a cabo estudios de identificación de un sistema desactivador de péptidos tóxicos en bacterias fitopatógenas, basándonos en la existencia de una alta homología de secuencia con un operón codificante de un sistema similar en *S. typhimurium* (7).

### Referencias

- (1) Lehrer R.I., Ganz T., and Selsted M.E. (1991). Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 64:229-230.
- (2) Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H. and Boman H.G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292, 246-248.
- (3) Zasloff M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial sequence of a precursor. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 84, 5449-5453.
- (4) García-Olmedo F., Rodríguez-Palenzuela P., Hernández-Lucas C., Ponz F., Marañón C., Carmona M.J., López-Fando J., Fernández J.A. and Carbonero P.(1989). The Thionins: a protein family that includes purothionin, viscotoxins and crambins. *Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology*. Vol.6, 31-60. *Oxford Surveys*.
- (5) García-Olmedo F., Molina A., Segura A. and Moreno, M. (1995). *Trends in microbiology* Vol.3 n2 72-74.
- (6) Groisman E.A. (1994). How Bacteria resist Killing by host defense peptides. *Trends in Microbiology* Vol.2 11:444-449.
- (7) Parra-López C., Baer M.T. and Groisman E.A. (1993). Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *The EMBO Journal* Vol. 12 no. 11 4053-4062.



## Caracterización de LRP, una proteína de tomate asociada a la matriz extracelular y que pertenece a la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR).

P. Tornero, M. E. Mayda, V. Conejero y P. Vera

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas "Eduardo Primo Yúfera", (U.P.V.-C.S.I.C.) Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia*

En la presente comunicación se describe el aislamiento, a partir de una genoteca de cDNA de tomate, de *LRP*, un gen que codifica una nueva proteína de la matriz extracelular. La secuencia de aminoácidos putativa muestra que la proteína contiene un péptido señal en la parte N-terminal, es rica en leucina (de ahí su denominación LRP) y contiene interesantes motivos estructurales. El primero de estos dominios es de dimerización, tipo *leucine zipper*, mientras que el segundo consta de cuatro repeticiones de un motivo canónico de 24 aminoácidos tipo Repetición Rica en Leucina (LRR), el cual está presente en diferentes proteínas que median en procesos de reconocimiento e interacción. La estructura del gen, en cuanto a disposición de intrones se refiere, favorece la hipótesis de que los dominios LRR presentes en la LRP han evolucionado por duplicación de exones y reordenación genómica. El análisis de la expresión de *LRP* y su localización inmunohistoquímica indican que el gen está regulado en asociación con el desarrollo, mostrando especificidad tisular, particularmente en cierto tipo de células del cilindro vascular, como son las fibras del floema, células del parénquima del protoxilema, y en las filas de células que conforman los rayos de xilema secundario. En este trabajo mostramos que la infección del viroide de las exocortis de los cítricos (CEVd) induce una activación de la transcripción y una acumulación de la proteína. Es en este contexto patogénico, donde, manteniendo su especificidad celular de expresión y localización, es procesada proteolíticamente hasta un peso molecular más bajo por una proteasa extracelular inducida en la infección. Las características estructurales de LRP, su expresión espacio-temporal, así como su procesamiento post-transcripcional en patogénesis, señala a esta proteína como molécula posiblemente mediadora de los procesos de reconocimiento e interacción que tienen lugar en la matriz extracelular tanto en condiciones normales como de estrés.

## **Metabolismo y Reguladores**



## Inserción y topología de la HMGR de plantas en la membrana del retículo endoplasmático.

N. Campos y A. Boronat.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Química. Universidad de Barcelona. C/ Martí i Franquès 1. 08028 Barcelona.

En plantas superiores, la vía de síntesis de isoprenoides genera una gran variedad de compuestos que están implicados en muy diversas funciones (carotenoides y cadena lateral de clorofilas en la fotosíntesis, ubiquinona en la respiración, esteroides en la formación de membranas; fitoalexinas en la defensa contra patógenos, giberelinas y ácido abscísico en el control del desarrollo, etc.) (1,2). Por otra parte, existen compuestos isoprenoides de gran interés económico (polímeros como el caucho, fármacos como el taxol, pesticidas como las piretrinas, etc). La vía de síntesis de isoprenoides en plantas es muy compleja y ramificada (2,3). La localización subcelular de las enzimas que participan en esta vía no está suficientemente clarificada, a pesar de que esta información es fundamental para entender la organización y el control de la ruta metabólica. La primera reacción de la vía consiste en la síntesis de mevalonato a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A. Esta reacción está catalizada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGR). Se ha sugerido que la HMGR de plantas está presente en el citosol (unida a membranas), en cloroplastos y en mitocondrias (4). En todas las especies de plantas estudiadas la HMGR está codificada por una familia multigénica (5). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado la existencia de dos genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican para tres isoformas de HMGR: HMGR1S y HMGR1L, derivadas del gen hmg 1, y HMGR2, derivada del gen hmg2 (6,7). Estas tres proteínas se insertan en la membrana del retículo endoplasmático (RE) (6,7).

Una característica común de todas las isoformas de HMGR de plantas descritas hasta el momento es la presencia de dos secuencias hidrofóbicas altamente conservadas, H1 y H2, en la zona N-terminal de la proteína. Utilizando un sistema *in vitro*, hemos demostrado que las secuencias H1 y H2 de la isoforma HMGR1S de *Arabidopsis* actúan como secuencias señal internas. El reconocimiento específico de estas secuencias por la "signal recognition particle" (SRP) media la inserción de la proteína en la membrana de vesículas microsomales derivadas del RE. Las dos secuencias hidrofóbicas se convierten en segmentos de transmembrana y ambas son requeridas para el proceso de inserción. La región N-terminal y el dominio catalítico (C-terminal) quedan situados en el lado citosólico de la membrana, mientras que únicamente una corta secuencia hidrofílica, situada entre las secuencias H1 y H2, es translocada al lumen de los microsomas. Nuestros resultados sugieren que el destino subcelular primario de todas las isoformas de HMGR de plantas conocidas hasta el momento es el RE y que estas proteínas tienen la misma topología en la membrana. La presencia de una secuencia consenso que determina retención en el RE (8), en el extremo N-terminal de la mayor parte de las isoformas conocidas de HMGR de plantas, sugiere que éstas son proteínas residentes del RE. Otras isoformas de HMGR de plantas, cuya secuencia N-terminal está divergida con respecto a la secuencia consenso, podrían tener localizaciones subcelulares alternativas. La evidencia presentada sugiere que la síntesis de mevalonato en células vegetales se produce exclusivamente en el citosol y apoya la hipótesis de que la síntesis de isoprenoides en plantas está mediada por asociaciones enzimáticas localizadas en distintas regiones del sistema de endomembranas (3).

## Referencias

- (1) Gray, J.C. (1987). Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Adv. Bot. Res.* 14, 25-91.
- (2) McGarvey, D.J., y Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7:1015-1026.
- (3) Chappell, J. (1995). Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 521-547.
- (4) Bach, T.J., Weber, T., y Motel, A. (1990). Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA in plants. En "Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids", Vol. 24, G.H.N. Towers y H.A. Stafford, eds (New York: Plenum Press), pp. 83-97.
- (5) Stermer, B.A., Bianchini, G.M., y Korth, K.L. (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J. Lipid Res.* 35, 1133-1140.
- (6) Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arró, M., y Boronat, A. (1994). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91, 927-931.
- (7) Lumbreras, M.V., Campos N., y Boronat A. (1995). The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* hmg1 gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase isoform with an extended N-terminal region. *Plant J.* en prensa.
- (8) Schutze, M.P., Peterson, P.A., and Jackson, M.R. (1994). An N-terminal double arginine motif maintains type-II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 13, 1696-1705.

## **Análisis molecular de la biosíntesis de glutamina y glutamato en coníferas**

*F. M. Cánovas, F. R. Cantón, A. García-Gutiérrez y F. Gallardo*

*Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071-Málaga*

Durante la germinación, el nitrógeno almacenado en la semilla se moviliza para ser utilizado por la plántula en las etapas iniciales de desarrollo. Las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) tienen un papel clave en este proceso generando la glutamina y el glutamato necesarios para la biosíntesis de las principales biomoléculas nitrogenadas. En nuestro laboratorio se está estudiando, a nivel molecular, la regulación de este proceso en coníferas utilizando plantas de pino como modelo experimental. Las coníferas se caracterizan por su capacidad de sintetizar clorofila y desarrollar cloroplastos en ausencia de luz.

Un primer objetivo de nuestra línea de trabajo, que ya se ha cubierto en parte, es definir la estructura de estos genes y estudiar la regulación de su expresión durante el desarrollo temprano de los árboles.

Las estructuras primarias de la GS y GOGAT de pino son muy parecidas a las descritas en angiospermas. Sin embargo, la expresión de estas proteínas es sustancialmente diferente a los modelos conocidos. En tejidos fotosintéticos de angiospermas, GS y GOGAT están principalmente implicadas en la asimilación de amonio procedente de la fotorespiración y de la asimilación primaria de nitrógeno, siendo la expresión de ambas proteínas reguladas por luz. En coníferas, la expresión de ambas enzimas es diferente, acumulándose los polipéptidos y mRNAs durante el desarrollo de la plántula en oscuridad. La presencia del ciclo GS/GOGAT puede ser importante para proporcionar glutamina y glutamato necesarios para la síntesis de clorofila y de otros compuestos necesarios durante la diferenciación independiente de luz del cloroplasto en coníferas.

Otro aspecto importante es la aplicación de los estudios anteriores en programas de biotecnología forestal con el fin de mejorar la eficiencia del metabolismo nitrogenado de estas plantas mediante la manipulación genética del sistema.

### Referencias

Cantón FR, García-Gutiérrez A, Gallardo F, de Vicente A, Cánovas FM (1993). *Plant Molecular Biology*, 22, 819-828.

García-Gutiérrez A, Cantón FR, Gallardo F, Sánchez-Jiménez F, Cánovas FM (1995). *Plant Molecular Biology*, 27, 115-128.

## Expresión del gen que codifica una *L-asparaginasa* de *Arabidopsis thaliana*

A. Casado , A.R. Franco , E. Moyano., J. Cárdenas y J. Muñoz-Blanco

Dpto de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. de Ciencias. Univ. de Córdoba Avda San Alberto Magno s/n. 14071 CORDOBA Fax: 957-21 8606 E-mail: bb1 mublj@uco.es

En plantas amidas, la vía más común de asimilación y movilización de nitrógeno es la conversión de nitrato en amonio seguida de la síntesis de amidas las cuales se transportan hacia los órganos en desarrollo. En este tipo de plantas, la asparagina constituye uno de los metabolitos fundamentales de transporte de nitrógeno, jugando, por lo tanto la asparaginasa, enzima que cataliza la hidrólisis de la asparagina en amonio y aspartato, un papel central en la nutrición nitrogenada de la planta.

El gen que codifica la *L-asparaginasa* de *A.thaliana* ha sido clonado y secuenciado, presentando una estructura constituida por cuatro exones y tres intrones, estructura muy similar a la de la *L-asparaginasa* de *Lupinus angustifolius*.

En la presente comunicación se presenta algunas de las características de expresión de dicho gen. Experimentos de hibridación de ADN total (Southern) a alta estrictencia indican que es un gen de copia simple mientras que los realizados a baja estrictencia indican la probable existencia de dos asparaginases en *A.thaliana*. Por otra parte, experimentos de Northern, con plántulas de 6,10 y 21 días, indican que la expresión de la *L-asparaginasa*, utilizando ribosondas, presenta un grado de expresión similar e independiente de la edad en todas las plántulas, no detectándose diferencias en la expresión del gen en los primeros estadios del desarrollo. En plantas adultas, el gen se expresa, aunque en cantidades claramente inferiores a los observados en plántulas, en hojas, tallo y silicuas, siendo prácticamente indetectables las cantidades de ARNm en raíz y flores.

No se observaron variaciones en la expresión del gen de *A.thaliana* cuando las plántulas que habían crecido en luz se sometieron a períodos de oscuridad de 2, 4, 8,12 y 24h, lo que nos indica que la expresión no se regula por transiciones luz-oscuridad, tal y como ocurre con la actividad enzimática de la *L-asparaginasa* de *Pisum sativum*

Experimentos de hibridación *in situ* de plántulas completas indican una clara expresión de la *L-asparaginasa* de *A.thaliana* en la zona apical de la raíz así como una menor expresión menos en cotiledones. Con el objeto de determinar si la expresión en cotiledones pudiera ser un artefacto se procedió a realizar experimentos de Northern en cotiledones de plántulas de 10 días obteniéndose una clara expresión del gen en los mismos.

Los datos obtenidos concuerdan con un papel fisiológico de la *L-asparaginasa* relacionado con la hidrólisis de asparagina, en plantas amidas, para suministrar nitrógeno a tejidos en desarrollo.

## Caracterización molecular de las enzimas mevalonato quinasa y farnesilpirofosfato sintasa de *Arabidopsis thaliana*.

N. Cunillera<sup>1</sup>, M.A. Lluch<sup>1</sup>, D. Delourme<sup>2</sup>, C. Riou<sup>2</sup>, A. Masferrer<sup>1</sup>, M. Arró<sup>1</sup>, F. Karst<sup>2</sup>, A. Boronat<sup>3</sup> y A. Ferrer<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Unitat de Bioquímica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.

<sup>2</sup> Institut de Biologie Moléculaire et d'Ingenierie Génétique. Université de Poitiers. Francia.

<sup>3</sup> Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Universitat de Barcelona.

Las plantas superiores producen una gran variedad de compuestos isoprenoides, muchos de los cuales son esenciales para el normal desarrollo y crecimiento de las plantas. Dentro de este heterogéneo grupo de productos se incluyen reguladores del crecimiento, pigmentos, esteroides, transportadores de electrones, agentes de defensa contra patógenos, etc. Determinados isoprenoides vegetales son también importantes por su interés farmacéutico e industrial.

La vía metabólica de síntesis de isoprenoides en plantas consta de una parte troncal que, a partir de acetil-CoA y vía mevalonato e isopentenil pirofosfato (IPP), produce toda una serie de prenifosfatos de diferente longitud. Estos compuestos son puntos de partida de numerosas ramificaciones que conducen a la síntesis de la gran variedad de derivados isoprenoides. Si bien se admite que la biosíntesis de isoprenoides debe estar sometida a una estricta regulación, los mecanismos que controlan esta vía son todavía bastante desconocidos. En este sentido, y a pesar de no disponer de evidencias experimentales definitivas, se acepta que la enzima 3-hidroxi-3-metilglutarilCoA (HMG-CoA) reductasa, que cataliza la síntesis de mevalonato a partir de HMG-CoA, desempeña un papel clave en la regulación de esta vía. Sin embargo, la complejidad de esta ruta metabólica sugiere la existencia de puntos adicionales de control a fin de asegurar la síntesis de los diferentes isoprenoides en el momento y en el lugar adecuados.

Nuestro interés se centra actualmente en el estudio de las enzimas mevalonato quinasa (MK) y farnesilpirofosfato sintasa (FPS), puesto que ambas se consideran involucradas en la regulación de la parte troncal de la vía de síntesis de isoprenoides. La MK cataliza la fosforilación del mevalonato para producir mevalonato-5'-fosfato, mientras que la FPS, que pertenece a la familia de las prenilttransferasas, cataliza la condensación secuencial 1'-4 de dimetilalilpirofosfato (DMAPP) con dos moléculas de IPP para producir el compuesto de 15 carbonos farnesilpirofosfato (FPP).

Mediante complementación funcional de los mutantes de levadura *erg 12*, deficiente en actividad MK, y *erg 20*, deficiente en actividad FPS, con un banco de expresión de cDNA de *Arabidopsis thaliana*, se ha clonado un cDNA correspondiente a cada una de las dos enzimas. La disponibilidad de dichos cDNAs ha permitido iniciar el trabajo que se presenta a continuación.

Por lo que respecta a la caracterización de la MK, se ha demostrado, mediante experimentos de Southern blot genómico, que *Arabidopsis thaliana* contiene un único gen que codifica MK. Dicho gen ha sido clonado y secuenciado, y la comparación de su secuencia con la del cDNA aislado previamente ha permitido deducir su estructura. El gen consta de cinco exones separados por cuatro intrones. El análisis preliminar de su patrón de expresión, mediante experimentos de Northern blot, muestra que el gen se expresa mayoritariamente en raíces e inflorescencias, aunque el mRNA se detecta en todos los tejidos estudiados (raíces, tallos, hojas, inflorescencias y frutos). No se aprecian diferencias significativas en el nivel de expresión del gen en plántulas crecidas durante seis días en condiciones de luz o de oscuridad.



En cuanto al estudio de la FPS, análisis de Southern blot genómico sugieren que *Arabidopsis thaliana* contiene una pequeña familia multigénica integrada por al menos dos genes (*FPS1* y *FPS2*) que codifican FPS. Se ha detectado la existencia de un gen adicional que podría codificar una nueva isoforma de FPS o una preniltransferasa relacionada. Los genes *FPS1* y *FPS2* han sido clonados y caracterizados. El gen *FPS1* contiene la secuencia del cDNA aislado previamente por complementación funcional y codifica la isoforma FPS1. Dicho gen consta de 12 exones separados por 11 intrones. El gen *FPS2* consta de 11 exones separados por 10 intrones. Ambos genes presentan una organización muy similar por lo que respecta a la posición de los intrones y el tamaño de los exones. Los genes *FPS1* y *FPS2* muestran patrones de expresión diferentes. Ambos genes se expresan en todos los tejidos analizados, si bien el gen *FPS1* se expresa preferentemente en raíces e inflorescencias, mientras que el gen *FPS2* se expresa principalmente en inflorescencias. Ello sugiere una posible especialización funcional de cada una de las isoformas de FPS. Por otra parte, no se aprecian diferencias significativas en el nivel de expresión de ambos genes en plántulas crecidas durante seis días en condiciones de luz o de oscuridad. En todas las muestras analizadas el gen *FPS2* presenta una expresión más reducida que el gen *FPS1*.

El cDNA correspondiente al gen *FPS2* ha sido clonado mediante la técnica de RT-PCR a partir de RNA poly(A) de inflorescencias. El análisis de la secuencia de cDNA ha revelado la existencia de un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 342 aminoácidos (isoforma FPS2) que presenta una homología del 90.6% con la isoforma FPS1. La funcionalidad de la isoforma FPS2 se ha demostrado por su capacidad para complementar mutantes de levadura deficientes en actividad FPS. Asimismo, mediante ensayos de actividad FPS en extractos celulares de mutantes de levadura que expresan la isoforma FPS2, se ha confirmado que dicha enzima cataliza la síntesis de FPP a partir de IPP y DMAPP.

## **Función del gen *narI* relacionado con la asimilación de nitrato en *Chlamydomonas reinhardtii*.**

A. Galván, J. Rexarch y E. Fernández

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, 14071-Córdoba, Fax 34-57-218606

En *Chlamydomonas reinhardtii*, se ha identificado una agrupación de genes para la asimilación de nitrato que ha sido descrita por Quesada et al. 1993

*Nia1* es el gen estructural de la nitrato reductasa (Fernández et al. 1989), *nar2* más *Nrt2;1* codifican para un transportador biespecífico de nitrato/nitrito de alta afinidad (sistema 1), *nar2* más *Nrt2;2* codifican para un transportador específico de nitrato de alta afinidad (sistema 2). Además, existe un transportador específico de nitrito independiente del producto del gen *nar2* cuyo(s) gen(es) todavía no están clonados (sistema 3) (Galván et al. 1995). La expresión del gen *narI* está regulada por nitrato y estirpes mutantes delecionadas en *Nrt2;2-Nrt2,1-nar2-Nit1-nar1* muestran un crecimiento normal en nitrito así como actividades de transporte de nitrito y nitrato reductasa (Quesada et al. 1993).

Para estudiar la función de *nar1*, se han construido mutantes que además de la NR contienen cada uno de los sistemas de transporte, con o sin el gen *nar1*. La caracterización de estos mutantes muestra que la ausencia de *nar1* no afecta a las actividades de transporte de nitrato/nitrito mediada por cada uno de los tres sistemas de transporte ni al crecimiento en nitrato/nitrito en las condiciones estándar de ensayo. Sin embargo, *nar1* es esencial para el crecimiento en nitrato y mantenimiento de la actividad transporte de nitrato en medio alcalino y carente de potasio. El fenotipo de los mutantes *nar1*<sup>-</sup> parece indicar que NAR1 es un canal de potasio que controla la asimilación de nitrato. Para demostrar esta hipótesis se determinó actividad de transporte de potasio usando como marcador Rb<sup>86</sup>. Las estirpes *nar1*<sup>+</sup> inducidas en nitrato mostraron dos componentes para el transporte de Rb<sup>86</sup>, uno de alta afinidad (K<sub>s</sub>= 30 mM) y otro de baja afinidad (K<sub>s</sub>= 0.2 mM). Las estirpes *nar1*<sup>+</sup> crecidas en amonio, condición en que no expresan *nar1*, así como las estirpes *nar1*<sup>-</sup> mostraron sólo el componente de baja afinidad.

### Referencias:

- Fernández, E., Schnell, R.A., Ranum, L.P.W., Hussey, S.C., Silflow, C.D., Lefebvre, P.A. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 6449-6453.
- Quesada, A., Galván, A., Fernández, E. (1993). *Mol. Gen. Genet.* 240, 387-394.
- Galván, A., Quesada, A., Fernández, E. (1995). Sometido a publicación.

## Genes de Giberelina 20-oxidasa de guisante y judía

J. L. García-Martínez e I. López-Díaz.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.

Las giberelinas (GAs) constituyen un grupo de hormonas que controlan diversos procesos fisiológicos como el crecimiento del tallo y la fructificación y el desarrollo del fruto. Aunque se conocen unas 100 GAs, sólo unas pocas parecen ser realmente activas. Hay evidencia experimental en apoyo de que GA<sub>1</sub> regula el alargamiento del tallo en muchas especies, y que GA<sub>1</sub> y/o GA<sub>3</sub> sintetizadas en las semillas en desarrollo controlan el crecimiento del pericarpio, al menos en guisante. La ruta de biosíntesis de GAs es compleja, y a partir de GA<sub>12</sub>-aldehído (la primera GA propiamente dicha), la mayoría de los enzimas implicados son dioxigenasas dependientes de 2-cetoglutarato y Fe<sup>2+</sup>. Uno de los primeros pasos metabólicos, la oxidación del carbono-20 con pérdida posterior del mismo para dar lugar a las GAsC<sub>19</sub> parece tener función reguladora.

En la presente comunicación se describe el aislamiento, caracterización y expresión de clones de cDNA de GA-20 oxidasas de dos leguminosas: guisante (*Pisum sativum* L.) y judía (*Phaseolus vulgaris* L.). El material empleado para el aislamiento de poli(A)<sup>+</sup>RNA para la síntesis de cDNA fue semillas jóvenes de guisante y judía de 6 y 15 días tras antesis, respectivamente, dado su elevado contenido de GA<sub>1</sub> en dichos estadios. El cDNA se utilizó como sustrato para amplificación mediante PCR con oligonucleótidos cebadores degenerados, diseñados a partir de secuencias de aminoácidos conservadas en diversas dioxigenasas dependientes de 2-cetoglutarato. Clones de PCR codificando secuencias de aminoácidos similares a las de GA 20-oxidasa de calabaza (*Cucurbita maxima*) (Lange et al. *Proc. Acad. Sci.* 91:8552, 1994) se utilizaron para el escrutinio de genotecas de cDNA de semillas en I-ZAP. Se ha aislado un clon de cDNA de longitud completa de guisante (Ps27-12, de unas 1400 bp) y dos de judía (Pv15-11 y Pv73-1, de 1500-1600 bp). Todos ellos tienen fases abiertas de lectura muy similares a otras de GA 20-oxidasa de calabaza y *Arabidopsis thaliana*. Los clones se introdujeron en fase en vectores pTrcHis para su expresión como proteínas de fusión en *E. coli*, y los productos se ensayaron para actividad 20-oxidasa utilizando [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> y [<sup>14</sup>C]GA<sub>53</sub> como sustratos. Mediante Gc-MS se demostró que las tres proteínas recombinantes son capaces de convertir [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> a [<sup>14</sup>C]GA<sub>9</sub> y [<sup>14</sup>C]GA<sub>53</sub> y [<sup>14</sup>C]GA<sub>20</sub> con igual eficiencia, contrariamente a otras GA 20-oxidasa clonadas previamente en calabaza y *Arabidopsis thaliana*, en donde GA<sub>12</sub> es el sustrato preferente. Hibridaciones southern de DNA genómico sugieren que los clones de cDNA aislados están representados por un solo gen. Los patrones de expresión de dichos genes, analizados mediante análisis northern, muestran que el clon de guisante (Ps27-12) se expresa en todos los tejidos investigados, particularmente en hojas y frutos jóvenes (dos órganos con supuesta capacidad biosintética de GAs). Los dos clones de judía, por el contrario, muestran expresión específica, asociada principalmente con cotiledones en desarrollo (Pv15-11) y hojas jóvenes (Pv73-1). La ausencia de expresión significativa en entrenudos en crecimiento de todos los genes de GA-20 oxidasa aislados sugiere que la síntesis de GA<sub>1</sub> (al menos hasta GA<sub>20</sub>), que controla el alargamiento del tallo, debe tener lugar en las hojas.

## Regulación diferencial por etileno de la expresión del gen de la S-adenosilmetionina sintasa en flores polinizadas de clavel

L. Gómez-Gómez y W. R. Woodson\*.

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de C. Biológicas, Universidad de Valencia, Dr Moliner 50 46100 Burjasot*

*\*Department of Horticulture, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907-1165*

En muchas especies, la polinización va asociada a un incremento en la producción de etileno por el estigma y el estilo. A continuación tiene lugar un incremento en la producción de etileno en otros órganos florales. En flores de clavel hay fuertes evidencias de la existencia de una regulación interórganos de la producción de etileno: el ovario actúa como fuente de ACC y/o etileno que son transportados a otros órganos florales tras la polinización. El tratamiento de flores con etileno, mimetiza los efectos de la polinización con respecto a la estimulación del desarrollo del ovario y senescencia del perianto en ausencia de polinización.

La S-adenosilmetionina (SAM) es el precursor en la biosíntesis de etileno. La conversión de metionina a SAM es catalizada por la S-adenosilmetionina sintasa (SAM-S). La SAM-S es un enzima imprescindible para las células debido a la importancia metabólica de la SAM, por lo que se consideraba que sus niveles de expresión siempre permanecían relativamente elevados, expresándose de forma constitutiva. Sin embargo, la presencia de varias copias de los genes de la SAM-S sugieren que parte de estos genes podrían ser expresados constitutivamente, mientras que otros podrían tener su expresión específicamente regulada por factores hormonales, medioambientales o de desarrollo.

En clavel la SAM-S está constituida por una familia multigénica de 2-3 copias. La expresión de la SAM-S en pétalos senescentes de flores polinizadas y en estigmas se encuentra negativamente regulada por el incremento de los niveles de etileno; este mismo comportamiento se observa cuando las flores no polinizadas son tratadas con etileno. Sin embargo la expresión de la SAM-S en ovarios polinizados se encuentra asociada a la elevada producción de etileno generado en el ovario, siendo también inducida cuando ovarios no polinizados son tratados con etileno. Dicha inducción puede inhibirse con el tratamiento de los ovarios polinizados con NBD. Estos resultados sugieren una regulación específica de la SAM-S por etileno en cada uno de los órganos florales. La inducción de la SAM-S en el ovario esta asociada a los elevados niveles de ACC y/o etileno producidos tras la polinización, ambos compuestos serían transportados hacia otras partes de la flor induciendo la senescencia de dichas estructuras, sin necesidad de una inducción de la expresión de la SAM-S para la síntesis de etileno.

## Caracterización de los enzimas del metabolismo energético del pirofosfato de microorganismos fotosintéticos y su utilidad como sistemas modelo en Bioenergética.

M. R. Gómez, M. Losada y A. Serrano

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC y Universidad de Sevilla, Apdo. 1113, 41080 Sevilla

El pirofosfato inorgánico (PPI) puede sustituir al ATP como compuesto energético donador de  $\sim P$  en muchos organismos fotosintéticos. El PPI es mucho más sencillo estructuralmente por lo que es hoy considerado como el compuesto que en la evolución pudo preceder al ATP en la bioenergética de los primitivos sistemas biológicos. Precisamente en los organismos fotosintéticos (desde bacterias fotosintéticas a plantas superiores) se encuentran todos los tipos de enzimas implicados en el metabolismo energético del  $PP_i$ : a) las *pirofosfatasa solubles (sPPasas)*, probablemente presentes en todos ellos; b) *las PPasas translocadoras de  $H^+$*  de la membrana vacuolar (tonoplasto), presentes en plantas superiores y probablemente también en microalgas eucarióticas, y c) *las  $PP_i$ -sintasas translocadoras de  $H^+$* , hasta el momento sólo encontradas en la membrana de cromatóforos de algunas bacterias fotosintéticas (p.e., *Rhodospirillum rubrum*). El  $PP_i$  es un producto de las reacciones de síntesis de biopolímeros (ácidos nucleicos, proteínas) y, en el citosol de las células vegetales, también de sacarosa. Al ser tóxico incluso a concentraciones del orden de 1 mM y para permitir el normal desarrollo de las reacciones de biosíntesis que lo producen, su concentración intracelular debe mantenerse muy baja. Esta función la llevan a cabo las sPPasas, muy estudiadas en eubacterias (Mm, 20 kDa) y eucariotas no fotosintéticos (Mm  $\sim$  32 kDa), pero de las que se posee poca información en organismos fotosintéticos. Hemos caracterizado la actividad sPPasa en extractos crudos de distintas microalgas: cianobacterias unicelulares (*Synechocystis* PCC 6803) y filamentosas (*Anabaena* PCC 7120); algas rojas unicelulares con cianoplastos (*Cyanidium*) o rodoplastos (*Porphyridium*); y microalgas clorofíceas (*Chlamydomonas*, *Monoraphydidium*), con el fin de hacer un estudio comparativo, tanto bioquímico como de genética molecular. Todas las sPPasas de microalgas son estrictamente dependientes de  $Mg^{2+}$ , pero presentan diferencias significativas en los perfiles de dependencia del pH de su actividad enzimática. Así, mientras que las cianobacterias y algas rojas primitivas (con cianoplastos estructuralmente parecidos a cianobacterias) poseen sPPasas neutras (con valores de pH óptimo de aproximadamente 7), las microalgas clorofíceas, más evolucionadas, presentan sPPasas alcalinas (con valores de pH óptimo en el rango de 8 a 9) similares en este aspecto a las de plantas. Actualmente estamos desarrollando un método de purificación que emplea como paso clave una cromatografía en hidroxapatito con elución bioespecífica del enzima mediante análogos estructurales del  $PP_i$  (iminodifosfato y ácido medrónico). El análisis por SDS-PAGE de preparaciones parcialmente purificadas de la sPPasa de *Synechocystis* PCC 6803 ha mostrado una proteína mayoritaria con una subunidad de Mm de 34 kDa aproximadamente. Las preparaciones purificadas de sPPasas de microalgas se están empleando para la obtención de anticuerpos y la secuenciación del extremo amino-terminal de las proteínas con el fin de clonar los genes correspondientes. Por otra parte, ya que la existencia de una PPasa translocadora de  $H^+$  en la membrana vacuolar de microalgas no se ha estudiado hasta el momento, se emplearán técnicas bioquímicas e inmunológicas para investigar dicha proteína en estos organismos y se usarán genes de plantas para chequear las genotecas correspondientes. La posible presencia de  $PP_i$ -sintasas translocadoras de  $H^+$  similares a las encontradas en bacterias fotosintéticas se investigará también tanto en cianobacterias como en microalgas eucarióticas. La existencia de estas proteínas en membranas de

microalgas puede ser muy relevante para el conocimiento de la evolución molecular de los procesos de transducción de energía, ya que hasta ahora sólo se han encontrado en organismos fotosintéticos muy alejados evolutivamente (plantas y bacterias fotosintéticas). Por otra parte, puesto que la  $PP_i$ -sintasa -una proteína intrínseca de membrana formada por dos subunidades de 70 kDa aproximadamente- es mucho más sencilla estructuralmente que las ATPasas pero lleva a cabo una función equivalente como bomba de protones, su análisis estructural detallado y el esclarecimiento de su mecanismo catalítico debe ser muy relevante en Bioenergética y podría utilizarse como sistema modelo. Nuestro grupo ha propuesto una teoría unificada de los procesos de transducción de energía por los sistemas bioquímicos según la cual la transferencia de un anión óxido ( $O^{2-}$ , un átomo de oxígeno con dos electrones adicionales) entre un grupo carboxilo ( $R-COO^- \longleftrightarrow R-C^+=O$ ) y otro fosfato (metafosfato  $\longleftrightarrow$  ortofosfato) juega un papel central en el mecanismo ácido-base propuesto para los enzimas que transfieren grupos fosforilo (metafosfato) y que intervienen tanto en la fosforilación a nivel de sustrato como de membrana. Las PPasas solubles y de membrana así como las  $PP_i$ -sintasas pueden ser relevantes a este respecto ya que se ha postulado recientemente que un grupo metafosfato ( $\sim P O_3^-$ ) interviene como intermediario en la hidrólisis del  $PP_i$  en presencia de iones  $Mg^{2+}$ . Puesto que el mecanismo de los enzimas que transfieren grupos fosforilo no está aún totalmente esclarecido, la estructura relativamente simple de las PPasas y  $PP_i$ -sintasas las hace sistemas apropiados para comprobar la validez de la teoría propuesta.

#### Referencias

- M.Losada, M.G. Guerrero, M.A. De la Rosa, A. Serrano, M. Hervás y J.M. Ortega (1990) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 23,105-128.
- M. Baltscheffsky y H. Baltscheffsky (1992) En: *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (L. Ernster, ed.), pp. 331-348. Elsevier, Amsterdam.
- M. Losada (1992) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 28, 31-42.
- A. Serrano, M.I. Mateos y M. Losada (1993) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 197, 1348-1356.
- B. Ma, C. Meredith y H.F. Schaefer (1995) *J. Phys. Chem.* 99, 3815-3822.

## Purificación y caracterización del enzima sacarosa sintasa de cebada.

J. Guerin y P. Carbonero.

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biotecnología-UPM  
E.T.S. Ingenieros Agrónomos, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid.

El enzima sacarosa sintasa cataliza la reacción reversible:



En plantas, la reacción enzimática está desplazada hacia la ruptura de la sacarosa en las zonas de la síntesis de almidón. Este enzima se encuentra presente en cereales en la mayoría de los tejidos de la planta incluyendo raíz, hoja y endospermo. Se han aislado y caracterizado dos tipos de isoenzimas en maíz, trigo y caña de azúcar. En cebada, se han obtenido dos tipos de clones cDNA completos correspondientes a sacarosa sintasa, SS1 y SS2.

Los dos genes parecen estar regulados diferentemente, estudios de expresión de RNA en cebada muestran que las dos isozimas se expresan fuertemente en endospermo mientras que en raíz sólo se expresa SS1. Además, la expresión de SS1 es altamente inducida por frío y anaerobiosis en coleoptilo y raíz. Esta regulación diferencial sugiere que las dos isozimas cumplen papeles fisiológicos distintos en la planta de cebada aunque las secuencias de sus cDNA presentan una alta homología.

Hemos aislado SS1 de raíces de cebada y estudiado varias de sus características. Usando cromatografía de afinidad y de intercambio iónico se enriqueció el enzima ~160 veces a partir de raíces jóvenes del cultivar Bomi. El peso molecular del enzima nativo es de aproximadamente 330 kD y la proteína es un tetrámero compuesto de cuatro subunidades de 83 kD. Las sacarosa sintasas de maíz y trigo también han sido descritas como tetrámeros compuestos de subunidades entre 87 y 92 kD. El punto isoeléctrico de la proteína nativa SS1 de cebada se estimó en aproximadamente 5.1. Se determinaron los parámetros cinéticos para la reacción en el sentido de ruptura. Se estimaron valores de 30 mM y 17 mM para las Km de sacarosa y UDP respectivamente.

Se han obtenido anticuerpos policlonales en conejo contra la proteína SS1 purificada de raíces de cebada. Debido a la similitud entre las secuencias de SS1 y SS2 es de esperar una reacción inmunológica cruzada de este anticuerpo frente a las dos tipos de sacarosa sintasa. Se están obteniendo anticuerpos contra un péptido diferencial específico de la isozima SS2. La localización de los dos isozimas en diferentes tejidos de cebada contribuirá a comprender el papel fisiológico de las dos isozimas *in vivo*.

## Bases moleculares de la interacción fructosa-1,6-bisfosfatasa/tiorredoxina en cloroplastos de plantas superiores

R. Hermoso, F.J. López Jaramillo, A. Reche, M. Sahrawy, M. Castillo, J.J. Lázaro, E. Ocón, A. Chueca y J. López Gorgé

Dpto. de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Prof. Albareda I, 18008-Granada

La alineación de las secuencias aminoacídicas de las seis fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) cloroplastídicas secuenciadas, muestra la existencia de un fragmento de baja homología (alrededor de 20 aminoácidos) en la región que precede al considerado centro regulador de la enzima (173Cys-178Cys en la FBPasa de guisante). La clara diferencia existente entre las enzimas de guisante y espinaca en su capacidad de interacción con tiorredoxina (Trx), su modulador redox fisiológico, nace de dicha zona no homóloga un buen candidato responsable de la distinta capacidad de unión. Aunque en la interacción FBPasa-Trx intervienen fuerzas hidrofóbicas (B.B.A.,636,113,1981), la fuerte dependencia del pH exige la participación adicional de fuerzas coulombianas. Efectivamente, la unión de la enzima de guisante con las Trxs f y m homólogas no tiene lugar a pH 7.1, estableciéndose fuertemente a pH 7.9 en presencia de DTT.

Usando como molde un clon complementario (cDNA) codificante para la FBPasa cloroplastídica de guisante aislado por nosotros (Planta,193,494,1994), se ha construido y amplificado por PCR la secuencia nucleotídica (cDNA) que codifica un fragmento de 19 aminoácidos (<sup>149</sup>Pro-<sup>167</sup>Gly), correspondiente a la zona de baja homología de la FBPasa de guisante. Inserto en el vector pGEMEX-1, se expresó en *E. coli* K38 con buen rendimiento como proteína de fusión de 37 kDa (35 kDa del fragmento codificado por el vector + 2040 Da en el lado C-terminal correspondiente al polipéptido de 24 aminoácidos); esta aparecía en forma insoluble en cuerpos de inclusión, de donde se extrajo con urea 8M. Su identidad se demostró por Western blot con anticuerpos frente a la FBPasa de guisante. Una fracción IgG específica frente al epitopo de 19 aminoácidos se obtuvo a partir de anticuerpos frente a la FBPasa total, por inmunofinidad con la proteína de fusión soportada en nitrocelulosa. Esta fracción IgG reconoce fuertemente, no solo a la proteína de fusión, sino también a la FBPasa nativa de guisante, mientras que no lo hace con la enzima de espinaca, lo que avala la baja homología indicada de la secuencia que precede a la zona reguladora.

Como ocurre con la FBPasa nativa, la proteína de fusión interacciona fuertemente con Trx m de guisante a pH 7.9, eluyendo por una columna de Superosa 12 como un complejo detectable con anticuerpos frente a Trx m y por la fracción IgG frente al epitopo de 19 aminoácidos. Este comportamiento se explica teniendo en cuenta que dentro de la secuencia de 24 aminoácidos (149Pro- 72Arg) de la FBPasa de guisante existen 9 restos ácidos, frente a uno sólo básico, con una carga negativa neta de 8. Por el contrario, en las enzimas de espinaca, *Arabidopsis* y colza esa carga es sólo de 7, bajando a 5 en las FBPasas de trigo y patata. Los resultados de filtración fueron confirmados con pruebas ELISA. Como ocurría en experiencias paralelas con FBPasa de guisante, la cantidad de proteína de fusión retenida por Trx m se incrementaba con la concentración de proteína añadida a los pocillos.

Ensayos preliminares han puesto de manifiesto una inhibición de la actividad FBPasa dependiente de DTT-Trx (pero no de la inducida con 10 mM Mg<sup>2+</sup> en ausencia de reductantes), cuando la enzima se preincuba con la fracción IgG frente al epitopo de 19 aminoácidos. Experiencias de inhibición competitiva de la FBPasa activada por Trx m, en presencia de la proteína de fusión portadora del fragmento de 19 aminoácidos, pusieron sorprenden-



temente de manifiesto un incremento de la actividad enzimática. Estos resultados indican que dicho fragmento no es sólo un lugar de anclaje pasivo para la Trx, sino que como consecuencia de la unión FBPasa-Trx esta última experimenta algún tipo de cambio conformacional que la hace más fácilmente reducible por DTT, o que aumenta su capacidad de transferencia de equivalentes de reducción a la enzima a activar.

El papel esencial del fragmento que precede a la zona reguladora en el proceso de unión a Trx, y en la propia activación de la enzima, se ha analizado preparando dos FBPasas quiméricas de guisante. En una de ellas se deleccionó el fragmento de 17 aminoácidos que va desde 154Leu a 170Gly, mientras que en la segunda se sustituyó la secuencia 150Asn- 172Arg por la correspondiente de la enzima de trigo. Después de subclonaje en pET-3d y expresión en *E. coli*, ambas mutantes fueron reconocidas en Western blot por anticuerpos frente a la FBPasa nativa de guisante. La enzima deleccionada mostró, junto a una baja estabilidad, la pérdida de su capacidad de modulación por Trx, cosa que no le ocurrió al híbrido con trigo. Experiencias preliminares de filtración por Superosa 12, previa incubación con Trx f, indican una ausencia de interacción, aún a pH 7.9, con la FBPasa que sufrió la delección.

Tomando como modelo los datos estructurales recientemente publicados para la FBPasa fotosintética de espinaca (Biochemistry,34,4299,1995), tanto el centro regulador de la enzima como el fragmento que le precede, potencialmente implicado en la unión con Trx, se localizan en un bucle superficial, totalmente accesible, tanto desde una perspectiva de estructura terciaria como cuaternaria de esta enzima homotetramérica.

De acuerdo con lo indicado, el componente culombiano en la interacción Trx-FBPasa se ha de establecer con agrupaciones básicas, accesibles, de la molécula de Trx. A tal fin hemos diseñado un programa de mutaciones sobre las Trxs f y m de guisante en las que, tomando como modelo la estructura tridimensional de la Trx de *E. coli*, aminoácidos básicos próximos al centro regulador son cambiados por aminoácidos neutros. Adicionalmente, se han preparado sendos híbridos entre ambas Trxs (Trx m-Trx f, y Trx f-Trx m). tomando como punto de corte el sitio de restricción *Ava II* existente en la secuencia nucleotídica codificante entre ambas cisteínas reguladoras. Experiencias de "binding", y de activación de FBPasa, con las Trxs híbridas y mutadas se encuentran actualmente en marcha.

## **Análisis de la expresión génica durante la embriogénesis somática y en tratamiento con ABA y sequía**

*R. Linacero, M. Candela, M. López-Bilbao y A.M. Vázquez*

*Depto de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid.*

La embriogénesis somática (e.s) es el proceso por el cual una célula somática se comporta como un cigoto, originando un embrión que posteriormente formará una planta. Algunos de los genes que se expresan diferencialmente durante la e.s. también presentan expresión diferencial en presencia de ABA y/o en tratamientos de sequía. El análisis molecular de algunos de estos genes lo llevamos a cabo desde dos diferentes enfoques.

1.-Se realiza el estudio del patrón de expresión durante la e.s. de algunos genes previamente descritos y que se expresan diferencialmente en la embriogénesis cigótica y/o en algunos procesos de estrés (Em Cuming 1984; RAB 21, Mundy and Chua 1988; rd22, Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 1993; ECP 31, Tomohiro et al. 1992). En estos estudios se utilizan callos embriogénicos y no embriogénicos.

2.- Se trata de aislar nuevos genes que se expresen diferencialmente. En este caso se utilizan cultivos embriogénicos de caña de azúcar en diferentes estados de la e.s., y se realizan tratamientos de ABA y sequía.

En ambos casos se aísla el RNA total de los cultivos en las diferentes situaciones y se sintetizan los correspondientes cDNAs. Estos cDNAs se amplifican diferencialmente a través de la técnica de PCR. Se utilizan oligos diseñados a partir de las secuencias conocidas en el experimento 1 y oligos no específicos, al azar en el experimento 2.

En el experimento 1 se observa que algunos de estos genes presentan un patrón de expresión similar al previamente descrito, mientras que otros presentan diferencias.

En el experimento 2 se aislaron varios clones, uno de ellos, el clon RLI se expresa diferencialmente en presencia de ABA y en tratamientos de sequía en una variedad susceptible a sequía, no siendo diferencial en la variedad tolerante.

## Caracterización del gen de la S-adenosilmetionina descarboxilasa de guisante (*Pisum sativum*. L.)

F. Marco y P. Carrasco.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat de València. Doctor Moliner,  
50 46100 Burjassot

La S-adenosilmetionina descarboxilasa (E.C 4.1.1.50; SAMdc) es una enzima con un papel clave dentro de la ruta de biosíntesis de las poliaminas espermidina y espermina. El sustrato para esta enzima es la S-adenosilmetionina (SAM) y el producto es la SAM descarboxilada que sirve como fuente de unidades aminopropilo necesarias para la biosíntesis de espermidina y espermina a partir de putrescina. Se ha demostrado que la actividad de esta enzima es limitante para la biosíntesis de estas poliaminas, no existiendo rutas alternativas descritas en la literatura. Se han descrito actividades SAMdc en diversidad de tejidos vegetales (Evans *et al*, 1989), aunque la información acerca de secuencias de este gen en plantas es mucho más reducida.

Partiendo de un clon de cDNA de SAMdc de patata, el primero descrito para plantas (Taylor *et al*, 1992), hemos comenzado a abordar la caracterización de este gen en *Pisum sativum*. El uso de este cDNA como sonda heteróloga nos ha permitido empezar a estudiar la expresión del gen de la SAMdc mediante análisis Northern, observándose niveles altos de ésta en tejidos indiferenciados (callos de hojas), mientras que en órganos vegetativos y reproductivos no se detecta señal.

Estas diferencias de expresión están de acuerdo con los resultados descritos en la literatura, que muestran en general niveles altos de poliaminas y actividad SAMdc en tejidos jóvenes y de división rápida (Evans *et al*, 1989). Coincide también con los estudios de expresión del gen de patata, que muestran un mayor nivel en tejidos de este tipo, en concreto brotes jóvenes de flores, frente a unos niveles de expresión menores en flores y polen maduros (Mad Avif *et al*, 1994). Por otro lado, la comparación de la secuencia del clon de cDNA de patata con el resto de genes SAMdc descritos en la literatura muestran la conservación de la secuencia proteica en determinadas zonas, que han permitido el diseño de un par de oligonucleótidos degenerados que han sido utilizados para la amplificación mediante RT-PCR de poli A-mRNA de tejidos indiferenciados, de un fragmento del gen de la SAMdc de guisante, que estamos utilizando en la actualidad para profundizar en los estudios de expresión de este gen, así como en el aislamiento de los clones completos de cDNA y genómico.

### Referencias

- Evans P.T., Malmberg R.L., (1989) *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 40: 235-269  
Mad Arif S.A., Taylor M.A., George L.A., Butler A.R., Burch L.R., Davies H.V., Stark M., Kumar A., (1994) *Plant. Mol. Biol.* 26: 327-338  
Taylor M.A., Mad Arif S.A., Kumar A., Davies H.V., Scobie L.A., Pearce S.R., Flavell A.J. (1992) *Plant. Mol. Biol.* 20: 641-651

## Caracterización molecular de enzimas implicadas en la biosíntesis de ácido jasmónico en patata.

M. Martín, J. Royo Cárcamo, G. Vancanneyt y J. J. Sánchez-Seirano.

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), UAM, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid.

El ácido jasmónico (JA) es una hormona que interviene en la transducción de señal que regula la inducción de genes por herida, inhibidores de proteinasas entre otros. El tratamiento de plantas con JA afecta la tuberización, senescencia, germinación y crecimiento de raíces, aunque no se ha demostrado el papel del JA endógeno en estos procesos.

El JA se sintetiza a partir del ácido linoléico, liberado de las membranas por la acción de lipasas, en una cadena de reacciones que incluyen, adición de grupos hidroxilo por lipoxigenasas y una serie de ciclaciones, reducciones y  $\beta$ -oxidaciones.

Con el objeto de ampliar el conocimiento del papel que desempeña el JA *in vivo*, estamos interesados en la caracterización de enzimas que intervienen en su síntesis, tales como la  $\omega$ 3-desaturasa ( $\omega$ 3-Des) y la 13-lipoxigenasa (13-LOX).

La  $\omega$ 3-Des interviene catalizando la inserción de un doble enlace en el ácido linoleico (LA) para dar lugar al ácido linoléico (LNA). En plantas, a diferencia de otros organismos, la mayor parte de la síntesis de ácidos grasos se lleva a cabo en los cloroplastos. Hemos aislado un cDNA de la  $\omega$ 3-Des de cloroplastos de patata, que se expresa constitutivamente en todos los órganos excepto en tubérculo.

La 13-LOX interviene catalizando el siguiente paso de la síntesis de JA, introduciendo oxígeno molecular en el LNA. Se han caracterizado cinco cDNAs de LOX de tubérculo, muy similares entre sí. Estas LOX se expresan de manera constitutiva en los tubérculos y en menor proporción en las raíces de patata. También se han aislado dos cDNAs que codifican isoenzimas de LOX de hoja, que muestran muy baja similitud con las de tubérculo. Ambos clones se expresan a bajo nivel en hojas, uno de ellos se induce después de tratamiento con JA mientras que el otro lo hace por herida. Los dos cDNAs y uno de tubérculo han sido expresados en *E. coli* y se ha determinado que las correspondientes actividades LOX tienen pHs óptimos y especificidad de sustrato distintos entre sí.

Hemos obtenido plantas transgénicas de patata que expresan RNAs complementarios a los mRNAs de la  $\omega$ 3-Des de cloroplastos y de las diferentes LOX, para estudiar si la reducción de las proteínas correspondientes afecta a los niveles endógenos de JA y, de esta manera, caracterizar el papel del JA en el desarrollo normal de la planta y en su respuesta frente a heridas.

## Alcohol deshidrogenasa clase III (formaldehído deshidrogenasa) de *Arabidopsis thaliana*: clonaje del cDNA, y estudio de sus propiedades moleculares y funcionales.

M. Caren Martínez, H. Achkhor, R. Fernández, J. Farrés y X. Parés.

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona)

La familia de las alcohol deshidrogenasas (ADHs) comprende un grupo de enzimas con diferentes grados de homología estructural y funcional. Entre las ADHs de mamíferos, la llamada clase III es única en cuanto a su distribución ubicua y a su especificidad de sustrato. Esta forma es poco efectiva oxidando etanol ( $K_m > 3M$ ) pero cataliza rápidamente la oxidación de alcoholes primarios de cadena larga, tales como n-octanol. Por otra parte, la ADH clase III cataliza también la oxidación de S-(hidroximetil)glutión, que se forma espontáneamente por reacción entre formaldehído y glutión, y es por tanto una formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutión.

De toda la familia de alcohol deshidrogenasas, la clase III es la más conservada en términos evolutivos y, sobre la base de su homología de secuencia entre diferentes especies, se ha sugerido que esta forma podría ser la precursora, de todas las demás ADHs, y, entre ellas, de la ADH clásica (clase I), activa con etanol (1).

Se ha demostrado la existencia de actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutión en diversas plantas (2, 3), aunque, hasta el momento solamente ha podido determinarse la secuencia de la ADH clase III de guisante, por secuenciación de la proteína purificada (trabajo en preparación). El estudio de la estructura de la ADH clase III en otras especies de plantas es importante para clarificar los patrones de evolución relativos en plantas y animales, así como para determinar el papel fisiológico de este enzima en las plantas.

En nuestro laboratorio hemos clonado un cDNA correspondiente a la ADH clase III de *Arabidopsis thaliana*, por medio de la técnica de PCR, utilizando una biblioteca de cDNA de flores inmaduras. La secuencia deducida de la proteína presenta un 68,9% de identidad con la ADH clase III humana y contiene perfectamente conservados los residuos del centro activo que son necesarios para una actividad frente al sustrato S-hidroximetilglutión. La secuencia clonada contiene una fase abierta de lectura de 1136 pares de bases, que correspondería a un polipéptido de 379 aminoácidos. El análisis por transferencia Northern muestra la presencia de un único transcrito, de un tamaño aproximado de 1.400 nucleótidos, presente por igual en todos los órganos de la planta adulta de *Arabidopsis* (raíz, tallo, hojas y flores).

Extractos proteicos, obtenidos a partir de plantas de *Arabidopsis*, muestran la presencia de actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutión, aunque en cantidades relativamente bajas (5 mU/mg de proteína). A partir de estos extractos, hemos podido purificar el enzima casi a homogeneidad, por sucesivas cromatografías en DEAE-Sepharose y Cibacron Blue-Sepharose. Los parámetros cinéticos y de especificidad de sustrato muestran que este enzima es un miembro típico de la clase III., con una  $K_m$  de 1,4 mM para el S-hidroximetilglutión, valor del mismo orden que el observado en mamíferos.

En consecuencia, estos resultados corroboran la existencia de ADH clase III en plantas y su poca divergencia a lo largo de amplios períodos de tiempo. Las alcohol deshidrogenasas activas con etanol, descritas en muchas plantas y muy relacionadas con las que se encuentran en los animales, se habrían originado por duplicaciones génicas a partir de este ancestro común, por un fenómeno de evolución paralelo al de los animales, en que ambos sistemas habrían convergido hacia una misma especificidad de sustrato. Por otra parte, la

existencia de un enzima muy conservado, tanto en estructura como en función, demuestra la importancia de la ADH clase III en la eliminación del formaldehído endógeno, que se forma durante el normal metabolismo celular, así como debido a la peroxidación lipídica.

#### Referencias

- (1) O. Danielsson, H. Jörnvall. (1992) PNAS 89, 9247-9251
- (2) L. Uotila, M. Koivusalo (1974) J. Biol. Chem. 249, 7653-7663
- (3) M. Giese, U. Bauer-Dorant, C. Langebartels, H. Sandermann (1994) Plant Physiol. 104, 1301-1309.

## Clonación y características de expresión de un ADNc de fresas que presenta homología con la pectato liasa de plantas

N. Medina-Escobar<sup>1</sup>, J. Cárdenas<sup>1</sup>, V. Valpuesta<sup>2</sup>, J. Muñoz-Blanco<sup>1</sup> y J.L. Caballero<sup>1</sup>

1.- Departamento de Bioquímica y Biología Molecular/Fac.Ciencias/Univ. Córdoba

2.- Departamento de Bioquímica y Biología Molecular/Fac.Ciencias/Univ. Málaga

A lo largo del proceso de maduración de la fresa, se producen cambios en la estructura de la pared celular, consistentes, fundamentalmente en una aparente disolución de la lamela media, región rica en pectina, lo que origina un reblandecimiento del fruto a lo largo de la maduración. Entre las enzimas que parecen estar relacionadas con la degradación de la pared celular durante la maduración de los frutos, nos encontramos con hidrolasas de pared como son las pectinesterasas (PE), poligalacturonasas (PG), celulasas y 13-galactosidasas. Aunque se ha demostrado que la actividad de estas enzimas aumentan con el grado de maduración de los frutos, aún no se han podido determinar los mecanismos responsables del reblandecimiento durante la maduración, probablemente debido a la complejidad tanto de la estructura de la pared celular como de los sistemas enzimáticos de las enzimas implicadas en su degradación. En fresa se ha descrito que las actividades endopoligalacturonasa, pectinmetilesterasas (PME) y celulasas aumentan a lo largo del proceso de maduración del fruto y se ha determinado que dicho aumento es paralelo al reblandecimiento del mismo. En otras plantas se han descrito genes homólogos a los de la pectatoliasa, una enzima relacionada con la degradación de la pared celular, tanto en polen de tabaco y maíz como en estilos de tomate y en pistilos de tabaco. Se ha propuesto que estos genes están implicados en procesos de germinación y elongación del tubo polínico.

En la presente comunicación se presenta la clonación, mediante escrutinio diferencial de una librería substractiva de fruto de fresa, de un ADNc con una longitud mayor de 1.25 Kb. Este fragmento ha sido parcialmente secuenciado ( 438 pb ) la secuencia obtenida presenta homología a nivel de nucleótido y aminoácido con el gen de la pectato liasa de plantas como el tomate (*Lycopersicon esculentum*) con valores de identidad que oscilan entre 74.3% /350 bp y 72.2%/108 aa; tabaco (*Nicotiana tabacum*) 61.2%/359 bp y 58,3%/101 aa; maíz (*Zea mays*) 60.8%/352 bp y 58.9%/107 aa.

Experimentos de Northern indican que el gen se expresa de manera específica en fruto y fundamentalmente en los estadios de maduración del mismo. También se observó una expresión muy débil en los estadios de elongación y por el contrario, no se observó expresión en raíz, hoja, flores y estolones.

Los resultados se discuten en función de un posible papel de esta enzima en la degradación de la pared celular a lo largo de la maduración del fruto de la fresa.

## Caracterización y expresión de clones de cDNA regulados por ABA en semillas durmientes de *Fagus sylvatica*.

C. Nicolás, O. Lorenzo, G. Nicolás y D. Rodríguez.

Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca.

La dormición de semillas constituye un bloqueo de la germinación debido, normalmente, a características intrínsecas de la semilla, como la presencia de cubiertas seminales duras o impermeables, o un inadecuado balance hormonal (Bewley y Black, 1994). Se han realizado numerosos estudios para establecer las causas de la dormición y los factores o tratamientos que permiten eliminarla (Schneider y Gifford, 1994), sin embargo los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en este proceso aún no se han esclarecido (Goldmark et al., 1992).

El factor hormonal más estudiado en relación con este fenómeno ha sido el ácido abscísico. Los experimentos realizados con mutantes deficientes o insensibles al ABA o con inhibidores de su síntesis, han demostrado que el ABA es necesario tanto para la inducción como para el mantenimiento de la dormición de semillas (Karssen et al., 1983; Le Page-Degivry y Garello, 1992), y que esta hormona puede regular la expresión de ciertos genes relacionados con este proceso (Ried y Walker-Simmons, 1990; Goldmark et al., 1992), aunque la función y el papel fisiológico de las correspondientes proteínas no son conocidos.

Nuestros estudios se han centrado en la especie *Fagus sylvatica*, cuyas semillas presentan una dormición endógena que puede ser eliminada por estratificación fría durante un tiempo superior a 8 semanas. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento a 4°C aumenta los porcentajes de germinación con respecto al control a 15°C (temperatura óptima para la germinación de esta especie), y que la eliminación del pericarpio acelera el efecto del tratamiento frío en la eliminación de la dormición, lo que indica que las cubiertas seminales son en parte causantes de la dormición de estas semillas. Por su parte, la adición de ABA revierte los efectos de las bajas temperaturas en la rotura de la dormición, mientras que la aplicación de GA3 es capaz de sustituir los efectos del frío, y ambas hormonas contrarrestan sus efectos cuando se añaden de forma conjunta.

El aislamiento de mRNAs de las semillas y su traducción *in vitro* ha puesto de manifiesto que durante la salida de la dormición se producen cambios específicos en los patrones de expresión génica. Estos cambios afectan fundamentalmente a 2 polipéptidos de 22 y 24 kDa aproximadamente, cuyos mRNAs son muy abundantes en semillas durmientes y en las tratadas con ABA, pero disminuyen considerablemente en los tratamientos que eliminan la dormición, como las bajas temperaturas o la aplicación de GA3, lo que sugiere su implicación en este proceso.

La construcción de una genoteca de cDNA a partir de mRNAs de semillas tratadas con ABA, y su posterior rastreo diferencial con sondas obtenidas de semillas durmientes y no durmientes, ha permitido aislar una serie de clones regulados por ABA y estudiar su expresión durante la salida de la dormición de estas semillas.

La secuencia parcial de uno de estos clones (612 pb) presenta una alta homología con proteínas kinasas (aprox. 75 % en 204 aminoácidos) y cuatro de los dominios catalíticos descritos para estas enzimas. El estudio de su expresión mediante análisis por northern-blot muestra que los mRNAs para esta proteína están presentes en semillas durmientes y se mantienen durante la estratificación, pero aumentan en las semillas tratadas con ABA. Además, el calcio y sus quelantes modifican su expresión, sugiriendo la participación de este ión en la regulación por ABA de la síntesis de esta proteína.



Otro de los clones caracterizados en esta genoteca corresponde a una proteína de unión a GTP (GTP-binding protein) con una clara zona de unión a membranas y una alta homología con otras *GTP-binding proteins* de origen tanto vegetal como animal (aprox. 80% en 202 aminoácidos). En su secuencia nucleotídica aparece una región consenso inhibidora del crecimiento presente en los genes *ras*. El análisis por northern-blot de la expresión de esta proteína revela que sus correspondientes mRNAs aparecen en semillas durmientes y disminuyen durante la estratificación, mientras que aumentan en el tratamiento con ABA.

El estudio de la expresión de estas proteínas, tan importantes en el metabolismo celular, aporta nuevos datos sobre la regulación de la dormición y el papel del ABA en este proceso.

#### Referencias

- Bewley D J, Black M. (1994). En: *Seeds: Physiology of Development and Germination* (2ª Ed.). Plenum Press, N.Y.
- Goldmark P J, Curry J, Morris C F, Walker-Simmons M K. (1992). *Plant. Mol. Biol.* 19: 433-441.
- Karssen C M, Brinkhorst-van der Swan D, Breeklund A E, Koorneef M. (1983). *Planta* 157:158-165.
- Le Page-Degivry M T, Garelo G. (1992). *Plant Physiol.* 98: 1385-1390.

## Estudio de tres genes cuya expresión aumenta durante la fructificación inducida por giberelinas en guisante

A. Pérez-García, M. Rodríguez-Concepción y J. P. Beltrán

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universidad Politécnica de Valencia-CSIC. Camino de Vera, 14 - 46022 Valencia.*

El desarrollo del fruto del guisante (*Pisum sativum* L.) puede ser inducido por giberelinas. Si se impide la polinización de la flor por emasculación, el ovario entra en un proceso de senescencia y degeneración. Sin embargo, al aplicar exógenamente ácido giberélico (GA3) el ovario continúa su desarrollo, produciéndose un fruto partenocárpico que sólo difiere del producido por fecundación en que carece de semillas.

Para avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares de este proceso, se han estudiado los cambios en la expresión génica que se producen en los primeros estadios del desarrollo del fruto partenocárpico de guisante por el tratamiento con giberelinas. Se realizó un escrutinio diferencial de una genoteca de cDNA de ovarios no polinizados tratados con GA3 y se aislaron 3 clones (G14, G17 y G19) cuya señal de hibridación era más intensa con las sondas de ovarios tratados que con las de los ovarios no tratados. Los mRNAs de G14, G17 y G19 están presentes en ovarios polinizados, pero no se detectan en ovarios no polinizados a partir del día+2 (2 días después de la antesis), en el que dejan de crecer. El tratamiento de estos ovarios con GA3 induce su crecimiento y reestablece la expresión de los tres genes. El tratamiento con otras hormonas, como auxinas y citoquininas (capaces de inducir procesos de desarrollo en los ovarios tratados), también mantiene la expresión de estos genes. G14 se expresa en todos los órganos florales, excepto en sépalos, y en otros órganos de la planta. G17 y G19 muestran un patrón de expresión similar y se localizan predominantemente en flores, sobre todo en el ovario.

Los mRNAs de G14, G17 y G19 tienen un tamaño estimado de 0'8 kb, 0'6 kb y 0'4 kb respectivamente. Las secuencias proteicas deducidas a partir de los cDNAs poseen repeticiones cortas de aminoácidos que las asemejan a posibles proteínas de pared celular. G17 y G19 son además ricas en prolina, y poseen extremos N-terminales hidrofóbicos con características de péptido señal. Los resultados están de acuerdo con la idea de que las giberelinas, junto con otras hormonas vegetales, podrían ser una señal responsable del mantenimiento de la expresión de genes implicados en el crecimiento del ovario, incluyendo G14, G17, y G19.

## Amplificación de secuencias inéditas de glutamina sintetasa de plantas superiores mediante PCR con cebadores degenerados

R. Pérez Vicente, G. Dorado\* y J.M. Maldonado.

Dpto. Biología Vegetal y Ecología, Div. Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias,  
Universidad de Córdoba

\* Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

La glutamina sintetasa (GS) es la principal responsable de la asimilación y reasimilación del amonio en plantas superiores, habiéndose descrito diferentes isoformas asociadas con distintos órganos y compartimentos celulares. Cuatro genes homólogos codifican los cuatro tipos de subunidades que componen las isoformas de la GS de judía. Tres (*gln-a*, *gln-b*, y *gln-g*) corresponden a las isoformas citosólicas y uno (*gln-d*) a la cloroplástica (1). Este modelo multigénico se ha hallado también en otras leguminosas (1), en arroz (2), en maíz (3), y probablemente se confirme en otras especies tras el aislamiento y caracterización de sus respectivos cDNAs. Hasta el presente, el acceso a las secuencias que codifican la GS ha requerido la creación de bibliotecas génicas o de cDNA y su rastreo con sondas heterólogas, con el consiguiente consumo de tiempo y materiales. El objetivo de este trabajo ha sido establecer un método para acceder a nuevas secuencias GS en condiciones experimentales más favorables. Para ello, elegimos la amplificación de cDNA mediante PCR con cebadores degenerados. Este procedimiento presenta ventajas por su rapidez y bajo costo respecto a los métodos tradicionales y, además, podría ser aplicado a muchas especies diferentes con mínimas modificaciones.

Primero se localizó un conjunto de regiones especialmente bien conservadas en los genes *gln* de plantas a partir de la comparación de las secuencias de 19 cDNAs para GS existentes en la base de datos GenBank. Las secuencias comparadas fueron seleccionadas por ser representativas de los mensajeros que codifican tanto subunidades citosólicas como cloroplásticas en especies mono y dicotiledóneas. A continuación, se diseñaron dos parejas de cebadores degenerados basados en la secuencia consenso de las regiones conservadas: la primera - gs1 y gs6 - para amplificar un fragmento del cDNA de cualquier tipo de subunidad GS, y la segunda - gs7 y gsc -, específica del cDNA de la subunidad cloroplástica, ya que el cebador gsc hibrida específicamente con una región exclusiva del extremo 3' de este tipo de subunidades. Evaluamos el rango de aplicación de los cebadores amplificando cDNA de un variado grupo de especies (girasol, haba, garbanzo, calabacín, pepino, berenjena, zanahoria, trigos duro y harinero, sorgo, lino, raigrás italiano y romero silvestre), cuyas secuencias GS no han sido aún descritas. En todos los casos se amplificaron los fragmentos del tamaño esperado (440pb para el par gs1/gs6 y 730pb para el par gs7/gsc), cuya identidad se confirmó por reamplificación con cebadores internos, por hibridación con sondas heterólogas y por secuenciación.

Mediante clonación y análisis de restricción se comprobó la presencia de diferentes tipos de fragmentos gs1-gs6 generados en una sola reacción de amplificación de cDNA de girasol. Esto indica que los cebadores gs1 y gs6 son útiles no sólo para amplificar secuencias GS de especies diferentes, sino también secuencias derivadas de la expresión de diferentes genes *gln* en la misma especie. Todas las amplificaciones fueron llevadas a cabo siguiendo un único y simple protocolo. En estas condiciones, el rendimiento de la PCR fue habitualmente muy alto, no requiriendo nunca una segunda amplificación. La presencia de productos inespecíficos fue escasa o nula. Además, se obtuvieron resultados consistentes tanto a partir de RNA total como de RNA poliadenilado. Con DNA genómico no se obtuvo amplificación alguna, sugiriendo la presencia de intrones.

El método propuesto constituye, por consiguiente, un procedimiento simple, eficiente y rápido para amplificar secuencias GS inéditas de plantas superiores. Las secuencias amplificadas tienen un uso inmediato como sondas homólogas o como, en nuestro caso, fuente de nuevos cebadores específicos con los que abordar un proyecto de amplificación de los cDNAs completos.

#### Referencias

- (1 ) Forde BG y Cullimore JV (1989) en: Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology (BJ Miflin, ed.) vol 6, pp 247-296, Oxford University Press
- (2) Sakamoto A, Ogawa M, Masamura T, Shibata D, Takeba G, Tanaka K y Fujii S (1 989) Plant Mol Biol 13:611 -614
- (3) Sakakibara H, Kawabata S, Takahashi H, Hase, T y Sugiyama T (1992) Plant Cell Physiol 33:49-58

## Identificación y caracterización molecular de dos nuevos genes relacionados con la asimilación de nitrato en *Chlamydomonas reinhardtii*.

A. Quesada y E. Fernández.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba. Avda S. Alberto Magno s/n, 14071-Córdoba, España.

En el alga verde unicelular *C. reinhardtii*, los genes relacionados con la asimilación de nitrato se encuentran agrupados en una región de 30 kb del cromosoma IX (Refs. 1 y 2). Trabajos previos han establecido la existencia de cinco genes, cuya caracterización condujo a la identificación funcional del gen de la nitrato reductasa (*nir1*; Ref. 1) así como de tres genes implicados en el transporte de nitrato (*nrt2;1*, *nrt2;2*, y *nar2*; Ref. 3). La existencia de marcadores genéticos ligados a la agrupación de genes y que confieren incapacidad de crecimiento en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno sugiere que el locus para la nitrato reductasa se encuentra próximo a esta región (Ref. 2).

A partir de una genoteca de *Chlamydomonas* y utilizando una sonda distal de la región clonada que contiene los genes para la asimilación de nitrato, se aislaron fragmentos que cubren 15 kb de la zona adyacente. Hibridaciones de ARN con distintas sondas que cubren esta nueva región han permitido detectar en ellas la existencia de dos unidades transcripcionales. La expresión de uno de los nuevos loci, de posición proximal a los genes de transporte de nitrato, resultó indetectable en las estirpes F6 y G1, que además de carecer de los genes de transporte de nitrato y nitrato reductasa (Ref. 2), son mutantes deficientes en actividad nitrato reductasa. Hibridaciones con DNA genómico de estas estirpes revelaron que deleciones y/o reorganizaciones importantes afectan a este locus, mientras que el segundo gen identificado, cuya posición es distal respecto de la agrupación de genes, no se encuentra alterado. Estos resultados sugieren que uno de los dos nuevos genes identificados en *C. reinhardtii* corresponde al gen de la nitrato reductasa, denominado *nir2* (según la nomenclatura ISPMB). Este gen ha resultado ser un nuevo marcador seleccionable en *Chlamydomonas* tanto en medios con nitrato como nitrato. Así, transformaciones realizadas en la estirpe G1 con un fragmento de ADN genómico conteniendo el gen *nir2* permitieron la complementación de su incapacidad de crecimiento en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno. Paralelamente, en una estirpe derivada de G1 en la que se había introducido una copia funcional del gen de la nitrato reductasa así como de los genes de transporte de nitrato (Navarro, Galván y Fernández, en preparación), la transformación con el gen *nir2* permitió la complementación en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno.

Se han realizado estudios para caracterizar la expresión de los dos nuevos genes identificados. *nir2* se expresa de forma corregulada con el resto de los genes relacionados con la asimilación de nitrato (Ref. 4). De esta forma se encuentra bajo el control de diversos efectores como el gen regulador *nir2*, disponibilidad y fuente de nitrógeno y de carbono, la luz, y la presencia de una forma activa de nitrato reductasa. Por lo que respecta a la expresión del segundo nuevo gen identificado, la luz es el único efector que ejerce un control claro sobre su expresión.

Escrutinios con sondas específicas para los nuevos genes identificados han conducido al aislamiento de numerosos clones de ADNc que están en proceso de caracterización.

## Referencias.

1. Fernández E, Schnell RA, Ranum LPW, Hussey SC, Silflow CD y Lefebvre PA (1989). Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. PNAS. USA, 86: 6449-6453.
2. Quesada A, Galván A, Schnell RA, Lefebvre PA y Fernández E (1993). Five nitrate assimilation related genes are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii*. MGG, 240: 387-394.
3. Quesada A, Galván A y Fernández E (1994). Identification of nitrate transport genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J, 5: 407-419.
4. Quesada A y Fernández E (1994). Expression of nitrate assimilation genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. PMB, 24: 185-194.

## Clonación del gen de la urato oxidasa de *cicer arietinum*

J. Redondo Nevado, J. Cárdenas, M. Pineda y J. L. Caballero<sup>1</sup>.

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular/Fac. Ciencias/Universidad de Córdoba/España  
<sup>1</sup>E.mail: bb1carej@uco.es

La urato oxidasa (EC 1.7.3.3) es una enzima clave en la biosíntesis de los ureidos ya que cataliza la oxidación del ácido úrico a alantoína. Los ureidos alantoína y alantoato son los principales compuestos utilizados por algunas leguminosas (soja, judía) para transportar el nitrógeno fijado desde los nódulos hacia el resto de la planta. Los ureidos son formas más eficientes para el transporte de nitrógeno que las amidas (asparragina y glutamina), utilizadas por otras leguminosas (haba, guisante), debido a la menor razón nitrógeno/carbono de éstas últimas. Algunas plantas de interés agronómico e importancia económica como el garbanzo (*Cicer arietinum*) pueden utilizar tanto amidas como ureidos para el transporte de nitrógeno.

El gen que codifica la urato oxidasa ha sido clonado en leguminosas tropicales como *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* y *Vigna aconitifolia* y está siendo estudiado a nivel molecular. No obstante, aún se desconocen los mecanismos moleculares implicados en la regulación del gen y en la biosíntesis de ureidos. En plantas como el garbanzo los mecanismos reguladores implicados en dicho proceso deben de ser de una complejidad diferente a los de las otras plantas. Con objeto de elucidar la regulación del flujo de nitrógeno en leguminosas hemos decidido clonar y estudiar el gen que codifica la urato oxidasa de este organismo particular. Para ello hemos utilizado una técnica diseñada en nuestro laboratorio que combina la construcción de genotecas subgenómicas con un escrutinio de las mismas mediante PCR y transferencia-Southern usando para ello sondas heterólogas. La técnica fue diseñada originalmente debido a la escasa señal obtenida al utilizar sondas heterólogas frente a DNA cromosómico de *Cicer arietinum* en experimentos de transferencia Southern tradicionales. Esta técnica permite la obtención de sondas homólogas para ser usadas posteriormente en el escrutinio de una genoteca de DNA genómico con el fin de obtener el gen completo y su región promotora.

En este trabajo presentamos la secuencia parcial de DNA genómico (714bp) del gen de la uricasa de garbanzo comparada con otras secuencias de uricasas de plantas presentes en la base de datos. El gen presenta fuerte homología a nivel de nucleótido y de aminoácido con los de *Glycine max* y *Vigna aconitifolia*. Se discute su estructura, así como el resultado de los estudios de expresión de dicho gen en diferentes partes de la planta y diferentes estadios de crecimiento.

## Caracterización de la asimilación de nitrato en *Antirrhinum majus*.

J. M. Romero.

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Universidad de Sevilla-CSIC.  
Apdo. 1113, 41080-Sevilla

El nitrato es la principal fuente de nitrógeno para las plantas superiores. Antes de su incorporación a esqueletos carbonados, el nitrato es reducido a nitrito por acción de la nitrato reductasa (NR) y, posteriormente, el nitrito es reducido a amonio por acción de la nitrito reductasa (NiR). El amonio generado por la NiR es entonces utilizado para la biosíntesis de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados. Estoy interesado en la caracterización de la asimilación de nitrato en plantas superiores y, especialmente, en la regulación de la ruta. Para ello, se está procediendo a caracterizar a nivel fisiológico, bioquímico y molecular la asimilación de nitrato en *Antirrhinum majus* y a la obtención de mutantes afectados en distintas etapas del proceso.

La elección de *A. majus* como sistema de trabajo se debe a que presenta ventajas notables para el análisis molecular de genes. *Antirrhinum* es una planta diploide; posee flores grandes fáciles de emasculiar y cruzar para realizar análisis genético de mutantes; puede ser propagada vegetativamente; y, quizás, su mayor ventaja radique en que posee elementos transponibles bien caracterizados, lo que permite realizar mutagénesis donde los genes afectados estén marcados por inserción de transposones.

Plantas de *A. majus* cultivadas con amonio como única fuente de nitrógeno presentan niveles muy bajos de actividad NR. Sin embargo, cuando las plantas son cultivadas con nitrato o nitrato amónico como fuentes de nitrógeno, la actividad NR aumenta notablemente. Estos resultados indican que la presencia de nitrato induce el desarrollo de actividad NR, no mostrándose el amonio como represor del desarrollo de dicha actividad, ya que en presencia de nitrato amónico los niveles de actividad son equiparables a los encontrados en presencia de nitrato. El comportamiento de la actividad NiR frente a la fuente de nitrógeno es diferente. Se detectan altas actividades NiR cuando las plantas se cultivan con nitrato, nitrato amónico o amonio, si bien en este último caso los niveles de actividad que se detectan son más reducidos.

Estos resultados indican que *A. majus* se comporta frente a la fuente de nitrógeno inorgánico de manera similar a otras plantas estudiadas como *Arabidopsis*, tomate, tabaco, etc. En estas plantas, el nitrato se muestra como un inductor de las actividades NR y NiR, mientras que el amonio no reprime el desarrollo de estas actividades. Sin embargo, la actividad NiR, aún respondiendo a nitrato, muestra unos niveles relativamente elevados en presencia de amonio.

A fin de determinar si el control del desarrollo de actividades NR y NiR en *A. majus* se realiza a nivel transcripcional, se ha procedido a la clonación de los genes estructurales de la NR y la NiR con el fin de utilizarlos como sondas en análisis de northern utilizando RNA aislado de plantas cultivadas en presencia de distintas fuentes de nitrógeno.

Para profundizar en el estudio de la asimilación de nitrato en *A. majus* se hace necesaria la obtención de mutantes afectados en distintos genes implicados en el proceso. En base al hecho de que *A. majus* posee transposones endógenos, se ha realizado un rastreo de plantas para la presencia de inserciones de transposones en los genes estructurales de la NR y NiR. Se han utilizado plantas procedentes de una mutagénesis con transposón a gran escala para realizar un rastreo de inserciones de transposones en los genes estructurales de la NR y la NiR mediante PCR. Del experimento de mutagénesis a gran escala se



recogieron hojas y semillas agrupadas en familias compuestas por de 15 plantas así como en grupos de 10 familias (M1). Semillas de la M1 se cultivaron para producir la M2, agrupándose las plantas de la misma manera. En todos los casos, las hojas recogidas se utilizaron para aislar DNA que posteriormente fue utilizado para el rastreo por PCR. Se han diseñado tres oligonucleótidos basados en las secuencias de diferentes transposones de *A. majus*. Los oligonucleótidos G1121 y G1122 corresponden a los extremos 5' y 3', respectivamente, de Tam 3 (el transposón más activo en *A. majus*), mientras que el oligonucleótido G1563 corresponde a un consenso de diferentes transposones. A partir de las secuencias de los genes estructurales de la NR y la NiR, se diseñaron 8 y 6 oligonucleótidos, respectivamente, dirigidos hacia ambos extremos de los genes. El rastreo por PCR se realizó con DNA aislado de hojas de las diferentes familias que fue mezclado para generar grupos de DNA correspondientes a 450 plantas. En 5 de los grupos de 450 plantas se detectaron bandas por hibridación de southern con sondas de la NR y la NiR, tras utilizar todas las combinaciones posibles de oligonucleótidos de transposones y de NR y NiR. Cuando se realizó el rastreo de los grupos de 150 plantas 2 posibles inserciones fueron descartadas al no ser reproducibles. El resto, dos posibles positivos para la inserción en la NR y uno en la NiR se han conseguido rastrear hasta localizar la familia ( 15 plantas) correspondiente. En la actualidad me encuentro realizando el análisis de las plantas individuales que constituyen las citadas tres familias para proceder a la caracterización molecular de los posibles mutantes.

## Characterization of plant genes able to promote auxin independent growth in tobacco protoplasts.

M.J. Soto, H. Harling, J. Schell y R.Walden

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Carl-von-Linne-Weg 10, 50829 Köln, Germany.

Auxins are considered to play a central role in the control of plant growth and development. However, little is known about the molecular basis by which this hormone acts. With the aim of isolating plant genes involved in auxin perception and action, dominant mutations were created by means of T-DNA tagging (1). The T-DNA derived tagging vector contains, in addition to a hygromycin resistance selectable marker, the transcriptional enhancer sequence of the 35S RNA promoter of cauliflower mosaic virus cloned as a tetramer (2). Following insertion of such a T-DNA into the plant genome, the 35S enhancer leads to overexpression of flanking genes. The dominant mutant obtained allows direct selection for a specific phenotype at the level of primary transformant. It is known that isolated wild-type protoplasts require exogenously applied auxin to divide *in vitro* (3). The T-DNA tagging vector was used in tobacco protoplast co-cultivation transformation experiments and the selection was carried out for growth of transgenic cells *in vitro* in the absence of auxin in the culture media. Several cell lines have been obtained which grow under selective conditions. In axi 159 the gene tagged *axi 1*, is a member of a small gene family, expressed principally in roots with no homology to previously characterised genes. However, results suggest that *axi1* is an auxin inducible factor playing a role in transcription. In another mutant line, axi 4, the gene tagged encodes an ion cotransporter. A third cell line, axi 152, is at the moment being studied in detail. Axi 152 plants are morphologically similar to untransformed SR1 tobacco plants; they flower, self-fertilize and set seeds normally. However, protoplasts isolated from axi 152 individuals are able to grow not only in the absence of auxin but also in high auxin concentrations as well as in the absence of cytokinin. Hybridization experiments have shown that axi 152 contains a single T-DNA insertion. The T-DNA and the flanking plant DNA has been rescued and when transfected into wildtype protoplasts confer the ability to divide in the absence of auxin. The genomic and cDNAs sequences are currently being investigated.

### Referencias

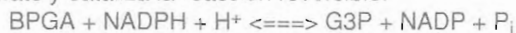
- 1.-Walden, R., Hayashi, H. and Schell, J. (1991) Plant J., 1, 281-288.
- 2.-Hayashi, H., Czaja, I., Lubenow, H., Schell, J. and Walden, R. (1992) Science, 258, 1350-1353.
- 3.-Nagata, T. and Takebe, I.(1970) Planta, 92, 301-308.

## Heterogeneidad molecular del polipéptido maduro de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa cloroplástica de distintos eucariotas fotosintéticos

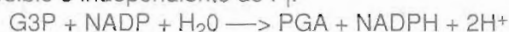
F. Valverde y A. Serrano

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC y Universidad de Sevilla, Apdo. 1113, 41080 Sevilla

Los eucariotas fotosintéticos, tanto plantas como microalgas, contienen dos gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas (GAPDH) dependientes de NADP: un enzima fosforilante (EC 1.3.1.13) localizado en el cloroplasto que participa en la ruta reductiva de las pentosas fosfato y cataliza la reacción reversible:



y un enzima no fosforilante citosólico (EC 1.3.1.9) que cataliza la siguiente reacción irreversible e independiente de  $\text{P}_i$ :



Ambas deshidrogenasas están codificadas por genes localizados en el genoma nuclear, pero mientras que este último enzima está presente solo en eucariotas fotosintéticos las cianobacterias poseen también una GAPDH funcional tanto con NADP como con NAD, que participaría tanto en la ruta reductiva de las pentosas fosfato como en glicolisis, y se podría considerar, de acuerdo con la teoría endosimbiótica del origen de los cloroplastos, muy similar al ancestro molecular de la GAPDH cloroplástica. De acuerdo con esta propuesta, la secuencia de aminoácidos deducida del gen (*gapa*) que codifica esta proteína en la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803, y que hemos clonado por complementación funcional en *E. coli*, presenta un elevado porcentaje de identidad -en el rango del 70 al 80%- con las de los genes *gapa* de GAPDHs cloroplásticas, en su mayoría de plantas, que se encuentran en los bancos de datos. Asimismo, un anticuerpo policlonal mono-específico anti-GAPDH de *Synechocystis* ha presentado reacción cruzada no solo con GAPDHs de otras cianobacterias sino también con las GAPDHs cloroplásticas, tanto de microalgas de distintos grupos taxonómicos como de plantas superiores, pero no con las GAPDHs glicolíticas (EC 1.3.1.12) de distinto origen (bacterias y eucariotas). El análisis con este anticuerpo de las proteínas de extractos de organismos fotosintéticos por "Western blot" tras SDS-PAGE ha relevado un alto grado de variabilidad en el valor de la masa molecular (Mm) de la subunidad de la GAPDH cloroplástica. En todas las cianobacterias estudiadas, tanto unicelulares (*Synechocystis*, *Synechococcus*) como filamentosas fijadoras de  $\text{N}_2$  (*Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*), y en la microalga rodofícea *Porphyridium purpureum* (con rodoplastos en ciertos aspectos similares a las cianobacterias) el anticuerpo reconocía una proteína del mismo tamaño (aproximadamente 38 kDa). En cambio, una banda correspondiente a una proteína de menor Mm (35-36 kDa) se detectaba en *Cyanidium caldarium*, una microalga termoacidófila primitiva de situación taxonómica incierta con cianoplastos similares a cianobacterias. *Euglena gracilis*, un alga unicelular con cloroplastos rodeados por una triple envuelta, presentaba dos bandas de Mms muy similares y en el mismo rango que las cianobacterias (36-38 kDa). Curiosamente no se detectó ninguna banda atribuible a una GAPDH cloroplástica típica en algas cromofíceas (diatomeas, etc.). Sin embargo, el análisis de microalgas clorofíceas (*Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Monoraphidium*), con cloroplastos típicos y de tejidos fotosintéticos de plantas ha mostrado una o dos bandas con valores de Mms superiores (en el rango de 38-42 kDa). La existencia de dos tipos de subunidades de la GAPDH cloroplástica, codificadas por dos genes muy similares (*gap alb*), se ha descrito únicamente en plantas. Todas las GAPDHs cloroplásticas estudiadas en este trabajo,

tanto de miaoalgas como de plantas, son codificadas muy probablemente por genes *gap* nucleares. Las proteínas que codifican estos genes deben atravesar la doble, y en algunos casos triple, membrana de la envuelta de los diversos tipos de plástidos fotosintéticos (cianoplastos, rodoplastos, cloroplastos) y sufrir el consiguiente proceso de maduración, que implica la eliminación de un péptido de tránsito, durante su importación al orgánulo. La heterogeneidad observada en la Mm del polipéptido maduro de la subunidad de las distintas GADPHs plastídicas estudiadas contrasta con la ausencia de variaciones interespecíficas significativas en el valor de las Mms de las subunidades de las dos GAPDHs *citósolicas* también presentes en todos los eucariotas fotosintéticos: el clásico enzima glicolítico (Mm, 36 kDa) y la GAPDH no fosforilante (Mm, 50 kDa; también detectada inmunológicamente en estos extractos mediante un anticuerpo obtenido contra el enzima de *Chlamydomonas*). Por lo tanto, aunque no se puede descartar *a priori* que las diferencias observadas sean debidas en algunos casos a las secuencias génicas que codifican los polipéptidos correspondientes a las proteínas maduras, la existencia de distintos sistemas de importación a los plástidos -con distintas secuencias de maduración que darían lugar a péptidos de tránsito de diferente tamaño- podría ser la causa de la heterogeneidad molecular observada. La secuenciación de los genes correspondientes y el análisis del extremo amino-terminal de las proteínas maduras ayudarán a resolver esta hipótesis.

#### Referencias

- A. Serrano, M.I. Mateos y M. Losada (1993) Biochem. Biophys. Res. Comm. 197, 1348-1356.  
R. Cerff (1995) Proc. 20th Taniguchi Int. Symp. (Go, M., ed.), Elsevier Sci., Amsterdam (en prensa).  
F. Valverde, M. Losada y A. Serrano (1995) Proc. Xth Int. Photosynth. Congress (P. Mathis, ed.), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht (en prensa).



# **Virus y Viroides**



## **Interferencia entre los tobamovirus del mosaico verde atenuado del tabaco (TMGMV) y del mosaico de la colza (ORMV) en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

*I. Aguilar, F. Sánchez y F. Ponz*

*Laboratorio de Biología Molecular y Virología Vegetal. CIT-INIA. Autopista A-6, Km 7. 28040 Madrid.*

La interferencia entre dos virus vegetales que son capaces de infectar el mismo huésped, puede dar lugar a la protección por uno de ellos (generalmente el que causa síntomas atenuados) de la infección del que ocasiona síntomas más graves.

Este fenómeno lo hemos observado en *Arabidopsis* empleando dos tobamovirus: el virus del mosaico verde atenuado del tabaco (TMGMV) y el virus del mosaico de la colza (ORMV). TMGMV es capaz de infectar la hoja inoculada del ecotipo RLD, pero la infección sistémica se produce de manera errática: tan sólo se detecta en el 5% de las plantas inoculadas y a los 28 días postinoculación, no encontrándose en el resto de los tiempos analizados (7, 14 y 21 días). La infección en este huésped es asintomática. ORMV, sin embargo, produce infección sistémica en *Arabidopsis*, obteniéndose una amplia gama de respuestas a la infección dependiendo del ecotipo que se emplee. En el caso del ecotipo RLD los síntomas son amarilleamiento y enanismo.

Con el fin de estudiar el fenómeno de interferencia se realizaron experimentos de coinoculación de ambos virus y, en paralelo, de inoculación retrasada de un virus respecto del otro. Se analizaron hojas diferentes a las inoculadas a distintos tiempos. El sistema de análisis fue por "Dot-Blot" empleando sondas de la zona de la replicasa en el caso de ORMV, y replicasa y movimiento para TMGMV. Las plantas inoculadas en primer lugar con TMGMV no presentaban síntomas de ningún tipo y el análisis por "Dot-Blot" reveló la ausencia de ambos virus en la hoja no inoculada. Las plantas inoculadas con ORMV y siete días más tarde con TMGMV presentaban síntomas iguales a los ocasionados por ORMV.

Los resultados obtenidos indican que la presencia de TMGMV protege de la infección de ORMV en *Arabidopsis*. Experimentos preliminares en relación con el mecanismo de este proceso sugieren que la protección se realiza impidiendo la dispersión de ORMV desde la hoja inoculada.



## Varabilidad genómica del retrotransposon Tnt1 de tabaco

J. M. Casacuberta<sup>1,2</sup>, S. Vernhettes<sup>1</sup>, P. Puigdomenech<sup>2</sup> y M.A. Grandbastien<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie Cellulaire. INRA. Versailles (Francia).

<sup>2</sup> Departament de Genètica Molecular. CID-CSIC. Barcelona

Los retrotransposones son elementos genéticos móviles muy relacionados con los retrovirus tanto estructural como funcionalmente. En ambos casos, dos moléculas de RNA genómico sintetizadas por la RNA polimerasa celular servirán para la síntesis de una nueva copia gracias a la acción de la transcriptasa reversa codificada por el propio elemento. Esta nueva copia del elemento se integrará en el genoma de la misma célula, en el caso de los retrotransposones, o de una célula distinta, en el caso de los retrovirus, siendo la capacidad infectiva de estos últimos la diferencia esencial entre estos dos tipos de elementos móviles. En el caso de los retrovirus se ha podido demostrar que este mecanismo de replicación genera un alto grado de heterogeneidad genómica debido a la poca fidelidad de los enzimas utilizados. De hecho, la variabilidad genómica es tan grande que no se puede definir a un virus como una única secuencia siendo necesario hacerlo como una población de genomas en equilibrio, lo que se conoce como quasispecies virales. Esta capacidad de evolucionar rápidamente confiere a los retrovirus una gran adaptabilidad permitiéndoles, por ejemplo, escapar a menudo a la acción del sistema inmune.

Hasta el momento se desconoce si otros retroelementos presentan estructuras genómicas análogas a las quasispecies virales y cuales son las consecuencias que una estructura de este tipo tiene para su regulación. El retrotransposón Tnt1 es uno de los pocos retrotransposones móviles de plantas y está presente en más de cien copias en el genoma de tabaco. El estudio por RT-PCR del RNA de Tnt1 nos ha permitido comprobar que su RNA no es una secuencia única sino que, de manera análoga a las quasispecies virales, está constituido por una población de moléculas distintas pero estrechamente relacionadas. Además, la población de moléculas de RNA no es la misma en los distintos tejidos donde Tnt1 se expresa, lo que muestra que Tnt1 podría tener, al igual que los retrovirus, una gran capacidad de adaptación, evolucionando de forma distinta bajo condiciones cambiantes. El análisis por PCR de los elementos Tnt1 presentes en el genoma de tabaco muestra que la mayoría de las mutaciones introducidas durante la retrotransposición se acumulan en zonas importantes para la expresión del elemento, generando una gran cantidad de elementos defectivos. Esto podría constituir un mecanismo de regulación para controlar la actividad mutagénica de Tnt1 y hacer compatible la actividad del retrotransposón con la viabilidad del genoma de tabaco.

En estos momentos estamos estudiando como evoluciona la población de elementos Tnt1. Para ello estamos analizando por PCR la población de elementos Tnt1 presentes en los genomas de otras especies del género *Nicotiana*. Por otro lado, y a fin de poder determinar si la evolución de estos elementos puede ser distinta en contextos diferentes, estamos analizando la retrotransposición de Tnt1 en contextos heterologos como son *Arabidopsis* y maíz.

### Referencias

- Casacuberta, Grandbastien (1993) *Nucleic Acids Res* 21, 2087-2093  
Lucas, Feuerback, Kunert, Grandbastien, Caboche (1995) *EMBO J* 14, 2364-2373  
Casacuberta, Vernhettes, Grandbastien (1995) *EMBO J* 14, 2670-2678

## Proteínas de geminivirus que interactúan con la proteína supresora tumoral del retinoblastoma

S. Collin<sup>1,3</sup>, M. Fernández-Lobato<sup>2</sup>, P. Mullineaux<sup>3</sup>, N. Muñoz-Martín y C. Fenoll<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología y <sup>2</sup>Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid

<sup>3</sup>John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK

Los oncovirus animales poseen una estrategia especializada para coordinar su ciclo infeccioso con la disponibilidad de los factores celulares que requieren. Sus genes tempranos codifican proteínas transformantes que previenen la progresión del ciclo celular interactuando con proteínas reguladoras clave del huésped, como las proteínas supresoras tumorales p53 y retinoblastoma (Rb). Rb ejerce su papel antiproliferativo secuestrando factores de transcripción de la familia E2F, esenciales para la entrada en la fase S, lo que inhibe la síntesis de DNA y detiene el ciclo celular en G<sub>0</sub>. Las oncoproteínas como el antígeno T del virus SV-40 o la proteína Ela de los adenovirus comparten una secuencia (Leu-X-Cys-X-Glu) que constituye un dominio conservado de interacción con Rb. La inactivación de Rb por unión de estas oncoproteínas virales libera los factores E2F, que a su vez activan la producción de las proteínas requeridas para la síntesis de DNA viral y celular y para la reanudación del ciclo celular. En ocasiones, los factores E2F además activan la transcripción viral.

Los geminivirus del grupo del virus del enanismo del trigo (wheat dwarf virus, WDV), son pequeños virus cuyo genoma, una molécula de DNA circular y monocatenario de unos 2700 nucleótidos con capacidad para codificar tan sólo cuatro proteínas, se replica y transcribe en el núcleo celular tras su conversión a una forma bicatenaria. Por ello se ha considerado que los geminivirus dependen en gran medida de factores del huésped para completar su ciclo vital. En apoyo de esta suposición se encuentran además las siguientes observaciones: en el virus del rayado del maíz (MSV), se ha demostrado que las secuencias requeridas para la transcripción en el sentido del virión en ausencia de proteínas virales interactúan específicamente con proteínas nucleares (factores de transcripción posiblemente) de maíz; la acumulación de formas bicatenarias del genoma viral en el virus del rayado de la digitaria (DSV) se correlaciona con la fase S del ciclo en células de digitaria; por último, la infección con el virus del mosaico dorado del tomate (TGMV), un geminivirus más complejo que WDV, provoca que las células quiescentes del mesófilo produzcan PCNA, una proteína marcadora de síntesis de DNA y progresión hacia la fase S. Estas y otras observaciones nos sugirieron que los geminivirus podrían utilizar mecanismos similares a los empleados por los oncovirus animales para reiniciar el ciclo celular, a través de la interferencia física de proteínas virales con factores del huésped.

En WDV, la proteína candidata para producir tales cambios en las células infectadas es C1:C2, necesaria para la replicación viral y para la activación de la transcripción en el sentido del virión. La otra proteína no estructural de WDV, C1, no tiene función adscrita; mediante el análisis funcional de mutantes de WDV introducidos en células de trigo por bombardeo con microproyectiles, nosotros hemos demostrado que C1 juega un papel activador en la expresión en el sentido del virión, pero que su inactivación no afecta a la replicación del genoma viral. Las proteínas C1 y C1:C2 que se deducen de la secuencia de WDV muestran una estructura modular compuesta por diferentes dominios funcionales muy similares a los que poseen las proteínas transformantes de los oncovirus animales. Esta similitud nos indujo a buscar el dominio de interacción con Rb en ambas proteínas. Encon-

tramos que el motivo Lys-X-Cys-X-Glu aparece en la región C-terminal de la ORF C1 que es compartida por la proteína C1:C2, de modo que las dos proteínas no estructurales de WDV podrían interactuar con una hipotética proteína Rb vegetal.

Decidimos comprobar si tanto C1 como C1:C2 eran capaces de interactuar con la Rb humana *in vivo*, utilizando el sistema de dos proteínas híbridas en levadura. Como control, empleamos un plásmido que contiene el dominio de unión a DNA del factor de transcripción GAL4 fusionado a una versión truncada de la Rb humana (pl 10). Cuando esta proteína híbrida es coexpresada en levaduras con otra que contiene el dominio de activación de GAL4 unido a la proteína celular E2F, que interacciona fuertemente con Rb, se reconstituye una forma funcional de GAL4 que activa la transcripción de dos promotores dependientes de GAL4, provocando la aparición de un fenotipo detectable. En nuestro experimento, las proteínas híbridas que debían interactuar con Rb se construyeron fusionando las regiones codificantes de C1 y de C1:C2 al extremo C-terminal del dominio activador de GAL4. La fusión a C1:C2 dió un resultado positivo, lo que indica que la replicación del virus probablemente dependa en parte de la inactivación de Rb en las células infectadas. Además, C1 también interactuó fuertemente con Rb en nuestros ensayos, sugiriendo que la transcripción viral también depende de la inactivación de un homólogo vegetal de Rb. Esta función es consistente con la presencia de un posible dominio de activación transcripcional en la región C-terminal de la ORF, con la que solapa parcialmente el motivo Leu-X-Cys-X-Glu. Este se encuentra en una posición equivalente en los factores de transcripción celulares de la familia E2F. El análisis de las proteínas que interactúan con el promotor viral nos dirá cómo influye la presencia de C1 a interacción de los factores celulares con el promotor.

El dominio de unión con retinoblastoma en C1 y C1:C2 no es una peculiaridad de WDV, sino que aparece en la mayoría de los geminivirus que infectan monocotiledóneas, siempre en un contexto de aminoácidos adecuado. Todos los geminivirus que presentan la secuencia son monopartitos y todos se transmiten de planta a planta por el mismo tipo de insectos (leafhoppers). Entre ellos, el único que infecta dicotiledóneas es el virus del enanismo amarillo del tabaco (ToYDV). Curiosamente, ni los geminivirus bipartitos más complejos, ni los dos monopartitos relacionados con ellos (TYLCV y BTCV), poseen el motivo de unión a Rb en ninguna de las proteínas de replicación o de transcripción que codifican.

Nuestros resultados demuestran que tanto C1 como C1:C2 son capaces de interactuar con la proteína Rb humana. Aunque todavía no se ha aislado ningún homólogo vegetal de Rb, el reciente hallazgo de ciclinas ~ vegetales que también poseen el dominio de unión a Rb sugiere que la presencia de este dominio en un virus vegetal tiene una significación biológica, sobre todo porque el contexto de aminoácidos en que aparece el motivo también es compartido por las proteínas virales y por las celulares. La existencia de estas proteínas que se unen a Rb tanto en mono como en dicotiledóneas es un argumento adicional para suponer la existencia de proteínas vegetales homólogas de Rb y de las proteínas relacionadas con esta p107 y p130 (cuando este trabajo ya estaba finalizado, se ha publicado que la proteína C1 puede interactuar con p130). Es, por tanto, una hipótesis plausible que las células infectadas de la planta sean obligadas a mantener una replicación y una transcripción viral eficientes a través de la inactivación de la proteína del retinoblastoma por C1 y C1:C2, de modo análogo a como lo hacen algunos virus animales, y que estas interacciones permitan explicar la producción de síntomas en las plantas infectadas. La existencia de dos proteínas virales relacionadas entre sí, ambas capaces de interactuar con Rb y ambas poseyendo posibles sitios de fosforilación podría permitir la sincronización del ciclo viral con el ciclo celular, a través de la acción de proteinkinásas dependientes de ciclinas.

## ***Nicotiana benthamiana* plants transformed with fragments of the plum pox potyvirus genome showing different responses to virus inoculation**

H.S. Guo, M. T. Cervera, E. Dominguez and J. A. García

Centro Nacional de Biotecnología, Campus de la Universidad Autónoma, 28049-Madrid

Genetic engineering of plants for virus resistance has provided promising strategies for control of virus diseases. Transgenic plants expressing the virus coat protein and showing resistance to infection (called "coat protein-mediated protection") have been described for a number of viruses. Recently, replicase-mediated resistant plants, which have genomic insertions of viral replicase genes, appear to be more effectively protected against the virus infection. Plant transformed with potyvirus protease (Nla) genes, resistant to virus infection have been also reported for PVY and TVMV. In our laboratory, *Nicotiana benthamiana* has been transformed, by using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system, with different fragments of the PPV genome. The constructions included an additional in-frame initiation codon contiguous to ORFs encoding a Nla(protease)-Nlb(replicase)-CP(capsid protein) polyprotein fragment (Nla lines), the same fragment with a CP deletion (NlaD lines), and the Nlb protein alone (Nlb lines). The ORF in the Nlb construction was supplied with an artificial stop codon. On the other hand, Gly to Val and Gly to Ala mutations in the conserved RNA replicase Gly-Asp-Asp motif were engineered on the NlaD and Nlb constructions (NlaDA, NlaDV, NlbDA and NlbDV lines). The integration of PPV sequences in the genome of the transformed plants was determined by PCR amplification, and the expression of the transgenes was ascertained by RT-PCR. The presence of the Gly to Val and Gly to Ala mutations in the NlaDA, NlaDV, NlbDA and NlbDV lines was confirmed by nucleotide sequence analysis of PCR-amplified fragments. Kanamycinresistant RI plants, coming from self-pollination of the original Ro transformants, were tested for resistance to PPV infection following to virion or viral RNA inoculation. Preliminary screening of each of the 21 transgenic lines by inoculation with 0.5 µg/ml of purified PPV virions, a concentration sufficient to infect 100% of control plants (nontransformed and vector-transformed), indicated that all were somewhat protected against PPV. Two plant lines from each construction were further analyzed by inoculation with 5 µg/ml of PPV virions. Lines NlaDA2, NlaDV1 and NlaDV2 exhibited 100% resistance to infection, whereas 80% and 71% of the plants of lines NlaD1 and NlaD1, respectively, and 28.5% of the plants of lines Nla7 and NlbDV3, were resistant to infection. The rest of the plants of these lines and all of the plants of the lines Nla1, NlaD4, Nlb2, Nlb3, NlbDA3, NlbDA7 and NlbDV2 became infected after inoculation, but with some delay in symptom expression. Also reduction in virus accumulation in some of these symptomatic plants, estimated by ELISA at 4, 7, 15, 21, 30 days post-inoculation, was observed when compared with control plants. Interestingly, some infected plants (42.8% and 37.5% in lines Nla7 and NlbDV2, respectively) exhibited a recuperation phenotype: the symptoms abated with time and the upper leaves did not have visible symptoms. Absence of virus in the recovered plants was confirmed by ELISA and by back inoculation in the local lesion-host *Cheopodium foetidum*. Reinoculation on the asymptomatic young leaves of the recovered plants failed to establish a new PPV infection, indicating that a true resistant status was instated in the plants. Plant lines NlaDA2 and NlaDV1, which showed complete resistance to infection with 5 mg/ml of PPV virions, were inoculated with 100 mg/ml of PPV virions and 3.5 mg/ml of PPV RNA. Both lines were resistant to the RNA inoculation, and 100% of the plants of the line NlaDV1 and 75% of those of the line NlaDA2 remained resistant to the high doses virion inoculum. No virus-specific RNA could be detected by Northern-blot analysis at

15, 24 or 48 hr after PPV inoculation of protoplasts derived from the highly resistant plant line NlaDVI, whereas viral replication was detected in protoplast derived from control plants as early as 15 hr postinoculation. These data suggest that the interference with the infection took place at the cellular level and was not due to blockage of cell-to-cell spread. No correlation was observed between the number of T-DNA insertions deduced from the segregation ratio of kanamycin resistance and the susceptibility to PPV infection in the different transgenic lines. The high degree of resistance both to virion and to RNA inoculation, its activity at the single cell level and the occurrence of the recovery phenotype, together with our inability to detect the transgene protein products in the resistant plants, strongly suggest that the resistance phenomena that we are describing is RNAm mediated. The amount of transgene mRNA in the resistant, susceptible and recovered tissues is presently being analyzed, trying to detect some correlation between transgene transcript accumulation and resistance that could indicate the existence of cosuppression events in the PPV transformed plants, as has been described in other cases of RNAm mediated resistance. On the other hand the specificity of the virus replication blockage is being assayed by inoculating the transgenic plants with different PPV isolates and other potyviruses.

## Caracterización de formas naturales de delección del RNA 2 del virus del cascabeleo del tabaco

C. Hernández y J. F. Bol.

*Institute of Molecular Plant Sciences, Gorlaeus Laboratories, P. O. Box 9502, 2300 RA Leiden. The Netherlands.*

El virus del cascabeleo del tabaco (tobacco rattle virus, TRV) posee un genoma constituido por dos RNAs de simple cadena de polaridad positiva. EL RNA 1 está muy conservado entre aislados y codifica proteínas implicadas en la replicación y el movimiento del virus. El RNA 2 es muy variable y codifica la proteína de cubierta aunque, en algunos aislados, puede presentar genes adicionales de función desconocida.

Recientemente hemos determinado la secuencia del ARN 2 del aislado PPK20 de TRV, cuyos vectores naturales son los nematodos de la especie *Paratrichodorus pachidermus*. El RNA 2 de dicho aislado esta formado por 3856 residuos de nucleótido y contiene, además del gen de la proteína de cubierta, otros dos genes que potencialmente codifican proteínas de 29.4kDa y 32.8kDa las cuales no presentan homologías con ningún otro producto viral conocido. En plantas mecánicamente inoculadas con el aislado PPK20 de TRV hemos detectado, junto a los RNAs genómicos y subgenómicos esperados, varias formas delecionadas del RNA2. Tras llevar a cabo una serie de transferencias mecánicas de la infección utilizando como inóculo preparaciones de ARN total, algunas de las formas delecionadas llegan a ser predominantes y terminan desplazando al RNA 2 genómico original después de la tercera transferencia. Un fenómeno similar se observa cuando la infección es iniciada utilizando una mezcla que contiene el RNA 1 de TRV-PPK20 y un clon infeccioso de un cDNA del RNA 2, indicando que estas formas delecionadas pueden ser generadas "de novo". Mediante una estrategia combinada de transcripción inversa y amplificación mediante PCR, seguida de clonaje y secuenciación, hemos caracterizado algunas de estas moléculas derivadas del RNA 2. Los resultados obtenidos muestran que dichas moléculas se originan por delección interna del ARN genómico original. Los mecanismos responsables de la generación de estas formas delecionadas y la posible implicación de las mismas en la evolución del TRV serán discutidas.

## Posible existencia de múltiples RNAs defectivos derivados del RNA del virus de la tristeza de los cítricos

C. López<sup>1</sup>, P. Moreno<sup>2</sup>, J. Guerri<sup>2</sup> y R. Flores<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia.

<sup>2</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46113 Moncada, Valencia

Citrus tristeza virus (CTV), es el closterovirus causante de la tristeza de los cítricos y constituye un factor limitante de este cultivo. La secuencia recientemente obtenida (19296 bases) para el RNA del aislado T-36 de CTV, tiene 12 marcos de lectura abierta (ORF) que potencialmente pueden codificar 17 polipéptidos (1). En la naturaleza existe una amplia gama de aislados de CTV, algunos agresivos como el T-36 y otros suaves cuya presencia en la planta puede protegerla frente a los daños causados por los primeros. La comprensión de las bases moleculares de esta patogenicidad diferencial tiene un claro interés básico y biotecnológico.

Como una primera aproximación a esta cuestión hemos iniciado un estudio comparado de la secuencia de aislados españoles de CTV, tomando como referencia la del T-36 para diseñar una serie de cebadores específicos que se han utilizado en la amplificación de regiones del RNA viral mediante una estrategia de RT-PCR. Como molde se han empleado preparaciones enriquecidas en ds-RNAs derivados de CTV-RNA ya que estos ds-RNAs, uno de tamaño genómico y varios de tamaño subgenómico, se acumulan en tejidos infectados y son fáciles de purificar.

En el curso de estos estudios observamos que además de los productos de amplificación con las dimensiones esperadas, ocasionalmente aparecían otros atípicos. Con objeto de investigar la naturaleza de los mismos procedimos a clonarlos y secuenciarlos. El análisis de su secuencia ha revelado que se trata de productos que contienen fusionadas regiones muy alejadas en el genoma viral, propiedad ésta que es característica de los RNAs virales defectivos. Hasta la fecha sólo recientemente se ha identificado un RNA de esta clase en CTV, compuesto de 1151 nt del extremo 5' y 1259 nt del 3' con dos repeticiones directas de ocho nt en la región de unión (2). Los presumibles RNAs defectivos de CTV identificados por nosotros, aunque por el momento sólo han sido parcialmente caracterizados, son claramente distintos del anterior por lo que se refiere a las secuencias que flanquean en 5' y 3' a las regiones de unión (el RNA viral se numera asignando al primer nt en 5' el número 1). Dichas secuencias flanqueantes en 5' y 3' están formadas respectivamente por: i) secuencias en torno a las posiciones 10835 y 18714 del RNA viral, dando lugar a una fusión entre las ORF 1b y 11 (1), y ii) secuencias en torno a las posiciones 443 y 17387 del RNA viral, dando lugar a una fusión entre las ORF 1a y 9 (1). Las regiones de unión carecen de repeticiones directas pero presentan un alto contenido en A y/o T, lo que en principio es consistente con un mecanismo del tipo de cambio de molde de la polimerasa ("copy choice") para la generación de los RNAs defectivos.

Es necesario llevar a cabo estudios adicionales para confirmar sobre bases más sólidas la existencia de estos RNAs defectivos de CTV. Concretamente hace falta completar su caracterización molecular e identificar la presencia *in vivo* de RNAs con las propiedades esperadas. De esta forma se podrá descartar la posibilidad de que pudieran haberse generado *in vitro* como consecuencia de "saltos" de la transcriptasa reversa y/o de la *Taq* DNA polimerasa empleadas en su análisis.

Muchos de los RNAs defectivos caracterizados en otros grupos de virus vegetales tienen carácter interferente y con frecuencia modulan la patogenicidad de estos últimos. Es posible por lo tanto que algo similar pudiera suceder en CTV y que el fenotipo de algunos aislados de este virus pudiera estar determinado, al menos en parte, por la existencia de RNAs defectivos interferentes.

#### Referencias

- (1) Karasev, A.V. *etal.*, (1995). *Virology*, 208: 511-520.
- (2) Mawassi, M. *etal.*, (1995). *Virology*, 208: 383-387.



## Patrones de movimiento de un tobamovirus (ORMV) y un potyvirus (TuMV) en dos huéspedes diferentes

A. Martín Martín, H.L. Cabrera y Poch y F. Ponz.

Laboratorio de Biología Molecular y Virología Vegetal, CIT-INIA, Autovía A-6, Crta. de la Coruña, Km 7, 28040, Madrid.

El movimiento de los virus en las plantas es parte esencial para el desarrollo de la infección. La dispersión del virus a partir de las células inicialmente infectadas tiene lugar a dos niveles: movimiento a corta distancia, célula a célula, y movimiento a larga distancia a través del sistema vascular. Atendiendo a este último tipo de movimiento parece claro que la mayoría, si bien no todos los virus, se mueven a larga distancia en forma de partículas virales; así mismo parece general, salvo excepciones, la necesidad de la proteína de la cápsida. También está descrita la implicación de otras regiones genómicas virales en el control de la extensión sistémica del virus. Es particularmente interesante la existencia de resistencias al movimiento a larga distancia, en las cuales el virus es capaz de replicar y moverse perfectamente en la hoja inoculada, pero es incapaz de salir de ésta y extenderse al resto de la planta. Todo esto sugiere fuertemente la idea de que además deben existir señales específicas por parte de determinados huéspedes que dirijan la evolución de la infección.

En los años 30, empleando tomate infectado con TMV, ya se evidenció que los virus podían moverse rápidamente a larga distancia: el virus se dirigía primero a la raíz para moverse luego a los tejidos jóvenes de la planta. Más tarde, se describió la importancia que parecía tener el flujo de metabolitos para la extensión del virus a través de la planta. Durante mucho tiempo, no se ha dispuesto de modelos generales acerca de como puede ser el patrón para el movimiento sistémico de los virus en plantas. Recientemente se ha propuesto un modelo según el cual el virus aprovecharía la ruta que sigue el fotoasimilado para moverse a larga distancia.

En nuestro trabajo hemos utilizado dos virus pertenecientes a diferentes familias: el potyvirus del mosaico del nabo (turnip mosaic virus, TuMV) y el tobamovirus del mosaico de la colza (oilseed rape mosaic virus, ORMV) y dos huéspedes de diferentes géneros *A. thaliana* y *B. juncea*. Los resultados obtenidos aportan información acerca del patrón de movimiento de ambos virus en los dos huéspedes a lo largo de todo el proceso de infección, desde estadios tempranos del desarrollo de la planta a tardíos. Para poder hacer el estudio fue necesario la puesta a punto de la técnica de hibridación del esqueleto de la planta ("plant skeleton hybridization") para nuestros sistemas. Hemos encontrado características comunes en el movimiento de ambos virus, con algunas especificidades propias de cada grupo. Ambos patógenos parecen aprovechar las rutas del fotoasimilado aunque existen importantes diferencias puntuales, entre el modelo viral y el de éste. Así, por ejemplo encontramos que un órgano como la raíz, que es un sumidero constante de fotoasimilado, no lo es de partículas virales, mostrando una clara regulación temporal en su comportamiento. Otra característica destacable del modelo encontrado por nosotros para los virus RNA, es su capacidad de invadir tejidos de hojas totalmente maduras, en consonancia con lo descrito hace más de 60 años para TMV. La literatura describe que este tipo de hojas ha perdido completamente su capacidad de importar fotoasimilado, y asimismo el modelo propuesto para un virus DNA (el virus del mosaico de la coliflor) propone su incapacidad de invadir este tipo de órganos.

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente la idea de que la invasión sistémica de una planta por parte de un patógeno viral es un fenómeno sometido a una fuerte regulación espaciotemporal. La caracterización detallada de esta regulación constituye un área de especial interés para el trabajo futuro, en la que es esperable que la disponibilidad de sistemas vegetales modelo, como *Arabidopsis*, permitirá un mayor ritmo de avance.

## Varabilidad en la respuesta de *Arabidopsis* frente a la infección de un tobamovirus (CRMV) y de un potyvirus (TuMV)

A. Martín Martín, D. Martínez Herrera, H.L. Cabrera y Poch y F. Ponz.

Laboratorio de Biología Molecular y Virología Vegetal, CIT-INIA, Autovía A-6,  
Ctra. de la Coruña, Km 7, 28040, Madrid.

Se ha realizado un estudio de la interacción entre la especie vegetal *Arabidopsis thaliana* y dos virus RNA pertenecientes a dos grupos taxonómicos diferentes, el virus del mosaico del nabo (turnip mosaic potyvirus, TuMV) y el virus del mosaico de la colza (oilseed rape mosaic tobamovirus ORMV). Estos dos grupos son ejemplos de estrategias muy distintas de expresión génica.

El estudio realizado con ORMV y una colección de 115 ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, muestra que existe variabilidad en la expresión de los síntomas entre diferentes ecotipos, aunque una homogeneidad completa entre plantas pertenecientes al mismo ecotipo. Estos resultados nos han permitido proponer una clasificación en grupos dependiendo del grado de susceptibilidad. Además hemos podido observar que cambios en las condiciones ambientales o en la dosis del inóculo juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. El análisis molecular, realizado por "DOT-BLOT" de hoja inoculada y no inoculada en plantas individuales de los diferentes ecotipos, ha revelado la existencia de una resistencia dependiente de la concentración viral del inóculo. El mecanismo se basa en la incapacidad del virus de moverse sistémicamente. Actualmente estamos realizando el estudio genético de esta interacción.

La misma colección de ecotipos ha sido inoculada con TuMV. Con este virus hemos encontrado variabilidad dentro de cada ecotipo respecto al grado de susceptibilidad frente al virus. Algunos ecotipos muestran resistencia a TuMV. Los resultados obtenidos realizando el análisis de hoja inoculada y no inoculada por ELISA, así mismo en plantas individuales en los diferentes ecotipos, indican la presencia de dos mecanismos de resistencia diferentes: por un lado algunos ecotipos parecen presentar un mecanismo de resistencia al movimiento a larga distancia y una aparente inmunidad, solapantes. Por otra parte hemos encontrado un ecotipo que presenta siempre un mismo tipo de respuesta frente a la infección por TuMV: aparente inmunidad. Los resultados iniciales determinados por hibridación tipo Northern, en hojas inoculadas, sugieren que podríamos estar ante un mecanismo de resistencia al movimiento a corta distancia. Actualmente estamos trabajando con el fin de confirmar este mecanismo y en paralelo estamos estudiando el control genético de estas resistencias.

## Movimiento a larga distancia del virus del enrollado de la hoja del cerezo (CRLV) en plantas de tabaco

P. Más, M. A. Sánchez-Pina y V. Pallás.

Dpto. de Mejora y Patología Vegetal, CEBAS (CSIC), Aptdo. 4195, 30080 MURCIA

En una interacción compatible los virus utilizan dos tipos de movimiento: el movimiento a corta y a larga distancia (Hull, 1989; Matthews, 1991). En el **movimiento a corta distancia**, el virus se mueve célula a célula a través de los plasmodesmos, mediante un proceso activo en el que están implicadas las denominadas proteínas de movimiento (MP), (Maule, 1991; Mushegian y Kooning, 1993). Varias aproximaciones experimentales sugieren que existen al menos dos mecanismos utilizados en el movimiento a corta distancia: el del tipo "tobamo", la proteína de movimiento se une al RNA viral para formar un complejo ribonucleoproteico que modifica el límite de exclusión molecular de los plasmodesmos. En un segundo mecanismo, el tipo "como", parecen estar implicadas tanto la proteína de movimiento (MP) como la proteína de cubierta (CP) viral.

El **movimiento a larga distancia** se produce cuando el virus sale de la hoja inoculada y es capaz de invadir el resto de la planta a través del sistema vascular (Atabekov y Dorokhov, 1984; Maule, 1991). Los requerimientos para este tipo de movimiento son más heterogéneos que para el de célula a célula. Así, además de la MP, en virus pertenecientes a los grupos tobamo, bromo, carmo, cucumo y potexvirus se ha demostrado el requerimiento de una CP funcional para invadir sistémicamente la planta. En el caso del virus del mosaico del chícaro (CPMV) y del virus del mosaico del tabaco (TMV), se ha demostrado que se requieren viriones ensamblados para un eficiente transporte sistémico. Sin embargo, la dispensabilidad de la CP ha sido documentada para los hordei, tombus y diantovirus.

El estudio del movimiento a larga distancia en el caso de los nepovirus ha sido muy escaso y no se disponen de datos a nivel molecular sobre la forma en que estos virus se mueven ni su distribución final en la planta.

En el presente estudio, utilizando la técnica del *tissue-printing* con sondas de RNA no radioactivas marcadas con digoxigenina (Mas y Pallas, 1995) hemos obtenido una visión macroscópica del patrón de acumulación y traslocación del virus del enrollado de la hoja de cerezo (CRLV) en plantas de tabaco infectadas. Paralelamente, la distribución viral se ha visualizado al microscopio óptico mediante la técnica del inmunomarcaje con oro coloidal y amplificación con plata.

El CRLV pertenece al grupo de los nepovirus, con un genoma compuesto por 2 RNAs de cadena simple y sentido positivo, poliadenilados en su extremo 3', y con una proteína (VPg) unida covalentemente a su extremo 5'. El análisis mediante *tissue-printing* a diferentes días post-inoculación (d.p.i.) de hojas de tabaco infectadas con el CRLV, reveló la presencia de RNA viral en la hoja inoculada a tan solo 20 horas post-inoculación (h.p.i.), alcanzándose un pico de acumulación a 8-10 (d.p.i.) a partir de los cuales disminuye progresivamente. El análisis mediante *dot-blot* y *tissue-printing* de peciósos infectados, reveló que el virus sale de la hoja inoculada e invade los tejidos vasculares del tallo aproximadamente a 3 d.p.i., moviéndose primero hacia las raíces antes que a las hojas superiores. La señal del *tissueprinting* obtenida en secciones transversales de tallo y peciósos revela la acumulación del RNA viral predominantemente en el parénquima y tejido floemático. En las hojas sistémicas, el virus aparece primero en la parte basal e infecta posteriormente la parte apical a través del sistema vascular de la hoja.

El análisis por *tissue-printing* de hojas sistémicas de tabaco infectadas reveló el mismo patrón de distribución para el RNA y la proteína de cubierta (CP) viral localizándose en

ambos casos, en las venas y áreas sintomáticas. Asimismo, se obtuvo un idéntico patrón de acumulación del RNA y la CP viral cuando se analizaron secciones longitudinales de tallo, lo que sugiere que el virus podría necesitar la CP en el movimiento a larga distancia. Además, las estructuras tubulares presentes en las paredes celulares de las células de hojas de *Nicotiana clevelandii* Gray (Jones y col., 1973) apoyan la idea de que el CLRV se mueve como virión para invadir la planta.

La infección sistémica está además influenciada por la disposición filotáctica de las hojas en la planta. Tanto los síntomas virales como la señal de hibridación en la hoja sistémica se localizan en el lado más cercano a la hoja inoculada. Esta influencia es más evidente en las hojas sistémicas contiguas a la inoculada y en los primeros estadios de la infección. La infección viral está también influenciada por el estado de desarrollo de las hojas. En plantas inoculadas en hojas con un 95 % de su tamaño final, el virus es capaz de replicarse pero no da lugar a una infección sistémica. En hojas muy maduras (inoculadas al 100 % de su tamaño final) el virus es incapaz de replicarse. Esta influencia parece estar regulada por la denominada transición fuente-sumidero de las hojas. Si el CLRV se mueve junto con el fotoasimilado, las "hojas sumidero" (que importan fotoasimilado) serán fácilmente infectadas por el virus, mientras que las "hojas fuente" (exportadoras de fotoasimilado) no se infectarán. Leisner y col. (1992) mostraron que sólo las partes de la planta hacia donde fluye el fotoasimilado son susceptibles de ser infectadas por el virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Nuestros resultados son consistentes con esta observación.

Los estudios de inmunocitoquímica al microscopio óptico pusieron de manifiesto que en la hoja inoculada la CP del virus se localiza en las zonas circundantes al tejido necrótico, acumulándose en ciertos foci de células específicamente marcadas. Aunque la mayoría de los virus RNA se mueven a larga distancia vía floema, siguiendo el flujo del fotoasimilado, nosotros hemos detectado la señal viral en los elementos traqueidales del xilema de hojas sistémicas y yemas axilares, lo que podría sugerir una posible implicación del xilema en el movimiento del virus a larga distancia. En el tallo la señal se distribuye heterogéneamente por las células del cortex y del tejido vascular.

## REFERENCIAS

- Atabekov, J.G. y Dorokhov, Y.L. (1984). *Adv. Virus Res.* 29, 313-364.
- Hull, R. (1989). *Ann. Rev. Phytopathol.* 27, 213-240.
- Jones, A.T., Kinninmonth, A.M. y Roberts, I.M. (1973). *J. Gen. Virol.* 18, 61-64.
- Leisner, M., Turgeon, R. y Howell, S.H. (1992). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5, 41-47.
- Más, P. y Pallás, V. (1995). *J. Virol. Methods.* 52, 317-326.
- Matthews, R.E.F. (1991). *Plant Virology* 3rd ed. Academic Press, New York.
- Maule, A.J. (1991). *Crit. Rev. Plant Sci.* 9(6), 457-473.
- Mushegian, A.R. y Koonin, E.V. (1993). *Arch. Virol.* 133, 239-257.

## Determinados análogos de sustitución del péptido sintético melitina inhiben la infectividad del virus del mosaico del tabaco

J. F. Marcos (1,3), R. N. Beachy (1), R. A. Houghten (2), S.E. Blondelle (2) y E. Pérez-Payá (2)

(1) *The Scripps Research Institute, La Jolla, USA.*

(2) *Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, USA.*

(3) *Dirección actual Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura - CSIC, Murcia, España.*

Los esfuerzos destinados al control de los virus vegetales son numerosos y diversos. Entre los más novedosos destacan aquellos basados en aproximaciones biotecnológicas. Así, en los últimos años se ha generalizado la utilización de plantas transgénicas para el control de las infecciones virales, en aplicación del concepto de 'resistencia derivada del patógeno' [1]. Paralelamente, estudios realizados en diversos sistemas experimentales han demostrado la alta versatilidad y plasticidad, tanto estructural como funcional, de los pequeños péptidos sintéticos. Por ejemplo, recientemente se han identificado péptidos sintéticos con actividad antiviral frente a virus animales [2]. Entre estos péptidos se encuentran secuencias correspondientes a proteínas virales o, alternativamente, secuencias sin relación alguna, *a priori*, con el virus al que inhiben. En el presente estudio se ha evaluado la posible utilización de péptidos sintéticos como antivirales dentro del campo de la biología vegetal. Para ello se han seleccionado dos sistemas experimentales modelo ampliamente reconocidos: el tobamovirus del mosaico del tabaco (TMV) y el péptido sintético de origen natural melitina (Mel).

Tanto en el caso del virión y proteína de cubierta (CP) del TMV como en el de la melitina se dispone de un detallado conocimiento previo a nivel molecular y estructural [3]. En el inicio de este trabajo se identificó una similitud de secuencia significativa entre un fragmento de la CP del TMV y la Mel. Esta similitud de secuencia primaria se traduce asimismo en estructuras secundarias similares en las respectivas regiones. Hay que subrayar al respecto dos hechos. Primero, la zona identificada de la CP (desde Ala 74 hasta Arg 92) contiene aminoácidos importantes en las dos funciones básicas de la(s) CP(s) de un virus: capacidad de autoasociación para formar la cubierta y capacidad de unión al ácido nucleico que constituye el genoma viral. Segundo, en posiciones equivalentes (Asp 77 de TMV CP y Lys 7 de Mel) se encuentran residuos críticos tanto para la interacción entre las subunidades de la CP, por un lado, como para el plegamiento y autoasociación de la Mel, por otro.

Como consecuencia de estas observaciones, y en una interpretación laxa del concepto 'resistencia derivada del patógeno', se estudió el posible efecto de la Mel sobre la infectividad del TMV, encontrándose un efecto inhibitorio cuantitativamente débil. Sorprendentemente, cuando se analizaron una serie de variantes de secuencia en la posición Lys 7 de la Mel, se comprobó que la sustitución por un residuo hidrofóbico tenía como consecuencia un importante bloqueo de la infección viral. Hay que destacar que sólo la sustitución por un aminoácido hidrofóbico, y no otra, tiene el efecto deseado, y que no existía ninguna razón que permitiera predecir el efecto que dicha sustitución tendría en la actividad biológica del péptido. Se eligió para un estudio más detallado el análogo de sustitución de Mel que presenta una Ile en la posición 7 (subK7I).

La especificidad de la actividad antiviral de subK7I sobre TMV se demostró evaluándola frente a otros tobamovirus que presentan secuencias gradualmente divergentes en la zona estudiada de la CP. Experimentos subsiguientes sugirieron que para observar el efecto de inhibición es necesaria la interacción de la partícula viral con el péptido, aunque este no

desestabiliza ni altera de forma apreciable la partícula. Tanto Mel como subK71 se unen con una elevada afinidad al RNA viral desnudo, inhibiendo su infectividad en aproximadamente la misma extensión. El efecto de la interacción entre el RNA viral y los péptidos derivados de Mel es recíproco; por una parte el RNA induce el plegamiento de los péptidos y por otra estos inducen la estructuración del RNA. De forma interesante, existe una correlación inequívoca entre la actividad antiviral de los péptidos, el tipo de plegamiento que estos pueden adoptar [4], y el tipo de estructuración que inducen en el RNA viral. Se discutirán todos estos datos dentro de un modelo que pudiera explicar la actividad biológica de los péptidos en relación con sus propiedades estructurales. En un trabajo paralelo e independiente se ha demostrado que la sustitución del Asp 77 de la CP del TMV por un residuo de Asn incrementa notablemente la estabilidad de la partícula viral hasta el punto de reducir su infectividad [5].

Nuestros resultados, además de ser positivos, trascienden el campo delimitado inicialmente, teniendo derivaciones tanto en aspectos de protección vegetal como en aquellos más básicos del estudio de la relación estructura-función en una molécula biológica. Asimismo, se discutirán las posibles implicaciones de este trabajo en la identificación de péptidos con actividad antiviral.

#### Referencias

1. Fitch, J. H., y Beachy, R. N. (1993) *Ann. Rev. Microbiol.* 47, 739-763; Wilson, T. M. A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3134-3141.
2. Collier, N. C., Knox, K., y Schlesinger, M. J. (1991) *Virology* 183, 769-772; Wachinger, M., Saermark, T., y Erfle, V. (1992) *FEBS Lett.* 309, 235-241; Wild, C. T., Oas, T., McDanal, C. B., Bolognesi, D., y Matthews, T. J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10537-10541; Aboudy, Y., Mendelson, E., Shalit, I., Bessalle, R., y Fridkin, M. (1994) *Int. J. Pept. Protein Res.* 43, 573-582; Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. K., McDanal, C. B., y Matthews, T. J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9770-9774.
3. Namba, K., Pattanayek, R., y Stubbs, G. (1989) *J. Mol. Biol.* 208, 307-325; Terwilliger, T. C., y Eisenberg, D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 6016-6022; Dempsey, C. E. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 143-161.
4. Pérez-Payá, E., Houghten, R. A., y Blodelle, S. E. (1994) *Biochem. J.* 299, 587-591; Pérez-Payá, E., Houghten, R. A., y Blodelle, S. E. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 10481-1056.
5. Culver, J. N., Dawson, W. O., Plonk, K., y Stubbs, G. (1995) *Virology* 206, 724-730.

## Una mutación que anula a la función de movimiento se mantiene en el virus de la aspermia del tomate (TAV) asociada a una mayor replicación

I. Moreno <sup>(1,2)</sup>, J. J. Bernal <sup>(1)</sup>, E. Rodríguez-Cerezo <sup>(2)</sup>, F. García-Arenal <sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup>- Depto. de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, 28040 Madrid.

<sup>(2)</sup>- Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C., Cantoblanco, 28042 Madrid.

TAV es un virus de plantas con un genoma tripartito de RNA de sentido mensajero. El RNA3, bicistrónico, codifica las proteínas necesarias para la infección sistémica: la proteína de movimiento (MP), que potencia el movimiento célula a célula a través de los plasmodesmos, y la proteína de la cápsida (CP), necesaria para el movimiento célula a célula y para el movimiento a larga distancia en el floema.

El RNA3 de la cepa V-TAV presenta una mutación que interrumpe la fase de lectura de la MP introduciendo un codón de parada UAA en lugar de un codón de *Ser* en posición 4. Dicha mutación no se encuentra en otras cepas secuenciadas de TAV, como por ejemplo la cepa 1-TAV. Por manipulación genética de clones de cDNA de longitud total del RNA3 de V-TAV y I-TAV hemos determinado que la presencia del codón de parada disminuye al menos 50 veces la infectividad en plantas de transcritos obtenidos *in vitro* del RNA3, pero no afecta a la infectividad en protoplastos. Por tanto, el codón de parada afecta considerablemente a la función de movimiento célula a célula de la MP. La proporción del codón de parada en la población de V-TAV es no menor del 80%. Asociado a esto V-TAV se acumula a menor nivel, y coloniza más lentamente la planta huésped, que 1-TAV. Sin embargo hemos comprobado que el RNA3 mutante se amplifica más eficazmente que el homólogo con un codón de *Ser* en posición 4, por lo que se mantiene y predomina en la población molecular.

## Estudios del grado de adaptación en experimentos de competencia de distintas razas de PVY

A. Romero y F. Ponz

CIT-INIA, Area de Biología Molecular y Virología Vegetal, Ctra. La Coruna, Km. 7,3. 28040 Madrid.

El virus Y de la patata, PVY, miembro tipo de los potyvirus, es uno de los virus de plantas que más se han estudiado tradicionalmente y de los más importantes atendiendo a su incidencia económica, especialmente en Solanáceas cultivadas.

A pesar del tiempo y esfuerzo dedicados al estudio de este virus, poco se sabe de su evolución. Tradicionalmente se han establecido grupos de aislados de PVY según diversos criterios, dependiendo del huésped del cual fueron aislados y basándose tradicionalmente en la sintomatología y la serología. Esto ha llevado a una clasificación no homogénea puesto que no ha existido un criterio único de clasificación independiente del huésped.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un método de caracterización molecular de aislados de PVY basado en inmunocaptura-RT-PCR (Nolasco y cols., 1993), seguidas de análisis de restricción de los productos amplificados (RFLP, Blanco-Urgoiti y cols., 1995). Así, se ha establecido una clara separación de razas de PVY procedentes de patata y razas procedentes de otros huéspedes, en función de la distancia genética entre ellos (Blanco-Urgoiti y cols., 1995). Parece posible afirmar que la adaptación al huésped ha constituido una componente importante en la evolución de las distintas razas de PVY, tal como se ha descrito también para otros virus vegetales (Fraile y cols., 1995). La especialización en PVY ha alcanzado un grado tal que razas de PVY procedentes de patata no son capaces de infectar pimiento, y viceversa.

En este trabajo se ha analizado el grado de adaptación ("fitness") que presentan las distintas razas de PVY en un huésped experimental común, como es el tabaco. Mediante este nuevo método somos capaces de analizar molecularmente el concepto de interferencia en las infecciones dobles y de convivencia de patógenos no distinguibles por síntomas o serología.

Para los estudios de grado de adaptación de PVY en tabaco, se coinocularon diferentes aislados de PVY-patata y PVY-pimiento. Los resultados revelaron que dos aislados de PVY-pimiento pertenecientes a patotipos distintos, cero y 1, no son capaces de convivir en tabaco, siendo el cero muy pronto desplazado por el 1. Curiosamente, Cook describió en 1962, por métodos tradicionales de inoculación de variedades resistentes y sensibles, que en pimiento el patotipo 1 era desplazado por el cero, lo cual apoya la idea de que diferentes grados de adaptación son dependientes del huésped. En el caso de dos restritotipos de PVY-patata coinoculados en tabaco, también aquí uno de ellos es rápidamente desplazado por el otro, mientras que un PVY-patata y un PVY-pimiento sí conviven al cabo de al menos siete pases en tabaco. Estos resultados sugieren que la menor distancia genética que presentan los aislados procedentes del mismo huésped está relacionada con la capacidad de interferirse mutuamente en infecciones dobles, mientras que las razas procedentes de distinto huésped son lo suficientemente diferentes como para mantener una infección doble, sin competir entre ellos.

Actualmente nos disponemos a analizar esta característica en diferentes huéspedes cultivables de PVY y establecer así una correlación entre las diferentes parejas de razas y su grado de adaptación al huésped.



## Referencias

- Blanco-Urgoiti, B., Dopazo, J., Sánchez, F., and Ponz, F. 1995. Enviado para su publicación.
- Cook, A.A. 1962. Plant Dis. Rep. 46, 569.
- Fraile, A., Aranda, M.A., and García-Arenal, F. 1995. En prensa.
- Nolasco, G., De Blas, C., Torres, V., and Ponz, F. 1993. J. Virol. Meth. 45, 201-218.

## Análisis de la región 5' no codificante del virus de la sharka

L. Simón, H.S. Guo y J. A. García

Centro Nacional de Biotecnología (C.S.I.C.), Campus de la Universidad Autónoma, 28049 Madrid

El virus de la sharka (plum pox virus, PPV) es un miembro del género *Potyvirus* que causa una grave enfermedad de árboles frutales del género *Prunus*. El genoma de PPV es una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 10000 nucleótidos de longitud que tiene una proteína VPg unida a su extremo 5' y una cola poli(A) en su extremo 3'. Este genoma se expresa a través de una poliproteína que es procesada co- y post-traducionalmente dando lugar a las proteínas funcionales de PPV.

La traducción del genoma de PPV comienza en el <sub>147</sub>AUG, que se encuentra en un adecuado entorno de Kozak. Existe otro <sub>35</sub>AUG, que no es funcional, o bien debido a que no está en un buen entorno para el inicio de la traducción o a la existencia de un sitio de unión interna de los ribosomas que los dirige al segundo AUG. Con el fin de determinar qué secuencias y/o estructuras secundarias de la región 5' no codificante (5' NC) de PPV son necesarias *in cis* para los procesos de encapsidación, traducción y replicación, hemos construido sobre un clon de cDNA del genoma de PPV mutantes puntuales y con deleciones que abarcan, solapándose, toda esta región.

En experimentos de traducción *in vitro* en un lisado de reticulocitos, empleando RNAs transcritos de un clon de cDNA que contiene los 2600 primeros nucleótidos de PPV, Sólo dos de los mutantes presentaron un descenso acusado de los niveles de traducción con respecto al RNA no mutado (mas de un 50% de reducción). En ambos casos la mutación había introducido un codón AUG que presentaba un adecuado entorno de Kozak para el inicio de la traducción y que daba comienzo a un ORF corto (del nt 60 al 68 y del 31 al 117). Mutaciones que implicaban a los mismos nucleótidos que las dos anteriores, pero sin dar lugar a un codón AUG, no afectaron a la traducibilidad de la construcción. Estos resultados indican que, al menos *in vitro*, ninguna secuencia de la región 5' NC de PPV es esencial para un eficiente inicio de la traducción. Deleciones de mas de 60 nucleótidos, que destruían cualquier tipo de hipotética estructura secundaria, ya improbable desde un punto de vista termodinámico dada la escasez de C y G (27%), no provocaron un descenso de los niveles de traducción. Ésto indica que tampoco es probable la existencia de una estructura secundaria que sea necesaria *in vitro* para el inicio de la traducción del RNA genómico de PPV. Estos resultados contradicen a otros autores que han propuesto, pero no demostrado, la existencia de una secuencia interna de unión de ribosomas en la región 5' no codificante de otros potyvirus, y abogan por un mecanismo de "barrido deficiente" (*leak*; y *scanning*) para el inicio de la traducción, que sería consistente con experimentos previamente realizados en nuestro laboratorio con RNAs bicistrónicos. Según este modelo los ribosomas se unirían al extremo 5' del RNA y se deslizarían a través de él hasta encontrar al <sub>147</sub>AUG con un entorno adecuado para el inicio de la traducción, ignorando al <sub>35</sub>AUG que no tiene un entorno adecuado y que probablemente está demasiado cerca del extremo para ser reconocido con eficacia. Se están realizando experimentos de expresión transitoria en protoplastos para confirmar el significado biológico de estos resultados.

Experimentos *in vivo*, inoculando plantas de la especie *Nicotiana clevelandii* con RNAs transcritos de clones cDNA del genoma completo de PPV que tienen mutaciones en la región 5' NC, han revelado que los virus mutantes que presentaban una traducibilidad de su RNA inferior al 50% de la del virus silvestre no eran capaces de infectar las plantas.

Deleciones de los nucleótidos inmediatamente anteriores al AUG iniciador también dieron lugar a virus no infecciosos (deleciones de los nt 146, 129 al 146, 131 al 146 y 113 al 146), salvo un mutante en el que se mantenía un buen entorno de Kozak de inicio de la traducción (nt 130 al 146 delecionados). Los valores de traducción *in vitro* varían entre el 70-80% con respecto al RNA del virus silvestre para los mutantes no infecciosos, y el 95% para el caso del mutante capaz de infectar plantas. Tras varios pases de inoculación de plantas con la progenie de este mutante, se detectaron en algunos casos segundas mutaciones (deleciones puntuales de una A o una T) en la secuencia  $_{63}\text{-AAAATTTT}_{-71}$ . Puesto que estas mutaciones adicionales deben de suponer un acoplamiento del RNA viral a sus necesidades funcionales, los datos obtenidos pueden dar considerable información sobre los requerimientos estructurales de algun proceso en que desempeñe un papel la región 5' NC. Se están realizando experimentos de análisis de estructura secundaria en solución para estudiar esta posibilidad.

También resultaron infecciosos, y estables tras varios pases de inoculación, virus mutantes que tenían delecionados fragmentos de la secuencia comprendida entre los nucleótidos 72 y 130 (nt 72 al 87, 76 al 90 y 91 al 130). Todos los mutantes ensayados fueron desplazados por el virus silvestre en experimentos de coinfección de plantas, por lo que podemos concluir que la zona comprendida entre los nucleótidos 72 y 146 no es necesaria para la viabilidad del virus pero sí colabora en la optimización de su ciclo vital.

Por otro lado, virus mutantes que tenían secuencias delecionadas entre los nucleótidos 15 y 35 (27 al 35, 28 al 35, 21 al 35 y 20 al 35) no eran infecciosos. Experimentos de replicación en protoplastos determinarán si estas secuencias son necesarias *in cis* para la replicación o para la encapsidación de PPV. La deleción o sustitución de los dos primeros nt (adeninas) del genoma de PPV también causaba la pérdida de la infectividad. Por el contrario, sí resultó ser infeccioso un mutante que tenía una adenina adicional en el extremo del RNA (5 adeninas en lugar de 4), aunque el análisis de su progenie indicó que pierde el nucleótido extra en los primeros ciclos de replicación. Estos resultados, ayudados por experimentos en curso, pueden dar luz sobre cuál es el mecanismo empleado por este tipo de virus para iniciar la replicación de su RNA.

## El DNA de un elemento extracromosómico de tipo retroviroidal de plantas se integra en diferentes puntos del genoma de un caulimovirus

A. Vera, J. A. Darós y R. Flores

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia.

El CarSV RNA (de *Carnation Small Viroid-like RNA*) es una pequeña molécula circular de 275 nt presente en ciertas plantas de clavel que muestra diversas semejanzas estructurales con los viroides y los RNAs satélites de tipo viroidal (1). Entre ellas destaca la capacidad de sus cadenas de ambas polaridades de autocortarse *in vitro* a través de estructuras del tipo cabeza de martillo. Estos ribozimas deben desempeñar presumiblemente un papel fundamental en su ciclo de replicación que probablemente ocurre mediante un mecanismo de círculo rodante del tipo simétrico. Sin embargo, contrariamente a los viroides y a los RNAs satélites de tipo viroidal, el CarSV RNA carece de infectividad y existe adicionalmente como secuencias de DNA repetidas en tandem en orientación cabeza-cola (2). Además, estas secuencias del CarSV DNA se hallan formando parte de elementos extracromosómicos fundidas con secuencias del CERV (*deCarnation Etched Ring Virus*), un pararetrovirus del grupo de los caulimovirus. Todo ello indica que las propiedades de este sistema son las de un retroelemento, y más concretamente de un retroelemento de tipo retroviroidal, con algunas características propias de viroides y RNAs satélites de tipo viroidal de plantas, mientras que otras de sus facetas lo asemejan a un transcrito de 330 nt proveniente de una secuencia repetida en tandem distribuida a lo largo de los cromosomas del tritón. Este transcrito es el único RNA conocido de origen animal que contiene un ribozima de cabeza de martillo (3).

Una primera caracterización parcial de los elementos extracromosómicos CarSV-CERV reveló el emplazamiento del CarSV DNA en la ORF V del virus, que codifica a la transcriptasa reversa. Las fusiones entre los DNAs CERV y CarSV se caracterizan por una corta secuencia común a ambos componentes del sistema. Esto sugiere un mecanismo de recombinación del tipo de cambio de molde (*copy choice*), mediado por una polimerasa poco procesiva. La continuación de estas observaciones nos ha llevado a identificar y caracterizar un número creciente de estas fusiones CarSV-CERV que se observan no sólo en la ORF V, sino también en el resto del genoma viral. Esto indica la existencia de una población de elementos extracromosómicos heterogénea respecto a la localización del DNA CarSV dentro del DNA del virus (que además de la ORF correspondiente a la transcriptasa reversa, afecta también a las que codifican la proteína de la cápsida y la proteína que media la transmisión por ácidos, entre otras). Aunque la mayoría de estas fusiones se han caracterizado en plantas seropositivas para el CERV, también las hemos detectado en plantas libres de virus. En todos los casos se confirma la presencia de 3 a 8 residuos comunes en la unión entre los DNAs CarSV y CERV. Por otro lado, la situación de las fusiones con respecto a la secuencia CarSV indica la existencia de "puntos calientes" que podrían estar relacionados con las diversas formas lineales del CarSV RNA y/o determinados elementos de fuerte estructura secundaria (o de orden superior) que favorecerían el "salto" de la polimerasa. También hemos detectado fenómenos de recombinación entre secuencias del DNA CERV de polaridades opuestas cuyas fusiones siguen así mismo un patrón estructural aparentemente similar al observado entre secuencias de los DNAs CarSV y CERV.

La replicación de los elementos CarSV-CERV es una cuestión por resolver. El conocimiento de la arquitectura completa de estos retroelementos sería de gran valor para com-

prender su génesis y su mecanismo de amplificación. En este sentido se dirigen los esfuerzos que estamos realizando actualmente.

#### Referencias

- 1) Hernández, C., Darós, J.A., Elena, S.F., Moya, A. y Flores, R. (1992). *Nucleic Acids Res.* 20: 6323-6329.
- 2) Darós, J.A. y Flores, R. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6856-6860.
- 3) Epstein, L.M. y Gall, J.G. (1987). *Cell* 48: 535-543.

## Grande1: un nuevo tipo de retrotransposón del género *Zea*

C. M. Vicient, A. Monfort y J. A. Martínez-Izquierdo.

Departamento de Genética Molecular, CID-CSIC, Jordi Girona Salgado 18-26, 08034 Barcelona. Telf. (93)40~61-27. Fax (93)204-59-04. E-mail: JAMGMJ@CID. CSIC.ES

Los retrotransposones son elementos genéticos móviles estructuralmente semejantes a los retrovirus que han sido descritos en todos los grupos taxonómicos de los Eucariotas. En las plantas los retrotransposones parecen ser especialmente abundantes y variados. En nuestro grupo se ha estado trabajando en la caracterización de un nuevo retrotransposón, Grande1, presente en todas las especies del género *Zea* y en el género *Tripsacum*, filogenéticamente muy cercano al anterior.

Grande1 fue descubierto gracias a la caracterización de una familia de secuencias repetidas dispersas descubierta por nuestro grupo en el género *Zea*, secuencias denominadas inicialmente ZRLE/ZEAR (Raz *et al.*, 1991; Aledo *et al.*, 1995). Grande1 presenta todas las características típicas de un retrotransposón del tipo Ty3/*gypsy*, mostrando además una serie de características poco usuales entre los retrotransposones (Vicient, 1995). Una de ellas es el tamaño, ya que Grande1 posee 13.7 Kb, lo que significa que es el retrotransposón de mayor tamaño de los caracterizados hasta la fecha en cualquier organismo. Teniendo en cuenta su tamaño y su número de copias, estimado en maíz en unas 1000 por genoma haploide, hace que Grande1 represente algo más del 1% del genoma del maíz.

La secuenciación de una copia completa nos indicó que el gran tamaño de Grande1 es consecuencia de que la región 3' abajo de los dominios codificantes típicos de los retrotransposones es inusualmente larga (7 Kb) para lo que es normal incluso en los retrotransposones más largos como los del tipo Ty3/*gypsy* (menos de 1.5 Kb). Esta región 3' presenta características estructurales peculiares como la existencia de dos agrupaciones de repeticiones en tándem. Agrupaciones semejantes se han detectado en otros elementos transponibles como los retrotransposones TOC1 de *Chlamydomonas*, y micropia de *Drosophila*, pero en ningún caso se ha podido establecer su origen o función aunque presentan un elevado grado de conservación intra e interelementos y una importante estructura secundaria (Monfort *et al.*, enviado a FEBS Letters).

La característica más peculiar de esta región 3' es que los únicos transcritos que se han detectado correspondientes a Grande1 corresponden a una región cercana a la LTR de 3', dentro de esta región anormalmente larga de Grande1. Concretamente, usando una sonda correspondiente a dicha zona es posible detectar por análisis "northern" un transcrito de 0.9 Kb bastante abundante en todos los tejidos analizados de maíz. El análisis de la secuencia de dicha zona ha revelado la existencia de una ORF flanqueada por secuencias con los elementos típicos de los promotores y terminadoras de la transcripción en plantas. El análisis de la expresión transitoria en suspensiones celulares de maíz mediante micro-bombardaje con construcciones de la región 5' arriba de la ORF y el gen informador *gus* han demostrado que esta secuencia es capaz de dirigir la síntesis de RNA. Por el momento desconocemos el origen o función de dicho gen. El examen de la secuencia de aminoácidos deducida de este gen no ha revelado similitud con las proteínas típicas de retroelementos y retrovirus. Por otra parte, el sentido de transcripción del gen es el inverso al de lo esperado para estos dominios típicos. No se han detectado similitudes significativas con otras secuencias de los bancos de datos, si bien presenta cierta similitud de secuencia y de patrón de expresión con proteínas ricas en glicina. La proteína deducida es además rica en aminoácidos ácidos.

El origen y/o función de la región 3' de Grande1 nos es desconocido por el momento. Nuestra hipótesis actual es que podría tratarse de una región capturada por un precursor de Grande1 mediante un mecanismo semejante al de la transducción en retrovirus, en cuyo caso, el gen descrito sería un gen celular. Datos indirectos apoyan esta hipótesis, como es que el uso codones del gen capturado se ajusta al del maíz mientras que el de los dominios codificantes de Grande1 como la transcriptasa inversa no. Otro dato preliminar también a favor de la hipótesis anterior sería la detección por análisis "northern" de bandas de hibridación semejantes a las de maíz en otras especies como sorgo, tabaco o *Arabidopsis*, en las cuales no se detecta Grande1 a nivel de hibridación southern. Estas bandas podrían corresponder a los RNAs transcritos de los genes homólogos al capturado por Grande1 en dichas especies. El clonaje y la secuenciación de estos genes podrían servir para confirmar definitivamente nuestra hipótesis.

Una de las copias de Grande1 secuenciadas (Grande1-7) se encuentra insertada dentro de un elemento similar al Cin1 de maíz, mientras que otra copia (Grande1-4) se haya insertada dentro de un nuevo retrotransposón que hemos denominado ZDE (Vicient y Martínez-Izquierdo, enviado a *Plant Molecular Biology*). La secuenciación de 1.5 Kb de uno de estos elementos, el que flanquea a Grande1-4, ha mostrado la presencia de unos dominios gag y proteasa con notable similitud a los del retrotransposón *dell* de *Lilium henryi*. ZDE presenta una distribución de especies idéntica a Grande1 y un número de copias moderado.

ZDE es el primer retrotransposón descubierto como consecuencia de la inserción dentro de el de otro elemento transponible. Por el momento desconocemos si esta aparente tendencia de Grande1 a insertarse dentro de otros retroelementos responde a una especificidad de lugar de integración o bien es debido al azar como consecuencia del elevado porcentaje del genoma de maíz ocupado por elementos transponibles. La secuenciación de las regiones flanqueantes de un mayor número de elementos nos dará la respuesta.

#### Referencias

- Aledo R., Raz, R., Monfort, A., Vicient, C., Puigdomenech, P. y Martínez-Izquierdo, J.A. (1995) *Theor. Appl. Genet.* 90: 1094-1100.
- Monfort, A. Vicient, C., Raz, R., Puigdomenech, P. y Martínez-Izquierdo, J.A. (1995) Enviado a *FEBS Lett.*
- Raz, R., Puigdomenech, P. y Martínez-Izquierdo, J.A. (1991) *Gene* 105: 151-158.
- Vicient, C.M. y Martínez-Izquierdo, J.A. (1995) Enviado a *Plant Molecular Biology*.
- Vicient, C.M. (1995) Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.







