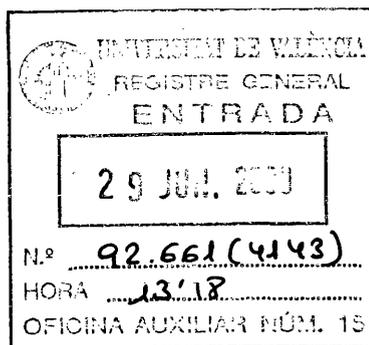


Biológicas  
T.D  
607



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Departament de Bioquímica i Biologia molecular

**Regulación de la S-adenosilmetionina descarboxilasa durante  
el desarrollo de *Pisum sativum* y *Arabidopsis thaliana*.**

Memoria presentada por

**Francisco Marco Picó**

Para optar al grado de

**Doctor en Ciencias Químicas**

Director

**Dr. Pedro M. Carrasco Sorlí**

**Valencia, 2000**



UMI Number: U607695

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607695

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

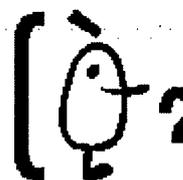
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAT DE CIÈNCIES  
Nº 16052  
DATA 12-2-01  
SIGNATURE TD807 Biología  
Nº 121284829

26 cm



# Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Ciències Biològiques



D. Pedro M. Carrasco Sorlí, Profesor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València

Certifica:

Que Francisco Marco Picó, licenciado en Ciencias Químicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Regulación de la S-adenosilmetionina descarboxilasa durante el desarrollo de *Pisum sativum* y *Arabidopsis thaliana*", que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado a 5 de junio de 2000.

Firmado: Pedro M. Carrasco Sorlí



Als meus pares



# Agraïments

---

Ha estat ara, en aquest moment, quan me'n he adonat de tot el temps i de tantes coses que han passat des de que vaig començar esta aventura de la tesi. Es fa molt difícil resumir en estes línies tot el viscut i tot el que voldria agrair després de tot este temps, encara que intentaré fer-ho el millor possible, si m'oblido d'algú espere que em perdone.

En primer lloc voldria agrair a Pedro, el meu director, per tota eixa confiança depositada en mi des del primer dia i com no, per eixa capacitat tan seua d'aconseguir tot allò necessari per a la tesi que li he demanat, encara que més d'una vegada fora "al límit". Ah! I per preocuparse també per la meua "formació integral", ell ja m'enten.

És obligat ara agrair tantes i tantes cosses als companys del laboratori de plantes, i ésta és la part més difícil, per la gran quantitat de gent que ha passat per ací (un lloc que algú va anomenar "laboratorio trampolín"). Començaré pel principi, amb els components de l'antic "laboratori lejía": Salva (el president), (don) Toni, Joan i Juanjo (abans mariscal i bayarri, ara la policia científica), amb els que vaig descobrir el costat divertit del dia a dia al laboratori i també fora d'ell. Menció especial a la "jefa" Lourdes, amb qui em vaig iniciar en aquest món de la biologia molecular (i Radio 3!)...qui puguera seguir el seu ritme de feina!. A Helena i Marçal, per tants bons moments i per no deixar mai de sorprendre'm (sobre tot últimament). A les meues "alumnes": Noemí (per deixar-me ser el seu "Mentor"), Mónica (per batejarme com "papa Paco" i tantes altres coses) i Clara (per definir-me com "útil"). A Ignacio i Pepe per eixes converses irrepetibles i tantes rialles entre miniprep i miniprep. A María i Raúl, per ajudarme a aguantar els envits de Pedro, i a les noves adquisicions: Vicent, Julia i M<sup>a</sup> Jesus per soportar la meua "dictadura" musical. També a la resta de caps del laboratori: Marisa, per sempre intentar traure'm un somriure, a Lola, per el seu entusiasme front a qualsevol experiment, a Ximo per no renunciar mai a les reunions de laboratori... i a Carlos, per vore la llum i passar-se al PC.

A la resta dels becaris del departament, en especial als companys del dinar (i piscina), Nelo (a més, per compartir amb mi Internet i altres obsesions), Gemma ("no me

## AGRAÏMENTS

---

cuente usted su vida”), Susana, Geno, Pepa, Ethel... i també als becaris “iateros”, sobre tot a Sergi, sempre un amic. A JR per revelar-me més de un dels seus secrets de Mcgyver, i a la resta del personal del departament, sobretot per elevar (inmerescudament) a categoria de maestria la meua “xicoteta” afició al ratolí i al teclat.

A M<sup>a</sup> Jose i la seua gent del CEAM, per posar a la nostra disposició la Peira i l’ozó, i també per contribuir a que esta tesi puguera ser finalitzada en aquest últim any “extra”. Espere poder respondre a eixa confiança depositada en mi a partir d’ara.

Com no tot va a ser treball, he d’agraïr als membres de la Societat del mejar xinés “Lian Shan Po” tants sopars i la sort de ser un dels membres fundadors. També a Salva, Laura, Joan, Eva, Toni, Juanjo, Xelo i David el mai perdre l’esperança de vore’m i sempre cridar-me als sopars. I com no, als amics de sempre, la “escoria almandiense”: Tinín, Santi, Poli i David per tants estius i caps de setmana de tamarindo, ponderosa, Guau, “cueva” i alicateo.

Finalment voldria agrair i dedicar esta tesi als meus pares, per estar sempre ahí i “presumir” tant de mi i dels meus germans.

“Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas.”

*Louis Pasteur.*



# Indice

---

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>IV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. LA BIOSÍNTESIS DE POLIAMINAS.	1
1.2. RELACIÓN DE LAS POLIAMINAS CON LOS PROCESOS DE CRECIMIENTO Y SENESCENCIA VEGETAL.	3
1.2.1. EL OVARIO NO POLINIZADO DE GUISANTE COMO SISTEMA EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE DESARROLLO Y SENESCENCIA VEGETAL.	5
1.2.2. LAS POLIAMINAS EN EL DESARROLLO DEL FRUTO Y LA SENESCENCIA DE LOS OVARIOS NO POLINIZADOS DE GUISANTE.	7
1.3. LAS POLIAMINAS Y LOS PROCESOS DE RESPUESTA A ESTRÉS DE LA PLANTA.	8
1.3.1. RESPUESTA A DEFICIENCIAS EN NUTRIENTES.	9
1.3.2. RESPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO.	9
1.3.3. RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO.	11
1.3.4. RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO: EL OZONO COMO CONTAMINANTE AMBIENTAL.	11
1.4. MANIPULACIÓN DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS.	13
1.4.1. UTILIZACIÓN DE INHIBIDORES DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS.	13
1.4.2. UTILIZACIÓN DE MUTANTES DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS.	14
1.4.3. UTILIZACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.	15
1.5. S-ADENOSILMETIONINA DESCARBOXILASA.	18
1.5.1. FUNCIÓN BIOLÓGICA Y CARACTERÍSTICAS.	18
1.5.2. S-ADENOSILMETIONINA DESCARBOXILASA DE PLANTAS. CARACTERÍSTICAS DEL cDNA	19
1.5.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA SAMdC EN PLANTAS SUPERIORES.	20
1.5.3.1. Regulación de la SAMdC durante el desarrollo de la planta.	20
1.5.3.2. Regulación de SAMdC por la luz y ritmos circadianos.	21
1.5.3.3. Regulación de SAMdC por factores ambientales.	22

## INDICE

---

1.5.4. EFECTOS DE LA ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SAMdC EN PLANTAS TRANSGÉNICAS.	22
<b>1.6. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>27</b>
<b>2.1. MATERIAL VEGETAL.</b>	<b>27</b>
2.1.1. CULTIVO DEL MATERIAL VEGETAL.	27
2.1.1.1. Pisum sativum.	27
2.1.1.2. Obtención de callos de Pisum sativum cv. Alaska.	27
2.1.1.3. Arabidopsis thaliana.	28
2.1.2. . TRATAMIENTOS Y RECOGIDA DEL MATERIAL VEGETAL.	28
<b>2.2. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.</b>	<b>29</b>
2.2.1. AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO.	29
2.2.2. ANÁLISIS SOUTHERN.	30
2.2.3. AISLAMIENTO DE RNA.	31
2.2.4. ANÁLISIS NORTHERN.	32
<b>2.3. AISLAMIENTO DEL CDNA DE LA S-ADENOSILMETIONINA DESCARBOXILASA DE GUISANTE.</b>	<b>32</b>
2.3.1. RT-PCR.	32
2.3.2. AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' DEL CDNA DE SAMdC DE GUISANTE	34
2.3.3. AMPLIFICACIÓN DEL CDNA COMPLETO DE SAMdC DE GUISANTE.	36
<b>2.4. AISLAMIENTO DEL CDNA DE LA S-ADENOSILMETIONINA DESCARBOXILASA DE ARABIDOPSIS.</b>	<b>36</b>
<b>2.5. EXPRESIÓN EN LEVADURA DE LOS CDNAS DE LAS SAMdC DE GUISANTE Y ARABIDOPSIS.</b>	<b>37</b>
<b>2.6. AISLAMIENTO DEL CLON GENÓMICO DE SAMdC DE ARABIDOPSIS THALIANA.</b>	<b>38</b>
<b>2.7. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS THALIANA.</b>	<b>39</b>
2.7.1. METODOLOGÍA DE TRANSFORMACIÓN. ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.	39
2.7.2. CONSTRUCCIONES UTILIZADAS.	39
2.7.2.1. Expresión de GUS bajo el control del promotor de la SAMdC	39
2.7.2.2. Expresión constitutiva de la SAMdC.	42
2.7.2.3. Expresión inducible por cobre de la SAMdC.	42
<b>2.8. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD GUS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS.</b>	<b>45</b>

---

<b>3. RESULTADOS.</b>	<b>47</b>
3.1. CARACTERIZACIÓN DEL CDNA DE LA SAMdC DE GUISANTE	47
3.2. CARACTERIZACIÓN DEL CDNA DE SAMdC DE <i>ARABIDOPSIS</i>	50
3.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE LOS CLONES DE SAMdC DE GUISANTE Y <i>ARABIDOPSIS</i> .	52
3.4. LOS CDNAS DE GUISANTE Y <i>ARABIDOPSIS</i> CODIFICAN PARA UNA PROTEÍNA FUNCIONAL.	53
ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS GENES DE SAMdC DE GUISANTE Y <i>ARABIDOPSIS</i> .	56
3.6. CARACTERIZACIÓN DEL CLON GENÓMICO DEL GEN DE SAMdC DE <i>ARABIDOPSIS</i> .	59
3.7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE SAMdC EN PLANTAS DE GUISANTE.	61
3.7.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SAMdC EN TEJIDOS DE GUISANTE.	61
3.7.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA SAMdC DURANTE EL DESARROLLO Y SENESCENCIA DEL FRUTO DE GUISANTE.	62
3.7.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SAMdC Y OTRAS ENZIMAS DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE POLIAMINAS EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON OZONO.	65
3.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SAMdC EN TEJIDOS DE <i>ARABIDOPSIS</i>	71
3.8.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE SAMdC EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> .	72
3.8.2. EFECTOS DE LA DELECCIÓN UNIDIRECCIONAL DEL PROMOTOR	74
3.8.3. EFECTOS DE LA SOBREENPRESIÓN DE LA SAMdC EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> .	76
3.8.3.1. Sobreexpresión constitutiva de la SAMdC	76
3.8.3.2. Sobreexpresión inducible de la SAMdC.	80
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>84</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>92</b>
<b>6. REFERENCIAS:</b>	<b>94</b>

---

# Abreviaturas

---

ABA	ácido abscísico
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ADC	L-arginina descarboxilasa
AVG	aminoetoxivinilglicina
BAC	cromosoma bacteriano artificial
BAP	6-bencilaminopurina
BSA	seroalbúmina bovina
dcSAM	S-adenosil-5'-3'-metilpropilamina
DNA	ácido desoxiribonucleico
DFMA	DL-difluorometilarginina
DFMO	DL-difluorometilornitina
EDTA	ácido etiléndiaminotetraacético, sal disódica
EST	Expressed Sequence Tag
GA <sub>3</sub>	ácido giberélico
GUS	β-Glucuronidasa
K	Kinetina
mRNA	RNA mensajero
MGBG	metilglioxal-bis-(guanilhidrazona)
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MTA	metiltioadenosina
MS	Murashige y Skoog
MU	7-hidroxi-4-metilcumarina
Mu-Gluc	4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido
NAA	ácido 1-naftilacético
O.D. <sub>600</sub>	densidad óptica a 600 nm.
ODC	L-ornitina descarboxilasa
ORF	pauta abierta de lectura
OTC	cámaras de techo abierto

## ABREVIATURAS

---

PAO	poliamina oxidasa
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
poli(A)+ RNA	RNA poliadenilado
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
SAM	S-adenosil-L-metionina.
SAMdC	S-adenosil-L-metionina descarboxilasa
SAMs	S-adenosil-L-metionina sintasa
SDS	n-dodecil sulfato sódico
spm	espermina
spmd	espermidina
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UTR	región no traducida
X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-glucurónido
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético



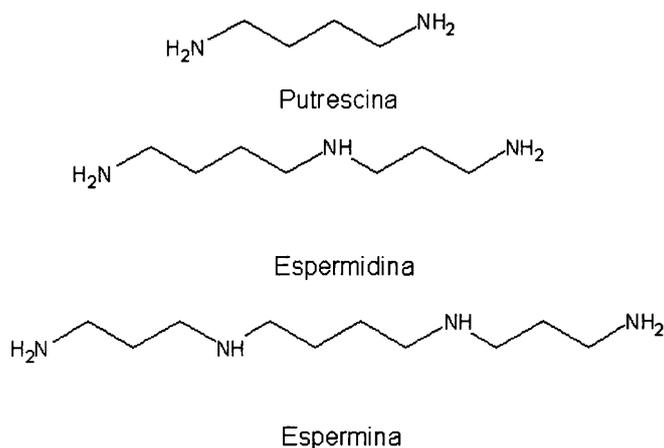


# 1. Introducción

---

## 1.1. La biosíntesis de Poliaminas.

Las poliaminas constituyen un grupo de moléculas alifáticas de bajo peso molecular y naturaleza policatiónica a pH fisiológico. Sus representantes más característicos son la diamina putrescina, la triamina espermidina y la tetraamina espermina (Figura 1.1). De naturaleza ubicua en todos los organismos vivos, se presentan en forma libre o conjugadas a macromoléculas o metabolitos fenólicos secundarios (Malmberg y col, 1998). Aunque se ha demostrado su carácter esencial en los procesos de crecimiento y desarrollo tanto en procariontes como en eucariotes, su papel exacto en estos procesos está todavía por dilucidar (Kumar y col, 1997).

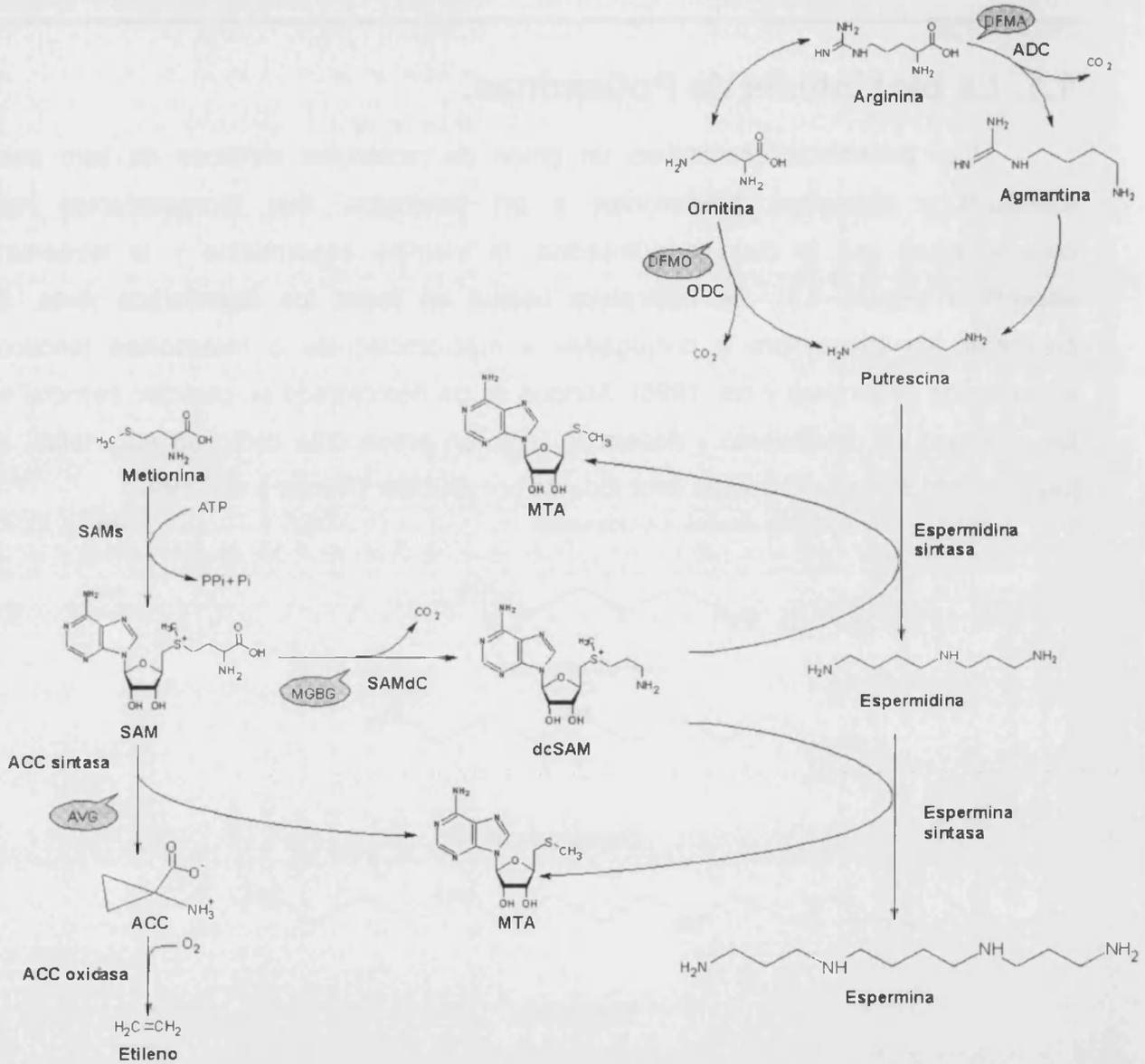


---

**Figura 1.1** Estructura química de las poliaminas más habituales en células eucariotas: putrescina, espermidina y espermina.

La biosíntesis de poliaminas en plantas es un proceso bien caracterizado, que puede dividirse en dos fases: síntesis de putrescina a partir de aminoácidos y formación de espermidina y espermina por la adición de grupos aminopropilo a las moléculas de

putrescina y espermidina respectivamente. (Figura 1.2) (Kumar y col, 1997; Tiburcio y col, 1997; Walden y col, 1997). La putrescina puede ser sintetizada a partir de ornitina



**Figura 1.2 Ruta biosintética de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en plantas y su relación con la biosíntesis del etileno.** ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; ADC arginina descaboxilasa; MTA, metiltioadenosina; SAM, S-adenosilmetionina; SAMdc, S-adenosilmetionina descarboxilasa; SAMs, S-adenosilmetionina sintasa; ODC, ornitina descarboxilasa. Se indican los inhibidores de las enzimas implicadas en los globos sombreados de gris: AVG, aminoetoxivinilglicina; DFMA, DL-difluorometilarginina; DFMO DL-difluorometilornitina; MGBG, metilglioxal-bis-guanil hidrazona.

mediante la actividad ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17), o indirectamente desde arginina en tres reacciones enzimáticas, de los cuales la arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19) parece ser la actividad limitante. La putrescina sirve a su vez como sustrato para la obtención de espermidina, y ésta a su vez para la síntesis de espermina mediante la acción sucesiva de las aminopropiltransferasas espermidina sintasa (EC 2.5.1.16) y espermina sintasa (EC 2.5.1.22), siendo el donador de los grupos aminopropilo necesarios la S-adenosil-5'-3'-metilpropilamina generada a partir de la acción de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMdC, EC 4.1.1.50) sobre la S-adenosilmetionina (SAM), metabolito también que también es precursor de la hormona etileno mediante la formación previa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Van der Straeten y Montagu, 1990). Esta competición por la SAM como punto común en ambas rutas metabólicas ha motivado muchas de las investigaciones centradas en la capacidad de etileno y poliaminas de regular y/o influir en su síntesis a través de la variación de los niveles de SAM (Kushad y Dumbroff, 1991).

## **1.2. Relación de las poliaminas con los procesos de crecimiento y senescencia vegetal.**

La presencia de las poliaminas en todos los organismos vivos y su aparente carácter esencial para crecimiento y desarrollo (Galston y Kaur-Sawhney, 1995) han impulsado numerosos estudios acerca de su implicación fisiológica tanto en animales como en plantas (Evans y Malmberg, 1989). Como consecuencia de dichos estudios, las poliaminas han sido implicadas en la mayoría de los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, incluyendo división celular, diferenciación vascular, embriogénesis, desarrollo radicular, iniciación y desarrollo floral, desarrollo del polen y del fruto y control de la senescencia (Galston y Kaur-Sawhney, 1995).

En plantas, la correlación entre división celular y niveles de poliaminas se ha basado en la observación de una mayor actividad biosintética en tejidos con tasas altas de división activa o metabólicamente activos, en comparación con tejidos sin división celular. En este sentido, se les asigna un papel en los procesos de síntesis de mRNA, síntesis proteica y metilación del DNA (Egea-Cortines y Mizrahi, 1991). En el proceso de germinación de *Phaseolus Vulgaris* se han observado niveles elevados de espermidina, espermina, RNA y proteínas en el embrión, mientras sus niveles disminuyen en el

cotiledón (Bagni, 1970). Por otro lado se ha demostrado una correlación positiva entre potenciales bajos de germinación y un contenido bajo en poliaminas en semillas de maíz, aunque la situación parece ser la opuesta en arroz (Egea-Cortines y Mizrahi, 1991). En cuanto al desarrollo del fruto, los niveles de poliaminas son altos durante el desarrollo de la flor y las primeras fases del desarrollo del fruto, si se compara con otros estadios de su desarrollo o incluso cuando se compara con otras estructuras de la planta con tasas altas de división activa (Egea-Cortines y Mizrahi, 1991). Los niveles decaen en los estadios de desarrollo del fruto posteriores.

Las poliaminas también han sido relacionadas con la senescencia (Galston y Sawhney, 1995), atribuyéndoles en general un papel antisenescente, basado en la observación de una correlación entre la disminución de los niveles de poliaminas y el inicio de la senescencia, así como en el hecho de que, en algunos casos, la adición de poliaminas exógenas retrasa la aparición de síntomas senescentes. Estas correlaciones han sido observadas en protoplastos de mesófilo en sistemas experimentales basados en el uso de hojas arrancadas, y en tubérculos de *Helianthus tuberosus* (Sawhney y Galston, 1991). Su acción antisenescente se ha relacionado con su capacidad de estabilización de membranas mediante su interacción con los fosfolípidos o  $Ca^{2+}$ , por una posible inhibición de la biosíntesis del etileno, por la estimulación de la síntesis de macromoléculas y su capacidad de eliminación de radicales libres (Sawhney y Galston, 1991).

Sin embargo, existen evidencias, relativas tanto a cambios en la concentración de poliaminas durante la senescencia, como al efecto de la adición de poliaminas exógenas sobre material vegetal senescente que apuntan a que esta correlación con la capacidad antisenescente no es una característica aplicable a todos los casos. Así, en una línea de guisante cuya senescencia está influenciada por el fotoperíodo, la senescencia comienza antes de la disminución de la concentración de poliaminas (Smith y Davies, 1985), por otro lado, en ovarios no polinizados de guisante, aunque los niveles de putrescina y espermidina decrecen durante la senescencia, los niveles de espermina aumentan, existiendo una correlación entre máximo nivel de espermina y el inicio de la senescencia (Carbonell y Navarro, 1989).

### **1.2.1. El ovario no polinizado de guisante como sistema experimental para el estudio de los procesos de desarrollo y senescencia vegetal.**

El guisante (*Pisum Sativum* L.) es una planta que presenta grandes ventajas como sistema experimental para el estudio de procesos de desarrollo vegetal. De fácil y rápido crecimiento, se dispone de gran cantidad de conocimientos en cuanto a su fisiología y genética (Murfet, 1985). El fruto de guisante es un fruto dehiscente que deriva de un único ovario o carpelo (Esau, 1977). Previo al desarrollo del fruto de guisante tiene lugar una fase de crecimiento del ovario, que abarca desde la formación del primordio floral hasta dos días después de la antesis de la flor. El guisante es una planta que se autopoliniza, produciéndose este proceso un día antes de la antesis de la flor, cuando los estambres crecen hasta alcanzar la altura del estigma del ovario y las anteras finalizan su desarrollo liberándose el polen. El desarrollo del tubo polínico abarca 32-48 horas por lo que la fertilización de los óvulos no tiene lugar hasta el día de la antesis (día 0) o un día después de ésta (día 1 post-antesis) (García-Martínez y col, 1991).

El crecimiento del fruto de guisante sigue un modelo de tipo sigmoideo doble, en la que dos curvas están separadas por una meseta, que se relaciona con la competición entre el fruto y el embrión por las sustancias producidas por el endospermo (Biale, 1964). La característica más peculiar del desarrollo del fruto de guisante es el crecimiento precoz de la vaina con respecto a la semilla que lo contiene. La vaina llega a alcanzar más de la mitad de su tamaño final, antes de que la semilla inicie su fase de crecimiento exponencial. El secado de la vaina va asociado a una pérdida en su peso fresco, pero el contenido total en nitrógeno, materia seca y minerales también disminuye. Las semillas no pierden peso al alcanzar la madurez, aunque se produce pérdida de agua, ya que esta pérdida está compensada por el peso ganado debido a la deposición de material de reserva en el cotiledón. La madurez del fruto se alcanza a la 5ª o 6ª semana después de la antesis (Pate y Flinn, 1977). El rápido incremento que tiene lugar en el tamaño y peso de la vaina se produce durante las etapas iniciales y va acompañado de un engrosamiento de la pared de la vaina. La vaina se hincha para formar una envuelta, por crecimiento diferencial de sus capas externa, exocarpo, y media, mesocarpo, con respecto a la interna, endocarpo (Vercher y col, 1984). El exocarpo está constituido por una única capa de células epidérmicas de paredes gruesas, mientras que el mesocarpo está formado por un conjunto de células parenquimáticas de paredes delgadas que

## INTRODUCCION

---

durante el proceso de desarrollo del fruto se incrementan en tamaño y acumulan gránulos de almidón (Vercher y col, 1984). Por último, el endocarpo está constituido por células epidérmicas y parenquimáticas, y en estadios más avanzados por células de esclerénquima (Vercher y col, 1984, Vercher y Carbonell, 1991).

Si se evita la polinización mediante la emasculación de la flor de guisante por eliminación de las anteras, los ovarios de las flores emasculadas continúan creciendo hasta el equivalente al tercer día post-antesis. Si durante este período el ovario no recibe ningún estímulo que induzca su fructificación, entra en un rápido proceso de senescencia que lleva a la desorganización del ovario y finaliza con la abscisión de la flor dos o tres días más tarde (día 5 o 6 post-antesis). El inicio de la senescencia va acompañada de pérdida de sensibilidad a tratamientos hormonales (García-Martínez y Carbonell, 1980). Posteriormente, empiezan a tener lugar una serie de cambios a nivel morfológico y bioquímico, como el cese del crecimiento por expansión de las células del endocarpo (Vercher y col, 1984) y la disminución del contenido de proteínas debido a la aparición de nuevas actividades proteolíticas (Carbonell y García-Martínez, 1985; Carrasco y Carbonell, 1988, 1990; Vercher y col, 1989; Cercós y col, 1992). También se producen cambios a nivel de la morfología de los núcleos y degradación de DNA, estos procesos se producen sobre todo a nivel de los núcleos de las células próximas al endocarpo del fruto en senescencia (4-5 días después de la antesis), así como a nivel del saco embrionario (Orzáez y Granell, 1997; Orzaez y col, 1999).

El proceso de senescencia del ovario de guisante emasculado puede evitarse mediante el tratamiento de estos ovarios con diversas hormonas, produciéndose el desarrollo de frutos partenocárpicos (García-Martínez y Carbonell, 1980). El tratamiento con ácido giberélico ( $GA_3$ ), 6-benzilaminopurina (BAP) o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) genera cambios histológicos asociados al desarrollo del fruto idénticos a los producidos tras la polinización y fertilización: aumento de las células del mesocarpo por expansión y diferenciación de las células del endocarpo en esclerénquima (Vercher y col, 1987; Vercher y Carbonell, 1991).

### **1.2.2. Las poliaminas en el desarrollo del fruto y la senescencia de los ovarios no polinizados de guisante.**

La ruta biosintética de poliaminas en los procesos de senescencia y desarrollo del ovario de guisante ha recibido especial atención en los últimos años. En este sentido se han determinado tanto los niveles de poliaminas en los ovarios y frutos durante estos procesos (Carbonell y Navarro, 1989), como los niveles de algunas de las actividades enzimáticas implicadas (Pérez-Amador y Carbonell, 1995; Alabadí y Carbonell, 1999) y los genes que codifican para algunos de las enzimas biosintéticas (Gómez-Gómez y Carrasco, 1996; Pérez-Amador y col, 1995, Alabadí y Carbonell, 1999).

Las medidas de los niveles de poliaminas señalan en general un incremento transitorio en los niveles de putrescina, espermidina y espermina durante el desarrollo temprano del fruto putrescina así como en ovarios partenocárpico obtenidos mediante inducción con  $GA_3$ , y una posterior caída durante el resto del desarrollo del fruto, siendo las poliaminas mayoritarias espermidina y espermina. Por otro lado se observa una correlación entre niveles altos de espermina y la senescencia del ovario, y entre un nivel bajo de espermina y el desarrollo del fruto inducido por polinización o tratamiento con auxinas (2,4-D) o giberelinas ( $GA_3$ ). (Carbonell y Navarro, 1989). Durante la senescencia del ovario se observa la acumulación de un derivado de la espermidina, la  $N^4$ -hexanoil-espermidina, cuyos niveles aumentan significativamente cuando el ovario entra en senescencia. Los niveles de este derivado se mantienen constantes durante el desarrollo del fruto partenocárpico inducido por  $GA_3$ , citoquininas o auxinas, por el despunte de la planta, o de forma espontánea en el mutante *slender* (Pérez-Amador y col, 1996).

El estudio de la ruta biosintética de poliaminas se ha profundizando posteriormente a nivel de las actividades de las enzimas implicadas y el aislamiento de los cDNAs que codifican para las mismas. La actividad ADC es la responsable de la biosíntesis de putrescina en ovarios y frutos jóvenes de guisante, no detectándose actividad ODC en estos tejidos (Pérez-Amador y Carbonell, 1995). Se observa un incremento transitorio tanto en la actividad ADC como en el nivel de su mRNA tras la inducción del desarrollo partenocárpico con  $GA_3$ , así como una disminución de su expresión en la senescencia del ovario no polinizado (Pérez-Amador y Carbonell, 1995; Pérez-Amador y col, 1995). La actividad espermidina sintasa presenta también un incremento en los estadios tempranos del desarrollo del fruto polinizado o partenocárpico

inducido con GA<sub>3</sub>, y que correlaciona con los niveles de uno de los mRNA que codifican para esta enzima (psSPDSYN1), mientras que la expresión del segundo gen para espermidina sintasa aislado (psSPDSYN2), se incrementa en estadios avanzados del desarrollo del fruto (Alabadí y Carbonell, 1999). Por otro lado se han aislado dos cDNA que codifican para la SAMs (Gómez-Gómez y Carrasco, 1996) que muestran una regulación diferencial, tanto a nivel de tejido, como en respuesta a etileno y durante el desarrollo del ovario (Gómez-Gómez y Carrasco, 1998). Durante el desarrollo del fruto, inducido por polinización o mediante tratamiento con 2,4-D, tiene lugar un aumento del transcrito del gen SAMs 1, mientras que el mensajero del gen SAMs 2 no presenta cambios en sus niveles. Por otro lado, ambos genes presentan una inducción de su expresión durante la senescencia del ovario, estando el gen SAMs 1 regulado por el etileno, mientras que la inducción observada para el gen SAMs 2 parece encontrarse asociada a otros factores de senescencia no relacionados directamente con el etileno. (Gómez-Gómez y Carrasco, 1998).

En cuanto al resto de tejidos de guisante, existe en general una correlación de expresiones elevadas para tejidos jóvenes y de metabolismo activo para todos los genes de la ruta biosintética de poliaminas aislados hasta el momento (Pérez-Amador y col, 1995; Gómez-Gómez y Carrasco, 1998, Alabadí y Carbonell, 1999).

### **1.3. Las poliaminas y los procesos de respuesta a estrés de la planta.**

Las plantas se encuentran expuestas continuamente a una sucesión de cambios rápidos en los factores ambientales. La disponibilidad para la planta de luz, temperatura, agua o nutrientes puede variar estacionalmente, diariamente, o incluso en horas, debiendo la planta disponer de una serie de mecanismos de adaptación a estas variaciones. En plantas superiores, el metabolismo de poliaminas se ve modificado con los cambios en las condiciones externas. De hecho, los efectos conocidos durante más tiempo y, probablemente, aquellos donde se da un cambio más drástico en el metabolismo de poliaminas, son los producidos por el estrés abiótico: el sometimiento a falta de nutrientes, la exposición a choque osmótico o a contaminantes ambientales, pueden producir en la planta grandes cambios en el metabolismo de nitrógeno y poliaminas (Flores, 1991).

Por otra parte, las plantas también deben responder a la agresión de factores bióticos como los patógenos. En este sentido, las poliaminas han sido implicadas en procesos de señalización molecular en interacciones planta-patógeno (Martin-Tanguy, 1987), así como también en la respuesta de la planta a microorganismos simbioses importantes para su nutrición (El Ghachtouli y col, 1996).

### **1.3.1. Respuesta a deficiencias en nutrientes.**

Una respuesta clásicamente observada en la planta como respuesta a la deficiencia de  $K^+$ , es la acumulación de putrescina. La primera observación fue realizada en hojas de cebada (Richards y Coleman, 1952). Estudios posteriores en otras plantas han establecido el papel específico de la putrescina en el mantenimiento del balance anión-catión en la planta y que su acumulación en respuesta a la deficiencia en  $K^+$ , vía activación de ADC, es un fenómeno general tanto en mono- como dicotiledóneas y puede ser una respuesta universal. (Bouchereau y col, 1999). En todos los casos la máxima acumulación de putrescina coincide con la aparición de síntomas severos de falta de nutrientes minerales (Flores, 1991). Sin embargo la función fisiológica de este aumento de putrescina permanece todavía poco clara. Los niveles altos de putrescina pueden ser los causantes de los daños observados, aunque por otro lado la putrescina puede ser beneficiosa para la planta. Alternativamente, estos niveles elevados de putrescina pueden ser uno de los muchos cambios que produce la deficiencia de minerales, sin ninguna otra trascendencia (Bouchereau y col, 1999). Otros estudios realizados en vid (Geny y col, 1997) sugieren la implicación de las poliaminas conjugadas en la respuesta a este tipo de estrés.

### **1.3.2. Respuesta a estrés térmico.**

Se ha observado que cuando las células de la planta son sometidas al calor, son capaces de acumular poliaminas de alto peso molecular (caldina, termína, caldopentamina), que previamente solo habían sido observadas en bacterias termófilas y a las cuales se les asigna un papel esencial en el mantenimiento de la síntesis proteica a altas temperaturas (Oshima, 1983).

La exposición de polen o cultivos celulares de algodón a altas temperaturas produce la acumulación de estas tres poliaminas, que utilizan diaminopropano,

## INTRODUCCION

---

proveniente de la degradación de espermidina por la poliamina oxidasa (PAO; EC 1.5.3.3), como precursor, así como grupos aminopropilo provenientes de dcSAM (Phillips y Kuehn, 1991). Las observaciones realizadas en callos de arroz (Roy y Gosh, 1996) indican que el estrés por calor produce la acumulación de estas poliaminas de cadena larga, así como cambios en el metabolismo de poliaminas. Los niveles de poliaminas libres y conjugadas, así como los de actividad ADC y PAO son más elevados en callos tolerantes al calor que en callos sensibles en condiciones normales. Cuando son expuestos al calor, los callos tolerantes acumulan más poliaminas tanto en forma libre como conjugada, detectándose también caldina y termina. Los aumentos observados correlacionan con aumentos en ADC y PAO (Roy y Gosh, 1996).

El daño por frío parece ser un proceso que implica alteración en la estructura de la membrana. Se ha propuesto que como consecuencia del estrés por frío se produce una transición de fase en la ordenación molecular de los lípidos de membrana (Raison y Lyons, 1970). Esta transición de fase puede tener varios efectos perjudiciales para los tejidos, incluyendo alteraciones en la permeabilidad de la membrana y alteraciones en actividades de proteínas de membrana.

Se ha descrito que la exposición a bajas temperaturas puede inducir la acumulación de putrescina en varias especies de plantas (Martin-Tanguy, 1987). Un ejemplo lo constituye la correlación positiva entre inducción de putrescina y resistencia al frío observada en trigo (Racz y col, 1996). Por otro lado se ha observado que determinadas plantas responden al aclimatamiento a bajas temperaturas con una subida uniforme y sustancial de los niveles de espermidina (Flores, 1991). El preacondicionamiento del fruto de calabacín durante 2 días a 10°C reduce significativamente el daño por frío, produciéndose durante este período un aumento significativo en los niveles de espermidina y espermina pero no en los de putrescina (Kramer y Wang, 1989). El aumento en espermidina y espermina observado correlaciona con niveles elevados de actividad SAMdC (Kramer y Wang, 1990). Por otro lado, la infiltración de espermidina y espermina mediante presión reduce significativamente los daños por frío, aumentando la firmeza del fruto. Los autores sugieren que la protección observada para espermidina y espermina podría estar basada en un mecanismo que implicara la protección de los lípidos de membrana mediante el retardo de su peroxidación.

Lee y col (1997c) han observado que la exposición al frío de una variedad tolerante de arroz produce aumentos en los niveles de putrescina, actividad ADC en tallos y raíces, así como en los niveles de espermidina, espermina y actividad SAMdC en tallos. Experimentos posteriores con inhibidores han demostrado que el mecanismo de respuesta al frío observado implica un aumento previo de los niveles de ácido abscísico (ABA), el cual promueve la síntesis de putrescina mediada por ADC (Lee y col, 1997c).

### **1.3.3. Respuesta a estrés osmótico.**

La exposición a sorbitol induce niveles elevados de putrescina y ADC en hojas de cebada separadas de la planta (Flores y Galston, 1984), mientras que espermidina y espermina muestran una disminución drástica. Por otro lado, con la eliminación de agua o la utilización de otros osmolitos con diferentes rutas de asimilación, los autores consiguen resultados similares, coincidiendo con otros síntomas claros de estrés, como marchitamiento y pérdida de proteína. Este proceso puede ser retardado mediante tratamiento con DFMA o espermidina. Experimentos posteriores demuestran que la actividad ADC es la responsable de este incremento en putrescina y que la espermidina debe jugar un papel en la regulación post-transcripcional de la ADC, inhibiendo el procesamiento de su proenzima (Borrel y col, 1996).

Por otro lado, cuando se somete a cultivos celulares de alfalfa, generados a partir de líneas resistentes a sequía, a un déficit de agua mediante PEG, se observa una tendencia de acumulación de espermidina y espermina y pérdida de putrescina (Kuehn y col, 1990), así como la aparición de las poliaminas de cadena larga caldina y termina. También se ha observado un aumento de cadaverina y putrescina en discos de hojas de colza sometidos a estrés osmótico o en plántulas sometidas a sequía (Aziz y col, 1997).

### **1.3.4. Respuesta al estrés oxidativo: el ozono como contaminante ambiental.**

Las poliaminas también parecen estar implicadas en las respuestas a estrés oxidativo. La resistencia al estrés por el oxidante paraquat se ha podido correlacionar con niveles constitutivos elevados de poliaminas, así como de actividades ADC y ODC en variedades resistentes de *Coryza canadiensis* (Ye y col, 1997).

Por otro lado, el pretratamiento de *Arabidopsis* con DFMA evita el aumento de espermidina inducido por luz ultravioleta C (UV-C) y aumenta la sensibilidad de la planta

## INTRODUCCION

---

a la irradiación con UV-C (Campos y col, 1991). De forma similar, la aplicación de espermidina previene parcialmente los daños inducidos por UV-C. Mientras que el tratamiento con UV estimula la acumulación de putrescina en pepino (Kramer y col, 1991).

El ozono (O<sub>3</sub>) es un componente mayoritario de la polución ambiental y se considera que tiene serios efectos en la vegetación en Europa y América del Norte. Incluso aplicado a bajos niveles, el O<sub>3</sub> puede producir disminuciones significativas en la fotosíntesis, causar daños en la hoja y acelerar la senescencia (Heagle, 1989). Las reacciones que la planta desencadena frente al estrés por ozono incluyen incrementos en ácido ascórbico, peroxidasas, compuestos fenólicos, etileno y poliaminas (Heagle, 1989).

Existen diversas evidencias que apoyan el papel protector de las poliaminas frente al daño causado por ozono. La aplicación exógena de poliaminas a plantas de tabaco y tomate reduce significativamente el daño a la hoja (Ormrod y Beckerson, 1992). Por otro lado, en hojas de cebada tratadas con ozono se produce un aumento significativo tanto de la actividad ADC como en los niveles de espermidina (Rowland-Bamford y col, 1989). La aplicación de DFMA reduce estos incrementos y agrava los síntomas visuales de daño en la hoja en comparación a controles no tratados con ozono. También se ha observado acumulación de poliaminas (espermidina y espermina) en *Picea abies* (Dohmen y col, 1990) y trigo (Drolet y col, 1986) tratados con ozono.

El papel protector que parecen desempeñar las poliaminas se ha intentado explicar en base a su capacidad para eliminar radicales libres ("scavenger"), como parece indicar el hecho de que la formación de radicales superóxido enzimáticamente (mediante xantina oxidasa) o químicamente (mediante oxidasa rivo flavina o pirogalol), es inhibida *in vitro* por putrescina, espermidina o espermina a 10-50 mM (Drolet y col, 1986). Por otro lado estos resultados apuntan a que el retardo de la senescencia e inhibición de la peroxidación de lípidos producida *in vivo* por las poliaminas pueden ser debidas a esta capacidad eliminadora de radicales libres (Flores, 1991).

Por otro lado, los daños foliares producidos por la exposición a ozono del cultivar Bel W3 de tabaco pueden ser reducidos por aplicación de putrescina, espermidina o espermina a través de la raíz. Las medidas de poliaminas realizadas señalan a los conjugados de putrescina y espermina con la pared celular y fracción membranosa como

los complejos responsables de la eliminación de los radicales y no las poliaminas libres (Langebartels y col, 1991). Otros efectos que podrían contribuir al papel protector se desencadenarían a través de la competencia con la ruta biosintética del etileno por la SAM. El etileno ha sido postulado como mediador de la respuesta a ozono, actuando como segundo o tercer mensajero (Mehlhorn y col, 1991; Sandermann y col, 1998).

## **1.4. Manipulación del metabolismo de poliaminas.**

### **1.4.1. Utilización de inhibidores del metabolismo de poliaminas.**

Gran parte de los aproximaciones iniciales para determinar los mecanismos de acción de las poliaminas durante los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal se han realizado mediante estudios indirectos, manipulando sus niveles mediante la aplicación exógena de poliaminas, o utilizando inhibidores específicos de su ruta biosintética. Los cuatro inhibidores más comúnmente utilizados han sido difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor irreversible de la ODC (Bey y col, 1987); difluorometilarginina (DFMA), un inhibidor irreversible de la ADC (Bitonti y col, 1987); metilglioxal-bis(guanilhidrazona) (MGBG), un inhibidor competitivo de la SAMdC (Williams–Ashman y Schenone, 1972); y ciclohexilamina, un inhibidor competitivo de la espermina sintasa (Hibasami y col, 1980). Este tipo de estudios ha permitido poner de manifiesto la implicación de las poliaminas en diferentes aspectos del desarrollo de la planta (Evans y Malmberg, 1989; Galston y Sawhney, 1995). De esta forma, se ha observado que el DFMO inhibe el desarrollo del fruto de tomate, mientras que su aplicación conjunta con la putrescina evita el efecto inhibitorio (Cohen y col, 1982). Así mismo, el DMFA inhibe la diferenciación de la raíz en cultivos de tejidos de tabaco y su efecto es revertido por putrescina exógena (Kumar y col, 1997). El uso de estos inhibidores aunque útil, tiene sus limitaciones. Así, el MGBG no es un inhibidor específico de SAMdC y puede inhibir también ADC (Hiatt y col, 1986) y poliamina oxidasa (Pegg y Williams-Ashman, 1987). Por otro lado, un problema en la aplicación *in vivo* de DFMA a la planta, es que la enzima arginasa puede convertir DFMA a DFMO produciéndose también inhibición de la ODC (Slocum y Galston, 1987). Por tanto, la utilización de este tipo de aproximaciones permite una manipulación indirecta, y a veces difícilmente controlable, de los niveles endógenos de poliaminas, de las cuales

pueden establecerse únicamente evidencias correlativas entre niveles de poliaminas y diferentes parámetros bioquímicos y/o fisiológicos de la planta.

### **1.4.2. Utilización de mutantes del metabolismo de poliaminas.**

Una segunda aproximación a la manipulación del metabolismo de poliaminas ha consistido en la obtención de mutantes resistentes a inhibidores de la síntesis de poliaminas, provenientes de cultivos celulares de tabaco (revisado en Malmberg y col, 1998). Se ha aislado una colección de mutantes que incluye un gran número de cultivos resistentes al MGBG (inhibidor de SAMdC) y un cultivo resistente al DFMO (inhibidor de ODC). Los análisis bioquímicos realizados a las líneas resistentes al MGBG indicaron incrementos de la expresión de SAMdC, así como posibles cambios en la estructura de la SAMdC que producirían resistencia al MGBG. Los autores fueron capaces de regenerar algunos de los cultivos resistentes al MGBG en plantas completas, observando importantes alteraciones morfológicas, que incluyen enanismo y una morfogénesis floral alterada, que impidió en muchos casos la realización de cruces genéticos, de tal manera que únicamente se consiguió un pequeño número de semillas para una de las líneas (Malmberg y Rose, 1987). El fenotipo observado en las plantas obtenidas de esas semillas demostró que la resistencia a MGBG era dominante. Por otro lado, la línea resistente a DFMO contenía niveles de poliaminas elevados y fue parcialmente resistente a estrés ácido (Hiatt y Malmberg, 1988). Lamentablemente, aunque se consiguió su regeneración a planta, ésta presentó un fenotipo enano extremo y no floreció. La falta de análisis genético de estas líneas resistentes a MGBG y DFMO impidió determinar si la variedad de alteraciones morfológicas observadas estaba ligada a cambios en los niveles de poliaminas. Aun así, los resultados obtenidos sugieren que las poliaminas podrían jugar un papel en la resistencia a estrés, longitud del internodo, iniciación floral y desarrollo de los órganos florales. La relación potencial entre las poliaminas y estos caracteres podría ser debida a la implicación de las poliaminas en la división celular (Malmberg y col, 1998).

La utilización de otras técnicas, como la de activación insercional por T-DNA (Walden y col, 1994), ha permitido mejorar la selección de mutantes a MGBG. Esta técnica consiste en la utilización de un T-DNA modificado que contiene activadores transcripcionales y un promotor CAMV35S fuerte. Este T-DNA es utilizado en la

transformación de protoplastos de planta mediante co-cultivo. Los protoplastos pueden ser posteriormente sometidos a selección buscando aquellos caracteres que sean producidos por la sobreexpresión de algún gen en el cultivo celular, para posteriormente identificar el gen mediante la recuperación de las secuencias flanqueantes al punto de inserción del T-DNA activador. De esta forma, se obtuvieron ocho líneas resistentes a MGBG, que fueron regeneradas en plantas. Los fenotipos observados en estos mutantes recordaban en algunos casos a los fenotipos observados por Malmberg y colaboradores, tales como enanismo, curvado de la hoja, esterilidad masculina, partenocarpia y malformaciones en la flor. Por otro lado algunas de las líneas obtenidas presentaban actividades SAMdC y niveles de poliaminas elevados (Fritze y col, 1995). Estos resultados indican que el desarrollo floral es muy sensible a las variaciones en poliaminas y actividad SAMdC.

Más recientemente, se han caracterizado nuevos mutantes con un fenotipo de actividad ADC reducida, seleccionados mediante un ensayo de actividad *in vivo* de semillas germinadas de *Arabidopsis thaliana* mutagenizadas con EMS (Watson y col, 1998). Los autores identificaron 9 alelos independientes asociados a baja actividad ADC, que pueden agruparse en dos grupos de complementación, denominados *spe1* y *spe2*. El fenotipo de los mutantes obtenido permite correlacionar niveles bajos de actividad ADC con un incremento en el número de las ramificaciones laterales de la raíz y un mayor crecimiento de ésta. Por otra parte, los dobles mutantes presentaron además alteraciones en su parte aérea, órganos más alargados y un retraso en la floración. Ninguno de los mutantes analizados presentó la carencia absoluta de ADC, e incluso los alelos más fuertes presentaron disminuciones del orden del 10-20% en los niveles de poliaminas. El análisis de los dobles mutantes con los alelos más fuertes reveló que también poseían una actividad ADC baja, pero detectable. Los autores señalan la importancia de averiguar la relación entre estos dos grupos de complementación y las dos copias del gen de ADC presentes en el genoma de *Arabidopsis*. (Watson y col, 1997).

#### **1.4.3. Utilización de plantas transgénicas.**

Entre los primeros estudios sobre metabolismo de poliaminas en plantas transgénicas se encuentran los realizados con plantas de tabaco transformadas con la

## INTRODUCCION

---

mitad izquierda del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* (Ri TL-DNA). Las plantas transgénicas que contienen este Ri-DNA presentan los fenotipos T y T', con diferente grado de alteración en el tiempo de floración, alteraciones morfológicas en las hojas y alteración de la dominancia apical. En estas plantas se ha observado una relación inversa entre los niveles de poliaminas conjugadas y el grado de alteraciones en el desarrollo de la planta (Martin-Tanguy y col, 1991). La aplicación a estas plantas transgénicas de los cuatro inhibidores más comunes de la biosíntesis de poliaminas por Burtin y col (1991) puso de manifiesto que el DFMO producía una fenocopia del fenotipo T' cuando se aplicaba a plantas transgénicas con fenotipo T, mientras que los demás inhibidores (MGBG, DFMA, cicloheximida) producían algunas anomalías en el crecimiento pero no mimetizaban el fenotipo. La expresión de alguna de las secuencias codificadoras del Ri TL-DNA (los genes *rolA*, *rolB*, *rolC*) afecta al metabolismo de poliaminas, así como a los niveles de fitohormonas como citoquininas, auxinas, giberelinas y etileno, sin embargo, la naturaleza y función de estos genes *rol* no ha sido aclarada (revisado en Malmberg y col, 1998).

La disponibilidad de los genes de la ruta biosintética de poliaminas ha permitido por otro lado la obtención de plantas transgénicas con alteraciones del metabolismo de poliaminas por sobreexpresión o silenciamiento mediante antisentido de alguno de los genes de la ruta biosintética (revisado en Malmberg y col, 1998). Algunas de estas plantas transgénicas se han obtenido mediante la introducción de un gen heterólogo, como es el caso del trabajo de Hamill y col (1990), que consiguieron la sobreexpresión de la ODC de levadura en plantas de tabaco, obteniendo niveles elevados de putrescina e incrementos en los niveles de alcaloides. Por otro lado Descenzo y Minocha (1993) obtuvieron plantas de tabaco sobreexpresoras de la ODC de ratón, donde se encontraron niveles de poliaminas elevados, así como fenotipos anormales en los primeros estadios de crecimiento, flores con estambres reducidos, y plantas que no dieron semillas. La sobreexpresión de la misma ODC en cultivos de zanahoria produjo un incremento en el contenido celular en putrescina y una embriogénesis somática mejorada (Bastola y Minocha, 1996).

La sobreexpresión de la ADC de avena en tabaco ha dado resultados diferentes. Así, Masgrau y col (1997) mediante la utilización de un promotor inducible por tetraciclina, obtienen después de la inducción plantas con elevada actividad ADC, que

llega a ser hasta 55 superior a la actividad ADC medida en las plantas control. En estas plantas también se observan incrementos hasta del 46% en los niveles de putrescina. Las plantas transformadas en condiciones de inducción continua presentaron un fenotipo cuya severidad correlacionó con el contenido en putrescina. Los autores observaron inhibición del crecimiento, necrosis, clorosis, hojas jóvenes curvadas y raíces más pequeñas, mientras que no se observó ningún cambio en la morfología o crecimiento de la flor. La necrosis observada es asociada por los autores a niveles letales de putrescina. Estos fenotipos no se observaron si la inducción era realizada después de que el crecimiento floral se hubiera iniciado. Por otro lado Burtin y Michael (1997) utilizaron el promotor CAMV35S fusionado al gen de ADC de avena para obtener plantas de tabaco con actividades de ADC aumentadas hasta 20 veces respecto a las plantas control. Aunque detectaron niveles de agmatina más elevados, los niveles de putrescina, espermidina y espermina no cambiaron con respecto a los controles, siendo las plantas morfológicamente normales. Así pues, los resultados obtenidos por ambos autores difieren significativamente en cuanto al efecto que la sobreexpresión de ADC tiene sobre el metabolismo de poliaminas en la planta y en su morfología. Existen diferencias en el modo de conseguir la sobreexpresión y el cultivar de tabaco utilizado. La ausencia de variación en los niveles de poliaminas en las plantas de Burtin y Michael (1997) podrían ser explicados por una mayor capacidad tamponante de las plantas respecto a las variaciones en los niveles de poliaminas o que las plantas con niveles altos de poliaminas no sobrevivieran el proceso de transformación y regeneración (Malmberg y col, 1998).

Por otro lado, también se han conseguido plantas transgénicas donde se sobreexpresa el gen biosintético de poliaminas homólogo de la planta. Tal es el caso de las plantas transgénicas para el gen de SAMdC de patata (Kumar y col, 1996). Más recientemente se han obtenido plantas transgénicas de tabaco sobreexpresoras de ADC y ODC mediante promotor inducible por tetraciclina (Masgrau, 1999). La sobreexpresión del gen homólogo de ADC de tabaco da lugar a incrementos de ADC y putrescina, así como a alteraciones fenotípicas similares a las observadas por sobreexpresión del gen de la ADC de avena. En algunas de las plantas antisentido obtenidas para la ADC de tabaco se observa una disminución de los niveles de mRNA, observándose en una línea un fenotipo relacionado con el inicio de determinación floral y la formación de

inflorescencias. Una línea sobreexpresora del gen homólogo de ODC de tabaco presenta alteraciones en los órganos florales que afecta a la fertilidad (Masgrau, 1999).

### 1.5. S-adenosilmetionina descarboxilasa.

#### 1.5.1. Función biológica y características.

La enzima SAMdC cataliza la eliminación del grupo carboxilo de la SAM para formar S-adenosil-5'-3'-metilpropilamina (dcSAM), que actúa como donador de los grupos n-propilamino necesarios para la síntesis de espermidina y espermina a partir de la diamina putrescina (Figura 1.2). El hecho que la concentración de dcSAM sea muy baja en condiciones fisiológicas ha sugerido la posibilidad de que el paso de la descarboxilación de la SAM pueda constituir uno de los pasos limitantes en la formación de espermidina y espermina (Marie y col, 1992; Tabor y Tabor, 1984).

Al igual que otros genes de la ruta biosintética de poliaminas, la SAMdC ha sido objeto de estudio en *Escherichia coli* (Tabor y col, 1986), *Saccharomices cerevisiae* (Kashiwagi y col, 1990) y en mamíferos (Pajunen y col, 1988) entre otros. Aunque de localización ubicua en la célula eucariota, la SAMdC constituye una mínima fracción del total de proteínas intracelulares. Esto se debe por un lado a una vida media corta, así como al hecho de que la expresión de SAMdC se encuentra regulada a múltiples niveles: transcripcional, traduccional y post-traduccionalmente, actuando como factores reguladores las propias poliaminas, así como hormonas, factores de crecimiento, promotores de tumores y otros estímulos que afectan al crecimiento (Heby y Persson, 1990). La SAMdC se sintetiza como una proenzima que se escinde autocatalíticamente para formar dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , generándose el grupo prostético piruvato en el extremo 5' de la subunidad  $\alpha$  por serinolisis (Stanley y col, 1989). La enzima de mamíferos posee una estructura dimérica  $(\alpha\beta)_2$  cuya estructura cristalina ha sido recientemente resuelta a una resolución de 2.25 Å (Ekstrom y col, 1999), revelando que el monómero formado por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se pliega en un motivo no descrito anteriormente y cuya simetría sugiere que puede ser el resultado de una antigua duplicación génica.

### 1.5.2. S-adenosilmetionina descarboxilasa de plantas. Características del cDNA

La primera detección de actividad SAMdC en plantas fue realizada por Coppoc y col (1971) en extractos de brotes de judía, siendo posteriormente purificada en plántulas de maíz (Suzuki y Hirasawa, 1980) y col china (Yamahona y Cohen, 1985). La vida media de esta enzima en células de cultivo de tabaco es de 30-60 minutos (Hiatt y col, 1986) y su actividad es inhibida por espermidina, proponiendo los autores que este efecto se produce a nivel de la síntesis de la SAMdC y no a nivel post-traducciona, de manera similar a lo observado con la SAMdC de mamíferos, donde espermidina y espermina inhiben la actividad de la enzima (Heby y Persson, 1990).

El primer cDNA de SAMdC de plantas fue aislado en *Solanum tuberosum* (Taylor y col, 1992; Mad Arif y col, 1994), siendo posteriormente aislados en *Spinacea oleacea* (Bolle y col, 1995), *Catharantus roseus* (Schröder y Schröder, 1995), *Tritordeum* (Dresselhaus y col, 1996), *Dianthus caryophyllus* (Lee y col, 1997a), *Brassica juncea* (Lee y col, 1997b), *Pharbitis nil* (Yoshida y col, 1998), *Triticum aestivum* (Li y Chen, 2000a), *Vicia faba* (Fruehling y col, 2000) entre otros.

El grado de identidad entre las secuencias de estos clones de plantas es elevado. Sin embargo, al compararlas junto con el resto de organismos los valores de identidad se reducen bastante, centrándose en determinadas regiones conservadas. Estas regiones incluyen los residuos necesarios para la actividad enzimática (Stanley y Pegg, 1991; Ekstrom y col, 1999), así como el sitio de ruptura autocatalítica postraducciona (Stanley y col, 1989; Kashiwagi y col, 1990, Lee y col, 1997a; Xiong y col, 1997). Otra característica conservada con mamíferos es la presencia de secuencias PEST (Lee y col, 1997a, Pajunen y col, 1988) implicadas en mecanismos degradativos de proteínas (Rogers y col, 1986). Los cDNAs de SAMdC de plantas se caracterizan también por poseer regiones 5' no traducidas largas (5'-UTR) y que contienen una putativa pauta de lectura de 50-54 aminoácidos conservados y a la cual se ha atribuido un posible papel regulador (Schröder y Schröder, 1995), a semejanza de la situación en mamíferos, donde los mensajeros de SAMdC poseen también una región 5' no traducible larga que contiene una pauta de lectura para un hexapéptido [MAGDIS], cuya presencia es necesaria para la inhibición de la síntesis de SAMdC por espermina (Shantz y col, 1994; Ruan y col, 1996).



En cuanto a su organización genómica, la tendencia general parece ser la presencia de más de una copia del gen de la SAMdC, como lo demuestran la presencia de dos o más copias en el genoma de clavel (Lee y col, 1997a), patata (Stanley y col, 1992; Rorat y col, 1998), aunque sin embargo en *Trithordeum* se ha detectado una única copia (Dresselhaus y col, 1996).

### **1.5.3. Regulación de la expresión de la SAMdC en plantas superiores.**

#### **1.5.3.1. Regulación de la SAMdC durante el desarrollo de la planta.**

A partir del aislamiento de cDNAs que codifican para la SAMdC se ha visto que su expresión puede estar regulada por diversos factores. Por un lado el estudio de la expresión de los genes de la SAMdC a nivel de los diferentes tejidos de la planta muestra niveles detectables de transcrito de SAMdC en todos los tejidos estudiados, existiendo niveles de expresión altos en tejidos jóvenes y de división activa y niveles bajos en tejidos maduros, tanto en tejidos vegetativos como reproductivos. Este patrón de expresión es consistente con anteriores observaciones tanto de máxima actividad SAMdC como de niveles altos de poliaminas en tejidos con tasas altas de división celular activa o en diferenciación (Evans y Malmberg, 1989). De hecho, algunos de los clones de SAMdC aislados provienen de rastreos diferenciales en procesos de división celular activa: el clon de SAMdC de patata fue aislado como un clon cuya expresión se inducía en estadios iniciales de tuberización (Taylor y col, 1992), mientras que el clon de *Catharanthus roseus* se aisló en un rastreo diferencial de genes que se inducían en cultivos celulares en suspensión al ser transferidos a una concentración alta de sacarosa (Schröder y Schröder, 1995).

El estudio de la expresión de SAMdC en patata, reveló niveles elevados de expresión en brotes florales, que decrecían en la flor y polen maduros, observándose también un descenso en los niveles de expresión con la edad del tejido en tejidos vegetativos (tallos y raíces) o en estadios finales de tuberización (Mad Arif y col, 1994).

El patrón de expresión observado en tejidos de clavel (Lee y col, 1997a) muestra en tejidos reproductivos los niveles más altos de transcrito de SAMdC en pétalos, siendo menores en ovarios y estilo. El proceso de desarrollo de la flor produce también cambios significativos en la expresión de SAMdC, observándose un aumento de los niveles de los

dos transcritos de SAMdC en pétalos desde el estadio de brotes florales jóvenes hasta la antesis, momento donde se produce una expansión activa de los pétalos, para después decaer progresivamente durante la senescencia de la flor (Lee y col, 1997a). En tejidos vegetativos, el nivel mayor de expresión se observa en tallos, siendo más bajos en raíces y hojas. Además, aunque se detectan niveles de transcrito similares para tallos y pétalos, los tallos presentan niveles de actividad específica SAMdC cinco veces más elevados que en pétalos. Un resultado similar se observa en tallos y raíces, que presentan actividades SAMdC similares pese a observarse mayores niveles de expresión en raíces. Ambas observaciones apuntan a una posible regulación post-transcripcional de los niveles de proteína (Lee y col, 1997a).

#### **1.5.3.2. Regulación de SAMdC por la luz y ritmos circadianos.**

Los estudios de expresión realizados en *Hordeum vulgare* (Dresselhaus y col, 1996) demuestran una oscilación circadiana de los niveles de mensajero de SAMdC en hojas primarias de plantas crecidas en un fotoperíodo de 16/8h luz/oscuridad. Se observa una oscilación de los niveles de transcrito con un nivel máximo durante las primeras 8 horas en luz y un nivel mínimo durante la mitad del período de oscuridad. Esta oscilación se mantiene en exposiciones posteriores de la planta a situación de luz u oscuridad continua, aunque con un periodo de oscilación más prolongado en la oscuridad y con niveles de transcrito más elevados en general. Esta oscilación circadiana también se observa en hojas de *Pharbitis nil*, donde plantas crecidas en ciclos de luz/oscuridad presentan oscilaciones con un máximo de transcrito de SAMdC tras la primera hora de exposición a la luz, que decae posteriormente a un mínimo durante el final del período de oscuridad. La oscilación se mantiene al pasar las plantas a exposición de luz continua, con una periodicidad circadiana de 24 h aproximadamente (Yoshida y col, 1998). Los estudios de expresión en *Pharbitis nil* revelan por otro lado una rápida inducción por luz de la expresión de SAMdC, en la cual están implicadas tanto el receptor de luz azul como el fitocromo PhyB. Posteriormente se observa una caída de los niveles del mensajero, con una vida media de aproximadamente 30 minutos (Yoshida y col, 1999). Por otro lado en patata, se observa un aumento de la expresión de SAMdC al final de la exposición a un período de 10/10h luz/oscuridad (Rorat y col, 1998).

### **1.5.3.3. Regulación de SAMdC por factores ambientales.**

Los niveles de expresión de SAMdC también presentan variaciones respecto a factores ambientales, observándose en arroz una acumulación diferencial en respuesta a estrés salino, a estrés por sequía o mediante la aplicación exógena de ácido abscísico (Li y Chen, 2000a). La comparación de los niveles de mensajero de SAMdC entre variedades de sal resistente (Lansheng) o sensible (77-170) al estrés salino revela que la variedad resistente posee niveles más elevados de transcrito de SAMdC que la variedad sensible, tanto en condiciones normales como en estrés salino, produciéndose además una inducción más rápida en la variedad resistente en respuesta al estrés salino (Li y Chen, 2000b).

También puede observarse una respuesta a estrés en patata, donde el crecimiento a 3-4°C produce un aumento de la expresión de los dos mRNA de SAMdC, tanto en un cultivar de patata tolerante al frío capaz de aclimatarse (*Solanum sogarandium*), como una variedad sensible (*Solanum tuberosum* cv Cisa), presentándose además niveles de expresión más elevados en el cultivar tolerante (Rorat y col, 1998).

### **1.5.4. Efectos de la alteración de la expresión de SAMdC en plantas transgénicas.**

La disponibilidad de genes de SAMdC ha permitido por otro lado la manipulación del metabolismo de poliaminas mediante técnicas moleculares. La primera aproximación en este sentido fue realizada por Noh y Minocha (1994) mediante sobreexpresión en plantas de tabaco, donde se introdujo el gen de SAMdC humana bajo el control de promotor CAMV35S. Las plantas transgénicas regeneradas presentaron mayor actividad SAMdC, variando desde niveles tres veces superiores en la mayoría de los transformantes, hasta nueve veces superior en alguna línea transgénica. Estas plantas llegaron a presentar niveles del putrescina 50% más bajos que las plantas control, así como niveles de espermidina de 2 a 3 veces más elevados. En algunas líneas se observaron también niveles superiores de espermina. Durante el proceso de regeneración de las plantas se observaron anomalías fenotípicas, como tallos y hojas delgadas, y un mal desarrollo en general. Muchas de estas anomalías desaparecieron progresivamente durante el proceso de subcultivo. Los autores indican por otro lado la

dificultad en obtener callos de estas líneas transgénicas, dado que eran capaces de producir tallos en medios inductores de callos.

Kumar y col (1996) intentaron obtener plantas transgénicas de patata con el cDNA de SAMdC en orientación sentido o antisentido, bajo el control del promotor constitutivo CAMV35S. La obtención de plantas transgénicas sobreexpresoras de SAMdC no fue posible, puesto que en el proceso de transformación los microcallos generados cesaban su crecimiento en medio de selección sin dar lugar a brotes aéreos. Por otro lado, las líneas transgénicas antisentido obtenidas presentaron actividad SAMdC reducida hasta un 10-28% respecto a la detectada en plantas control, así como reducciones en el contenido de poliaminas hasta un 16% de las cantidades detectadas en los controles. Estas plantas antisentido presentaron alteraciones fenotípicas severas, incluyendo crecimiento reducido, internodos cortos, ramificaciones abundantes, hojas pequeñas y una capacidad de enraizamiento en cultivo *in vitro* baja. El grado de alteraciones observado correlaciona con el grado de reducción de los niveles de mRNA de SAMdC (Kumar y col, 1996).

Las alteraciones observadas en las plantas antisentido se mantuvieron cuando las plantas fueron crecidas en condiciones de cultivo de invernadero, presentando además una senescencia avanzada de las hojas maduras y necrosis, indicativas de daños oxidativos. Estas plantas fueron capaces de dar tubérculos, aunque más pequeños y elongados que los controles. La senescencia también se pudo observar al crecer las plantas *in vitro* en recipientes sellados para retener el etileno, al contrario que en las plantas control. La determinación de la tasa de producción de etileno reveló que las líneas transgénicas con un fenotipo más acusado y una menor actividad SAMdC producían 45 veces más etileno que los controles, apoyando la idea de competencia por la SAM entre las rutas biosintéticas de poliaminas y etileno. Los autores también señalan la imposibilidad de recuperar el fenotipo observado mediante crecimiento en medio suplementado con espermidina y/o espermina, sugiriendo que los fenotipos observados en estas plantas antisentido deben de ser debidos a la combinación de alteraciones en las rutas biosintéticas tanto de poliaminas como de etileno (Kumar y col, 1996).

Por otro lado los mismos autores obtuvieron plantas donde la sobreexpresión de SAMdC en sentido y antisentido era controlada por un promotor inducible por tetraciclina (Gatz y col, 1992). En este caso la obtención de plantas sobreexpresoras de SAMdC fue

## INTRODUCCION

---

exitosa, debido probablemente a que la expresión del transgen estaba reprimida y no fue letal en los primeros estadios de regeneración. El tratamiento de hojas de estas plantas con tetraciclina produjo aumentos en los niveles de mRNA de SAMdC de 2 a 6 veces superiores a los de las hojas control sin tratar, así como aumentos en actividad SAMdC entre 2 y 4 veces, de 7 veces en los niveles de espermidina y 4 en los de espermina (Kumar y col, 1996).

En el caso de las líneas antisentido bajo el control del mismo promotor inducible se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con el promotor constitutivo. Así, el tratamiento con tetraciclina en hojas produjo reducciones en los niveles de transcrito de SAMdC así como reducciones en la actividad SAMdC hasta el 55% respecto de los controles sin tratar. Por otro lado estas reducciones en actividad no significaron reducciones en espermidina y espermina tan elevadas como las obtenidas con el promotor constitutivo, aunque sí que se observó un aumento de hasta 29 veces en la producción de etileno al tratar con tetraciclina. Los autores también describen la imposibilidad de reproducir el fenotipo observado en las líneas antisentido mediante el crecimiento en cultivo hidropónico con tetraciclina, resultado cuya causa puede ser debida a un problema de mantenimiento de niveles de tetraciclina internos en un determinado tejido o estadio de desarrollo, ya sea debido a la inestabilidad propia de la tetraciclina en el medio de cultivo, o por accesibilidad de la misma al tejido. Por ello, proponen el uso de otros promotores, específicos de tejido o regulados en el desarrollo, para una manipulación más específica de la ruta biosintética de poliaminas, que permitiría una mejor determinación del papel que las poliaminas pueden jugar en el desarrollo de la planta (Kumar y col, 1996). En esta línea de estudio, se han obtenido plantas transgénicas de patata sentido y antisentido con el gen de SAMdC bajo en control del promotor de patatina, específico de tuberización (Pedros y col, 1999). Los tubérculos en desarrollo de los transformantes en sentido obtenidos presentaron tanto niveles altos de transcrito y actividad SAMdC, como niveles de espermidina significativamente mas altos que los controles. Se observa también una variación en el tamaño y distribución de los tubérculos sobreexpresores de SAMdC, obteniéndose un mayor número pero de menor tamaño. Los transformantes antisentido presentan tubérculos en desarrollo con menores niveles de mRNA y actividad SAMdC, así como menores niveles de poliaminas totales. Pese a ello, no se observa ningún efecto

fenotípico obvio en la fisiología de tuberización de las líneas antisentido (Pedros y col, 1999).

Finalmente, otra modificación específica de la expresión de SAMdC ha sido desarrollada en tomate (Mehta y col, 1999) donde se ha introducido el gen de levadura (Kashiwagi y col, 1990) en sentido y bajo el control del promotor E8, específico de maduración del fruto (Deikman y col, 1996). Los frutos en maduración de las líneas transgénicas acumulan poliaminas, en contraste con las líneas control donde prácticamente no se detectan espermidina y espermina. Los frutos transgénicos acumulan también licopeno y muestran una maduración y senescencia retrasada respecto a los frutos control de tipo salvaje. Los autores señalan puntos todavía por resolver como son por un lado la observación de que diferentes líneas transgénicas acumulan preferentemente un determinado tipo de poliamina, pese a tener todas la misma construcción en su genoma, así como la observación sorprendente de que junto con la acumulación de poliaminas, los frutos transgénicos producen más etileno que las líneas control (Mehta y col, 1999).

## 1.6. Objetivos

El presente trabajo forma parte de un proyecto más amplio consistente en analizar los diferentes mecanismos relacionados con la senescencia vegetal, tanto natural como inducida por diferentes tipos de estreses ambientales. Dentro de este proyecto, uno de los aspectos abordados es el estudio de la relación entre el metabolismo de las poliaminas y los procesos de senescencia. La enzima SAMdC cataliza la conversión de la SAM a dcSAM, precursor utilizado en la biosíntesis de poliaminas; en consecuencia compite por la SAM con la ACC sintasa, primer enzima de la síntesis de etileno. El objetivo planteado para este trabajo fue el aislamiento y caracterización de cDNAs que codificaran para la S-adenosilmetionina descarboxilasa, debido a su doble importancia como posible paso limitante en la biosíntesis de espermidina y espermina, y por utilizar como sustrato la SAM, el punto de posible competencia en las rutas biosintéticas de poliaminas y etileno, compuestos de efectos antagónicos relacionados con el desarrollo y senescencia.

El trabajo se ha llevado a cabo en plantas de guisante y de *Arabidopsis thaliana*. En plantas de guisante por los datos previos de que disponíamos de niveles de

## INTRODUCCION

---

poliaminas y de otros genes implicados en la biosíntesis de poliaminas; y porque el ovario de guisante es un buen sistema experimental para realizar estudios de desarrollo inducido por polinización o mediante reguladores del crecimiento vegetal, así como de senescencia natural. En *Arabidopsis thaliana* por su facilidad de manipulación genética para la realización de estudios de alteración de la expresión génica y sus efectos en el desarrollo y senescencia, así como para la realización de estudios de expresión mediante el uso de fusiones con el promotor del gen de interés y un gen informador.

La utilización de ambos sistemas ha permitido desarrollar los siguientes objetivos:

1. Aislamiento y caracterización de los genes que codifican para la SAMdC en guisante y *Arabidopsis thaliana*.

2. Estudio de la expresión de los genes que codifican para la SAMdC en plantas de guisante y *Arabidopsis thaliana*.

3. Estudio de la expresión de los genes que codifican para la SAMdC durante el desarrollo o senescencia de ovarios de guisante; regulación hormonal de la expresión del gen durante la fructificación.

4. Estudio de la expresión de los genes que codifican para la SAMdC en procesos de senescencia inducida por estrés en guisante.

5. Estudio de la expresión de los genes que codifican para la SAMdC de *Arabidopsis thaliana* durante su desarrollo, y los elementos reguladores responsables de su patrón de expresión mediante la utilización de fusiones del promotor del gen(es) con un gen informador.

6. Estudio de los efectos de la alteración de la expresión de la SAMdC, tanto de manera constitutiva como inducible, sobre el metabolismo de poliaminas y el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

## 2. Materiales y Métodos.

---

### 2.1. Material vegetal.

#### 2.1.1. Cultivo del material vegetal.

##### 2.1.1.1. *Pisum sativum*.

Se emplearon dos tipos de variedades de plantas de *Pisum sativum*: Alaska y Paladio, obtenidas por multiplicación continuada de semillas originalmente adquiridas a Asgrow (Complejo Agrícola de semillas, Madrid). Las semillas se esterilizaron con NaClO al 2% durante 20 minutos, se lavaron con agua desionizada. Las plantas de la variedad Alaska se sembraron en vermiculita y se cultivaron en una cabina de invernadero equipada con sistemas de calefacción y refrigeración, fijados a 22°C durante el día y 17°C durante la noche, aunque se produjeron variaciones debidas a las diferentes situaciones climáticas a lo largo del año, con un límite máximo de 30°C y mínimo de 16°C. La luz natural se complementó con luz artificial mediante tubos fluorescentes para mantener un fotoperíodo de 16h durante todo el año. Las semillas esterilizadas de la variedad Paladio se sembraron en perlita y su crecimiento se efectuó en cámaras de techo abierto (OTC), en la finca experimental La Peira (Benifaió, Valencia), en condiciones ambientales, sin ningún complemento de luz artificial ni regulación de la temperatura. En ambos casos, las plantas se regaron en todo momento con disolución Hoaglan nº1, enriquecida con oligoelementos (Hewitt, 1966), mediante un sistema de riego automático.

##### 2.1.1.2. Obtención de callos de *Pisum sativum* cv. Alaska.

Se obtuvieron callos de guisante a partir de segmentos de hipocotilo de 5 mm, crecidos en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) enriquecido con sacarosa, 10 µM ácido 1-naftilacético (NAA, Sigma Chemicals Co, St Louis, USA) y 5 µM 6-bencilaminopurina (BAP, Sigma), pH 5.8, solidificado con 0.8 % agar (Pronadisa, España). Los callos fueron crecidos en cabina de cultivo Sanyo MLR-350 (Sanyo Electric Co., Japón) bajo un fotoperíodo de 14 h de luz a 24 °C y 10 h de oscuridad a 18 °C.

Después de 15 días, se cortaron secciones de los mismos y se subcultivaron bajo las mismas condiciones de fotoperíodo. Con objeto de optimizar las condiciones de *cultivo in vitro* se ensayaron diferentes medios de cultivo: a) el mismo medio de cultivo sólido empleado inicialmente; b) el medio más 0,6 mM de ácido L(+)-ascórbico (Sigma) y c) un medio en el que se sustituyó el NAA y la BAP por 5  $\mu$ M de Kinetina (K, Sigma) y 5  $\mu$ M de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, Fluka, Buchs, Suiza). Finalmente, todos los medios utilizados fueron capaces de inducir el desarrollo de callos.

### 2.1.1.3. *Arabidopsis thaliana*.

Se empleó el ecotipo Columbia de *Arabidopsis*. Las semillas se esterilizaron con HClO al 15%, Triton X-100 0.01% (Sigma), durante 5 minutos y se lavaron con agua desionizada 3 veces, para posteriormente ser sembradas en una mezcla de turba:arena:vermiculita 1:1:1 y regadas con agua destilada. Las plantas se crecieron en cámara de cultivo Sanyo MLR-350 a 23°C con un fotoperíodo de 16h luz, 8 h oscuridad, siendo trasladadas a cabina de invernadero en los estadios finales de secado de las silicuas.

Las plantas de *Arabidopsis* obtenidas por transformación, se crecieron en medio de cultivo 1/2x MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 5%, suplido con la mezcla de vitaminas de Murashige y Skoog (MS) 1x (Sigma), al que se añadió 50  $\mu$ g/ml kanamicina (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) para la selección de las plantas transgénicas. Durante la selección de líneas transgénicas homocigotas se procedió a germinación en medio MS con kanamicina y posterior trasplante a turba:arena:vermiculita, donde se crecieron en las condiciones descritas anteriormente.

### 2.1.2. . Tratamientos y recogida del material vegetal.

Los experimentos de análisis de la expresión de la SAMdC de guisante se llevaron a cabo en hojas, tallos y raíces de plantas maduras y en ovarios de flores polinizadas y no polinizadas de la variedad Alaska. En todos los experimentos se emplearon la primera y segunda flor de cada planta. Las primeras flores aparecen entre 28 y 32 días después de la siembra y aproximadamente dos días después las segundas. Las flores no polinizadas se obtuvieron por eliminación de los pétalos y de las anteras dos días antes de la antesis. En el momento de la emasculación pétalos y sépalos tenían

aproximadamente la misma longitud. Los ovarios de las flores no polinizadas se sometieron a distintos tipos de tratamientos. A partir de ovarios de guisante se utilizaron los siguientes tipos de muestras: a) ovarios de flores polinizadas; b) ovarios de flores emasculadas, no sometidos a ningún tratamiento; c) ovarios de flores emasculadas en los que se indujo el desarrollo partenocárpico mediante tratamiento, en el equivalente al día de antesis, con una de las siguientes disoluciones: GA<sub>3</sub> (20 µl de 100 µg/ml GA<sub>3</sub> (Fluka) en 0.1% Tween-80(Sigma)), BAP (20 µl de 100 µg/ml BAP (Fluka) en 0.1% Tween-80 (Sigma)), o 2,4-D (20 µl de 100 µg/ml 2,4-D (Fluka) en 0.1% Tween-80 (Sigma)); d) ovarios de flores emasculadas tratados en el día de antesis con aminoetoxivinilglicina (AVG) (20 µl de 100 µg/ml AVG (Sigma) en 0.1% Tween-80(Sigma)); e) ovarios de flores emasculadas tratados en el día de antesis con espermidina (20 µl de 100 µg/ml espermidina (Sigma) en 0.1% Tween-80 (Sigma)).

Los experimentos de análisis del efecto de los tratamientos con ozono sobre la expresión de la SAMdC de guisante se llevaron a cabo en hojas y tallos de plantas maduras de la variedad Paladio. Las plantas se crecieron en OTCs bajo tres ambientes diferentes; aire filtrado a través de carbono activo, o aire fumigado, diariamente con 30 ó 100 ppb de ozono durante 6 horas. Las muestras se recogieron semanalmente durante tres meses.

Los experimentos de análisis de la expresión de la SAMdC en plantas de *Arabidopsis* se llevaron a cabo en hojas, tallos, raíces y silicuas de plantas adultas. En el caso de los experimentos de inducción con cobre, se añadió CuSO<sub>4</sub> (Panreac, Barcelona, España) al medio de cultivo MS a una concentración final de 5 o de 50 µM.

El material vegetal recogido fue pesado y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -80°C hasta su uso.

## 2.2. Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos.

### 2.2.1. Aislamiento de DNA genómico.

Empleando como material vegetal hojas de guisante o de *Arabidopsis* se siguió un protocolo estándar para la extracción de DNA genómico. El tejido vegetal se disgregó en mortero en presencia de nitrógeno líquido, se homogeneizó en 10 volúmenes de

tampón de lisis [10mM Tris-HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% (p/v) SDS y 100 mg/mL proteinasa K (Boehringer Mannheim)], incubándose durante 1h a 37 °C. El DNA se extrajo mediante reparto en fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1) y posterior precipitación con dos volúmenes de etanol 96%. El RNA se eliminó mediante digestión con 50 µg/ml RNAsa (Boehringer Mannheim) durante 30 minutos a 37 °C, repitiéndose posteriormente los pasos de fenolización y precipitación con etanol. El DNA genómico obtenido fue cuantificado mediante determinación de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A..

Se empleó un método simplificado de extracción de DNA genómico para el análisis de plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Se procedió a la disgregación en eppendorf de una hoja o plántula de *Arabidopsis* y homogeneización posterior en 500 µl de tampón de lisis (100mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1% (p/v) SDS y 10 mM β-mercaptoetanol). Incubándose 10 minutos a 65 °C y purificando posteriormente el DNA mediante precipitación de las proteínas por adición de acetato de potasio a una concentración final de 1 M, centrifugación y posterior precipitación del DNA del sobrenadante con dos volúmenes de etanol. El DNA obtenido fue utilizado posteriormente como molde de reacción de PCR.

### 2.2.2. Análisis Southern.

El análisis Southern del DNA genómico de guisante se llevó a cabo a partir de 30 µg de DNA genómico. El DNA fue digerido con las enzimas de restricción Bam HI, Hind III o Nco I (Boehringer Mannheim), y separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. El DNA se transfirió, previa desnaturalización, a una membrana de Nylon Hybond-N (Amersham International, UK) según el procedimiento descrito por Southern (1975). El DNA fue entrecruzado a la membrana de Nylon mediante irradiación ultravioleta en un Genelinker (Bio-Rad, Hercules, CA). El filtro fue prehibridado e hibridado a 65 °C en las condiciones descritas por Church y Gilbert (1984). Se prehibridó la membrana durante 10 minutos en una disolución conteniendo 0.3 M fosfato sódico pH 7.2, 7% SDS, 1mM EDTA. La hibridación se realizó durante 12 horas en la misma disolución después de añadir la sonda; 25-50 ng de cDNA se marcaron con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Amersham, 3000Ci/mmol), mediante el método de cebadores al azar (Feinberg y Volgelstein, 1983) empleándose el kit de marcaje radiactivo "Random Primed DNA

Labelling Kit" (Boehringer Mannheim) siguiendo las correspondientes instrucciones. La sonda se purificó empleando columnas de Sephadex G10 (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweeden), mediante centrifugación a 3000 g durante 4 minutos, y se calentó a 100°C durante 10 minutos antes de añadirla a la disolución de hibridación. Los filtros fueron lavados en 3 x SSPE (1xSSPE es 0.12 M NaCl, 15 mM citrato sódico, 2 mM EDTA, 13 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.5), 0.1% (p/v) SDS, dos veces a temperatura ambiente durante 10 minutos; dos veces en 2 x SSPE, 0.1% (p/v) SDS a 65°C durante 10 minutos y dos veces en 1 x SSPE, 0.1% (p/v) SDS a 65°C durante 10 minutos. El filtro fue expuesto sobre una película sensible a los rayos X (Kodak XAR-5) a -80°C durante 48 horas usando un estuche Kodak X-Omatic con pantallas intensificadoras.

El analisis Southern del DNA genómico de *Arabidopsis* se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero utilizando 10 µg de DNA genómico digerido con las enzimas de restricción Bam HI, Eco RI, Hind III y Xba I (Boehringer Mannheim). La sonda utilizada en este caso fue el cDNA de SAMdC de *Arabidopsis*.

### 2.2.3. Aislamiento de RNA.

El RNA total de hojas, tallos, raíces y ovarios se extrajo siguiendo el método de Prescott y Martin (1987). El tejido vegetal se disgregó en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. El polvo resultante se homogeneizó añadiendo 10 ml de tampón de extracción por gramo de peso fresco. El tampón de extracción contenía: triisopropilnaftaleno sulfonato 1% (p/v), 5% (v/v) fenol, 6% (p/v) p-aminosalicilato sódico, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, β-mercaptoetanol 150 mM. El RNA total se extrajo mediante reparto en fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1, v/v), precipitación con dos volúmenes de etanol 96%, y posterior precipitación diferencial con 3 volúmenes de acetato sódico (NaAc) 4 M pH 6.0. El RNA total obtenido fue concentrado mediante una nueva precipitación con etanol, rediseuelto y cuantificado determinando la absorbancia a 260 nm.

En la extracción de poli(A)+ RNA de callos de guisante se utilizó el Quick prep micro mRNA purification kit (Pharmacia) en las condiciones recomendadas por el fabricante.

La extracción de RNA de plántulas transgénicas de *Arabidopsis* fue realizada mediante la utilización de RNAeasy plant mini Kit (Quiagen Inc, Valencia, USA) según las condiciones recomendadas por el fabricante.

### 2.2.4. Análisis Northern.

El análisis Northern de las diferentes muestras de RNA se llevó a cabo previa separación electroforética en geles desnaturizantes de agarosa al 1% en tampón 1 x MOPS (2mM MOPS, 0.5 mM NaAc, 0.1 mM EDTA pH 8.0), 2.2 M formaldehído. Las muestras de RNA se prepararon añadiendo 3 volúmenes de tampón de muestra (0.6 ml formamida, 0.2 ml formaldehído, 0.12 ml 10 x MOPS pH 8.0). Los rRNA se visualizaron añadiendo 1  $\mu$ l de bromuro de etidio (400  $\mu$ g/ml) por cada 10  $\mu$ l de muestra, así se comprobó la integridad del RNA y se ajustó la cantidad de RNA en las muestras. Tras la electroforesis, los RNAs fueron transferidos a membranas de nylon, Hybond-N (Amersham) empleando 5 x SSC (1 x SSC es 0.15 M NaCl, 15mM citrato sódico pH 7.0) y unidos covalentemente a la membrana mediante irradiación ultravioleta en un Genelinker (Bio-Rad). La prehibridación e hibridación de los filtros se realizó a 65°C en las mismas condiciones indicadas para el análisis Southern. La señal obtenida en los filtros fue monitorizada y cuantificada mediante el sistema de imagen radioanalítica Instantimager 2024 (Packard, Canberra, Australia), siendo posteriormente expuestos sobre una película sensible a los rayos X (Kodak Xar-5) a -80°C durante 48 horas usando un estuche Kodak X-Omatic con pantallas intensificadoras. Los valores de cpm obtenidos fueron posteriormente normalizados mediante hibridación con una sonda de rRNA 18S de guisante (Piller y col, 1990) o *Arabidopsis* (Unfried y col, 1989) y posterior cuantificación.

## 2.3. Aislamiento del cDNA de la S-adenosilmetionina descarboxilasa de guisante.

### 2.3.1. RT-PCR.

Se utilizó 1  $\mu$ g poli(A)+ RNA aislado a partir de callos de guisante crecidos en medio MS enriquecido con NAA (Sigma), BAP (Sigma) y ácido ascórbico (Sigma) como molde para la síntesis de la primera cadena de cDNA. La reacción se preparó utilizando

un oligo(dT)<sub>17</sub>-adaptador como cebador para la AMV-RT (transcriptasa reversa del virus de la microblastosis de las aves, Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. 2 µl de una dilución 1/100 de la reacción de transcripción reversa fueron utilizados como molde para la reacción de amplificación por PCR (Berchtold, 1989; Kawasaki y Wang, 1990), utilizando como cebador directo el oligonucleótido degenerado SAMdC-1 (AARACNTGYGGNACNACNAA) y como cebador reverso el SAMdC-2 (TCNGGNGTDATRTGDATNGT). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador modelo PHC-3 (Techne, Cambridge, UK). El volumen final de cada reacción fue de 50 µl, conteniendo 2 µM de cada oligonucleótido, 10 mM Tris-HCl pH 8.8 a 25°C, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM dNTPs y 1U de Dynazyme II (DNA polimerasa termoestable de *Thermus brockianus*, Finnzymes Oy, Finlandia). Debido al uso de oligonucleótidos degenerados, las condiciones del PCR fueron modificadas según el método de "Touchdown PCR" (Don y col, 1991), al objeto de aumentar la especificidad de la amplificación. Después de la etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 4 min, la reacción de amplificación transcurrió mediante 12 ciclos de 94 °C 1 min, Temperatura de hibridación (T) 1 min, 72°C 1 min, donde T varió de 59 a 48°C, bajando 1 grado en cada ciclo; seguidos de 25 ciclos de 94°C 1 min, 47°C 1 min, 72°C 1 min. y un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos. Se obtuvo un producto de amplificación de 505 pb, que fue separado en gel de agarosa, aislado del mismo mediante su unión a silica gel (Ausubel y col, 1993), y clonado en el vector p-Bluescript (S/K)+ (Stratagene, La Jolla, USA) digerido con Eco RV (Boehringer Mannheim) y modificado por adición de una cola de timidinas según las condiciones de Hadjeb y col (1996). (Figura 2.1 A)

La secuenciación del producto clonado se hizo mediante el método de terminación de cadenas con dideoxinucleótidos, o método enzimático (Sanger y col. 1977). Empleándose el sistema "fmol™ DNA Sequencing System" (Promega). Como precursor radiactivo se empleó [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP (1000 Ci/mmol, Amersham). Como cebadores se emplearon las secuencias del promotor de la RNA polimerasa del fago T7 (forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y la del promotor de la transcriptasa reversa (reverse, 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') presentes en el vector p-BlueScript (Stratagene). La secuenciación se completó en las dos direcciones con varios clones. El

análisis de las secuencias se llevó a cabo utilizando el paquete de programas "Genetic Computer Group" (GCG) de la Universidad de Wisconsin.

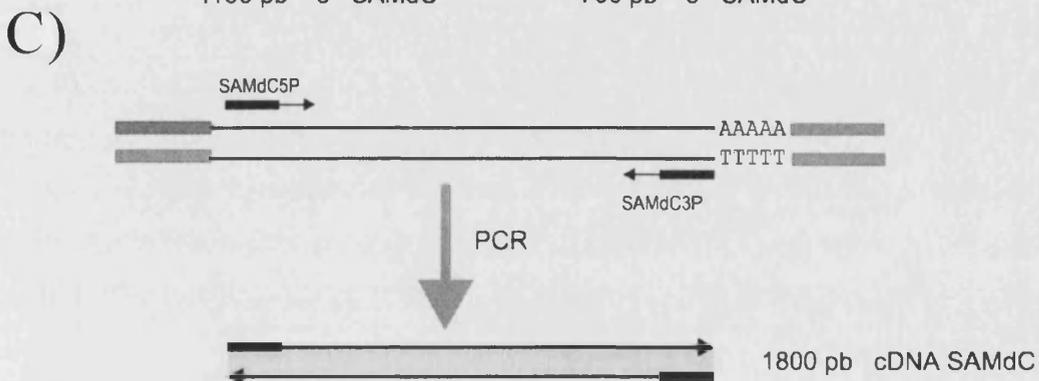
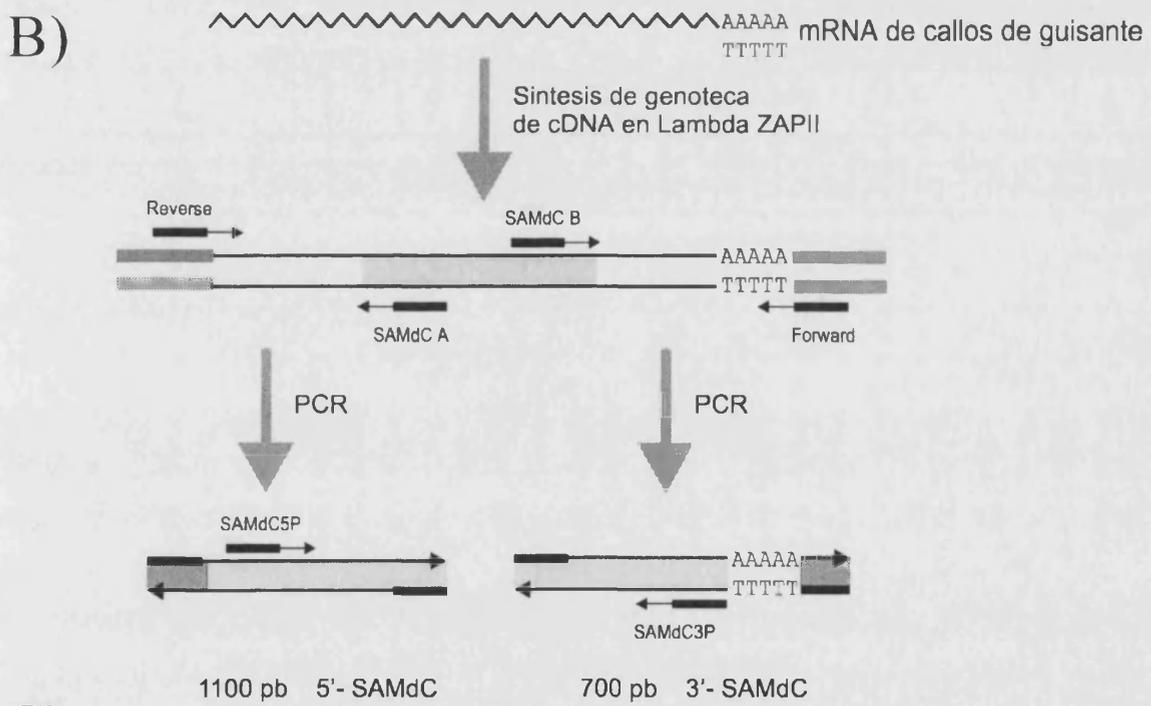
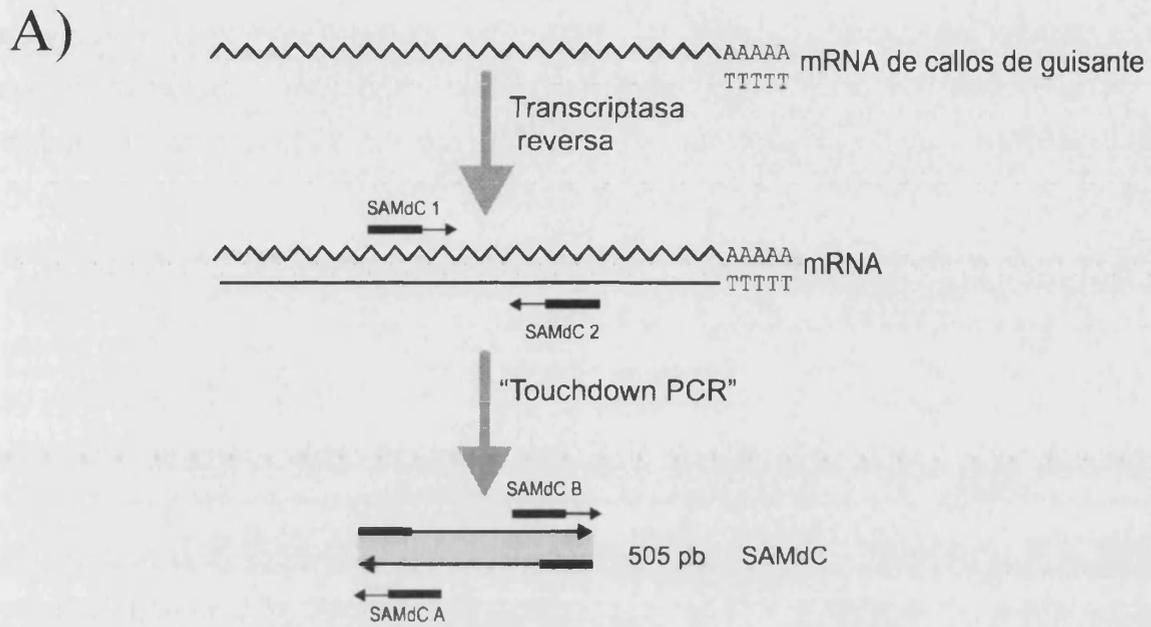
### 2.3.2. Amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA de SAMdC de guisante

El clon completo del cDNA de la SAMdC de guisante se aisló de una genoteca obtenida de poli(A)+ RNA extraído de callos de guisante crecidos en medio MS enriquecido con NAA, BAP y ácido ascórbico. El cDNA se sintetizó utilizando el sistema "UNI-Zap™ XR cDNA synthesis Kit" (Stratagene). La población de cDNA resultante se ligó en los sitios Eco RI y Xho I del fagémido Lambda ZAP® II (Stratagene), quedando la cola poliA del RNA situada junto al sitio Xho I. Junto a ambos sitios de restricción se encuentran situados los oligonucleótidos *forward*, flanqueado por el sitio Eco RI, y *reverse*, flanqueado por el sitio Xho I. El DNA recombinante fue empaquetado *in vitro* utilizando el extracto "Gigapack Gold II" (Stratagene). La genoteca resultante fue amplificada en placa utilizando la cepa XL1-Blue de *E. coli*, según métodos estándar (Sambrook y col. 1989).

La construcción de esta genoteca permitió la amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA de guisante mediante PCR. Se utilizaron los cebadores *forward* y *reverse*, situados en el vector, junto los oligonucleótidos SAMdCA (5'-TTCATCGGATC CACCCAGAATATAA-3') y SAMdCB (5'-CTTCCGAATTCTGAAATTTGTGACT-3'), diseñados a partir del fragmento amplificado por RT-PCR. Se extrajo DNA fágico de una alícuota de esta genoteca conteniendo  $6.8 \times 10^8$  pfu y se utilizó como molde de la reacción de amplificación. Las parejas de cebadores utilizadas fueron: los oligonucleótidos *forward* y SAMdC A para la amplificación del extremo 5'; y *reverse* y SAMdC B para la amplificación del extremo 3'. Las condiciones de amplificación fueron:

---

**Figura 2.1 Esquema del aislamiento del cDNA de SAMdC de guisante.** A) Aislamiento de un fragmento central de cDNA mediante amplificación con los oligonucleótidos degenerados SAMdC 1 y SAMdC 2 ; B) Amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA de SAMdC a partir de cebadores específicos SAMdC A y SAMdC B diseñados a partir de la porción central amplificada en A) ; C) Amplificación del cDNA completo de SAMdC mediante los cebadores específicos SAMdC5P y SAMdC3P diseñados a partir de los extremos 5' y 3' de los productos amplificados en B) y cebadores del vector.



94°C, 4 min, y a continuación 35 ciclos de 94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72° C, 1 min; y un ciclo de extensión final de 72 °C, 10 min. Los productos de amplificación obtenidos fueron clonados según las condiciones indicadas en el apartado anterior y secuenciados. (Figura 2.1 B)

### **2.3.3. Amplificación del cDNA completo de SAMdC de guisante.**

A partir de las secuencias de los productos de PCR obtenidos en el apartado anterior se seleccionaron secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del cDNA de SAMdC guisante, para el diseño de los oligonucleótidos SAMdC-5P (5'-CAGAGATCGTCCTTTTCTAGGGTT-3') y SAMdC-3P (5'-TGAAGGTTATAACCTTCTAGACACA-3'), que fueron utilizados como cebadores de PCR para la obtención del cDNA completo de la SAMdC, utilizando de nuevo como molde el DNA fágico de la genoteca de callos. (Figura 2.1 C) Las condiciones de PCR fueron 94°C, 4 min; 35 ciclos de 94 °C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min; y un ciclo de extensión final de 72 °C, 10 min. El producto de amplificación obtenido fue clonado y secuenciado. La secuencia del mismo se encuentra depositada en la base de datos Genbank con el número de acceso U60592.

## **2.4. Aislamiento del cDNA de la S-adenosilmetionina descarboxilasa de *Arabidopsis*.**

La estrategia de clonación de la SAMdC de *Arabidopsis* se inició mediante una búsqueda de homología a SAMdCs en la base de datos de clones EST de *Arabidopsis* (Newman y col, 1994; Rounsley y col, 1996 ). Fruto de la misma se localizó el clon ID:91O10T7, perteneciente a una genoteca de cDNAs construida a partir de cuatro fuentes de RNAs asilados de los siguientes tejidos: a) plántulas etioladas de 7 días, b) cultivos celulares de raíces, c) rosetas de dos conjuntos de plantas: unas crecidas en iluminación continuada las 24h del día y otras crecidas bajo ciclos de 16h de luz, 8 h de oscuridad, y d) tallos, flores y silíquas de las mismas plantas de las que se emplearon las rosetas. Los cDNAs están clonados direccionalmente en los brazos Sal I – Not I del vector lambda Zip-Lox (Gibco-BRL, USA) , quedando la cola poliA del RNA situada junto al sitio Not I. La posterior escisión deja a los clones en el vector plasmídico pZL1.

Tras recibir el correspondiente clon del banco de clones de la Ohio State University se secuenció el clon de cDNA completo utilizando como cebadores los oligonucleótidos del promotor de la RNA polimerasa del fago SP6 (5'-ATTAGGTGACACTATAG-3') y T7 situados en el vector pZL1 y que flanquean ambos lados del cDNA, así como cebadores internos diseñados a partir de la secuencia del cDNA que se iba obteniendo con la secuenciación. La secuencia completa se encuentra depositada en la base de datos Genbank con el número de acceso U63633.

## **2.5. Expresión en levadura de los cDNAs de las SAMdC de guisante y *Arabidopsis*.**

En los experimentos de expresión en levadura se utilizó la cepa Y342 (MAT6 $\alpha$  ura3-52 leu2  $\Delta$ spe2::LEU2), cedida por el Dr. H. Tabor del National Institute of Diabetes and Kidney Diseases, Bethesda, USA. Las levaduras fueron manipuladas siguiendo protocolos estándar (Rose y col, 1990), siendo crecidas a 30°C en medio mínimo con 2% Galactosa, 1x Yeast Nitrogen Base (YNB) y los suplementos apropiados (medio SG). Se tuvieron en cuenta las precauciones necesarias descritas por Cohn y col (1980), para asegurar que todos los medios líquidos y sólidos utilizados estuvieran libres de poliaminas.

Los cDNA de SAMdC de guisante y *Arabidopsis* fueron clonados en los sitios Sma I/Hind III y Sma I/Xba I del vector de expresión de levadura pEMBLyex4, respectivamente, quedando bajo el control del promotor GAL10, inducible por galactosa, (Cesareni y Murray, 1987). Las construcciones obtenidas fueron denominadas pSDCPEA y pSDCORA. Se transformaron células de la cepa Y342 mediante el método de acetato de litio (Gietz, 1992) con los vectores pSDCPEA, pSDCORA o el vector original pEMBLyex4, siendo seleccionados los transformantes en un medio SG sin uracilo. Transformantes independientes llevando los plásmidos pSDCPEA, pSDCORA o pEMBLyex4 fueron cultivados en 5 ml de medio de selección con o sin espermidina durante 24 horas, siendo diluidos posteriormente 1/500 en el mismo medio fresco. Este proceso de dilución fue repetido 3 veces más cada 24h, siguiéndose el crecimiento de las levaduras mediante la medida de la O.D.<sub>600</sub>.

## 2.6. Aislamiento del clon genómico de SAMdC de *Arabidopsis thaliana*.

Utilizando el clon de cDNA de *Arabidopsis* como sonda se realizó un escrutinio de una genoteca construida a partir de DNA genómico de *Arabidopsis*, cedida por el Dr. Robert Fischer (University of California, Berkeley). La genoteca fue preparada a partir de DNA genómico digerido con Sau 3AI, fraccionado en un gradiente salino y clonado en brazos Bam HI del vector Lambda GEM11, con un tamaño medio de inserto de 20.6 Kb. El rastreo se realizó según los métodos estándar (Sambrook y col. 1989). El DNA correspondiente a 400000 placas de lisis fue fijado sobre filtros de nylon Hybond-N (Amersham) mediante irradiación UV en un Genelinker (Bio-Rad) e hibridado con la sonda de cDNA de SAMdC de *Arabidopsis* marcada con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP en las mismas condiciones anteriormente descritas en el apartado 2.2.2. Los filtros fueron expuestos frente a una película sensible a los rayos X (Kodak Xar-5) a -80°C con pantallas intensificadoras durante 15 días.

Las placas de lisis que dieron una señal de hibridación positiva se recuperaron de las placas de agar empleando una pipeta Pasteur estéril, y se dejaron difundir en tampón SM (100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 y 0.01% (p/v) gelatina). Estos positivos se sometieron a un doble control: por un lado fueron analizados mediante amplificación directa por PCR de una alícuota de los fagos presentes en el tampón SM (Kawasaki y Wang, 1989) utilizando la pareja de oligonucleótidos SAMDCARA4 (5'-CTGAGATCTGCGACTTTGAATTCGA-3') y SAMDCARA3P (5'-CTTCACAAGTCATTATTCATAGGAA-3') diseñados a partir de la secuencia de SAMdC de *Arabidopsis*, para comprobar la presencia del gen de SAMdC en el inserto. Por otro lado, se sometieron a una segunda ronda de análisis, con el fin de comprobar la pureza de la placa de lisis aislada. A continuación se procedió a la extracción del DNA de los fagos positivos que superaron este doble control, según los métodos estándar (Sambrook y col. 1989; Ausubel y col, 1993). Este DNA fue sometido a digestión con la enzima de restricción Bam HI (Boehringer Mannheim). Los productos de las reacciones de digestión se separaron en un gel de agarosa del 0.8%, y se analizaron mediante la técnica Southern Blot (Southern, 1975), utilizando como sonda radiactiva el extremo 5' del clon de SAMdC de *Arabidopsis* obtenido mediante digestión Sal I/ Bam HI. Todos los

clones mostraron una banda de hibridación de 3 Kb, que fue clonada en vector pBluescript abierto con Bam HI (Boehringer Mannheim) y secuenciada con oligonucleótidos directo y reverso del vector, así como con cebadores diseñados a partir de la secuencia.

## **2.7. Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.**

### **2.7.1. Metodología de transformación. Análisis de plantas transgénicas.**

La obtención de plantas transgénicas se realizó mediante el método de transformación por infiltración al vacío (Bechtold y col, 1993; Ye y col, 1999). Se utilizaron células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58, transformadas con la construcción de interés mediante el método descrito por Bevan (1984), y *Arabidopsis thaliana* variedad Columbia. En la selección de transformantes se empleó tanto la utilización de kanamicina como marcador de selección en el medio MS de crecimiento de las plantas, como la comprobación mediante PCR de la presencia de las construcciones de DNA en el genoma de la planta utilizando parejas específicas de cebadores para cada una de ellas. Por otro lado, para cada línea transgénica, se obtuvo la correspondiente línea de individuos homocigotos, mediante la autofertilización de la primera (T1) y segunda (T2) generaciones de transformantes y posterior observación de la segregación de la resistencia a kanamicina en la tercera generación (T3).

### **2.7.2. Construcciones Utilizadas.**

#### **2.7.2.1. Expresión de GUS bajo el control del promotor de la SAMdC**

El vector binario pBI101 (Jefferson y col, 1987) se utilizó para la obtención de construcciones donde la expresión del gen que codifica para la  $\beta$ -Glucuronidasa de *E. coli* (GUS, EC 3.2.1.31) fuera controlada por el DNA genómico flanqueante al extremo 5' del cDNA de SAMdC de *Arabidopsis*. El vector pBI101 dispone de un sitio múltiple de clonación en el extremo 5' flanqueante al gen GUS. Se emplearon dos tipos de construcciones: las que incluían tanto el promotor como parte de la secuencia 5' del cDNA de SAMdC, conteniendo la 5'-ORF de 52 aminoácidos (construcciones pBI-2X), y

aquellas construcciones en que dicha secuencia había sido eliminada (construcciones pBI-3x). En ambos tipos de construcciones se deleccionó el promotor mediante digestión con una enzima de restricción determinada, procediéndose a un clonaje previo del fragmento de promotor deseado en p-Bluescript y posterior inserción en el vector binario.

En el caso de las construcciones pBI-2X, se partió de un clon de fragmento de DNA genómico aislado y clonado en pBluescript, denominado pBS111. Dicho clon poseía 1.1 kb del extremo 5' del cDNA de SAMdC así como 2 kb de DNA genómico 5' flanqueante, que fue deleccionado mediante digestiones con Pst I (construcción PBS-2C, con 1.2 kb de promotor), Xho I (pBS-2D, 455 pb de promotor), Sna BI (pBS-2E, 80 pb de promotor), Sca I (pBS-2F 50 pb de promotor). Los insertos de estas construcciones fueron liberados con una digestión Hin dIII/Xba I, y clonados posteriormente en pBI101, obteniéndose las construcciones pBI-2C, pBI-2E, y pBI-2F. La construcción pBI-2D fue

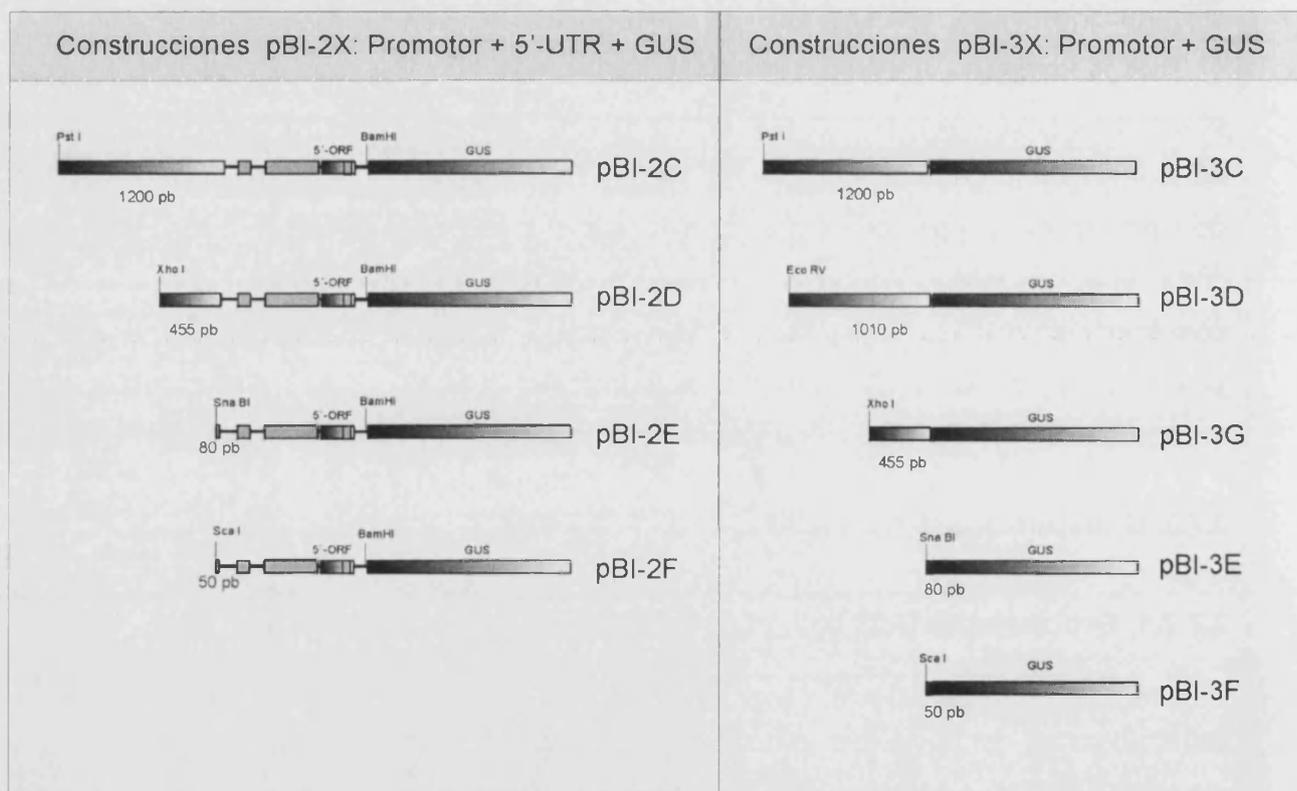
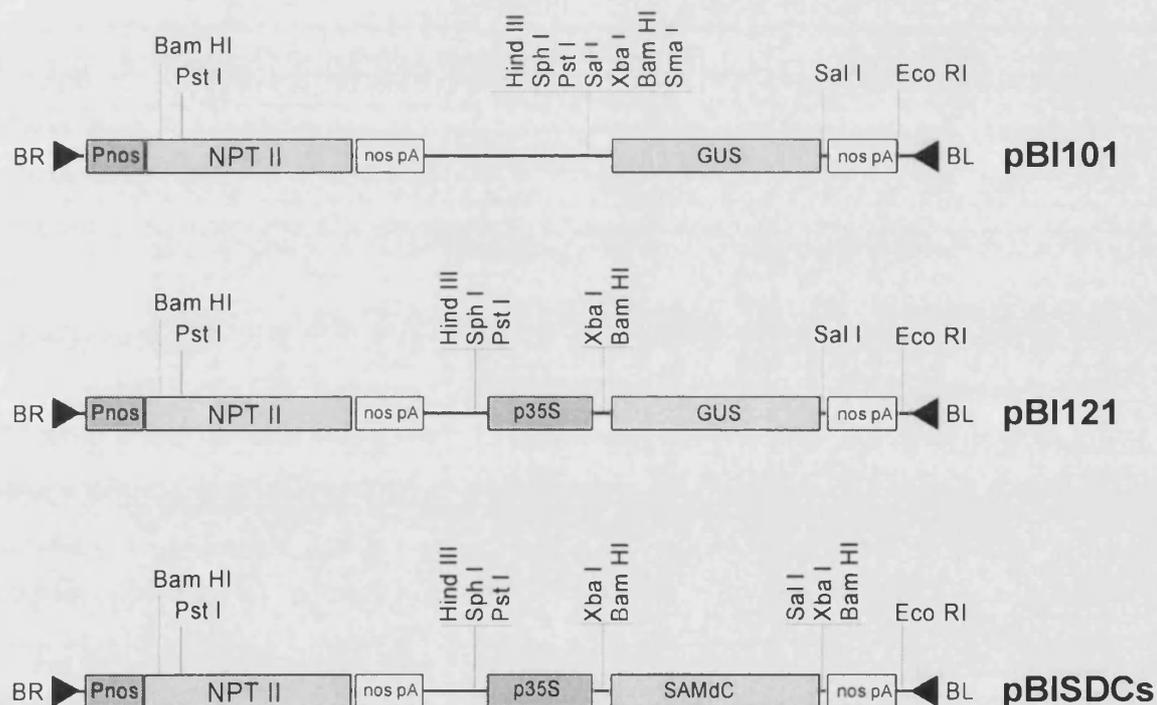


Figura 2.2 Esquema de las construcciones utilizadas en el estudio de la región promotora del clon genómico de SAMdC. Se representan el fragmento de región promotora fusionado al extremo 5' del gen informador GUS en el plásmido binario pBI101 para cada construcción.

generada mediante digestión de pBS111 con Bam HI e inserción en el sitio Bam HI de pBI101.

Las construcciones pBI-3X se obtuvieron previa eliminación del DNA del extremo 5' del cDNA de SAMdC mediante amplificación por PCR utilizando un cebador específico SAMdCARAI3 (5'-TTGAGAGAAACGATTAAGTTGATGA-3'), diseñado a partir de la secuencia de los primeros 50 pb del cDNA, y el cebador T7. Los moldes utilizados fueron las construcciones pBS-2C, pBS-2D, pBS-2E y pBS-2F, obteniéndose las construcciones pBS-3C, pBS-3D, pBS-3E y pBS-3F clonadas en pBluescript. La eliminación del extremo 5' en este tipo de construcciones permitió la utilización de la enzima de restricción Eco RV para realizar una deleción intermedia del promotor a partir de la construcción pBS-3C, obteniéndose la construcción pBS-3G (1 kb de promotor). Posteriormente, mediante liberación del inserto de estas construcciones con una digestión Hind III/Xba I e inserción en pBI101, se obtuvieron las construcciones pBI-3C, pBI-3D, pBI-3E, pBI-3F y pBI-3G. (Figura 2.2).



**Figura 2.3** Esquema de las construcciones utilizadas para la sobreexpresión constitutiva de SAMdC. p35S, promotor CAMV35S; GUS,  $\beta$ -glucuronidasa; Pnos, promotor del gen de la nopalina sintasa; nos pA terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintasa..

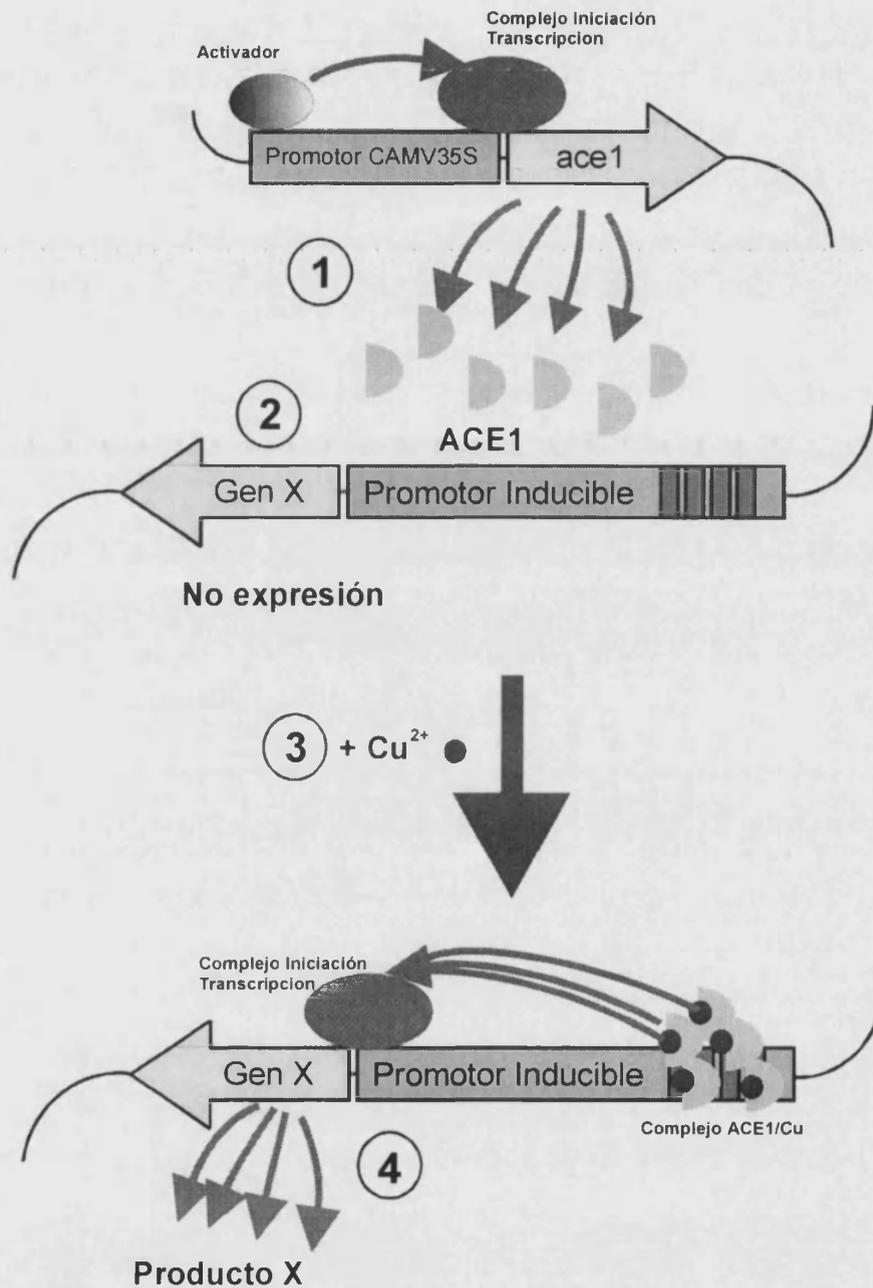
### 2.7.2.2. Expresión constitutiva de la SAMdC.

Se sustituyó el gen GUS del plásmido binario pBI121 (Jefferson y col, 1987) por el cDNA de SAMdC de *Arabidopsis*, situando así el cDNA de SAMdC bajo el control del promotor constitutivo CAMV35S (Bentley y Chua, 1990). Para ello se liberó el gen GUS del vector unido al terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintasa (*nos*; Bevan y col, 1983) mediante digestión con Bam HI/Eco RI (Boehringer Mannheim), mientras el cDNA de la SAMdC de *Arabidopsis* fue escindido del vector pZL-1 mediante digestión con Bam HI/Xba I (Boehringer Mannheim). Por otro lado, se liberó el terminador *nos* previamente clonado en pBluescript (Stratagene) mediante digestión Xba I/Eco RI (Boehringer Mannheim). Los fragmentos BamHI/EcoRI del vector binario, Bam HI/Xba I del cDNA de la SAMdC, y Xba I/Eco RI del terminador *nos* fueron aislados y utilizados en una reacción de ligación tripartita obteniéndose la construcción pBI-SDCSENSE. (Figura 2.3)

### 2.7.2.3. Expresión inducible por cobre de la SAMdC.

Se utilizó el sistema de vectores pPMB7066 y pPMB765, cedidos por el Dr. Paul Reynolds, del Horticulture and Food Research Institute de Nueva Zelanda. El fundamento del sistema de inducción por  $\text{Cu}^{2+}$  se representa en la figura 2.4. Se basa en la expresión constitutiva del factor de transcripción ACE1, que precisa la unión a cobre para poder unirse al elemento de regulación MRE (Dameron y col, 1991). Si se pone el gen de interés bajo el control de un promotor que contenga estas secuencias reguladoras en *cis* MRE, solo se producira su expresión en presencia de cobre (Mett y col, 1993).

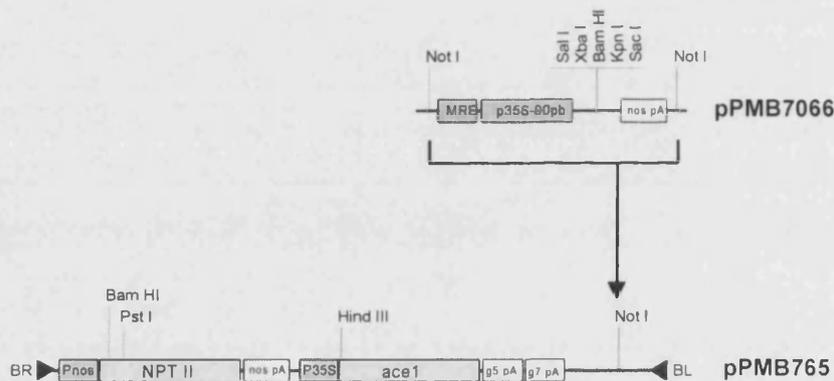
El promotor que reconoce el factor ACE1 esta contenido en el vector pPMB7066, es un vector basado el pUC119 que contiene una copia del elemento metaloregulatorio MRE fusionado a las primeras 90pb del promotor CAMV35S, y separado de la secuencia terminadora *nos* por un sitio de clonación múltiple que permite la inserción del gen de interés. La fusión promotor-gen-terminador puede ser posteriormente escindida por una digestión con la enzima Not I e insertada en el vector binario pPMB765, basado en el sistema pART (Gleave, 1992), que contiene los genes de resistencia a kanamicina y *ace1* fusionados a promotores constitutivos. (Figura 2.5 A)



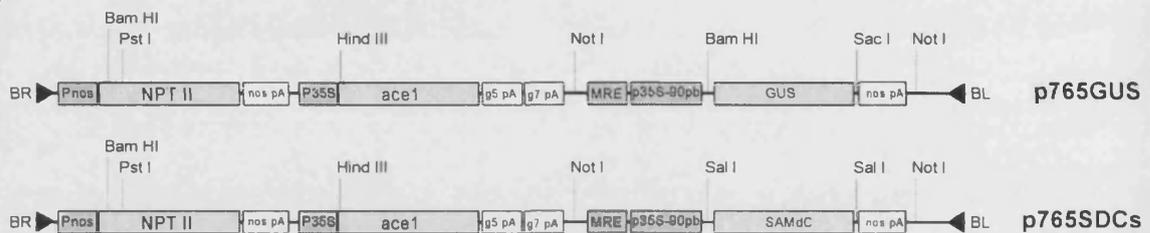
**Figura 2.4 Sistema de expresión inducible por  $\text{Cu}^{2+}$ .** 1) El factor de transcripción de levadura ACE1 se expresa bajo el control de un promotor fuerte (p. ej. el promotor CAMV35S); 2) En ausencia de cobre, ACE1 no puede unirse al promotor inducible diana; 3) La unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a ACE1 produce el cambio conformacional que permite la unión de ACE1 a secuencias cis específicas situadas en el promotor inducible diana; 4) El resultado de la unión del ACE1 al promotor es la inducción de la expresión del gen deseado (adaptado de Gatz y Lenk, 1998).

La inserción del cDNA de SAMdC en el sitio múltiple de clonación del vector se realizó mediante una amplificación por PCR del cDNA completo mediante el cebador específico del vector T7, situado al lado del extremo 5' del cDNA de SAMdC en el clon 91010T7, y el cebador SAMDCARA3PSAL (5'-CACAAGTCGACATTCATAGGAA-3'), diseñado a partir del extremo 3', sustituyendo el triplete central ATT original por CTG para la generación de un sitio de restricción Sal I. El objeto de esta amplificación fue conseguir que el cDNA de SamdC estuviera flanqueado por dos sitios de restricción Sal I (uno en el extremo 5', propio del vector y, otro en el extremo 3' generado en la amplificación). Se utilizó como molde el clon 91010T7. Las condiciones de PCR fueron

A)



B)



**Figura 2.5 Esquema de las construcciones utilizadas para la sobreexpresión inducible de SAMdC.** A) Vectores utilizados para la sobreexpresión inducible por Cu<sup>2+</sup>. El gen deseado se fusiona previamente al promotor inducible mediante inserción en el sitio múltiple de clonación del vector pPMB7066, basado en pUC119. La construcción es posteriormente insertada en el sitio Not I del vector binario pPMB765. B) Vectores resultantes de la inserción de los genes GUS (p765GUS) y SAMdC (p765SAMDCs) y bajo el control del promotor inducible por Cu<sup>2+</sup>.

94°C, 4 min; 35 ciclos de 94 °C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min; y un ciclo de extensión final de 72 °C, 10 min. El producto de PCR de 1.8 Kb obtenido fue digerido con Sal I y clonado en el sitio Sal I de pPBM7066. Se seleccionaron, mediante digestión Eco RV/Bam HI, aquellas colonias que contenían el inserto en la orientación adecuada, obteniéndose la construcción p7066SAMDCs. Posteriormente se liberó la fusión del promotor-SAMdC-nos mediante digestión con Not I y se insertó en pPMB765, para obtener la construcción p765SAMDCs (Figura 2.5 B).

El gen GUS también fue fusionado al promotor inducible por Cu<sup>2+</sup> previa liberación del vector pBI101 mediante digestión Bam HI/Sac I, inserción en el vector pPMB7066 para formar la construcción p7066GUS; y posterior clonación en el sitio Not I del vector pPMB765, obteniéndose la construcción p765GUS, que fue utilizada como control de las condiciones de inducción del sistema. (Figura 2.5 B).

## 2.8. Análisis de actividad GUS en Plantas transgénicas.

Se realizaron medidas de actividad GUS en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* mediante la utilización de dos tipos de ensayos: por un lado medidas fluorimétricas, y por otro ensayos histoquímicos, que se realizaron como se describe en Jefferson y col (1987) y Rodrigues-Pousada y col (1993) respectivamente.

El ensayo fluorimétrico requirió la disgregación del material vegetal con nitrógeno líquido y posterior homogeneizado con 10 ml de tampon de extracción GUS (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 10mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 10mM β-mercaptoetanol por gramo de peso fresco). El extracto obtenido se centrifugó y el sobrenadante fue utilizado en el ensayo de medida de actividad GUS. El ensayo se llevó a cabo añadiendo el sustrato de la reacción, 4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido (Mu-Gluc, Molecular Probes, Eugene, USA), a una concentración final de 1mM y siguiendo la aparición del producto de reaccion de su hidrólisis, 7-hidroxi-4-metilcumarina (MU), mediante la medida de emisión fluorescente de alícuotas de reacción diluidas 1/1000 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Las medidas fueron realizadas en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 (Shimadzu corp. Europe, Duinsburg, Alemania), utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y observando la emisión de fluorescencia a una longitud de onda de 455 nm. Las medidas de fluorescencia fueron posteriormente normalizadas frente a una curva de calibrado con MU (Molecular Probes), así como frente a una cuantificación de proteínas totales de los

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

extractos obtenidos para las medidas fluorimétricas, realizada según el método de Lowry (1951), utilizando como patrón una curva de BSA.

Las medidas histoquímicas fueron realizadas mediante infiltración al vacío con una disolución del sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-glucuronido, Sigma) 1mM, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ph 7.2, 0.5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.1 % Triton X-100, y posterior incubación a 37°C durante 6-10h hasta la aparición del precipitado azul como consecuencia de la hidrólisis del sustrato. Los pigmentos del tejido fueron posteriormente eliminados mediante sucesivos lavados con etanol.

## 3. Resultados.

---

### 3.1. Caracterización del cDNA de la SAMdC de guisante

El aislamiento del cDNA de la SAMdC de guisante se llevó a cabo mediante una estrategia de amplificación por RT-PCR. Se identificaron las regiones proteicas conservadas en diferentes SAMdCs a partir del alineamiento de la secuencia proteica de la SAMdC de patata (Mad Arif y col, 1994), única aislada en plantas en ese momento, frente a la humana (Marie y col, 1992) y la de *S. cerevisiae* (Kashiwagi y col, 1990), y se seleccionaron dos secuencias proteicas -en concreto, KTCGTTKLL y TIHITPE- por dar lugar a la combinación que menor número de posiciones indeterminadas originaba en el diseño de los oligonucleótidos degenerados SAMdC-1 y SAMdC-2.

Los oligonucleótidos SAMdC-1 y SAMdC-2 fueron utilizados en una reacción de RT-PCR como cebadores frente a un molde constituido por una población de cDNAs de cadena simple generados por retrotranscripción de poli(A)<sup>+</sup> obtenido a partir de un cultivo de callos. Tras ensayar varias condiciones de amplificación, se utilizó la técnica de ciclos de temperatura "Touchdown", consistente en iniciar el primer ciclo de amplificación con la temperatura de hibridación más elevada posible para posteriormente ir decreciendo un grado en cada nuevo ciclo de amplificación hasta llegar a una temperatura mínima con la cual se realiza una amplificación de 25 ciclos. Con la progresiva bajada de temperatura de hibridación en los ciclos iniciales se pretende el enriquecimiento de la reacción de amplificación en productos específicos frente a los artefactos, puesto que si el apareamiento correcto es más eficiente a una temperatura más alta frente al incorrecto, cada ciclo a una temperatura alta supondrá una ventaja de amplificación del producto correcto de dos veces por ciclo (Donn y col, 1991). La aplicación de esta técnica dio como resultado la amplificación de una banda de un tamaño aproximado de 500 pb, cuya posterior clonación y secuenciación reveló que poseía un alto grado de homología a la secuencia de SAMdC de patata (Figura 2.1 A).

El cDNA completo de la SAMdC de guisante se aisló a partir de una genoteca de cDNA preparada a partir de poli(A)<sup>+</sup> de callos. La genoteca fue utilizada como molde en



reacciones de amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA flanqueantes a la secuencia de 500 pb anteriormente amplificada. Para ello, se diseñaron cebadores específicos de los extremos de este fragmento (SAMdC-A y SAMdC B), orientados hacia los extremos, y se utilizaron junto a cebadores específicos de los brazos del fago (forward y reverse) (Figura 2.1 B). La utilización de la pareja reverse/SAMdC-A permitió la amplificación de un extremo 5' flanqueante de 1100 pb, mientras que con la pareja SAMdC-B/forward se consiguió un fragmento 3' flanqueante de 700 pb. El solapamiento de estas dos secuencias permitió deducir la secuencia completa del cDNA de la SAMdC, que fue posteriormente amplificada en su totalidad mediante uso de la pareja de cebadores SAMdC5P/SAMdC3P, diseñados a partir de las secuencias de los extremos 5' y 3' del cDNA. Se obtuvo una banda de alrededor de 1.8 Kb, que fue clonada y secuenciada (Figura 2.1 C). Su secuencia se encuentra depositada en la base de datos Genbank con el número de acceso U60592.

El cDNA aislado para la SAMdC de guisante tiene una longitud de 1815 pb, con una 5'-UTR de 548 pb, que contiene una putativa pauta de lectura de 54 aminoácidos, característica conservada en todos los cDNAs de SAMdC de plantas, y a la cual se ha atribuido un posible papel regulador post-transcripcional (Schröder y Schröder, 1995). Le sigue una pauta de lectura de 1061 pb, que codifica para una proteína de 356 aminoácidos con una masa molecular estimada de 38.70 kDa, y cuya secuencia alrededor del codón de inicio presenta similitud con la secuencia consenso que rodea al ATG en dicotiledóneas, en las posiciones -2, +1 y +2 [GGCCATGGC] (Joshi y col, 1997). La región 3' no codificante tiene una longitud de 205 pb y contiene dos posibles motivos de poliadenilación AATAAA y AATTGAA (Hunt, 1994), en posiciones -20 y -26 respecto al sitio de poliadenilación respectivamente (Figura 3.1).

**Figura 3.1** Secuencias nucleotídica y aminoacídica del cDNA de la SAMdC de guisante. Se indica también la putativa secuencia aminoacídica conservada de la región 5'-UTR. Las supuestas señales de poliadenilación se indican subrayadas.

### 3.2. Caracterización del cDNA de SAMdC de *Arabidopsis*

El aislamiento de la SAMdC de *Arabidopsis* se realizó a partir de una búsqueda de clones con homología a SAMdCs en el proyecto EST (Expressed Sequence Tag) de *Arabidopsis thaliana* (Newman y col 1994, Rounsley y col 1996). Se obtuvo un conjunto de clones secuenciados parcialmente que solapaban con distintos puntos del cDNA de la SAMdC, consecuencia de la terminación prematura de la transcriptasa reversa en el momento de la síntesis de la primera hebra de cDNA. Un solapamiento de las secuencias de dichos clones permitió localizar el clon ID: 91O10T7 como el de secuencia más próxima la del extremo 5' del cDNA de *Catharantus roseus*, y por tanto el que podía corresponder al cDNA completo de *Arabidopsis*, por lo que se procedió a su secuenciación completa en las dos hebras. La secuencia completa se envió a la base de datos del Genbank, donde figura con número de acceso U63633.

La secuencia de la SAMdC de *Arabidopsis* tiene 1822 pb de longitud, con una 5'-UTR de 523 pb, que contiene una putativa ORF de 52 aminoácidos, seguida de una ORF de 1100 pb, que codifica para una proteína de 366 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 40.34 kDa, cuya secuencia alrededor del codón de inicio coincide en las posiciones -2, +1 y +2 [CGAGATGGC] con respecto a la secuencia consenso de inicio (Joshi y col, 1997). La región 3' no codificante es de 188 pb, no encontrándose ningún motivo consenso de poliadenilación, aspecto también observado en muchos genes de plantas (Hunt, 1994). (Figura 3.2).

---

**Figura 3.2** Secuencias nucleotídica y aminoacídica del cDNA de la SAMdC de *Arabidopsis*. Se indica también la putativa secuencia aminoacídica conservada de la región 5'-UTR .

GCTCATTGCTTCATCATTACCAAATCATCAACTTAATCGTTTCTCTCAAATTTAGGGTTT	60
TCTCTTTTCTCGAAAGTCTTGCGGTTTTCTGAATCATCTCTATCTGGTTTGAGGGTTTCG	120
TTTGATATCTGGAGAAAGGGTTTTCTGGAAACAAGGAGTTCATAATTCGCGATCTTGATC	180
TATCGATCTTCATTTATATATAAAAAGCGTGAATGAGATTATGATGGAGTCGAAAGGTGGT	240
	M M E S K G G
AAAAAGAAGTCCAGCAGTAGTAGTTTCCTTATTTTACGAAGCTCCCCTCGGTTACAGCATT	300
K K K S S S S S S L F Y E A P L G Y S I	27
GAAGACGTTTCGTCCAAACGGTGAATCAAGAAATTCCAAATCTTCTGTCTACTCAAACCTG	360
E D V R P N G G I K K F Q I F C L L K L	47
CTCCAAGAGGCCATCCTGAGTACCAGCGTGCACCGATCTTCATAATATAGTTATAGCTTT	420
L Q E A I L S T S V H R S S *	61
CCTTACTTTCCAGTTTATCCTTTTTCTTCTTTCAAAGCTCCTTTTCTGCTGGTTCCCGGAT	480
CCAATCGTTCTCTCCTCTACTACAAGTCTGTTCGCTCACACAACAAGCGGAGATGGCC	540
	M A
TTATCTGCAATCGGTTTTCGAAGGTTACGAGAAACGGCTCGAGGTGACTTTCTTTGAGCCA	600
L S A I G F E G Y E K R L E V T F F E P	22
AGCATCTTTCAAGACTCCAAGGGACTGGGACTCCGTGCTCTGACCAAGTCCCAGCTTGAT	660
S I F Q D S K G L G L R A L T K S Q L D	42
GAAATTCTTACACCTGCTGCATGCACGATCGTTTTCATCTCTCTCCAACGATCAATTGGAC	720
E I L T P A A C T I V S S L S N D Q L D	62
TCTTACGTA CTCTGAGTCCAGCTTCTTTGTCTACCCCTACAAAGTCATCATCAAGACT	780
S Y V L S E S S F F V Y P Y K V I I K T	82
TGCGGTACCACTAAGCTCCTCCTCTCTATCCCACCACTTCTAAAGCTGGCTGGTGAGCTC	840
C G T T K L L L S I P P L L K L A G E L	102
TCTCTGAGTGTCAAGTCTGTGAAGTACACTCGCGGCTCCTTCTCTGCCCGGAGGCCAG	900
S L S V K S V K Y T R G S F L C P G G Q	122
CCTTTTCTCACCAGCTTCTCTGAAGAAGTCTCTGTTCTTGATGGGCACTTTACTCAG	960
P F P H R S F S E E V S V L D G H F T Q	142
CTGGGCTTGAACAGCGTAGCTACTTTGATGGGCAATGATGATGAGACTAAGAAATGGCAT	1020
L G L N S V A T L M G N D D E T K K W H	162
GTCTATGCTGCCTCTGCCAGGACTCCAGCAACTGCAACAACAATGTCTACTCTCGAG	1080
V Y A A S A Q D S S N C N N N V Y T L E	182
ATGTGCATGACTGGTCTGGACAGAGAGAAAGCTGCTGTCTTCTACAAGGATGAAGCTGAC	1140
M C M T G L D R E K A A V F Y K D E A D	202
AAGACTGGGTCAATGACTGATAACTCTGGAATCAGAAAGAACCTTCCAAGTCTGAGATC	1200
K T G S M T D N S G I R K N L P K S E I	222
TGCGACTTTGAATTCGAGCCCTGCGGCTACTCTATGAACTCAATTGAAGGGGATGCAATC	1260
C D F E F E P C G Y S M N S I E G D A I	242
TCCACGAACCATGTGACCCCTGAAGATGGGTTTAGCTACGCTAGCTTCAAGCTGTGGGT	1320
S T N H V T P E D G F S Y A S F E A V G	262
TACGACTTCAACACCCTTGACCTTAGCCAGCTGGTGACAAGGGTTCTCTCTTGCTTCGAG	1380
Y D F N T L D L S Q L V T R V L S C F E	282
CCCAAGCAATTCTCTGTAGCTGTGCACTCGAGCGTTGGAGCGAACTCATACAAGCCAGAG	1440
P K Q F S V A V H S S V G A N S Y K P E	302
ATTACTGTAGACTTGAAGACTATGGGTGCAGAGAGAGGACATTTGAGTCTCTAGGAGAA	1500
I T V D L E D Y G C R E R T F E S L G E	322
GAGAGTGAACAGTGATGTATCAGACGTTTGGAGAAGCTTGGTAAGTACTGTGGATCGCCT	1560
E S G T V M Y Q T F E K L G K Y C G S P	342
AGATCTACCTTGAAGTGTGAATGGAGCAGCAACAATAGCTGCAGCAGCGAGGACGAGAAG	1620
R S T L K C E W S S N N S C S S E D E K	362
GACGAGGGAATCTAGCAGAATTTTTCTTCTAATAACTAATTTTCGAGCTTTCTGGTTTT	1680
D E G I *	366
GGTCTTTCTTTTTAAAAACCTATTAAGTTCCTATGAATAATGACTTGTGAAGTTTTAGT	1740
TCGTCTCCTTCAAGCAAGTTGTATTGGTGTCTTCTACTTTATGAATATGGGTTTTATT	1800
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1823

### 3.3. Análisis de las secuencias aminoacídicas de los clones de SAMdC de guisante y *Arabidopsis*.

Los cDNAs de las SAMdC de guisante y *Arabidopsis* aislados presentan altos porcentajes de identidad de secuencia aminoacídica con el resto de cDNAs de SAMdCs de plantas aislados, que pueden compararse en la Tabla 3.1. La figura 3.3 muestra un alineamiento de las secuencias de SAMdC de *Arabidopsis* y guisante con otras SAMdC de plantas, humana y de levadura. La comparación con las secuencias humana y de levadura revela la presencia de los motivos conservados en todas las SAMdCs. Por un lado la secuencia LSESS [residuos 66-70 en ambas secuencias], identificada como el sitio de procesado para el proenzima en mamíferos (Stanley y Pegg, 1991), levadura (Kashiwagi y col, 1990), clavel (Lee y col, 1997a) y patata (Xiong y col, 1997). También se localizan secuencias PEST en los residuos 243-255 de guisante [HITPEDGFSYASF] y *Arabidopsis* [HVTPEDEGFSYASF], presente tanto en plantas (Lee y col, 1997a), como

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. <i>P. sativum</i>	100,0														
2. <i>A. thaliana</i>	63,6	100,0													
3. <i>A. thaliana2</i>	65,0	80,4	100,0												
4. <i>S. tuberosum</i>	71,4	63	65,4	100,0											
5. <i>S. oleacea</i>	68,3	62,5	63,1	70,4	100,0										
6. <i>C. roseus</i>	69,7	64,9	66,2	74,2	66,9	100,0									
7. <i>B. juncea1</i>	59,4	72,4	81,8	60,7	59,4	60,1	100,0								
8. <i>B. juncea2</i>	64,6	80,6	91,2	65,6	63,7	65,5	86,4	100,0							
9. <i>H. anuus</i>	66,2	62,5	65	67,8	67,3	67,2	59,9	65,1	100,0						
10. <i>H. chilense</i>	55,0	50,6	51,7	55,1	53,3	56,4	46,9	51,1	52,6	100,0					
11. <i>N. tabacum</i>	73,1	63,1	65,5	92,5	72,1	75,9	60,8	65,7	68,1	55,8	100,0				
12. <i>O. satyva</i>	55,0	50,4	52,1	56,2	55,6	55,8	47,6	50,7	53,1	84,8	56,9	100,0			
13. <i>T. aestivum</i>	54,4	49,6	50,7	54,2	53,1	55,5	46,2	49,9	51,7	94,9	54,9	83,8	100,0		
14. <i>Z. mays</i>	53,7	49,9	51	53,5	54,9	54,5	46,8	50,4	52,1	82,6	54,5	83,6	81	100,0	
15. <i>V. faba</i>	94,6	64,2	66,4	73,7	70,3	71,1	60,8	65,7	67	55,3	75,6	55,6	54,7	55,1	100,0

Tabla 3.1 Porcentajes de identidad de secuencias aminoacídicas de las SAMdC de plantas.

Las secuencias comparadas son las derivadas de los clones de guisante (*Psativum*, Genbank(GB) U60592), *Arabidopsis* (*Athaliana*, GB U63633; *Athaliana2*, GB AJ251915), patata (*Stuberosum*, GB Z11680), espinaca (*Soleacea*, GB X81414), *Catharanthus roseus* (*Croseus*, GB U12573), *Brassica juncea* (*Bjuncea1*, GB X95729; *Bjuncea2* GB U80916), *Helianthus anuus* (*Hanuus*, GB AF066078), *Hordeum chilense* (*Hchilense*, GB X83881), tabaco (*Ntabacum*, GB AF033100), arroz (*Osativa*, GB AF067194), *Triticum aestivum* (*Taestivum*, GB AF117660), maíz (*Zmavs.* GB Y07767) v haba (*Vfaba.* GB AJ250026).

mamíferos (Pajunen y col, 1988), así como los residuos E8, E12, S69, K83, S230, H245, a los cuales tanto estudios de mutagénesis como estudios estructurales de la proteína humana resuelta por rayos X, asignan un papel importante en el centro activo de la enzima (Stanley y Pegg, 1991, Ekstrom y col 1999).

### **3.4. Los cDNAs de guisante y *Arabidopsis* codifican para una proteína funcional.**

La funcionalidad de los cDNAs clonados se comprobó por su capacidad de complementar el gen SPE2 en el mutante de levadura Y342. Esta cepa es un mutante nulo para el gen SPE2, que codifica para la SAMdC de levadura (Balasundaram y col, 1991). El mutante se obtiene mediante delección parcial del gen SPE2 e inserción de una copia del gen LEU2. Su fenotipo característico se revela como incapacidad de crecimiento en un medio mínimo sin poliaminas. A medida que se produce el agotamiento de las poliaminas internas de partida en la célula como consecuencia de las divisiones celulares, se produce un aumento del tamaño celular, presencia de cuerpos vesiculares, disminución en el índice de gemación y parada del crecimiento. La adición de poliaminas al medio contrarresta estos efectos.

Se subclonaron los cDNAs de SAMdC de guisante y *Arabidopsis* en el vector de expresión pEMBLyex4, bajo el control del promotor GAL10, inducible por galactosa, obteniéndose las construcciones pSDCPEA y pSDCARA. Estas construcciones, junto con el vector sin inserto fueron utilizadas en la transformación de levaduras mutantes, ensayándose su capacidad de crecimiento en un medio mínimo con galactosa como fuente de carbono (SG) y libre de poliaminas.

La figura 3.4 muestra el fenotipo mutante de la cepa Y342 transformada con el vector pEMBLyex4, consistente en una disminución progresiva del crecimiento del cultivo tras sucesivas etapas de dilución en medio fresco sin poliaminas y posterior subcultivo. La adición de espermidina o la presencia del cDNA de SAMdC en el plásmido restablecen el crecimiento, indicando que estos cDNA codifican para una proteína SAMdC funcional en levadura, pese a las diferencias de secuencia existentes con

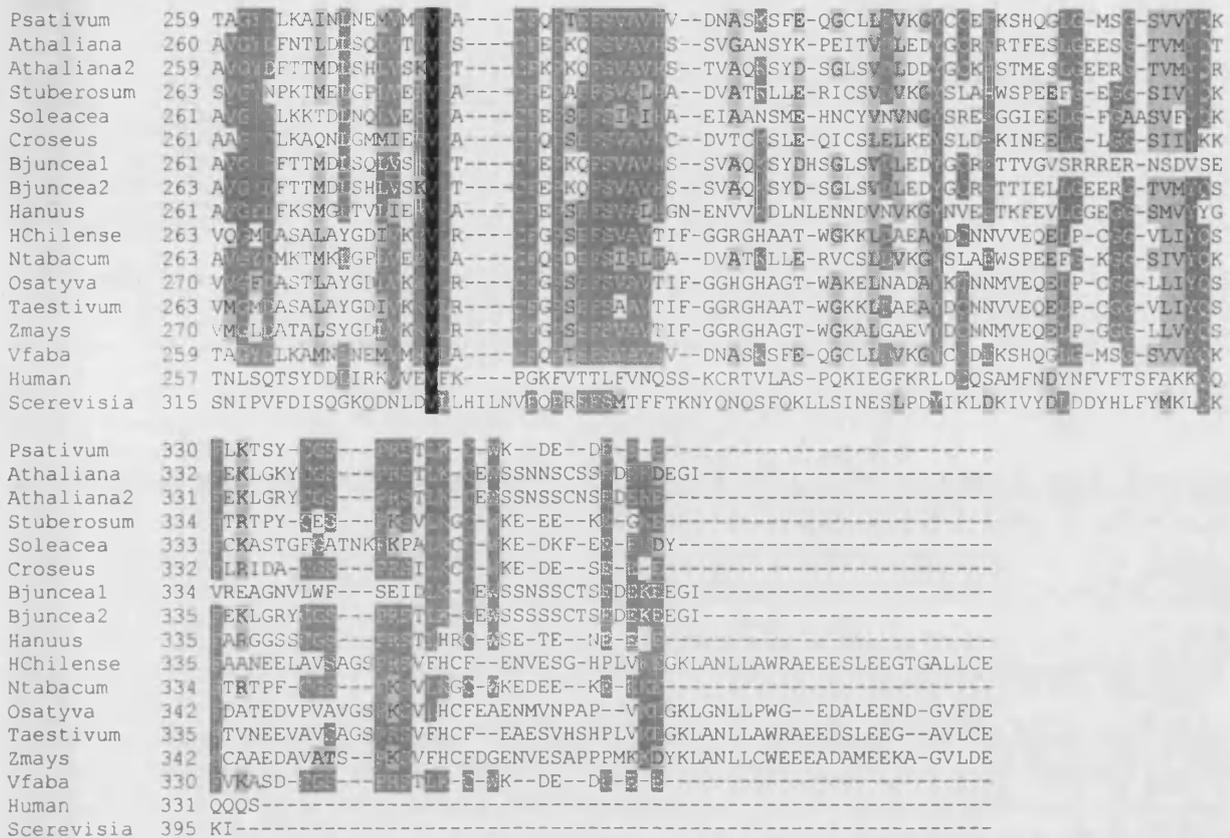
RESULTADOS

Psativum 1 -----MAVSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Athaliana 1 -----MALSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Athaliana2 1 -----MAMSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Stuberoseum 1 -----MEMDLPVSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Soleacea 1 -----FEMAI SAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Croseus 1 -----MALPA SAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Bjuncea1 1 -----MSLSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Bjuncea2 1 -----MSVSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Hanuus 1 -----M-TSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 HChilense 1 -----MAAPVSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Ntabacum 1 -----MDSALPVSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Osatyva 1 -----MGVLSAADPPVSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Taestivum 1 -----MAAPTSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Zmays 1 -----MAVLSAADASPVSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Vfaba 1 -----MAVSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Human 1 -----MEAHSAIDFEFEKRLKLSFSDGLRSDQCRSLHSITNSLUMILAIACETLSEIADSD  
 Scerevisia 1 MVTIKELTNNHYIDHLSATLSDTLDLAEFDEPKLLELWHP-HKKSITTEKTLNIGMDRWLLELKLKVEVLS-MKKTKE

Psativum 61 VLSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Athaliana 61 LGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Athaliana2 61 LGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Stuberoseum 65 VLSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Soleacea 63 VDRVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Croseus 63 LGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Bjuncea1 61 LGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Bjuncea2 61 LGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Hanuus 60 LGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 HChilense 63 LGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Ntabacum 65 VGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Osatyva 70 LGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Taestivum 63 LGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Zmays 70 LGSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Vfaba 61 VLSVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Human 60 QEAVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS  
 Scerevisia 80 LLAFLVLSSESEFPYKAVLTKTGTT-----LSSVTPKNSDSSG-----MWRSMYRSESEELDLSPTNHS

Psativum 130 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Athaliana 130 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Athaliana2 130 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Stuberoseum 134 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Soleacea 132 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Croseus 132 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Bjuncea1 130 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Bjuncea2 130 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Hanuus 129 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 HChilense 132 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Ntabacum 134 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Osatyva 139 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Taestivum 132 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Zmays 139 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Vfaba 130 SEENSLDGHFAKGLSEVTLGDDDET-KKAVVSSAPAKNS---NGDNNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-  
 Human 131 QSETEFTNAIPNGAG---LCCRMNSD-CNYLTLDFPEER---VSDGDDLEILNSELPAVMDQYMKDQVT  
 Scerevisia 160 APEFDYLNKPEIDNGKS---NSVSRNKS-NINLNVYVLEEMVLEKAVVYKNESS-

Psativum 202 -----SAAHIVRSQKATLQKSE-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Athaliana 203 -----KTGSADNSGIRKLFQSO-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Athaliana2 202 -----SAGSADNSGIRKLFQSO-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Stuberoseum 206 -----SAAHIVRSQKATLQKSE-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Soleacea 204 -----NAVYVRSQKATLQKSE-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Croseus 204 -----SAAHIVRSQKATLQKSE-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Bjuncea1 204 -----SAGSADNSGIRKLFQSO-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Bjuncea2 206 -----SAGSADNSGIRKLFQSO-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Hanuus 204 -----SAAHIVRSQKATLQKSE-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 HChilense 203 H-----VSCKEKRLKLSISDIEME-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Ntabacum 206 -----SAAHIVRSQKATLQKSE-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Osatyva 210 H-----TSCKEKRLKLSISDIEME-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Taestivum 203 H-----VSCKEKRLKLSISDIEME-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Zmays 210 N-----TTCKEKRLKLSISDIEME-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Vfaba 202 -----SAAHIVRSQKATLQKSE-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Human 200 -----AKDVTRE-SGIDLLISGV-----LQDFEPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE  
 Scerevisia 235 TTLAVEPNEDKGHNLGYQAKNTRLEDEYVNAQSDLSFHHDAATPCGYSNAISG-PHISTHTTPELGFVYVTE



**Figura 3.3** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las SAMdC de plantas derivadas de los clones indicados en la tabla 3.1 , así como las SAMdC humana (human, GB M88003) y de levadura (Scerevisiae, GB M38434). Se señalan aquellos aminoácidos conservados en todas las secuencias (cuadrados negros), en mas del 50 % (cuadrados gris oscuro) y los cambios conservativos (cuadrados gris claro). El alineamiento fue realizado mediante el programa DNAMAN y el sombreado de las secuencias mediante el programa BOXSHADE.

respecto a la SAMdC de levadura. Este método de comprobación de funcionalidad por complementación en mutantes nulos de levadura ha sido utilizado en otros cDNA de enzimas de biosíntesis de poliaminas, tales como SAMdC de patata (Mad Arif y col, 1994), ODC de tomate (Alabadí y Carbonell,1998) y espermidina sintasas de guisante y tomate (Alabadí y Carbonell, 1999; Alabadí, 1999).

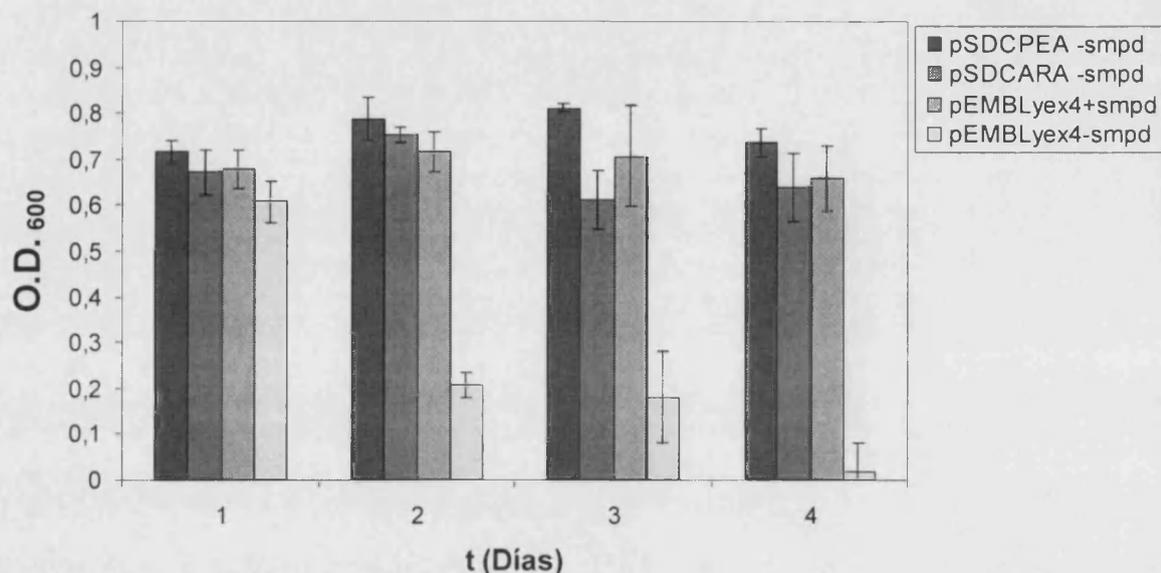


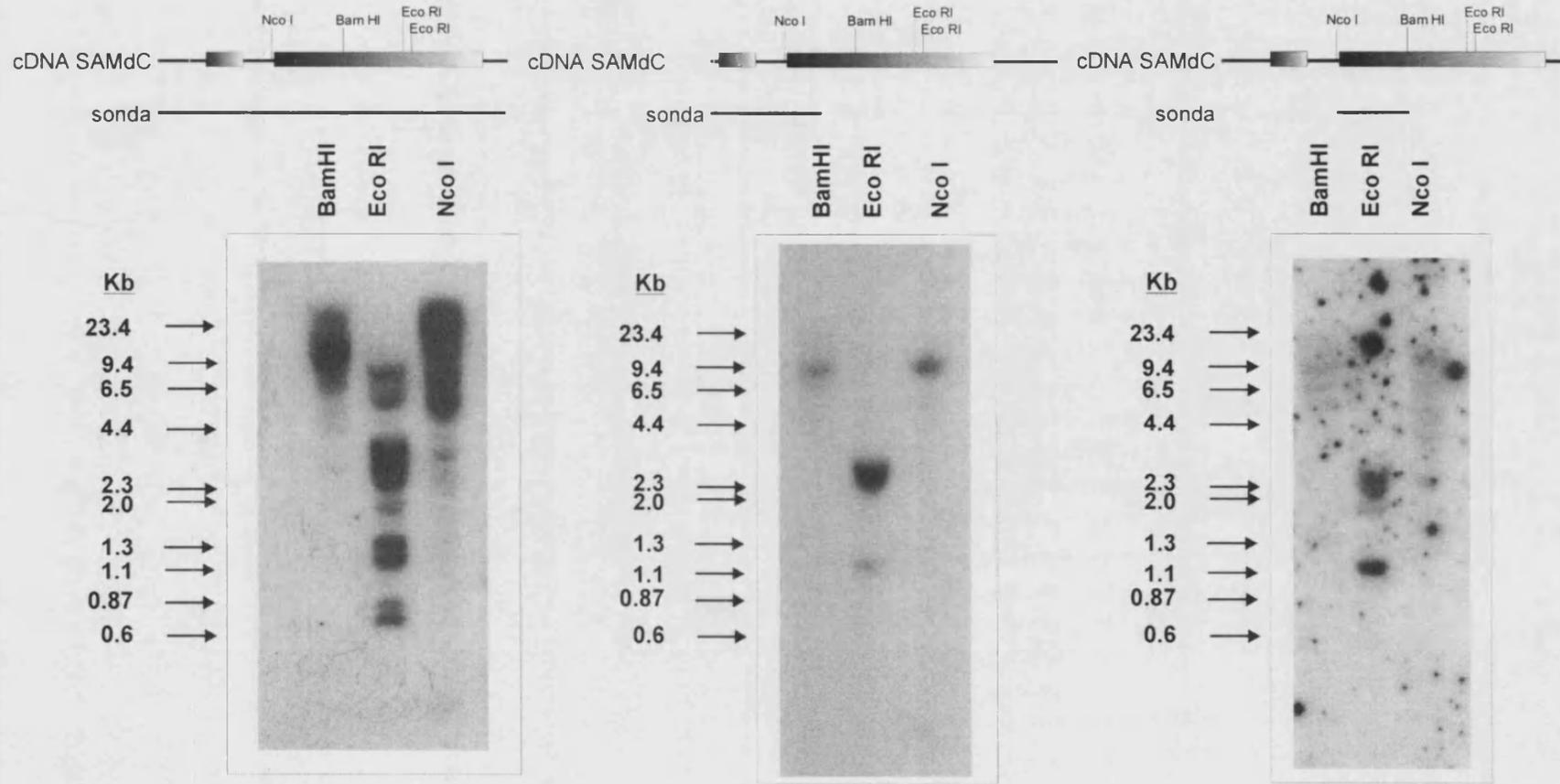
Figura 3.4 Funcionalidad de los cDNA de guisante y *Arabidopsis*. Crecimiento de las levaduras de la cepa mutante Y342 transformadas con el vector pEMBLyex4 o con las construcciones pSDCPEA y pSDCARA. Las células se cultivaron en medio mínimo con galactosa como fuente de carbono, los requerimientos mínimos apropiados, y en presencia o no de espermidina (smpd). Cada 24 h se hizo una dilución en el mismo medio con o sin espermidina. O.D.<sub>600</sub>, densidad óptica del cultivo a 600 nm.

### 3.5. Análisis de la organización genómica de los genes de SAMdC de guisante y *Arabidopsis*.

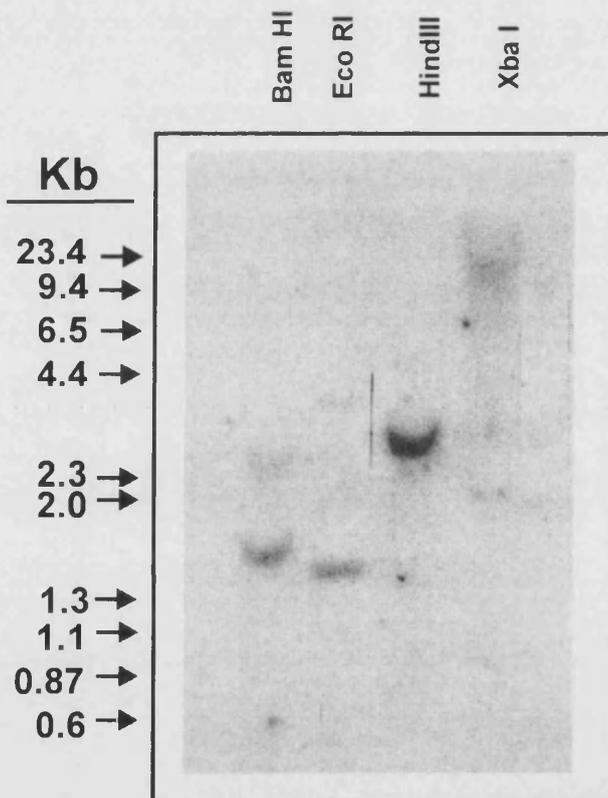
El número de copias del gen de SAMdC en los genomas de guisante y *Arabidopsis*, se determinó mediante análisis Southern de DNA genómico digerido con diferentes enzimas de restricción.

En el caso de guisante, el DNA genómico fue digerido con las enzimas de digestión Bam HI y Nco I, enzimas que presentan un punto de corte en el cDNA de la

Figura 3.5 Análisis Southern de DNA genómico de guisante. Se digirieron 30 µg de DNA con las enzimas de restricción Bam HI, Eco RI y Nco I, siendo sometidos a electroforesis, transferencia e hibridación en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos. En cada panel se muestra en la parte superior el fragmento de cDNA de SAMdC de guisante utilizado como sonda, así como los marcadores de tamaños de DNA a la izquierda.



SAMdC y Eco RI, con dos puntos de corte (Figura 3.5). Tras separarlo electroforéticamente, el DNA digerido se hibridó frente al cDNA completo de la SAMdC. El filtro se lavó en condiciones de alta estrictez. Se obtuvo un patrón de bandas múltiple (Figura 3.5, izquierda) que podría indicar la presencia de intrones o bien la existencia de más de una copia del gen de SAMdC. El mismo filtro se hibridó sucesivamente frente al extremo 5' del cDNA de la SAMdC, obtenido mediante digestión con Nco I (Figura 3.5, centro) y con un fragmento central del cDNA obtenido mediante digestión Nco I/ Bam HI (Figura 3.5, derecha), ambos sin sitios de corte Bam HI, Eco RI o Nco I en su interior. Aunque la utilización de la sonda 5' dió como resultado bandas únicas en las digestiones con Bam HI y Nco I (Figura 3.5, centro), la sonda central hibridó con más de una banda en todas las digestiones (Figura 3.5, derecha), indicando la presencia de al menos 2



**Figura 3.6 Análisis Southern de DNA genómico de *Arabidopsis*.** Se digirieron 10 µg de DNA con las enzimas de restricción Bam HI, Eco RI, Hind III y Nco I, siendo sometidos a electroforesis, transferencia e hibridación en las condiciones indicadas en materiales y métodos. La sonda utilizada fue el cDNA completo de *Arabidopsis*. Los marcadores de tamaños de DNA aparecen a la izquierda.

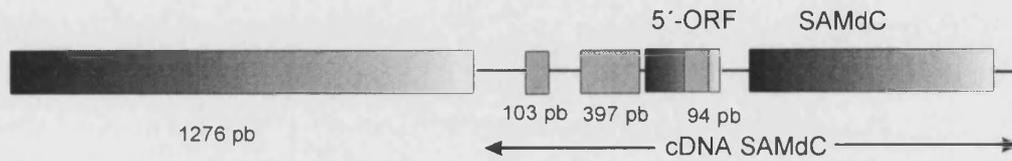
copias del gen de SAMdC. Por otro lado la existencia de bandas adicionales cuando se hibrida con el cDNA completo sugiere la existencia de intrones con sitios Bam HI, Eco RI y Nco I, en los genes de SAMdC de guisante.

En el caso de *Arabidopsis*, el análisis Southern se realizó digiriendo DNA genómico con Bam HI, Eco RI, Hind III o Xba I, hibridado con el cDNA completo de SAMdC de *Arabidopsis* y lavado en condiciones de alta estrictez. La digestión con BamHI, EcoRI o HindIII, enzimas con un punto de corte en el cDNA, dio como resultado dos bandas de hibridación (Figura 3.6), mientras que con la digestión con Xba I, enzima sin punto de corte en el cDNA, se obtuvo una sola banda. Estos resultados sugirieron la presencia de una copia única del gen de la SAMdC en el genoma de *Arabidopsis*, aunque con posterioridad se ha comprobado la existencia de una segunda copia del gen en la base de datos del Genbank, con número de acceso AJ252212.

### **3.6. Caracterización del clon genómico del gen de SAMdC de *Arabidopsis*.**

Utilizando como sonda el cDNA de SAMdC, se analizó un total de  $4 \times 10^5$  clones de una genoteca genómica de *Arabidopsis*. Mediante subclonado en pBluescript y secuenciación de los clones positivos se obtuvo una secuencia genómica del gen de SAMdC de *Arabidopsis*, así como alrededor de 1.3 Kb de secuencia 5' adyacente al cDNA. El alineamiento de las secuencias genómica y de cDNA de SAMdC revela la existencia de tres intrones de 103, 397 y 94 pb en las posiciones 107, 202 y 357 del cDNA, no existiendo ningún intrón en la región que codifica para la SAMdC (Figura 3.7). Las secuencias de los extremos de los intrones (están de acuerdo con las secuencias consenso definidas para plantas [GT...AG] (Brown, 1986; Brown y col, 1996). La secuencia promotora presenta una putativa caja TATA [TTATATAAA] (Joshi, 1987) en posición -49 respecto al inicio de la secuencia de cDNA, así como un elemento AGGA (Joshi,1987) en posición -224. El alineamiento con las secuencias promotoras de patata (Mad Arif y col, 1994), clavel (Kim y col, 1997) e *Ipomonea nil* (Park y col, 1998) no revela la presencia de zonas conservadas. Posteriormente la secuencia de este clon genómico ha sido localizada en el cromosoma III de *Arabidopsis* (BAC F16B3, número de acceso Genbank AC021640).

RESULTADOS



```

-1275          ttcca tgatcaactcg ggagagatat
-1250 gacagaatca gattctcgcg atcgacatga ttaacttgcg agatcattta
-1200 atctcacttg tagtgatcaa ttgagggcat tgatgtgttc aaatctgttg
-1150 gtatacttca aaaacactct cagctctctt gaataatcaa caactgtgtt
-1100 tttttgtttt gttcaggcca gggatcaaaa acgtttggaa agaactgaca
-1050 ctggagatca agaagactaa tgccaaaccg gttcaaccgt aggaaatccg
-1000 gttggcaata acctgaacct gaacagaag ttggattcga atctgttttc
-950 tcactttatc tttcttgtt gaaataatc cttttcctc atattgtcaa
-900 gttgggtggg aatctctat cagaactct ctgattgttt ttgcaaat
-850 cgtggaaaag aagaagcat gctcagctg atgtatagat agagagag
-800 accagtgttc cttagagag ctcaactaat tgacaagtaa atcatattgt
-750 tcaaaaggtat tcttattctt taaggttcat ggtaccaaac tagtccaaaa
-700 tctcagaate tctaaatcag acctatggtt gaacaaaaaa gatttcgaat
-650 aaataattac acactggtca atagtgattg gttataatc tgatacattt
-600 tatttgattt tttttgacaa atggtggaca tgagtcgagt gagtcaagg
-550 gaggccaat tttgtcatgt agtggagcag ttgagagcct ttgagaaata
-500 gaatttgatt cttttaggcc ccacgctacg ctaccgtgac agctcgcctc
-450 gaggttaccg cttcaacggc acacgtatct tctaaacacg tgcactctt
-400 tgattgggta atatagctgt ttggccatc tctgttttat atttgttgt
-350 tccgcaaaa ataatgtcac caaataataa ataaataat aaactctcaa
-300 aattaaaata atttctactt gcgcgaaaag aaaagaaatt tgttaaaata
-250 gttggggcta tttatctcgc gtcaggaatg gagatgctcg cacctaccga
-200 tccaacgta agtaaatggt tgaaggttaa tttgggtaaa aacctcgaaa
-150 cgccaaattg gaaataatca acggctcaga tagcttcacg cgatataaac
-100 gctaaggtat aagtcgaaat acgtaattgt cagggagcat aacctagta
-50  cttatataaa ggcactctt ctacctttc tttctcttc acgaacgcg
    
```

```

1  CTCATTGCTTCATCATACCAAATCATCAACTTAATCGTTTCTCTCAAATTTAGGGTTTT
61  CTCTTTTCTGAAAGTCTTGCGGTTTTCTGAATCATCTCTATCTGgtgagctctcttttt
121  gaattgtagatctcgttttctctctctgtagatctgctccgctgttgaggataatgtttt
181  taatcgggtaattcgggtttttctcagTTTGAGGGTTTCTGTATCTGGAGAAAG
241  GGGTTCTGGAACAAGGAGTTCATAATTCGGGACTTGTATCTATCGATCTTCAATTATA
301  TATgtaagatctctcagcattgacgtctctctctegattgatccatagctcagctaggt
361  tagatagacatcgttcttatcgtcctaggttttggtaaaagagattgatattcgcatgca
401  tggctaggttgacattacactgaaacacagcactggtttctgattttgtttgtttacat
481  gtagattgacctattgtcttaggctttgttttttagttatggatctgctataaataatggt
541  tctactcatcattcgagatatacaaatgaaatgaaatggttcttattggtttatagatt
601  cgtattgctgataaacattgtgtgtagcttttgaatccctggtatttttatttttc
661  atctgactctttctcttggatttggtttcttcttaatacagAAAAGCGTGAATGAGATTAT
M 1
721  GATGGAGTCGAAAGGTGGTAAAAAGAAGTCCAGCAGTAGTAGTTCCTTATTTACGAAGC
MESKGGGKKKSSSSSSSLFYE A 21
781  TCCCTCGGTTACAGCATTGAAGACGTTCCGTCACACGGTGAATCAAGAAATCAAAATC
PLGYSIEDVRPNGGIKKFKS 41
841  TCTGTCTACTCAAAGctgagtttctctataatgctatactgattcttcaatctcta
SVYSN 46
901  tggttaccattatgtagtctctctttaaactatgttttggttttgttgagCTCCAAK
TCSK 49
961  AGGCCATCCTGAGTACCAGCGTGCACCGATCTTCATAATATAGTTATAGCTTCTTTACT
RPS* 52
1021  TTCCAGTTTATAATTTTCTTCTTCAAAAGCTCCTTTCTGCTGGTTCCCGGATCCAATCG
1081  TTCTCTCTCTACTACAAGTCTGTCGCTCACACAACAGGCGAGATGGCCTTATCTGC
MALS A 5
1141  AATCGGTTTCGAAGTTACGAGAAACGGCTCGAGGTGACTTCTTTGAGCCCAAGCATCTT
IGFEGYEKRLLEVTFEFEPSIF 25
1201  TCAAGACTCAAGGGACTGGGACTCCGTGCTGACCAAGTCCAGCTTGATGAAATCT
QDSKGLGLRLRALTKSQLEIDL 45
1261  TACACTGTGCATGCAGATCGTTTCTCTTCCAAGCATCAATGGACTCTTAGCT
TPAACTIVSSLSNDQLDSYV 65
1321  ACTCTGAGTCCAGCTTCTTTGCTACCCTACAAAGTCTCATCAAGACTGCGGTAC
LSESSFVVPYKVIKTCGT 85
1381  CACTAAGCTCCTCTCTATCCACCAGCTTCTAAGCTGGCTGGTGGCTCTCTGAGT
TKLLLSIFPLKLAGELSL 105
1441  TGTCAGCTGTGGAAGTACACTGCGGGCTCTCTCTGCCCCGGAGGCCAGCCTTTTCC
VKSVKYTRGSLFLCPGGQPFP 125
1501  TCACCCGAGCTTCTCTGAAGAGTCTCTGTTCTTGATGGGCACTTTACTCAGCTGGCCTT
HRSFSEEVSVLDGHHFTQLGL 145
1561  GAACAGCTAGCCTTGTGAGGCAATGATGAGACTAAGAAATGGCATGCTATGC
NSVAYLMGNDDETCKWHVYA 165
1621  TGCCCTGCCAGGACTCCAGCACTGCAACAACAATGCTTACACTCTCGAGATGTGACT
ASAQDSSSNCNNNVYTLMECM 185
1681  GACTGGTCTGGACAGAGAAAGCTGCTGCTTCTACAAAGTGAAGTGAACAGACTGG
TGLDREKAAVIFYKDEADKTT 205
1741  GTCAATGACTGATAACTCTGGAATCAGAAAGATCTTCCAAAGTCTGAGATCTGCCACTT
SMTDNSGIRKILPKSEICDF 225
1801  TGAATTCGAGCCCTGCGGCTACTCTATGAAGTCAATGAAGGGATGCAATCTCCAGAT
EFEPCCGYSMNSIEGDAIST I 245
1861  CCATGTGACCCCTGAAGATGGGTTAGCTAGCTAGCTTTCGAAGCTGTGGGTTACGACTT
HVTPEDEGFSAFSAFVGYDF 265
1921  CAACACCTTGACCTTAGCCAGCTGGTGAAGGGTCTCTCTTGTCTCGAGCCCAAGCA
NTLDLSQLVTRVLSCFEPKQ 285
1981  ATTCCTGTAGCTGTGCATCGAGCGTTGGAGGAACTCATACAAGCCAGAGATTAAGTGT
FSVAVHSSSVGANASYKPEITV 305
2041  AGACTTGAAGACTATGGTGCAGAGAGGACTTTGAGTCTTAGGAGAAGAGAGTGG
DLEDYGCRRERTFESLGEESG 325
2101  AACAGTGATGATCAGACGTTTGAGAAGCTTGGTAAGTACTGTGGATCGCTAGATCTAC
TVMYQTFEKLGLGKYCGSPRST 345
2161  CTTGAAGTGAATGGAGCAGCAACAATAGCTGACAGCAGGAGGAGAGAGGAGGAGG
LKCEWSSSNNSSCSSEDEKDES 365
2221  AATCTAGCAGAATTTTCTCTAATAACTATTTTCGAGCTTCTGTTTTTGTCTTTCT
I* 366
2281  TTTTAAAAAATTTATTAAGTCTTATGAATAAGTACTTGTGAAGTTGAGTCTGCTCCT
2341  TCACAAGCAAGTTGATTTGGTGTCTTACTTTATGAATAGGGTTTATATA
    
```

## 3.7. Estudios de expresión de SAMdC en plantas de guisante.

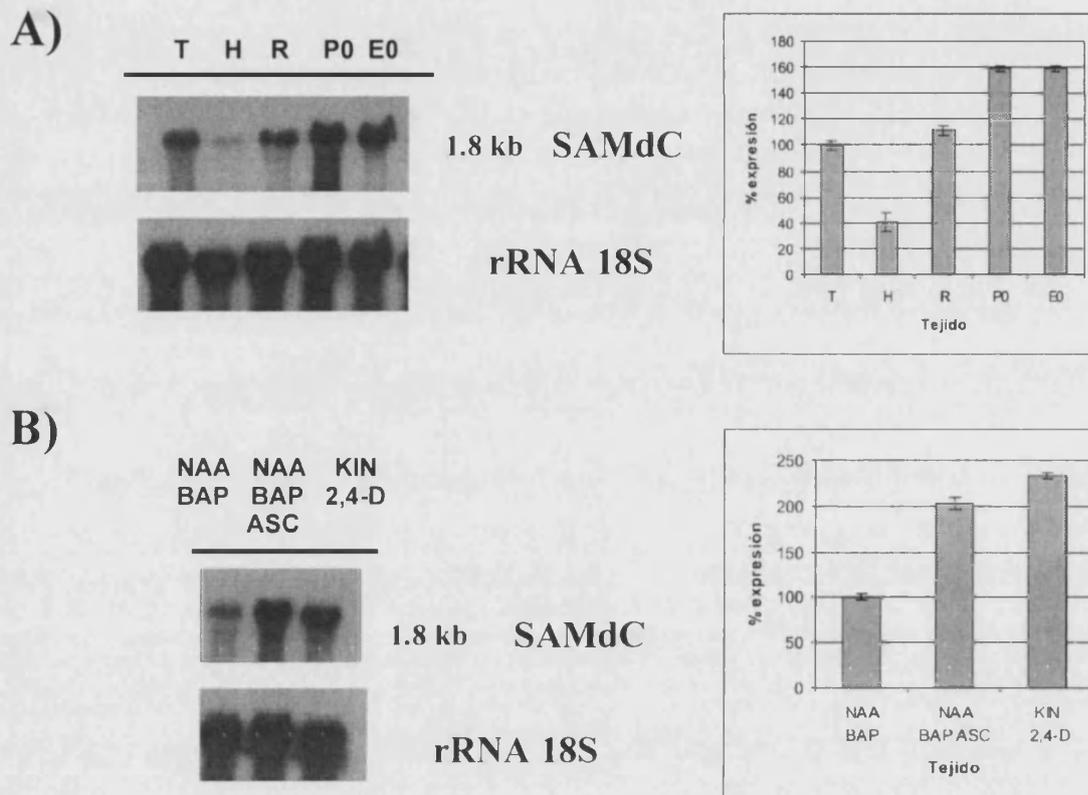
### 3.7.1. Análisis de la expresión de SAMdC en tejidos de guisante.

Se examinó el patrón de niveles de mRNA de SAMdC en diferentes tejidos de la planta mediante análisis Northern. La hibridación con el cDNA de SAMdC de guisante dio como resultado una única señal de aproximadamente 1.8 Kb, resultado esperado por el tamaño del cDNA. Se encontraron niveles detectables de transcrito de SAMdC en todos los tejidos analizados, observándose su nivel más alto en ovarios en día de antesis, tanto polinizados como emasculados, siendo su expresión aproximadamente un 50% más elevada que la observada en raíces y tallos. La expresión mas baja se detectó en hojas adultas, donde se observa una disminución del 60% con respecto a la expresión en tallos (Figura 3.8 A).

La expresión de SAMdC se examinó también en tejido indiferenciado, observándose que los niveles del mRNA de la SAMdC en callos respondieron a las hormonas utilizadas en el medio de cultivo. El crecimiento de los callos en presencia de 2,4-D y K resultó en un incremento de 2.3 veces de la expresión de SAMdC con respecto al crecimiento en BAP y NAA. La adición de ascorbato al medio también tuvo un efecto inductor de la expresión de SAMdC, duplicando el nivel de expresión. (Figura 3.8 B)

---

**Figura 3.7 Esquema del clon genómico de la SAMdC de *Arabidopsis*.** Se muestran las secuencias de la región promotora (panel izquierdo) con la putativa caja TATA señalada con un cuadrado gris, así como la secuencia genómica del gen de SAMdC (panel izquierdo) donde se indican con letra minúscula las secuencias intrónicas, representadas en la figura superior como cajas grises. Se indican también la secuencia aminoacídica de SAMdC, así como la putativa secuencia polipeptídica conservada de la región 5'.



**Figura 3.8 Patrón de expresión de SAMdC en tejidos de guisante** A) Tejidos de planta adulta. B) Callos crecidos con diferentes hormonas en el medio de cultivo. Se cargaron 15 µg de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de SAMdC de guisante. Para cada caso se muestran también los niveles de rRNA 18S en el panel inferior. A la derecha se indican las cuantificaciones de la expresión normalizadas frente a hibridación con sonda rDNA 18S y expresada en % expresión con respecto a la observada en tallos en (A) y en callos crecidos con NAA y BAP en (B). Las barras de error representan el error de medida dado por el Instantimager. T, tallo; H, hoja; R, raíz; PO ovarios polinizados en día de antesis; EO ovarios emasculados en día de antesis.

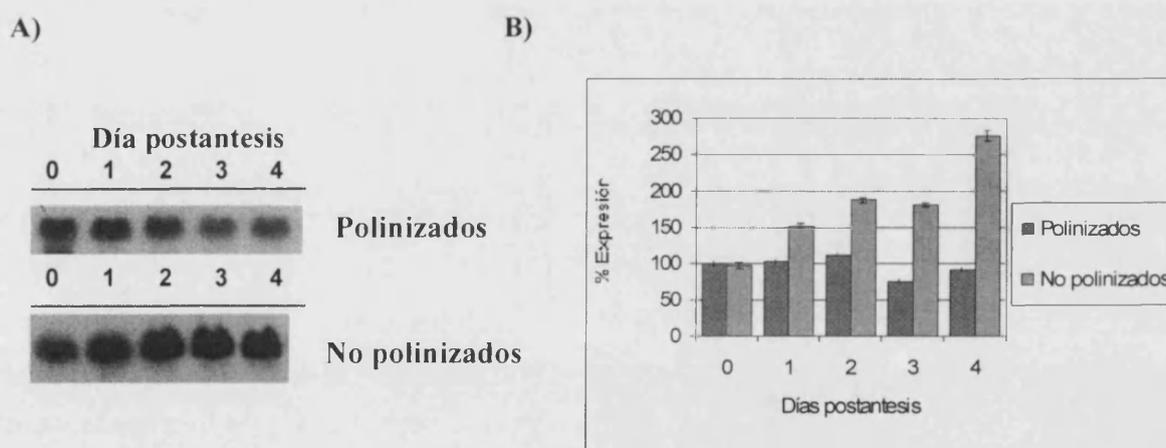
**3.7.2. Análisis de la expresión de la SAMdC durante el desarrollo y senescencia del fruto de guisante.**

Se examinó la variación de la expresión de la SAMdC durante el desarrollo de ovarios de guisante polinizados de manera natural, observándose un aumento transitorio de los niveles de SAMdC durante las primeras 24h después de la antesis, decayendo posteriormente a los dos primeros días postantesis (figura 3.9). La emasculación de las

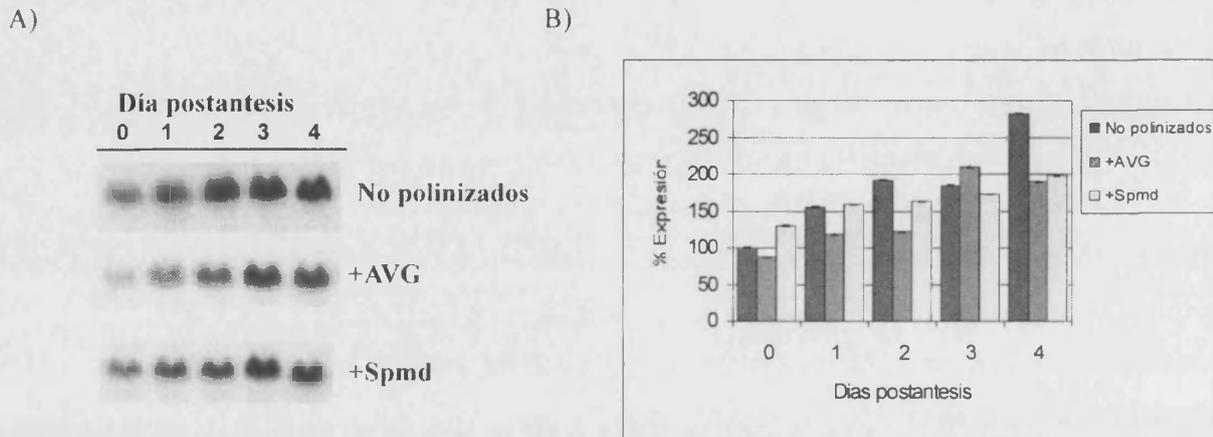
flores dio lugar a un aumento de los niveles de transcrito de la SAMdC a partir del equivalente al primer día postantesis, observándose niveles máximos en el cuarto día postantesis, cuando los ovarios han entrado en senescencia, donde el transcrito de la SAMdC llega a ser 2.6 veces mayor que el observado en día de antesis.

La aplicación de AVG, un inhibidor de la biosíntesis del etileno (Sato y Yang, 1989) en ovarios emasculados en el día de antesis retrasa su entrada en senescencia y produce una disminución en los niveles de transcrito de la SAMdC con respecto a los niveles observados en ovarios emasculados no tratados, llegando a observarse una reducción del 32% al cuarto día postantesis (Figura 3.10). Por otro lado, el tratamiento con espermidina también retrasa la entrada en senescencia del ovario emasculado (Gómez-Gómez, 1996) y tiene un efecto de disminución en los niveles de transcrito de la SAMdC, que se hace más evidente en el día cuarto postantesis, con una disminución del 30% respecto a ovarios emasculados no tratados (Figura 3.10).

La expresión de la SAMdC fue también analizada durante el desarrollo de frutos partenocárpicos obtenidos a partir del tratamiento de ovarios emasculados con

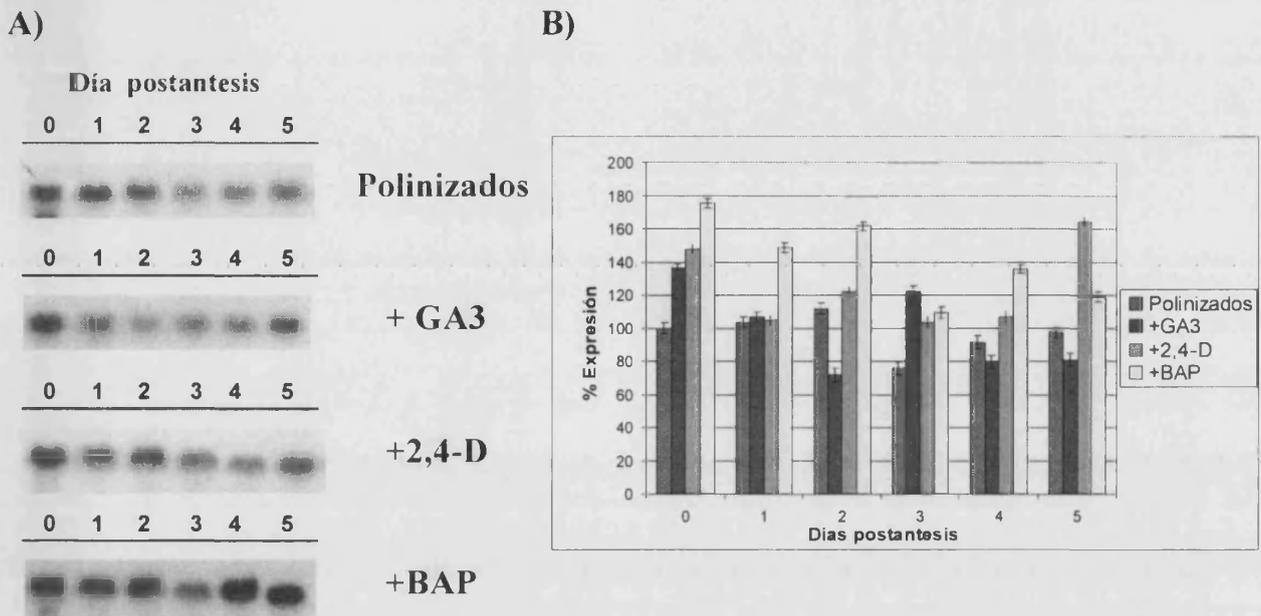


**Figura 3.9 Patrón de expresión de SAMdC durante el desarrollo de ovarios polinizados y no polinizados de guisante.** A) Análisis Northern. Se cargaron 15  $\mu$ g de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de SAMdC de guisante. B) Cuantificación de la expresión normalizada frente a hibridación con sonda rDNA 18S y expresada en % expresión con respecto a la observada en ovarios polinizados en día de antesis. Las barras de error representan el error de medida dado por el Instantimager.



**Figura 3.10 Efecto del tratamiento con AVG y espermidina en la expresión de la SAMdC en ovarios no polinizados de guisante.** A) Análisis Northern de los niveles del transcrito de SAMdC en ovarios no polinizados sin tratar o tratados con AVG o espermidina (Spmid). El tratamiento se realizó el día de antesis. Se cargaron 15 µg de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de SAMdC de guisante. B) Cuantificación de la expresión normalizada frente a hibridación con sonda rDNA 18S y expresada en % expresión con respecto a la observada en ovarios no polinizados sin tratar en día de antesis. Las barras de error representan el error de medida dado por el Instantimager.

diferentes reguladores del crecimiento. Si bien los tratamientos con GA<sub>3</sub>, 2,4-D y BAP son capaces de inducir el desarrollo partenocárpico del fruto, sus efectos sobre la expresión del nivel de los mensajeros de la SAMdC son diferentes.(Figura 3.11). Un efecto general observado es un aumento transitorio en los niveles de mensajeros de la SAMdC tras el tratamiento hormonal, así como el mantenimiento de niveles de expresión elevados a lo largo del desarrollo de los ovarios partenocárpico, al menos en el caso de los tratamientos con 2,4-D y BAP. El tratamiento con GA3 reprodujo parcialmente el patrón de expresión observado para ovarios polinizados aunque con la diferencia de un máximo de expresión al tercer día postantesis. Por otro lado, el tratamiento con 2,4-D produce un patrón de expresión de la SAMdC con niveles similares de expresión a los observados en polinizados hasta el tercer día postantesis, a partir del cual se observa un aumento que tiene su máximo en el quinto día postantesis. En el caso de ovarios tratados con BAP se observa el mantenimiento de niveles de expresión elevados con mínimos de expresión al tercer y quinto día postantesis. En cualquier caso, la expresión de los mRNA de la SAMdC durante el desarrollo del fruto nunca llegó a alcanzar los



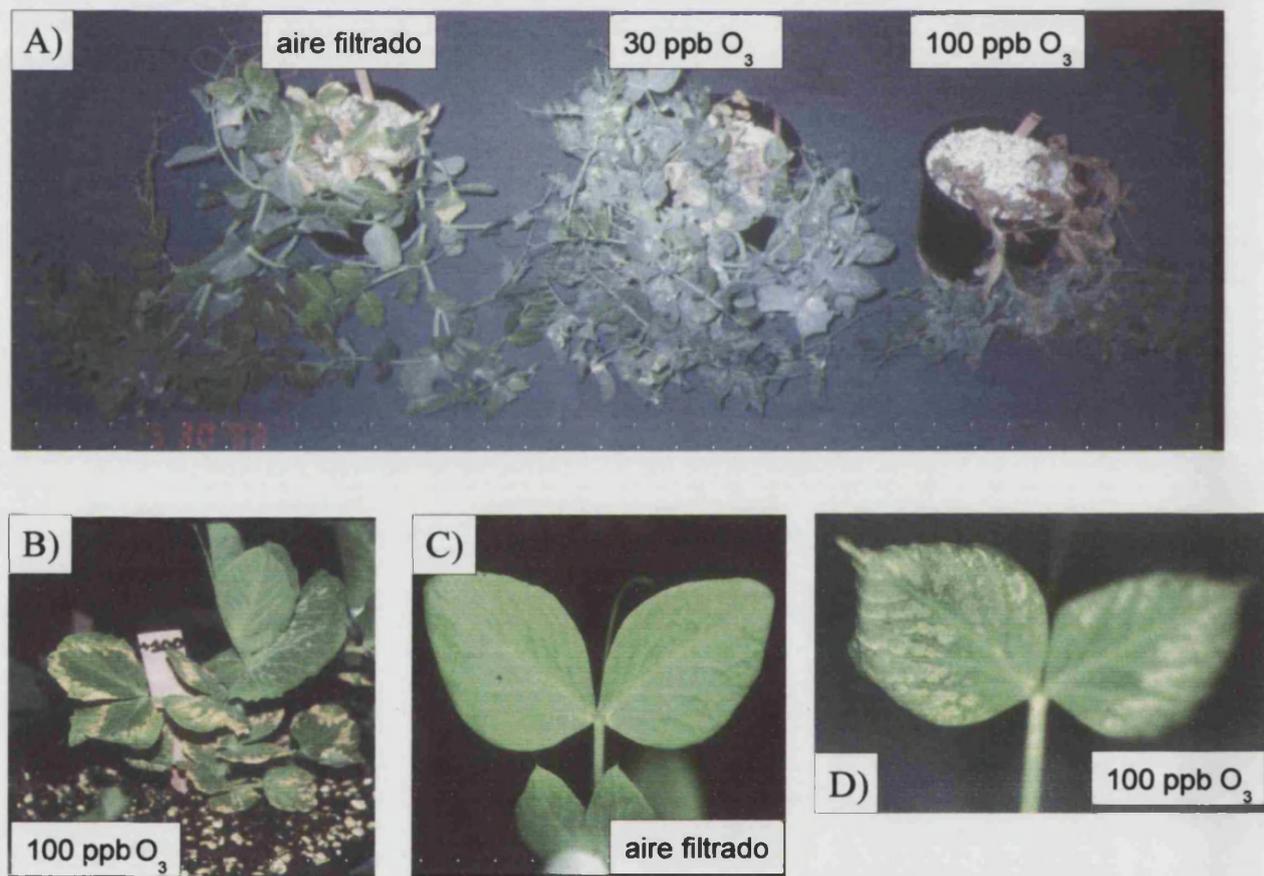
**Figura 3.11 Patrón de expresión de la SAMdC durante el desarrollo de ovarios polinizados y partenocárpicos de guisante.** A) Análisis Northern de los niveles del transcrito de la SAMdC en ovarios polinizados y ovarios no polinizados tratados con 2,4-D, GA<sub>3</sub> o BAP. Se cargaron 15 µg de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de SAMdC de guisante. B) Cuantificación de la expresión normalizada frente a hibridación con sonda rDNA 18S y expresada en % expresión con respecto a la observada en ovarios polinizados en día de antesis. Las barras de error representan el error de medida dado por el Instantimager.

niveles observados en ovarios senescentes, que llegan a ser hasta 1.7 veces más elevados al día cuarto postantesis.

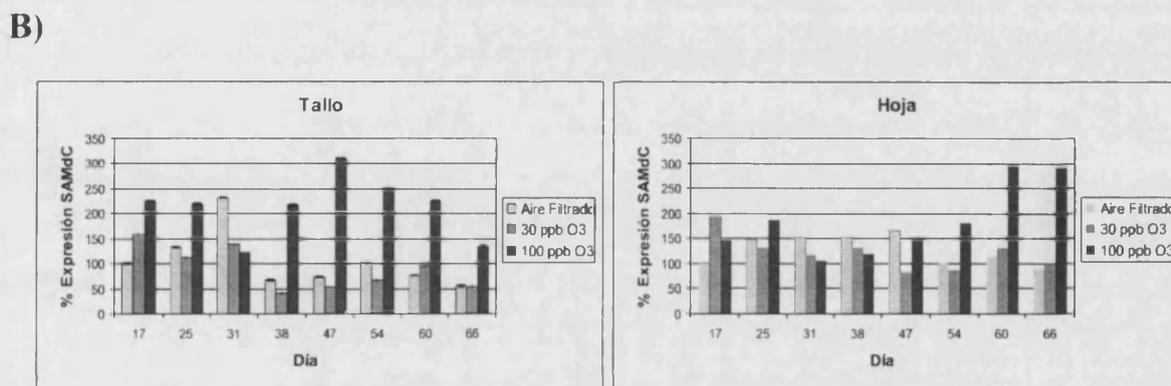
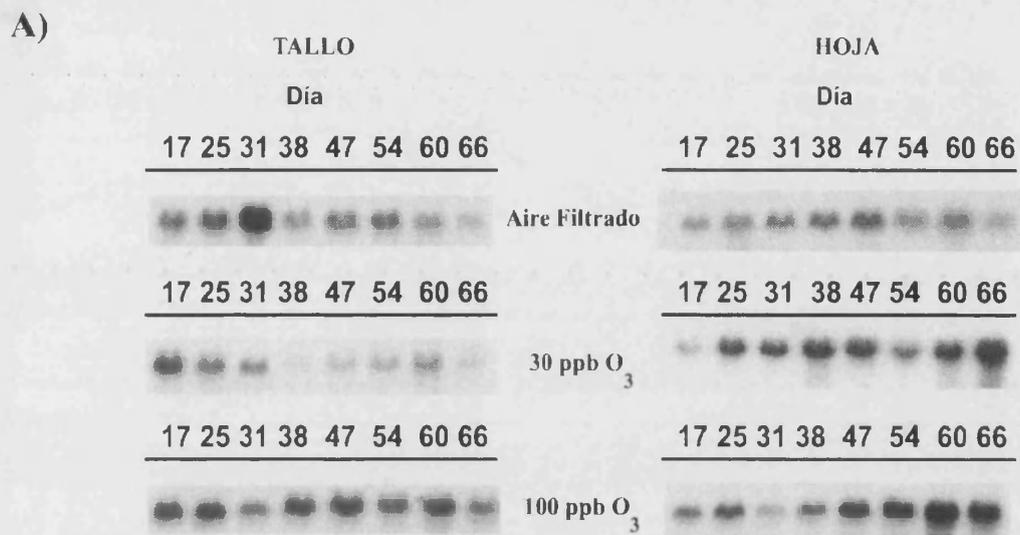
### 3.7.3. Análisis de la expresión de SAMdC y otras enzimas de la ruta biosintética de poliaminas en respuesta al tratamiento con ozono.

Se crecieron plantas de guisante en una finca experimental, sometiéndolas a una exposición diaria a diferentes concentraciones de ozono durante un periodo de dos meses. El tratamiento con ozono causó un retraso en general en el desarrollo de las plantas, un tamaño más reducido, así como síntomas necróticos en tallo y hojas (Figura 3.12). Se examinaron los niveles de expresión de SAMdC en hojas y tallos mediante análisis Northern (Figura 3.13).

La exposición a ozono produjo un aumento de la expresión de SAMdC en tallos de plantas expuestas a dosis de 100 ppb durante todo el periodo de tratamiento, resultado no observado a una dosis de 30 ppb, que muestra un patrón de expresión



**Figura 3.12** Efectos de la exposición a ozono en plantas de guisante. A) Plantas de guisante de 66 días, crecidas en aire filtrado o fumigadas diariamente durante 6 h con 30 ó 100 ppb de O<sub>3</sub>. B) Detalle de planta crecida a 100 ppb de O<sub>3</sub>, mostrando síntomas necróticos en hojas C) Detalle de hoja de planta crecida en aire filtrado D) Detalle de hoja de planta crecida en ambiente con 100 ppb O<sub>3</sub>, con síntomas necróticos.



**Figura 3.13 Efecto de la exposición a ozono en el patrón de expresión de SAMdC.** A) Análisis Northern de los niveles de transcrito de SAMdC en tallos y hojas de plantas crecidas en aire filtrado o expuestas diariamente durante 6 h a dosis de 30 o 100 ppb de ozono. Se cargaron 15 µg de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de SAMdC de guisante. B) Cuantificación de la expresión normalizada frente a hibridación con sonda rDNA 18S y expresada en % expresión con respecto a la observada en tallo o hoja crecida en aire filtrado 17 días. Las barras de error representan el error de medida dado por el Instantimager.

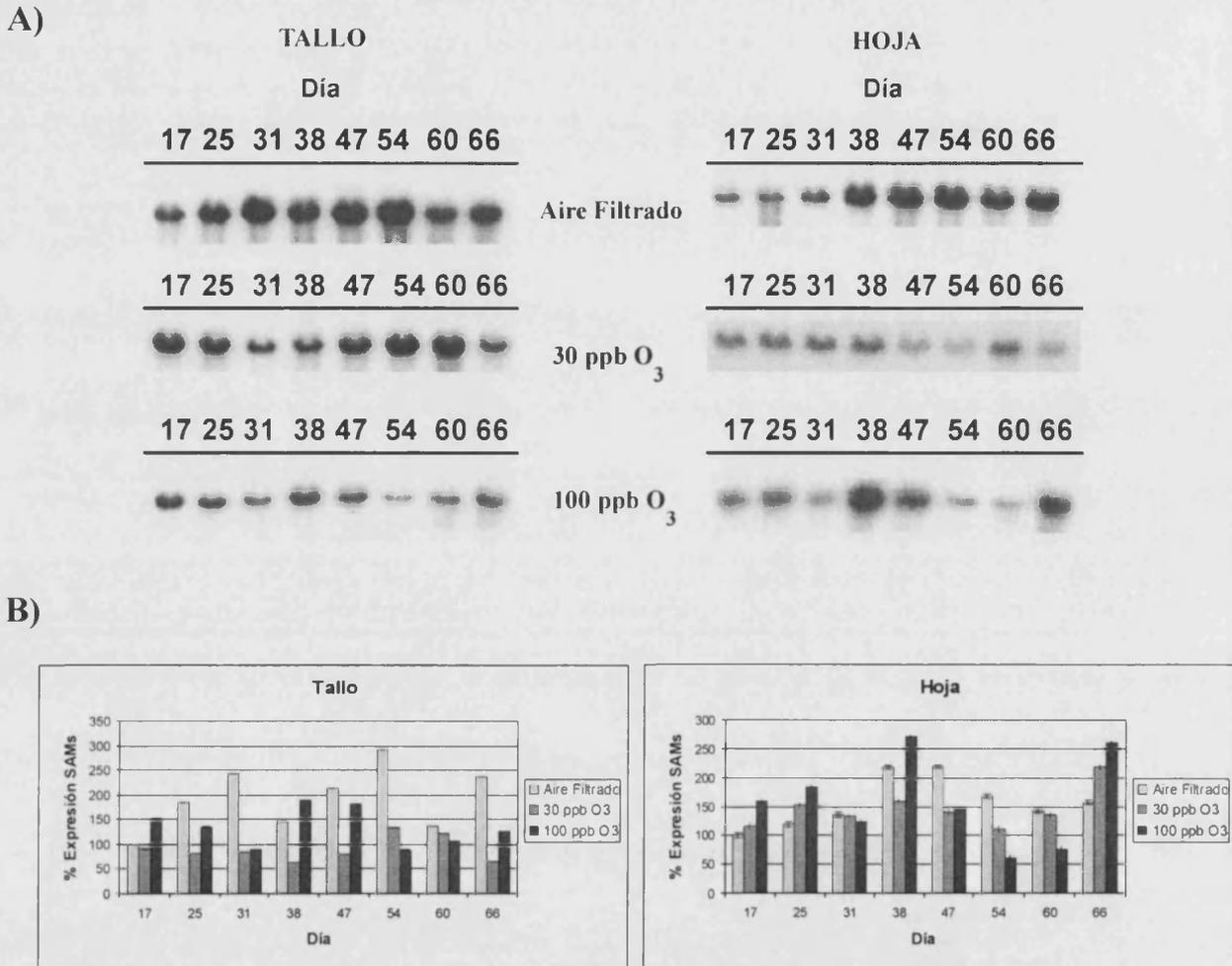


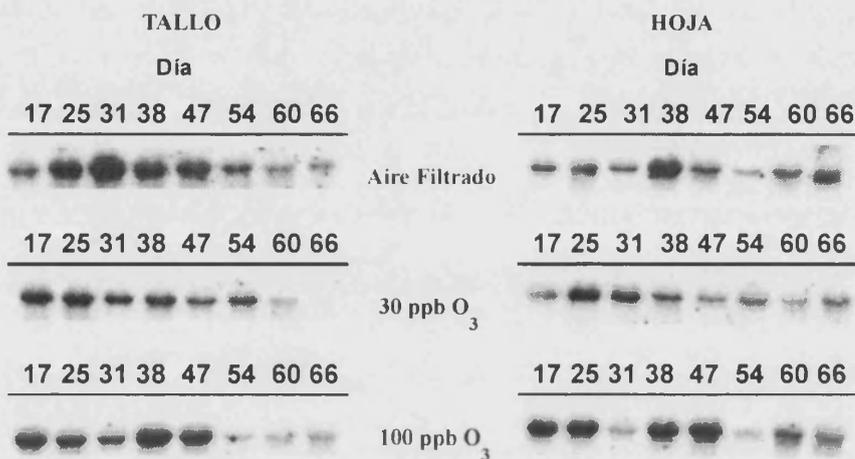
Figura 3.14 Efecto de la exposición a ozono en el patrón de expresión de SAMs. A) Análisis Northern de los niveles de transcrito de SAMs en tallos y hojas de plantas crecidas en aire filtrado o expuestas diariamente durante 6 h a dosis de 30 o 100 ppb de ozono. Se cargaron 15 µg de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de SAMs de guisante. B) Cuantificación de la expresión normalizada frente a hibridación con sonda rDNA 18S y expresada en % expresión con respecto a la observada tallo o hoja crecida en aire filtrado 17 días. Las barras de error representan el error de medida dado por el Instantimager.

similar al obtenido para plantas crecidas en atmósfera de aire filtrado. Las diferencias van aumentando a lo largo del tratamiento, llegando a ser máximas al mes de tratamiento, observándose niveles de expresión de SAMdC 3.2 veces más elevados en la exposición a 100 ppb de ozono. Los niveles decaen posteriormente en las tres semanas siguientes, reduciéndose las diferencias a 2.5 veces. El análisis Northern de hojas muestra también un aumento de expresión en atmósfera de 100 ppb de ozono aunque a tiempos de crecimiento en dicha atmósfera mucho más prolongados, observándose diferencias a partir de la sexta semana y llegando a un valor máximo en la octava semana de tratamiento, con niveles de expresión 3.3 veces más elevados en la máxima dosis de ozono (Figura 3.13 B).

Posteriormente se observó la variación de la expresión de otros cDNAs que codificaban para enzimas implicados en la biosíntesis de poliaminas disponibles en guisante. El patrón de expresión de la SAMs (Gómez-Gómez y Carrasco, 1996) muestra un comportamiento diferente al observado para la SAMdC (Figura 3.14). Las diferencias en dosis también producen en el caso de SAMs diferencias en los niveles de transcrito. Así, la exposición a la dosis de 30 ppb produce en general que los niveles de expresión se mantengan bajos en tallos, en comparación a los observados en tallos de plantas crecidas en aire sin ozono, mientras que la dosis de 100 ppb mantiene unos niveles más elevados. Los niveles de expresión observados en hojas presentan menores diferencias entre tratamientos, presentando un máximo de expresión a la cuarta y octava semana de tratamiento a 100 ppb.

Los niveles de mRNA de la ADC (Pérez-Amador y col, 1995) se vieron afectados por el tratamiento con ozono en forma diferente según el tejido y el estado de desarrollo (Figura 3.15). Independientemente del tratamiento se observó una disminución en los niveles de mRNA del tallo durante el crecimiento de la planta. Sin embargo, las plantas de 38 y 47 días y tratadas con 100 ppb mostraron unos niveles de mRNA considerablemente altos. Por otra parte, las hojas jóvenes fueron más sensibles a una concentración de ozono de 100 ppb. Las diferencias más evidentes entre tratamientos se observan a los 17 días, con una expresión más elevada en 100 ppb, que va disminuyendo en las semanas posteriores, recuperándose ligeramente en las dos últimas. El tratamiento con 30 ppb produjo una bajada mucho menos pronunciada en los niveles de mensajero de ADC, mientras que en aire filtrado los niveles se mantienen

A)



B)

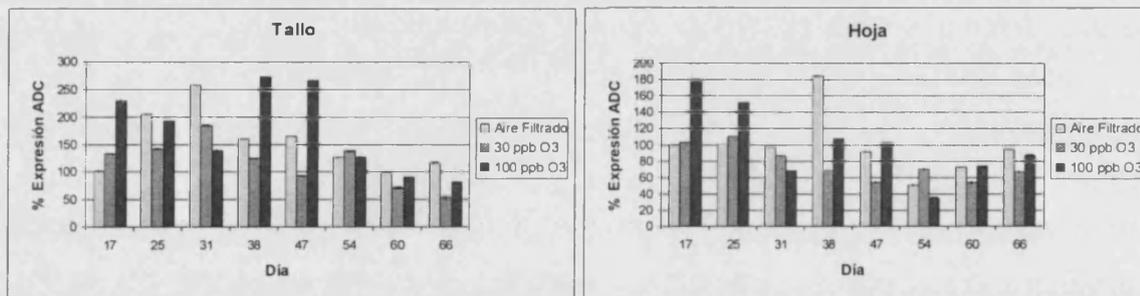


Figura 3.15 Efecto de la exposición a ozono en el patrón de expresión de ADC. A) Análisis Northern de los niveles de transcrito de ADC en tallos y hojas de plantas crecidas en aire filtrado o expuestas diariamente durante 6 h a dosis de 30 o 100 ppb de ozono. Se cargaron 15 µg de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de ADC de guisante. B) Cuantificación de la expresión normalizada frente a hibridación con sonda rDNA 18S y expresada en % expresión con respecto a la observada tallo o hoja crecida en aire filtrado 17 días. Las barras de error representan el error de medida dado por el Instantimager.

constantes las tres primeras semanas, aumentan en la cuarta, disminuyendo durante el resto del tratamiento, con una ligera subida en las dos últimas semanas.

### 3.8. Análisis de la expresión de SAMdC en tejidos de *Arabidopsis*

Se realizó un análisis Northern similar al efectuado en plantas de guisante, examinándose el patrón de niveles de mRNA de SAMdC en diferentes tejidos de la planta mediante la hibridación con el cDNA de SAMdC de *Arabidopsis*. Se obtuvo como resultado una única señal de aproximadamente 1.8 Kb, resultado esperado por el tamaño del cDNA, encontrándose niveles detectables de transcrito de SAMdC en todos los tejidos analizados. La expresión más elevada se observa en silicuas y tallos, con niveles de transcrito similares para ambos. La expresión más baja se detectó en brotes florales y hojas adultas, siendo un 64 y 87% más bajas que la observada en tallos, respectivamente, mientras que la expresión en raíz presentó un 22% menos de expresión que en tallos. (Figura 3.16).

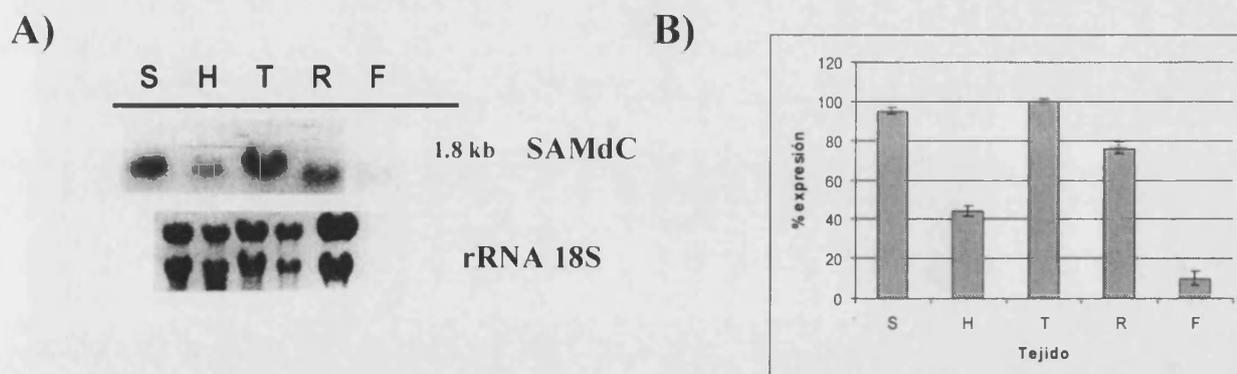


Figura 3.16 Análisis Northern del patrón de expresión de SAMdC en varios tejidos de planta adulta de *Arabidopsis*. Se cargaron 5  $\mu$ g de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de SAMdC de *Arabidopsis*. Se muestran también los niveles de rRNA 18S en el panel inferior. A la derecha se indican las cuantificaciones de la expresión normalizadas frente a hibridación con sonda rDNA 18S y expresada en % expresión con respecto a la observada en tallos. T, tallo; H, hoja; R, raíz; S, Silicuas; F, flor.

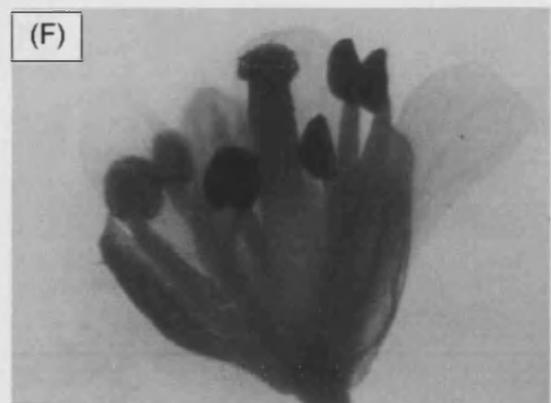
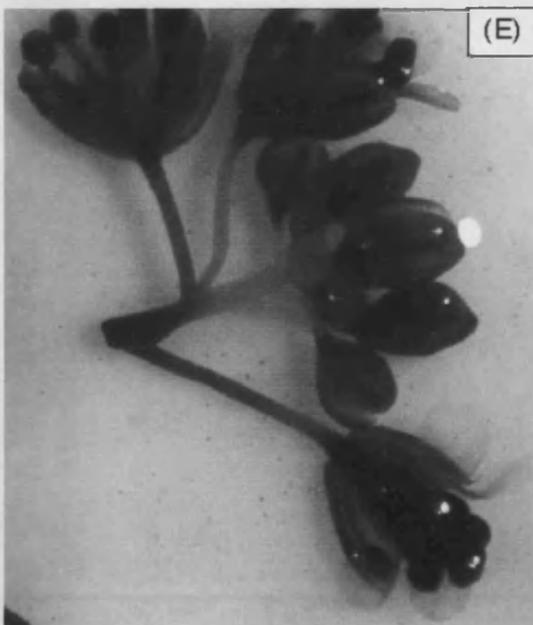
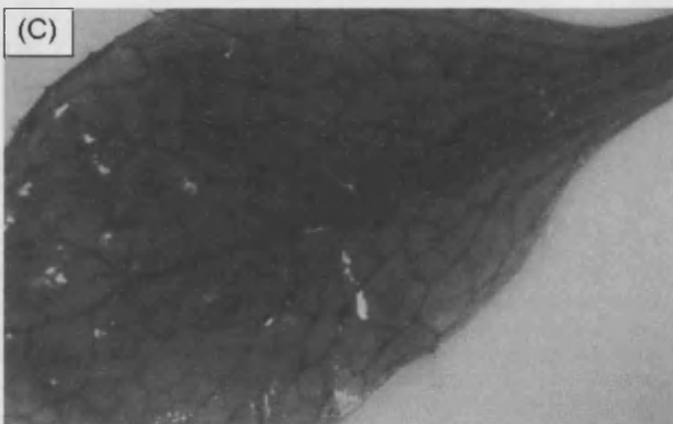
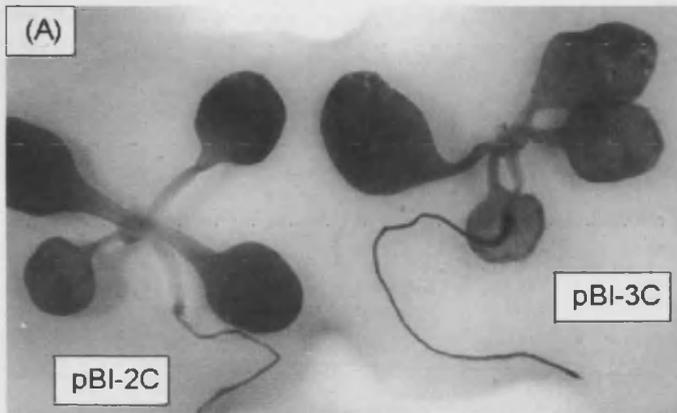
### 3.8.1. Estudio de la expresión de SAMdC en plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

Con el fin de estudiar el patrón de expresión del gen de SAMdC se realizaron fusiones de la región promotora aislada en el clon genómico al gen informador GUS (Figura 2.3). Dichas construcciones fueron utilizadas posteriormente para la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis*. La realización de estas fusiones perseguía dos objetivos, por un lado el intentar discernir qué elementos de la región promotora son importantes para la expresión del gen, y por otro el posible efecto de la presencia de la región 5' no traducible, a la cual se atribuye una función reguladora. Con este objetivo se realizaron deleciones unidireccionales a partir del extremo 5' de dicha región, y que incluyeran o no las 1100 pb correspondientes al extremo 5' del cDNA y los intrones presentes (Figura 2.2). De cada construcción se seleccionaron al menos tres líneas transgénicas independientes con una única inserción de la construcción en el genoma de la planta y homocigotas para la misma.

Con las plantas transgénicas obtenidas se realizaron ensayos de tinción histoquímica al objeto de determinar el patrón de expresión espacial del gen, observándose como resultado una expresión generalizada del mismo en todos los tejidos de la planta (Figura 3.17). Este patrón se observa en plántulas jóvenes, que muestran una tinción generalizada, tanto en hojas como raíces (Figuras 3.17 A, B), y se mantiene a lo largo del desarrollo de la planta, observándose en hojas adultas aunque en menor grado que en hojas de plántulas y preferentemente en tejido vascular (Figura 3.17 C). Se observa expresión en toda la extensión de la raíz (Figura 3.17 D), así como en tallos y silicuas (datos no mostrados). Se detecta también en las diferentes partes de la flor, excepto en pétalos (Figuras 3.17 E, F). La deleción de la región promotora produce una desaparición generalizada de la expresión de GUS y tinción histoquímica en las plantas transformadas con las construcciones de tipo E y F (datos no mostrados), indicando la existencia de elementos responsables de esta expresión generalizada entre las

---

**Figura 3.17 Localización espacial de la expresión del gen GUS bajo el control del promotor de SAMdC.** A) Tinción histoquímica GUS en plántulas pBI-2C de dos semanas; B) Detalle de la expresión en la hoja de la plántula de dos semanas; C) Detalle de la expresión en hoja de la roseta de planta adulta; D) Expresión en raíces de planta adulta; E) Expresión en botones florales de planta adulta; F) Detalle de la expresión en flor. Se muestran los resultados obtenidos para plántulas pBI-2C y pBI-3C en el panel (A), así como para plántulas pBI-2C en el resto de paneles.



## RESULTADOS

---

posiciones -455 y -80 de la región promotora. La presencia de la región 5' no traducible del cDNA junto con los intrones no afecta cualitativamente al patrón de expresión espacial, observándose resultados similares de presencia generalizada de tinción GUS para los transformantes pBI-2C y pBI-3C (Figura 3.17 A), así como para las líneas pBI-2D y pBI-3D (datos no mostrados).

### 3.8.2. Efectos de la delección unidireccional del promotor

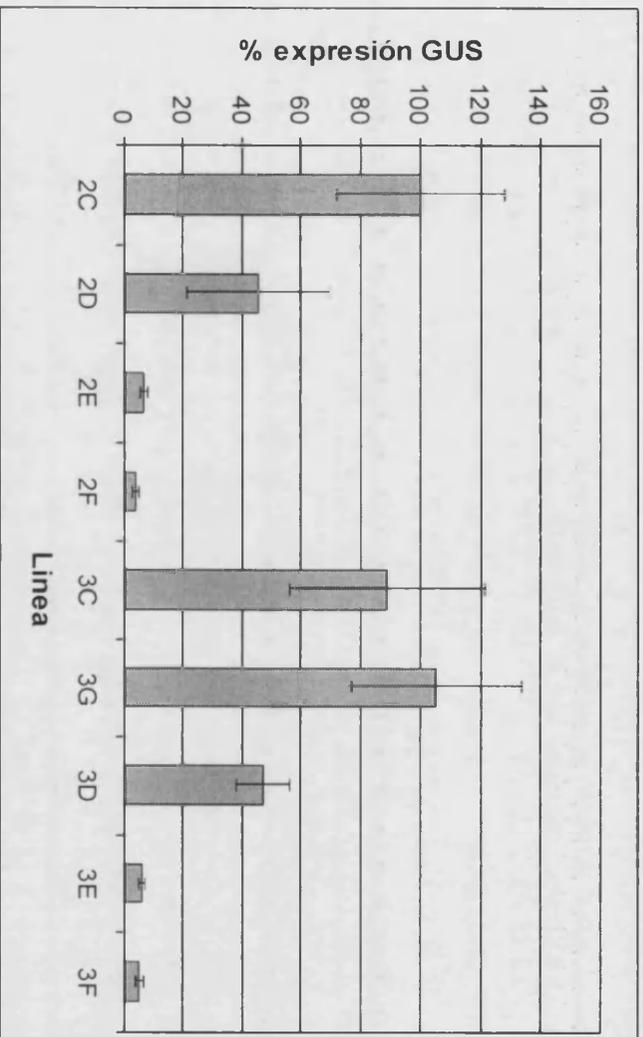
Por otro lado se comprobó la existencia del efecto cuantitativo de las delecciones del promotor en los niveles de actividad GUS, mediante un ensayo fluorimétrico, así como análisis Northern para el mensajero del gen, en al menos tres líneas transgénicas independientes para cada tipo de construcción. Los resultados se muestran en la figura 3.18.

En el análisis Northern y su cuantificación (Figura 3.18 A) se comprueba que la eliminación de la zona [-455 -80] del promotor produce una disminución drástica de la expresión del gen (construcciones pBI-2E y pBI-3E), tal y como se había observado en el ensayo histoquímico. Se observa también que la eliminación de la zona [-1200 -456] (transgénicas pBI-2D y pBI-3D) produce un efecto significativo en los niveles de expresión, reduciéndose en un 55% con respecto a la expresión de GUS observada en las líneas pBI-2C y pBI-3C, resultado que indica la posible existencia de elementos reguladores en la misma. El resultado obtenido con las líneas pBI-3G parece acotar esta zona a las posiciones [-1000 -456] dado que no se detectan diferencias significativas de los niveles de mensajero entre las líneas 3C y 3G. La presencia de la

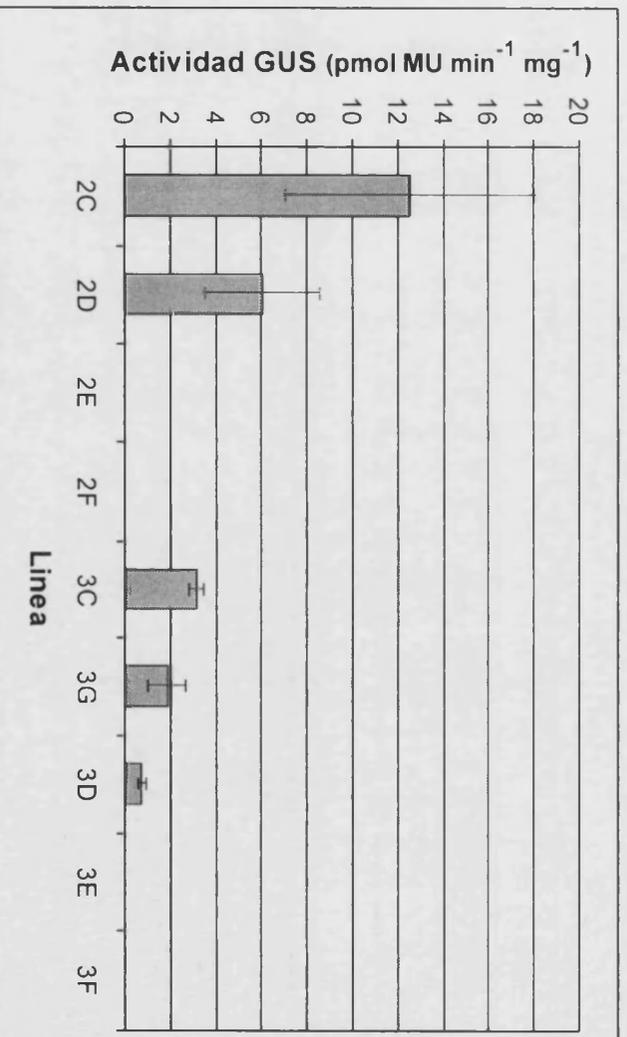
---

**Figura 3.18 Efectos de las delecciones unidireccionales de la región promotora y de la presencia de la región 5-UTR en los niveles de GUS de plantas transgénicas.** A) Analisis Northern de la expresión del mensajero de GUS de plantas transgénicas obtenidas mediante transformación con las construcciones indicadas en la figura 2.2. Para cada construcción se muestran tres líneas transgénicas independientes. Se cargaron 5 µg de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de GUS. En el gráfico se muestra la cuantificación de la señal obtenida en el Instantimager, normalizada acorde al nivel de 18S rRNA y referidas en % de expresión respecto a la observada en las plantas pBI-2C. B) Medida de actividad GUS de las plantas transgénicas. Para ambas gráficas, cada valor representa la media de la medida realizada al menos en tres líneas transgénicas independientes y las barras de error representan la desviación típica observada.

A)



B)



región 5' no traducible del gen no parece afectar a la expresión del gen , puesto que las transgénicas de tipo pBI-2C y pBI-3C presentan niveles de expresión similares, observándose la misma situación en los niveles de expresión GUS de las líneas pBI-2D y pBI-3D.

Los efectos de las deleciones se comprueban también en las correspondientes medidas de actividad GUS (Figura 3.18 B) , observándose una disminución de alrededor del 50% de actividad GUS en las transgénicas de tipo D con respecto a las de tipo C, y niveles de actividad no detectables para las transgénicas de tipo E y F, resultados que correlacionan con las variaciones observadas en los niveles del mensajero de GUS (Figura 3.18 A). Por otro lado, pese a tener niveles de expresión GUS similares, las líneas 2C y 2D presentaron niveles de actividad GUS 4 y 8 veces más elevadas que las líneas 3C y 3D, respectivamente, indicando que la presencia de la región 5' no traducible del gen de SAMdC podría tener un efecto a nivel postranscripcional y cuyo resultado, al menos en el caso de su fusión con GUS se traduce en niveles más elevados de actividad, que podría ser consecuencia de un efecto positivo ejercido por el extremo 5' sobre la traducción.

### **3.8.3. Efectos de la sobreexpresión de la SAMdC en plantas transgénicas de *Arabidopsis*.**

#### **3.8.3.1. Sobreexpresión constitutiva de la SAMdC**

Con el objeto de determinar qué efectos fenotípicos podría tener la alteración de la expresión de SAMdC se realizó una fusión del cDNA de la SAMdC con el promotor constitutivo CAMV35S en la construcción pBI-SAMdCSENSE (Figura 2.3), que fue utilizada en la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaran SAMdC.

Se obtuvieron un total de 22 transformantes cuya expresión de SAMdC fue analizada mediante análisis Northern (Figura 3.19), observándose en todas ellas la banda de 1.8 Kb correspondiente a los niveles endógenos del gen, así como para la



B)

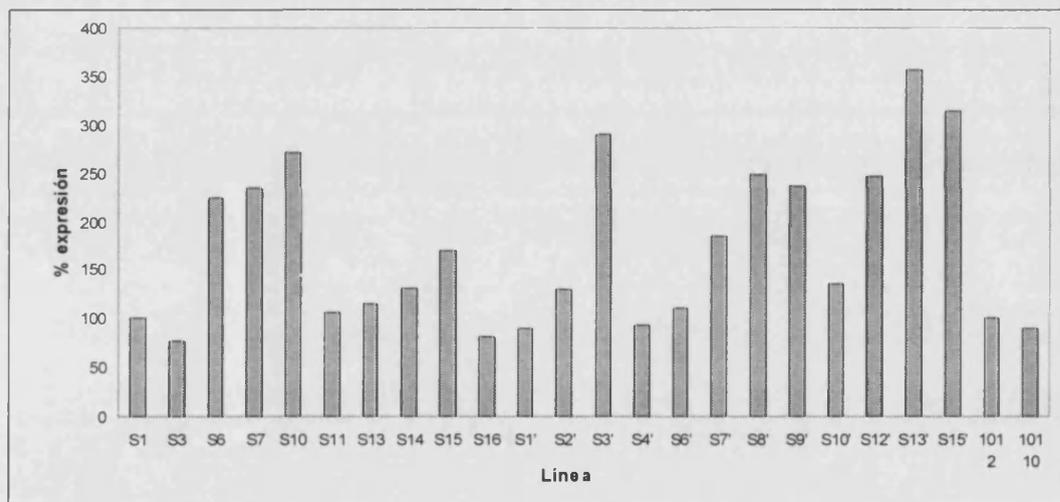


Figura 3.19 **Expresión de SAMdC en plantas transgénicas pBI-SAMDCSENSE.** A) Análisis Northern Se cargaron 5  $\mu$ g de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de la SAMdC de *Arabidopsis*. La banda superior corresponde al mensajero endógeno de SAMdC, mientras que la banda inferior corresponde al mensajero controlado por el promotor CAMV35S B) Cuantificación de la expresión normalizada acorde al nivel de 18S rRNA y referidas en % de expresión respecto a la observada en la línea pBI-101 2. Cada pocillo corresponde a una línea transgénica independiente, siendo las señaladas con S las obtenidas mediante transformación con la construcción pBI-SAMDCSENSE, mientras que las indicadas con 101 corresponden a plantas transformadas con vector pBI101.

## RESULTADOS

---

mayoría de ellos una banda adicional de un tamaño menor (1.1 Kb) correspondiente al cDNA insertado bajo el control del promotor constitutivo CAMV35S. Se observó una variación entre los niveles de expresión para cada línea transgénica examinada, existiendo líneas con un nivel de sobreexpresión del transgen de SAMdC elevado, con respecto al nivel endógeno de las plantas control (transformadas con el vector pBI101). Así, las líneas S13' y S15' presentaron incrementos de hasta 3.6 y 3.1 veces, respectivamente. En otras líneas, como S7' o S15, el incremento en la expresión rondaba alrededor de 1.7 veces. Por otro lado, otras líneas presentaron variaciones más pequeñas e incluso poco significativas con respecto al nivel de expresión de SAMdC observado en los controles, como es el caso de las líneas S1 y S6' (Figura 3.19).

En la mayoría de los transformantes con niveles elevados de expresión de SAMdC seleccionados pudo observarse que la sobreexpresión del gen de SAMdC produce efectos fenotípicos drásticos en las plantas cuando estas son crecidas *in vitro*, produciéndose un retraso en el desarrollo que se traduce en plantas de un tamaño menor y con raíces más cortas, al ser comparadas con plantas transgénicas obtenidas a partir del vector pBI101 (Figura 3.20 A). Este fenotipo se presentó de manera más acusada en los transformantes S6, S15, S3', S9' y S12', plantas con una parte aérea pequeña y poco desarrollo radicular (dos transformantes independientes se representan en la Figura 3.20A). Por otro lado, las líneas S10, S2', S6', S8', S13' y S15' presentaron un fenotipo intermedio, con tamaños de planta más cercano al de las plantas control, aunque con raíces más cortas. Las líneas S7 y S7', así como aquellas en las cuales no se observó un nivel alto de expresión del transgen (líneas S1, S3, S11, S13, S14, S16, S1', S4' y S10'), presentaron un tamaño y desarrollo similar al de las plantas control transformadas con el vector pBI101. Por otro lado, pese a estas alteraciones fenotípicas, las plantas sobrevivieron el posterior trasplante a tierra y fueron capaces de desarrollar

---

**Figura 3.20 Efectos fenotípicos de la sobreexpresión de SAMdC.** A) Aspecto de dos líneas transgénicas sobreexpresoras de SAMdC comparadas con plantas control, transformadas con vector pBI101. B) Efecto de la adición de espermidina (spd) y espermina (spm) 1 mM al medio de cultivo en plantas control. C) Comparación del aspecto de plantas control crecidas en presencia de espermidina y espermina 1 mM y plantas sobreexpresoras de SAMdC.

A)

101

S15

101

S6



B)

101  
1mM Spd/Spm

101



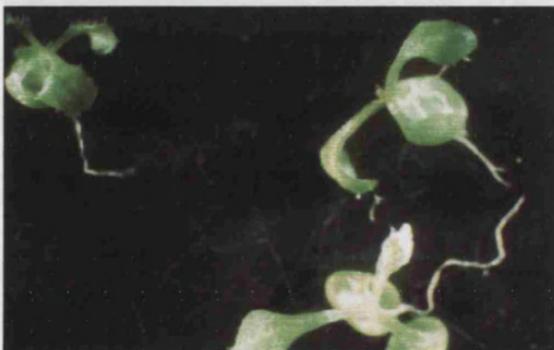
C)

101  
1mM Spd/Spm

S15

101  
1mM Spd/Spm

S6



plantas sin alteraciones fenotípicas evidentes, que dieron lugar a flores y silicuas normales, así como finalmente semillas fértiles. El fenotipo se reprodujo tanto en la generación T1, como en las posteriores T2 Y T3 donde se seleccionaron los individuos homocigotos.

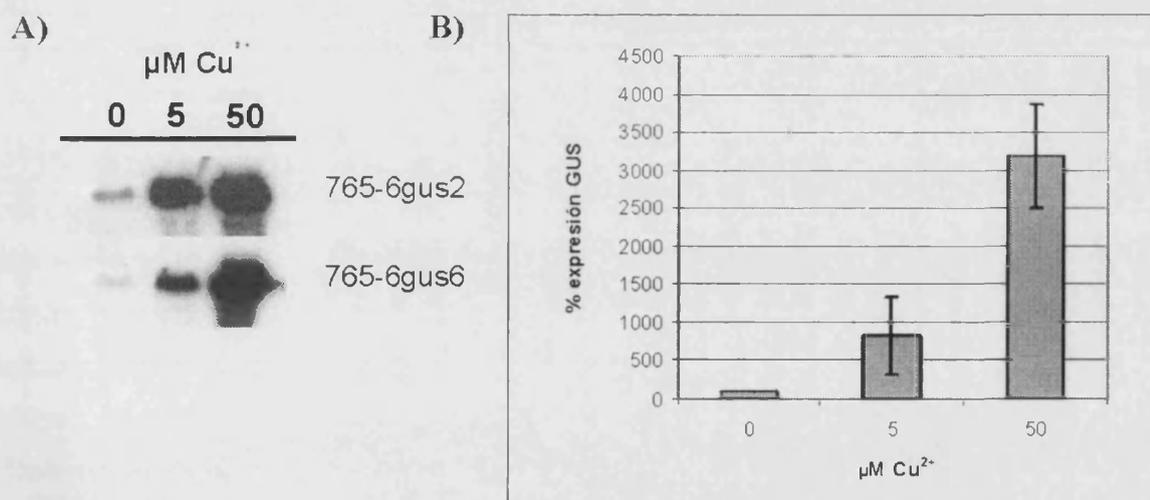
El fenotipo observado en las transgénicas sobreexpresoras puede ser reproducido mediante el crecimiento *in vitro* de plantas control en presencia de 1 mM de espermidina y espermina (Figura 3.20 B), obteniéndose plantas de menor tamaño y con un sistema radicular poco desarrollado, similares en aspecto al de las líneas transgénicas sobreexpresoras de SAMdC (Figura 3.20 C), resultado que podría sugerir la implicación de estas poliaminas en el fenotipo observado y la existencia de niveles elevados de estas poliaminas en las plantas sobreexpresoras de SAMdC obtenidas.

### 3.8.3.2. Sobreexpresión inducible de la SAMdC.

Se utilizó el sistema de inducción por cobre descrito por Mett y colaboradores (1993), para intentar la sobreexpresión inducible del cDNA de la SAMdC. Dicho sistema está basado en la sobreexpresión constitutiva del activador de transcripción de levadura ACE1, que necesita la presencia de cobre para poder unirse a sus secuencias diana, y que están presentes en el promotor al cual se fusiona el gen de interés (Figura 2.4). Este sistema ya había sido utilizado con éxito en tabaco (Mckenzie y col, 1998) y *Lotus corniculatus* (Mett y col, 1996), pero no existía bibliografía disponible acerca de su utilización en *Arabidopsis*. A efectos de comprobar la reproducibilidad del sistema en *Arabidopsis* se obtuvo la construcción p7656-6GUS, que contiene el gen informador GUS fusionado al promotor inducible (Figura 2.5 B), que fue utilizada posteriormente en la obtención de las correspondientes plantas transgénicas (líneas 765-6gus), así como de plantas control transformadas con el vector pPMB765 sin inserto (líneas 765).

Se obtuvieron 15 líneas transgénicas p765-6GUS, cuyas plantas presentaron un aspecto y desarrollo similar a las plantas control, transformadas con el vector pPMB765. Se seleccionaron 6 de ellas para la obtención de sus correspondientes individuos homocigotos con los que se realizaron estudios de inducción de GUS mediante crecimiento *in vitro* en presencia de concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  de 5 y 50  $\mu\text{M}$  durante dos semanas. El análisis Northern de la expresión de GUS para plántulas de dos líneas transgénicas 765-GUS, recogidas al finalizar este período se muestra en la figura 3.21 A.

En ausencia de cobre se observa un nivel basal de expresión del transgen, que aumenta en presencia de cobre de acuerdo a la concentración del metal añadido al medio de crecimiento. La posterior cuantificación de los niveles de transcrito para todas las líneas transgénicas da como resultado un promedio de inducción de 8.3 veces en presencia de  $0.5 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , mientras que la elevación de la concentración a  $50 \mu\text{M}$  aumenta los niveles de expresión 32 veces, resultados que indican la funcionalidad del sistema de inducción en *Arabidopsis*. El crecimiento a concentraciones más elevadas de cobre produjo síntomas cloróticos en las plantas, consecuencia del estrés oxidativo, llegando a la no germinación de las semillas a  $500 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ . Por ello, se comprobó la influencia de la presencia de cobre sobre la expresión de SAMdC, examinando mediante análisis Northern sus niveles de transcrito en plantas control 765 crecidas en presencia o ausencia de  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ . El resultado obtenido para tres líneas transgénicas independientes se observa en la figura 3.22 A).

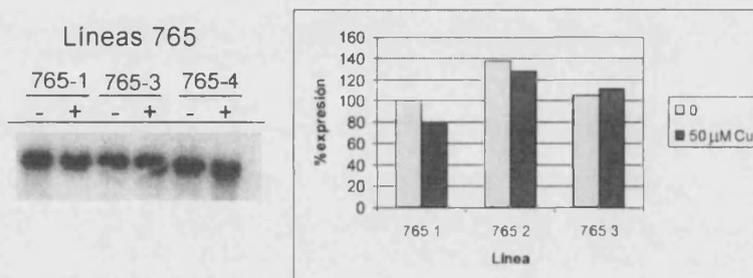


**Figura 3.21 Comprobación de la inducción de GUS en plantas transgénicas p765GUS mediante  $\text{Cu}^{2+}$ .** A) Análisis Northern de los niveles del transcrito de GUS en dos líneas transgénicas independientes obtenidas por transformación con la construcción p765GUS, crecidas *in vitro* en medio sin  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $5 \mu\text{M}$  y  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ . Se cargaron  $5 \mu\text{g}$  de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de GUS. B) Cuantificación de la expresión normalizada frente a hibridación con sonda rDNA 18S y expresada en % expresión con respecto a la observada en plantas crecidas en medio sin  $\text{Cu}^{2+}$ . Se representa la media de las cuantificaciones realizadas para 6 líneas transgénicas. Las barras de error representan la desviación típica.

## RESULTADOS

La adición de  $\text{Cu}^{2+}$  al medio tiene efectos diferentes dependiendo de cada línea, observándose tanto una disminución, que el caso de la línea 765 1 llega a ser de un 22%, como un ligero aumento del 5% en la línea 765 3. Estas variaciones sin embargo no llegan a ser más importantes que las que se producen si comparamos entre las plantas crecidas en ausencia de cobre, por lo que se concluyó que no eran significativas.

A)



B)

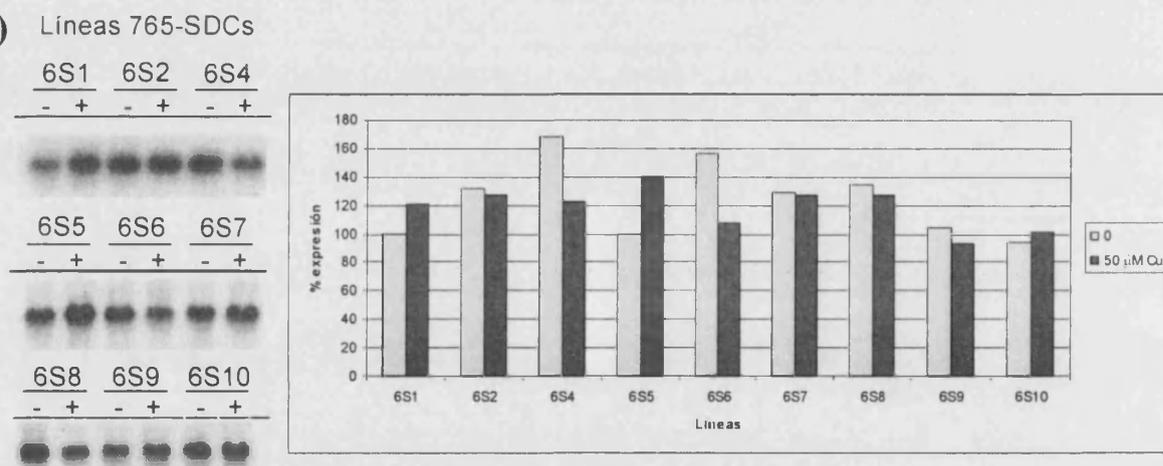


Figura 3.22 Efecto del crecimiento en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  en la expresión de SAMdC en líneas transgénicas 765 y 765SAMdCs. A) Análisis Northern de la expresión de SAMdC de plantas transformadas con el vector pPMB765. B) Análisis Northern de la expresión de SAMdC de plantas transformadas con el vector p765SAMDCs. Las plantas fueron crecidas *in vitro* durante dos semanas en presencia (+) o ausencia (-) de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ . Se cargaron 5  $\mu\text{g}$  de RNA por pocillo y se hibridó con el cDNA de SAMdC de *Arabidopsis*. Cada pocillo corresponde a una línea transgénica independiente. A la derecha se indican las cuantificaciones de la expresión realizadas normalizada frente a hibridación con sonda rDNA 18S y expresada en % expresión con respecto a la observada en plantas 765-1 en (A) y 6S1 en (B).

Comprobada la funcionalidad del sistema, y que la adición del cobre a las concentraciones empleadas no afectaba significativamente a los niveles endógenos de expresión de la SAMdC, se procedió a la obtención de las correspondientes plantas sobreexpresoras de SAMdC, para lo cual se realizó la fusión del cDNA de SAMdC bajo el control del promotor inducible en la construcción p765-SAMDCs (Figura 2.5 B).

La transformación de plantas con esta construcción dio como resultado un total de 9 líneas transgénicas (líneas 765-SAMdCs), que no presentaron diferencias en cuanto a aspecto y desarrollo con respecto a las plantas control 765 durante las posteriores generaciones crecidas para obtener las correspondientes líneas homocigotas.

Las líneas transgénicas obtenidas fueron sometidas al mismo experimento de inducción realizado con las plantas control anteriormente mencionadas, siendo crecidas durante dos semanas *in vitro* en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , con el que se pretendían reproducir los efectos de una sobreexpresión constitutiva de SAMdC observada en las plantas pBISAMdCs. Sin embargo, el crecimiento en 50  $\mu\text{M}$  de las plantas p765SAMdCs no supuso ninguna diferencia observable en cuanto a aspecto, comparadas con las plantas control p765. El resultado del análisis Northern de la expresión de SAMdC en las líneas p765SAMdCs se muestra en la figura 3.22 B, donde puede observarse que la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  en el medio de crecimiento no produce los aumentos de expresión observados en las líneas p765-GUS. La presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  produce el aumento más elevado en la línea 6S5, que llega a ser únicamente de un 60%, mientras que en las líneas 6S4 y 6S6 el efecto producido es una disminución de la expresión en un 40% aproximadamente. Ambas variaciones no pueden considerarse significativas dado que entran dentro del rango de variaciones de expresión de SAMdC observadas entre diferentes líneas transgénicas, que pueden llegar a ser del 60% para las líneas 6S como del 40% para las 765. Estas observaciones indican que mediante el sistema inducible por  $\text{Cu}^{2+}$  no hemos podido conseguir una sobreexpresión para el cDNA de SAMdC en *Arabidopsis* en condiciones de crecimiento *in vitro* en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ .

## 4. Discusión

---

Se han aislado dos clones de cDNA, uno de callos de guisante y otro de *Arabidopsis thaliana* que codifican para SAMdCs funcionales. Las secuencias aminoacídicas de ambos clones de SAMdC presentan altos porcentajes de identidad con el resto de SAMdCs aisladas en plantas (Tabla 3.1). Al extender la comparación de SAMdCs con el resto de organismos eucariotas, se observa que ambos clones poseen las regiones conservadas en todas las SAMdCs, entre ellas la identificada como el sitio de procesado y ruptura autocatalítica de la proenzima (Stanley y col, 1988; Kashiwagi y col, 1990; Lee y col, 1997a; Xiong y col, 1997), así como secuencias PEST, que sugieren un alto número de recambio y vida media corta para la SAMdC en plantas. En este sentido, Hiatt y col (1986) han establecido una vida media de 30-60 minutos para la SAMdC en células de cultivo de tabaco, mientras que Mad Arif y col (1994), utilizando un anticuerpo policlonal frente al extremo N-terminal de la SAMdC de patata en un análisis Western de extractos de protuberancias de estolones sólo consiguen detectar la banda correspondiente al proenzima de 38 kDa, no detectando ninguna banda de tamaño menor correspondiente al extremo N-terminal después del procesamiento, observación que según los autores se debe al rápido intercambio de la enzima en la planta una vez pasa a ser activa, tras el procesamiento autocatalítico de la proenzima inactiva (Mad Arif y col, 1994).

Al igual que el resto de clones de SAMdC de plantas, los cDNA de guisante y *Arabidopsis* se caracterizan por poseer regiones 5' no traducidas largas, de 548 y 523 pb respectivamente, y que contienen en su interior una putativa pauta de lectura, de 54 pb para guisante y 52 pb para *Arabidopsis*. Esta secuencia está conservada en todas las SAMdC de plantas y se le atribuye un papel regulador de la traducción de la proteína (Schröder y Schröder, 1995). Los mensajeros de SAMdC de mamíferos poseen también una región 5' no traducible larga, que contiene una pauta de lectura para un hexapéptido (MAGDIS), cuya presencia es necesaria para la inhibición de la síntesis de SAMdC por espermina (Shantz y col, 1994; Ruan y col, 1996). El mecanismo propuesto para la inhibición implica una interacción entre el péptido que codifica esta ORF y algún

componente de la maquinaria traduccional cuyo resultado final es la parada del ribosoma en el codón de terminación del ORF, que permanece unido al mRNA, bloqueando la traducción de la posterior pauta de lectura que codifica para la SAMdC. La naturaleza de estas interacciones, así como el mecanismo mediante el cual se supera esta parada y puede continuarse la traducción de la posterior pauta de lectura permanece todavía por determinar. Se propone que las poliaminas jugarían un papel estabilizante entre la ORF reguladora y su diana, de tal manera que en estados con niveles de poliaminas bajos se vería favorecida la traducción de la pauta de lectura que codifica para la SAMdC (Ruan y col, 1996). En todo caso, no existe ninguna similitud de secuencia entre la ORF reguladora de mamíferos y la ORF conservada en los extremos 5' de los mensajeros de la SAMdC en plantas, lo que podría indicar que el efecto que pueda ejercer esta ORF sobre la traducción del mensajero de la SAMdC sea diferente en plantas (Schröder y Schröder, 1995). En este sentido, los experimentos realizados en *Arabidopsis* con plantas transgénicas obtenidas con el mensajero de GUS fusionado al extremo 5' del cDNA de SAMdC de *Arabidopsis* parecen indicar un efecto favorecedor a nivel de la traducción, puesto que las plantas transgénicas que poseen el extremo 5'-UTR fusionado a GUS presentan niveles de actividad más elevados que las líneas que no lo poseen, a pesar de tener niveles de expresión similares (Figura 3.18). Se necesitan experimentos adicionales de delección para comprobar si este efecto es debido a la presencia de la putativa pauta de lectura en el extremo 5'.

Por otro lado, la funcionalidad de los dos clones aislados se pone de manifiesto mediante su expresión en la cepa de levadura Y342, mutante nula para el gen de la SAMdC (Balasundaram y col, 1991). La expresión de ambos clones confiere a la levadura mutante transformada la capacidad de crecer en un medio libre de poliaminas (Figura 3.4), indicando que ambos clones codifican para SAMdCs funcionales y que, a pesar de las diferencias de secuencia existentes entre las SAMdC de estas dos plantas y *S. cerevisiae*, se produce una correcta traducción y procesamiento postraduccional de la enzima, manteniéndose su funcionalidad. Este sistema fue utilizado para comprobar la funcionalidad del clon de cDNA de la SAMdC de patata, el primero aislado en plantas, y también ha sido empleado para el mismo objetivo con otros cDNA de enzimas de biosíntesis de poliaminas mediante la complementación de sus correspondientes mutantes nulos de levadura, como es el caso de la ODC de tomate (Alabadí y

## DISCUSION

---

Carbonell, 1998) y espermidina sintasas de guisante y tomate (Alabadí y Carbonell, 1999; Alabadí, 1999).

En cuanto a su organización genómica, los análisis Southern realizados sugieren que el gen de la SAMdC está representado por más de una copia en el genoma de guisante, y que deben existir intrones en las mismas (Figura 3.5). Por otro lado, el resultado obtenido en el mismo análisis en *Arabidopsis* parecía indicar la presencia de una única copia del gen, resultado que se veía reforzado por evidencias adicionales, tales como el hecho de que todos los clones EST analizados con homología a la SAMdC eran prácticamente idénticos (identidades mayores del 99%) y que en el rastreo del clon genómico realizado todos los clones obtenidos resultaron poseer la misma secuencia, que posteriormente fue localizada en el cromosoma III de *Arabidopsis* (BAC F16B3 del cromosoma III, número de acceso Genbank AC021640). Sin embargo, la aparición posterior en la base de datos del Genbank tanto de un clon de cDNA (número de acceso AJ251915) como del correspondiente clon genómico (número de acceso AJ252212) hacen pensar en la existencia de al menos dos copias del gen de la SAMdC en el genoma de *Arabidopsis*. La explicación a esta discordancia entre los datos obtenidos en el Southern y la situación real puede ser debida a la realización de lavados demasiado estrictos tanto en el Southern como en el rastreo de la genoteca genómica, que desestabilicen la hibridación entre la secuencia de la segunda SAMdC y la del clon utilizado como sonda, dado que la identidad de secuencia nucleotídica entre ambas es de un 70%, hecho que produciría que sólo se detectara la señal correspondiente a nuestro clon de SAMdC. Por otro lado, hasta la fecha solo existe un clon EST con secuencia idéntica a esta segunda SAMdC (120C24T7) frente a un total de 47 clones con secuencia idéntica para el clon caracterizado en este trabajo, hecho que implica una regulación diferencial de los dos genes, por lo que sería interesante la realización de estudios en este sentido para determinar de qué manera se encuentra coordinada la expresión de estas dos copias de SAMdC.

El clon genómico de SAMdC aislado en *Arabidopsis* muestra la existencia de intrones que se concentran en el extremo 5' de la secuencia, interrumpiendo uno de ellos la pauta de lectura con una hipotética función reguladora. La existencia de estos intrones en el extremo 5' parece ser una característica conservada en los genes de SAMdC, dado que también se encuentran en los clones genómicos de SAMdC aislados hasta el

momento: dos intrones en el clon genómico de clavel (Kim y col, 1998), tres intrones en el clon de *Iponomea nil* (Park y col, 1998) y un intrón en el clon de patata (Mad Arif y col, 1994). Por otro lado, la secuencia del segundo clon genómico de SAMdC de *Arabidopsis* posee también dos intrones en su extremo 5'. También se da la circunstancia que, excepto en el clon de la segunda SAMdC de *Arabidopsis*, en el resto de clones genómicos uno de los intrones interrumpe la secuencia de la putativa pauta de lectura situada en el extremo 5' y todos ellos en la misma posición aproximada. Experimentos de delección de la región del promotor y fusión al gen informador GUS parecen acotar la región promotora a un tamaño de 1 Kb, con elementos situados en la región [-1000 -456] cuya eliminación produce una bajada a la mitad de los niveles de expresión, así como en la región [-455 -80] cuya eliminación produce la desaparición de la expresión de GUS (Figura 3.18). Sería necesaria la realización de construcciones adicionales con delecciones más finas de la región promotora para la localización y caracterización de estos elementos reguladores.

La expresión de la SAMdC en guisante presenta niveles elevados en tejidos con tasas altas de división celular activa, tales como tejidos indiferenciados y ovarios en día de antesis (Figura 3.8), aunque también presentó niveles relativamente altos en tejidos con un crecimiento limitado, tales como tallo y raíz adultos. La expresión elevada en tejidos en desarrollo correlaciona con los niveles de expresión observados para ADC y espermidina sintasa 1 de guisante (Pérez-Amador y col, 1996; Alabadí y Carbonell, 1999). Los niveles altos de expresión de SAMdC en tallos de guisante (Figura 3.8 A) correlacionan con los observados para el gen de la espermidina sintasa 2 de guisante, el cual presenta su mayor expresión en tallo totalmente elongado (Alabadí y Carbonell, 1999). Por otro lado, la ADC presenta niveles relativamente altos en tallos, hecho que podría estar asociado a un crecimiento secundario del sistema floema/xilema (Pérez-Amador y col, 1996). Se ha visto que la espermidina es la poliamina más abundante en internodos, maduros o jóvenes, de varias líneas de guisante que presentan distinto fenotipo en cuanto a la longitud internodal (Smith y col, 1985). Este alto nivel de expresión de SAMdC en tallo se observa también en *Arabidopsis* (Figura 3.16), así como en clavel, que presenta un nivel elevado de transcrito para sus dos genes de SAMdC en tallo, siendo además este tejido en el que se detecta mayor actividad SAMdC en clavel (Lee y col, 1997a). Plantas transgénicas de patata que expresan el gen de SAMdC en

## DISCUSION

---

antisentido de manera constitutiva presentan internodos muy cortos (Kumar y col, 1996). Por otro lado, la presencia de niveles elevados en tallo explica el aumento de la expresión de SAMdC en callos crecidos en presencia de 2,4-D y Kinetina, puesto que el crecimiento en este medio indujo la formación de tallos.

El transcrito de SAMdC presenta también un nivel alto en raíces tanto en guisante (Figura 3.8 A), como en *Arabidopsis* (Figura 3.16). También se observan niveles moderados de expresión para la espermidina sintasa 1 de guisante en raíces (Alabadí y Carbonell, 1999), aunque no se detecta transcrito para la ADC (Pérez-Amador, 1995), único tejido de guisante donde se detecta actividad ODC (Pérez-Amador y Carbonell, 1995). La obtención del cDNA de la ODC de guisante sería importante para averiguar si en este tejido existe una expresión coordinada entre la ODC, SAMdC y espermidina sintasa. En *Arabidopsis*, a pesar de que se han clonado dos cDNAs para la ADC no se conocen datos acerca de su expresión en raíz, aunque una de las características observadas en el fenotipo de mutantes de *Arabidopsis* con baja actividad ADC es una alteración en el desarrollo radicular (Watson y col, 1998), por lo que quizás podría existir una coordinación entre la expresión de ADC y SAMdC en raíz. La adición de DFMO, ciclohexilamina o MGBG produce inhibición de la formación de raíces en *Prunus avium*, siendo este efecto parcialmente revertido con la adición de la correspondiente poliamina (Biondi y col, 1990). Por otro lado, las plantas transgénicas antisentido para SAMdC presentan un menor crecimiento de la raíz (Kumar y col, 1996).

La baja expresión en hojas encontrada para los transcritos de SAMdC de guisante y *Arabidopsis*, que también se observa para el caso de la SAMdC de clavel (Lee y col, 1997a) puede correlacionarse con una baja tasa de crecimiento y además con una división celular muy limitada.

Los resultados obtenidos con las tinciones histoquímicas de las plantas transformadas con la región promotora de la SAMdC fusionada al gen informador GUS apuntan a una localización generalizada de su expresión en la mayoría de los tipos celulares de los tejidos de *Arabidopsis*, expresión que se mantiene con el desarrollo de la planta. Sería interesante comprobar la localización de la expresión del resto de las enzimas biosintéticas de la ruta de poliaminas en *Arabidopsis* para comprobar en que manera se encuentran coordinadas espacialmente durante el desarrollo de la planta.

La expresión de la SAMdC de guisante se encuentra regulada durante el desarrollo temprano del fruto (Figuras 3.9 y 3.11), de tal manera que se produce un incremento transitorio en el nivel de su transcrito durante los dos primeros días postantesis, coincidiendo con la etapa de división celular activa. Este patrón de expresión correlaciona con los niveles de expresión observados para ADC (Pérez-Amador y col, 1995) y espermidina sintasa 1 de guisante (Alabadí y Carbonell, 1999), apoyando la implicación de las poliaminas en el proceso del desarrollo temprano del fruto de guisante. Además, la inducción de la expresión de SAMdC también se produce si la fructificación es desencadenada mediante el tratamiento con GA<sub>3</sub>, 2,4-D o BAP, aunque con diferencias en el patrón de expresión según el regulador del crecimiento utilizado, aspecto también observado para la expresión de los genes de espermidina sintasa de guisante (Alabadí y Carbonell, 1999) y SAMs (Gómez-Gomez y Carrasco, 1996), lo que apoya la idea de la existencia de distintas rutas de transducción de señal en guisante que pueden dirigir a los ovarios no polinizados a un crecimiento partenocárpico (Gómez-Gomez y Carrasco, 1996). De acuerdo con estas observaciones, los niveles elevados de expresión de SAMdC en silicuas inmaduras de *Arabidopsis* (Figura 3.16), sugieren la participación de las poliaminas en el desarrollo de su fruto.

Si no se desencadena el proceso de fructificación y se deja al ovario de guisante seguir su proceso senescente, se observa un incremento de la expresión de la SAMdC, que llega a valores máximos al cuarto día postantesis (Figura 3.9). Si la senescencia es retrasada mediante la aplicación de AVG o espermidina se produce también una disminución en los niveles de transcrito de SAMdC (Figura 3.10), resultado que refuerza la asociación entre una elevada expresión de SAMdC y un estado senescente del ovario. Este patrón de expresión correlaciona con resultados previos donde se observa un aumento en los niveles de espermina (Carbonell y Navarro, 1989), así como de actividad espermina sintasa (Alabadí, 1999) durante la senescencia del ovario no polinizado de guisante. Se ha sugerido que el aumento en el nivel de espermina podría tener un papel en el desencadenamiento de la senescencia del ovario de guisante, y que por tanto ese nivel estaría regulado de forma diferente al de putrescina y espermidina (Carbonell y Navarro, 1986). La obtención de un cDNA para la espermina sintasa de guisante permitiría averiguar si el aumento en la expresión de SAMdC observado está coordinado

## DISCUSION

---

con un aumento en los niveles de mensajero de espermina sintasa, al igual que ocurre con su actividad.

Entre los efectos de la exposición prolongada de plantas de guisante a ozono se observa un aumento en los niveles de expresión para la SAMdC en tallo y hoja (Figura 3.13), incremento que al parecer no está coordinado con la expresión de SAMs (Figura 3.14) y ADC (Figura 3.15). Este aumento en la expresión podría contribuir a la existencia de niveles más elevados de espermidina y espermina, de acuerdo con el papel protector asignado a las poliaminas en el estrés oxidativo que implica la exposición por ozono (Bouchereau y col, 1999). Se ha observado acumulación de espermidina y espermina después de un período prolongado a ozono y lluvia ácida en *Picea abies* (Dohmen y col, 1990). Por otro lado, el contenido en espermidina en hojas de cebada, tanto jóvenes como adultas, se incrementa después de tratamiento con ozono (Rowland-Bamford y col, 1989). La determinación de los niveles de poliaminas, así como los niveles de espermidina y espermina sintasas en tallo y hoja de las plantas de guisante expuestas a diferentes concentraciones de ozono permitiría aclarar cual podría ser el papel de la inducción de la expresión de SAMdC en la respuesta de la planta de guisante frente a la exposición a ozono.

La sobreexpresión del cDNA endógeno de SAMdC en *Arabidopsis* provoca alteraciones fenotípicas en las plantas transgénicas obtenidas (Figura 3.20 A) que pueden ser reproducidas en parte con el crecimiento en presencia de espermidina y espermina (Figura 3.20 C), resultado que implica la importancia de las poliaminas en los procesos de desarrollo de *Arabidopsis* y en la necesidad de la planta de mantener unos determinados niveles endógenos de las mismas para el establecimiento de un correcto desarrollo. En el caso de las plantas transgénicas sobreexpresoras de SAMdC en sentido obtenidas sería conveniente la medida de los niveles de poliaminas endógenos para comprobar si el aumento en el transcrito de SAMdC supone una modificación en los niveles endógenos de espermidina y espermina. Otro aspecto a resaltar, es que a pesar de las anomalías en el fenotipo observadas, las plantas son capaces posteriormente de recuperarse completando su ciclo vital sin anomalías aparentemente observables. Un resultado similar se observa en las plantas de tabaco sobreexpresoras del cDNA de SAMdC humana obtenidas por Noh y Minocha (1994), donde muchas anomalías fenotípicas observadas (hojas y tallo delgados, enanismo) desaparecen

gradualmente en el proceso de subcultivo. Estas observaciones implicarían un control muy estricto por parte de la planta respecto a sus niveles de poliaminas y justificarían la dificultad experimental de obtener plantas transgénicas con alteraciones importantes en los niveles de una determinada poliamina. En la mayoría de los casos sólo es posible conseguir incrementos de hasta 2 veces, mientras cambios importantes en una determinada actividad enzimática suponen únicamente variaciones en un 10-20% en los niveles de poliaminas (Malmberg y col, 1998). Un resultado similar se ha observado en ratones transgénicos sobreexpresores de ODC y SAMdC, donde no se detectan cambios significativos en los niveles de espermidina y espermina (Heljasvaara y col, 1997). Este control estricto justificaría el resultado obtenido cuando se intenta la sobreexpresión mediante el sistema inducible por  $\text{Cu}^{2+}$  del cDNA de SAMdC (Figura 3.22), no detectándose incrementos significativos del transcrito cuando las plantas son crecidas en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ . El silenciamiento en antisentido inducible por tetraciclina de SAMdC en patata no produce una reducción en los niveles de espermidina y espermina tan elevadas como las obtenidas con el promotor constitutivo (Kumar y col, 1996).

Por último, no es descartable que en el caso de la sobreexpresión constitutiva de SAMdC no hayamos podido obtener transformantes con un fenotipo más severo por la metodología del propio método de transformación, existiendo la posibilidad de pérdida de aquellos fenotipos más extremos en el rastreo de la primera generación transformante al quedar confundidos con las plantas no transgénicas muertas por la selección frente a kanamicina.

## 5. Conclusiones

---

1. Se han aislado y caracterizado dos cDNAs, uno a partir de una genoteca de cDNA de callos de guisante, y otro del banco de clones del proyecto EST de *Arabidopsis thaliana*, que codifican para la S-adenosilmetionina descarboxilasa. Ambos cDNAs muestran una elevada homología con otras secuencias de SAMdC de plantas y codifican para SAMdCs funcionales, capaces de complementar un mutante nulo de levadura para el gen de la SAMdC.
2. El análisis genómico indica la existencia de al menos dos copias del gen que codifican para la SAMdC en guisante. Los datos existentes en la base de datos del Genbank apuntan a la existencia de dos copias para el gen de la SAMdC en el genoma de *Arabidopsis thaliana*.
3. Se ha aislado y caracterizado un clon genómico del gen de la SAMdC descarboxilasa de *Arabidopsis*, correspondiente a la copia situada en el cromosoma III. Los análisis realizados permiten acotar una región promotora de 1 Kb con dos regiones donde se localizan elementos reguladores de la expresión de la SAMdC.
4. La expresión de la SAMdC se encuentra regulada a nivel de tejido tanto en guisante como en *Arabidopsis*. La localización espacial de la expresión en *Arabidopsis* muestra una expresión generalizada en la mayoría de los tipos celulares de la planta.
5. Durante el desarrollo temprano del fruto de guisante, ya sea inducido mediante polinización natural o mediante tratamiento hormonal, se produce un incremento transitorio de la expresión de SAMdC.
6. La expresión de la SAMdC se incrementa durante la senescencia del ovario del guisante. El retraso de la entrada en senescencia mediante la aplicación de AVG o espermidina produce una disminución en los niveles de expresión de SAMdC.
7. La exposición prolongada de plantas de guisante a una atmósfera de 100 ppb de ozono produce un aumento de los niveles de expresión de la SAMdC tanto en tallo como en hoja.

## CONCLUSIONES

---

8. La sobreexpresión constitutiva del cDNA de la SAMdC en Arabidopsis da lugar a alteraciones fenotípicas caracterizadas por una disminución del crecimiento, tanto de parte aérea como radicular, que pueden reproducirse por crecimiento en presencia de espermidina y espermina.

## 6. Referencias:

---

- ALABADI D. (1999) Biosíntesis de poliaminas durante la senescencia y fructificación en ovarios de guisante y de tomate. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- ALABADI D, CARBONELL J. (1998) Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiol.* **118**(1):323-8.
- ALABADI D, CARBONELL J. (1999) Differential expression of two spermidine synthase genes during early fruit development and in vegetative tissues of pea. *Plant. Mol. Biol.* **39**:993-943
- AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRULK K. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, USA
- AZIZ A, MARTIN-TANGUY J, LARHER F. (1997) Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. *Plant Growth Regul.* **21**:153-163
- BAGNI N. (1970) Metabolic changes of polyamines during the germination of *Phaseolus vulgaris*. *New. Phytol.* **69**:159
- BALASUNDARAM D, TABOR CW, TABOR H. (1991) Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomices cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5872-5876
- BASTOLA DR, MINOCHA SC. (1995) Increased putrescine biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA promotes somatic embryogenesis. *Plant. Physiol.* **109**:63-71
- BECHTOLD MW. (1989) A simple method for direct cloning and sequencing DNA by the use of a single specific oligonucleotide and oligo dT in a polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acid Res.* **17**(1):453
- BECHTOLD N, ELLIS J, PELLETIER G. (1993) In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad Sci. Paris, Life Sci.* **316**: 1194-1199
- BENTLEY PN, CHUA NH. (1990) The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinational regulation of transcription in plants. *Science* **250**:959-966

- BEVAN MW, BARNES W, CHILTON MD. (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA *Nucleic Acid Res.* **11**:369-385
- BEVAN M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acid Res.* **12**:8711-8721
- BEY P, DANZIN C, JUNG M. (1987) Inhibition of basic amino acid decarboxylases involved in polyamine biosynthesis. En: McCann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A. (Eds.) Inhibition of Polyamine metabolism. Academic Press, Orlando. pp 1-32
- BIALE JB. (1964) Growth, Maturation, and senescence in fruits. *Science* **146**: 880-888
- BIONDI S, DIAZ T, IGLESIAS L, GAMBERINI G, BAGNI N. (1990) Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in *Primus avium* shoot cultures. *Physiol. Plant.* **78**:474-480
- BITONTI AJ, CASARA PJ, MCCANN PP, BEY P. (1987) Catalytic irreversible inhibition of bacterial and plant arginine decarboxylase activities by novel substrate and product analogues. *Biochem. J.* **242**:69-74
- BOLLE C, HERRMANN R, OELMULLER R (1995) A spinach cDNA with homology to S-adenosylmethionine decarboxylase. *Plant Physiol.* **107**:1461-1462
- BORRELL AM BESFORD RT, ALTABELLA T, MASGRAU C, TIBURCIO AF. (1996) Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Physiol. Plant.* **98**:105-110
- BOUCHEREAU A, AZIZ A, LARHER F, MARTIN-TANGUY J.(1999) Polyamines and environmental changes: recent development. *Plant Sci.* **140**:103-125
- BROWN JWS. (1986) A catalogue of splice junction and putative branchpoint sequences from plant introns. *Nucl. Ac. Res.* **14**:9549-9559
- BROWN JWS, SMITH P, SIMPSON CG. (1996) *Arabidopsis* consensus intron sequences. *Plant Mol. Biol.* **32**:531-535
- BURTIN D, MARTIN-TANGUY J, TEPLER D. (1991)  $\alpha$ -DL-Difluoromethylornithine, a specific, irreversible inhibitor of putrescine biosynthesis, induces a phenotype in tobacco similar to that ascribed to the root-inducing, left-hand transferred DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Physiol.* **141**:461-468
- BURTIN D, MICHAEL AJ. (1997) Overexpression of arginine decarboxylase in transgenic plants. *Biochem. J.* **325**(pt 2): 331-337
- CAMPOS JL, FIGUERAS X, BORONAT A, PINOL MT, TIBURCIO AF. (1991) Changes in polyamine content of *Arabidopsis thaliana* after UV-C irradiation. En: Galston AW, Tiburcio AF (Eds.) Lecture course on Polyamines as Regulators of Plant Development, Fundación Juan March. pp 78-80

## REFERENCIAS

---

- CARBONELL J, GARCIA-MARTINEZ JL. (1985) Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase and fruit set or degeneration of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L. *Planta* **164**:534-539
- CARBONELL J, NAVARRO JL. (1989) Correlation of spermine levels with ovary senescence and with fruit set and development in *Pisum sativum* L. *Planta* **178**:482-487
- CARRASCO P, CARBONELL J. (1988) Involvement of a neutral proteolytic activity in the senescence of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L. *Physiol. Plant.* **85**:476-482
- CARRASCO P, CARBONELL J. (1990) Changes in the level of peptidase activities in pea ovaries during senescence and fruit set induced by gibberelic acid. *Plant Physiol.* **92**:1070-1074
- CERCOS M, CARRASCO P, GRANELL A, CARBONELL J. (1992) Biosynthesis and degradation of rubisco during ovary senescence and fruit development induced by gibberelic acid in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* **85**:476-482
- CESARENI G, MURRAY AA. (1987) Plasmid vectors carrying the replication origin of filamentous single-stranded phages. En: JK Setlow , (Ed.), Genetic Engineering vol 9, Plenum Press, New York. pp134-135
- COPPOC GL, KALLIO P, WILLIAMS-ASHMAN HG. (1971) Characteristics of S-adenosylmethionine decarboxylase from various organisms. *Int. J. Biochem.* **2**:673
- COHEN E, ARAD S, HEIMER YM, MIZRAHI Y (1982) Participation of ornithine decarboxylase in early stages of tomato fruit development. *Plant Physiol.* **70**:540
- COHN MS, TABOR CW, TABOR H. (1980) *J. Bacteriol.* **142**:791-799
- CHURCH GM, GILBERT W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1991-1995
- DAMERON CT, WINGE DR, GEORGE GN, SANSONE M, HU S, HAMER D. (1991) A copper-thiolate polynuclear cluster in the ACE1 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:6127-6131
- DEIKMAN J, KLINE R, FISCHER RL. (1992) Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit-specific promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant. Physiol.* **100**:2013-2017
- DESCENZO RA, MINOCHA SC. (1993) Modulation of cellular polyamines in tobacco by transfer and expression of mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Mol. Biol.* **22**:113-127

- DOHMEN GP, KOPPERS A, LANGEBARTELS C. (1990) Biochemical response of Norway spruce *Picea abies* (L.), towards 14 month-old exposure to ozone and acid mist: effects on amino acid, glutathione and polyamine titers. *Environ. Pollut.* **64**:375-380
- DON RH, COX PT, WAINWRIGHT BJ, MATTICK JS. (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acid Res.* **19**(14):4008
- DRESSELHAUS T, BARCELO P, HAGEL C, LÖRZ H, HUMBECK K. (1996) Isolation and characterization of a tritordeum cDNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase that is circadian-clock-regulated. *Plant Mol. Biol.* **30**:1021-1033
- DROLET G, DUMBROFF EB, LEGGE RL, THOMPSON JE. (1986) Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* **25**:367-371
- EGEA-CORTINES M, MIZRAHI Y. (1991) Polyamines in cell division, fruit set and development, and seed germination. En: Slocum RD, Flores HE (Eds.) *Biochemistry and Physiology of Polyamines in plants*. CRC Press. Boca Raton. FL. pp 143-158
- EL GACHTOULI N, MARTIN-TANGUY J, PAYNOT M, GIANIAZZI S. (1996) First report of the inhibition of arbuscular mycorrhizal infection of *Pisum sativum* by specific and irreversible inhibition of polyamine biosynthesis or by gibberellic treatment. *FEBS Lett.* **385**:189-192
- EKSTROM JL, MATHEWS II, STANLEY BA, PEGG AE, EALICK SE. (1999) The crystal structure of human S-adenosylmethionine decarboxylase at 2.25 Å resolution reveals a novel fold. *Structure* **7**:583-595
- ESAU K. (1977) *Anatomy of Seed plants*. John Wiley and Sons
- EVANS PT, MALMBERG RL. (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **40**:235-269
- FEINBERG AP, VOLGELSTEIN B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**:6-13
- FLORES HE. (1991) Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. En: Slocum R, Flores HE (Eds). *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in plants*, CRC Press, Boca raton, FL. pp 214-225
- FLORES HE, GALSTON AW. (1984) Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of the response. *Plant Physiol.* **75**:102-109

## REFERENCIAS

---

- FRITZE K, CZAJA I, WALDEN R. (1995) T-DNA tagging of genes influencing polyamine metabolism- isolation of mutant plant lines and rescue of DNA promoting growth in the presence of a polyamine biosynthetic inhibitor. *Plant J.* **7**:261-271
- FRUEHLING M, PUEHLER A, PERLICK AM. (2000) Isolation and characterization of a full-length cDNA (accession no.AJ250026) encoding S-adenosylmethionine decarboxylase from broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol.* **122**: 620-620
- GALSTON AW, SAWHNEY RK. (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* **94**:406-410
- GALSTON AW, SAWHNEY RK. (1995) Polyamines as endogenous growth regulators. En: Davies PJ (Ed.) *Plant hormones*. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. pp158-178
- GARCIA-MARTINEZ JL, CARBONELL J. (1980) Fruit-set of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L. Influence of plant growth regulators. *Planta* **147**:451-456
- GARCIA-MARTINEZ JL, MARTI M, SABATER T, MALDONADO A, VERCHER Y. (1991) Development of fertilized ovules and their role in the growth of the pea pod. *Physiol. Plant.* **83**:411-416
- GATZ C, FRHBERG, C WENDENBURG R. (1992) Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CAMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *Plant J.* **7**:261-271
- GATZ C, LENK I. (1998) Promoters that respond to chemical inducers. *Trends Plant Sci.* **3**(9):352-358
- GENY L, BROQUEDIS M, MARTIN-TANGUY J, SOYER JP, BOUARD J. (1997) Effects of potassium nutrition on polyamine content of various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Sauvignono. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**:85-91
- GIETZ RD. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acid Res.* **20**:1425
- GLEAVE AP (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* **20**(6):1203-1207
- GOMEZ-GOMEZ L. (1996) Regulación de la S-adenosilmetionina sintasa durante el desarrollo y la senescencia de ovarios no polinizados de *Pisum Sativum* L. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- GOMEZ-GOMEZ L, CARRASCO P. (1996) Hormonal regulation of S-adenosylmethionine synthase transcripts in pea ovaries. *Plant. Mol. Biol.* **30**:821-832

## REFERENCIAS

---

- GOMEZ-GOMEZ L, CARRASCO P. (1998) Differential expression of S-adenosylmethionine synthase transcripts genes during pea development. *Plant Physiol.* **117**:397-405
- HADJEB N, BERKOWITZ GA. (1996) Preparation of T-overhang vectors with high PCR product cloning efficiency. *Biotechniques* **20**:20-22
- HAMILL JD, ROBINS RJ, PARR AJ, EVANS DM, FURZE JM, RHODES MJC. (1990) Overexpressing a *Saccharomyces cerevisiae* ornithine decarboxylase gene in transgenic roots of *Nicotiana rustica* can lead to enhanced nicotine accumulation. *Plant Mol. Biol.* **15**:27-38
- HEAGLE AS. (1989) Ozone and crop yield. *Annu. Rev. Phytopatol.* **27**:397-412
- HEBY O, PERSSON L. (1990) Molecular genetics of polyamine synthesis in eucaryotic cells. *Trends Biochem. Sci* **15**: 475-479
- HELJASVAARA R, VERESS I, HALMEKYTO M, ALHONEN L, JANNE L, LAAJALA P, PAJUNEN A. (1997) Transgenic mice sobreexpressing ornithine and S-adenosylmethionine decarboxylases maintain a physiological polyamine homoeostasis in their tissues. *Biochem. J.* **323**(Pt 2):457-462
- HEWITT EJ. (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2<sup>a</sup> ed. Farnham Royal, Bucks. Commonwealth Agricultural Bureaux.
- HIATT AC, MCINDOO J MALMBERG RL. (1986) Regulation of polyamine biosynthesis in tobacco. Effects of inhibitors and exogenous polyamines on arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase *J. Biol. Chem.* **261**:1293-1298
- HIATT AC, MALMBERG RL. (1988) Utilization of putrescine in tobacco cell lines resistant to inhibitors of polyamine synthesis. *Plant. Physiol.* **86**:441-446.
- HIBASAMI H, TANAKA M, NAGAI J, IKEDA T. (1980) Dicyclohexamine, a potent inhibitor of spermidine synthase in mammalian cells. *FEBS Lett.* **116**:99-101
- HUNT AG. (1994) Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol Biol.* **45**:47-60
- JEFFERSON RA, KAVANAGH TA, BAVAN MW. (1987) Gus fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6**(13):3901-3907
- JOSHI C. (1987) An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucl. Ac. Res.* **15**:6643-6653
- JOSHI C, ZHOU H, HUANG X XIANG VL. (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant. Mol. Biol.* **35**:993-1001

## REFERENCIAS

---

- KAWASAKI ES, WANG MA. (1989) Detection of gene expression. En: Erlich HA (Ed.). PCR technology: principles and applications. DNA amplification. Stockton Press, New York. pp 89-97
- KASHIWAGI K, TANEJA SK, LIU TY, TABOR CV, TABOR H. (1990) Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosynthesis and processing of a proenzyme form of S-Adenosylmethionine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **265**:22231-22328
- KIM YJ, LEE MM, LEE SH, PARK KY. (1997) Cloning and sequence analysis of genomic clone (Accession Number U94786) encoding S-adenosylmethionine decarboxylase from carnation. *Plant Physiol.* **114**: 1135
- KRAMER GF, WANG CY. (1989) Correlation of reduced chilling injury with increased spermidine and spermine levels in zucchini squash. *Physiol. Plant.* **76**:479-482
- KRAMER GF, WANG CY. (1990) Effects of chilling and temperature preconditioning on the activity of polyamine biosynthetic enzymes in zucchini squash. *J. Plant. Physiol.* **136**:115-122
- KRAMER GF, HORMAN HA, KRIZEK DT, MIRECKI RM (1991) Influence of UV-B radiation on polyamines lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* **30**:2101-2108
- KUEHN GD, BAGGA S, RODRIGUEZ-GARAY B, PHILLIPS AC. (1990) Biosynthesis of uncommon polyamines in higher plants and their relation to abiotic stress responses. En: Flores HE, Arteca RN (Eds.) Polyamines and Ethylene: Biosynthesis, Physiology and Interactions, American Society of Plant Physiology. pp 190-202
- KUMAR A, TAYLOR MA, MAD ARIF SA, DAVIES HV (1996) Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMdC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene:antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant J.* **9**(2):147-158
- KUMAR A, ALTABELLA T, TAYLOR MA, TIBURCIO A. (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant. Sci.* **2**(4): 124-130
- KUSHAD MM, DUMBROFF EB. (1991) Metabolic and physiological relations between the polyamine and ethylene biosynthetic pathways. En: Slocum RD, Flores HE (Eds.) Biochemistry and Physiology of Polyamines in plants. CRC Press. Boca Raton. FL. pp 77-92
- LANGEBARTELS C, KERNER KJ, LEONARDI S, SCHRAUDNER M, TROST M, HELLER W, SANDERMAN H. (1991) Biochemical plant response to ozone I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* **91**:882-887

- LEE MM, LEE SH, PARK KY. (1997a) Characterisation and expression of two members of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant. Mol. Biol.* **34**:371-382
- LEE T, LIU JJ, PUA EC. (1997b) Molecular cloning of two cDNAs (Accession Nos. X95729 and U80916) encoding S-adenosyl-L-methionine decarboxylase in Mustard (*Brassica juncea*) (PGR97-157) *Plant Physiol.* **115**, 1287
- LEE TM, LUR HS, CHU C. (1997c) Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. 2. Modulation of free polyamine levels. *Plant. Sci.* **126**:1-10
- LI ZY, CHEN SY. (2000a) Isolation and characterization of a salt and drought-inducible gene for S-adenosylmethionine decarboxylase from wheat (*Triticum aestivum* L.) *J. Plant Physiol.* **156**: 386-393
- LI ZY, CHEN SY. (2000b) Differential accumulation of S-adenosylmethionine decarboxylase transcripts in rice seedlings in response to salt and drought stresses. *Theor. Appl. Genet.* **100**, 782-788
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. (1951) Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275
- MAD ARIF SA, TAYLOR MA, GEORGE LA, BUTLER AR, BURCH LR, DAVIES HV, STARK MJR, KUMAR A. (1994) Characterisation of the of S-Adenosylmethionine decarboxylase (SAMdC) of potato. *Plant. Mol. Biol.* **26**:327-338
- MALMBERG RL, ROSE DJ. (1987) Biochemical genetics of resistance to MGBG in tomato: mutants that alter SAM decarboxylase or polyamine ratios and floral morfology. *Mol. Gen. Genet.* **207**:9-14
- MALMBERG RL, WATSON MB, GALLOWAY GL, YU W. (1998) Molecular genetic analysis of plant polyamines. *Critical Reviews in Plant Sciences.* **17**(2):199-224
- MARIE SC, CROZAT A, JANE OA. (1992). Structure and organization of the human S-Adenosylmethionine decarboxylase gene. *J. Biol. Chem.* **267**:18915-18923
- MARTIN-TANGUY J. (1987) Hydroxycinnamic acids amides, hypersensitivity, flowering and sexual organogenesis in plants. En: D. Von Wettstein, D Chua (Eds). *Plant Molecular Biology*, Plenum, New York. pp 253-263.
- MARTIN-TANGUY J, TEPFER D, BURTIN D. (1991) Effects of Ri TI-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* and the inhibitors of polyamine synthesis on growth, floral development, sexual organogenesis and polyamine metabolism in tobacco. *Plant Sci.* **80**:131-144

## REFERENCIAS

---

- MASGRAU C, ALTABELLA T, FARRAS R, FLORES D, THOMPSON AJ, BESFORD RT, TIBURCIO AF. (1997) Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant J.* **11**:465-473
- MASGRAU C.(1999) Metabolismo de poliaminas en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* L. Efectos fenotípicos de la sobreexpresión de la arginina descarboxilasa. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.
- MCKENZIE MJ, METT V, REYNOLDS PHS, JAMESON PE. (1998) Controlled cytokinin production in transgenic tobacco using a copper-inducible promoter. *Plant. Physiol.* **116**:969-977
- MEHTA RA, ZHOU D, TUCKER M, HANDA A , SOLOMOS T, MATOO AK. (1999) Ethylene in higher plants: biosynthetic interactions with polyamines and high temperature-mediated differential induction of NR versus TAE1 ethylene receptor. En: Kanellis, Chang, Klee, Bleeker, Pech and Grierson , Eds, *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 387-393
- MEHLHORN H, O'SHEA JM, WELLBURN AR. (1991) Atmospheric Ozone interacts with stress ethylene formation by plants to cause visible leaf injury. *J. Exp. Bot.* **42**:17-24
- METT VL, LOCHHEAD LP, REYNOLDS PHS. (1993) Copper-controllable gene expression system for whole plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4567-4571
- METT VL, PODIVINSKY E, TENNANT AM, LOCHHEAD LP, REYNOLDS PHS. (1996) A system for tissue-specific copper-controllable gene expression in transgenic plants: nodule-specific antisense of aspartate aminotransferase-P2. *Transgenic Res.* **5**(2):105-113.
- MURASHIGE T, SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**:473-479
- MURFET IC. (1985) *Pisum Sativum*. En: Halevy AH. (Ed). Handbook of Flowering. Vol IV) CRC press. Boca Raton. FL pp 97-126
- NEWMAN T, DE BRUJIN FJ, GREEN P, KEEGSTRA K, KENDE H, MCINTOSH L, OHLROGGE J, RAIKHEL N, SOMERVILLE S, THOMASHOW M, RETZEL E, SOMMERVILLE C. (1994) . Genes Galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* **106**:1241-1255
- NOH EW, MINOCHA SC. (1994) Expression of a human S-adenosylmethionine decarboxylase cDNA in transgenic tobacco and its effects on polyamine biosynthesis. *Transgenic Res.* **3**:26-35

- ORMROD DP, BEKERSON DW. (1986) Polyamines as antiozonants for tomato. *Hortsci.* **21**:1070-1071
- ORZAEZ D, GRANELL A. (1997) DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. *Plant J.* **11**(1): 137-144
- ORZAEZ D, BLAY R, GRANELL A. (1999) Programme of senescence in petals and carpels of *Pisum sativum* L. flowers and its control by ethylene. *Planta* **208**(2):220-6.
- OSHIMA TA. (1983) Novel polyamines in *Thermus thermophilus*: Isolation, identification and chemical systems. *Methods Enzymol.* (94) 401-411
- PAJUNEN A, CROZAT A, JANE O, IHALAIEN PH, STANLEY B, MADHUBALA R, PEGG AE. (1988) Structure and regulation of mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase gene. *J. Biol. Chem.* **263**:17040-17049
- PARK WK, LEE SH, PARK KY. (1998) Cloning and characterization of genomic clone (Accession No.U64927) encoding S-adenosylmethionine decarboxylase whose gene expression was regulated by light in morning glory (*Ipomoea nil*) (PGR98-014). *Plant Physiol.* **116**(2): 867 (1998)
- PATE JS, FLINN AM. (1977) Fruit and seed development. En: Stuccliffe JF, Pate JS (Eds.) *The Physiology of the Garden Pea*. Academic Press, Londres. pp 431-466
- PEDROS AR, MACLEOD MR, ROSS HA, MCRAE D, TIBURCIO AF, DAVIES HV, TAYLOR MA. (1999) Manipulation of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in potato tubers. An increase in activity leads to an increase in tuber number and a change in tuber size distribution. *Planta* **209**(1):153-160
- PEGG AE, WILLIAMS-ASHMAN HG. (1987) Pharmacological interference with enzymes of polyamine biosynthesis and of 5-methylthion-adenosine metabolism. En: McCann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A (Eds.) *Inhibition of Polyamine Metabolism*. Academic Press. Orlando. pp 33-48
- PEREZ-AMADOR MA, CARBONELL J. (1995) Arginine decarboxylase and putrescine oxidase in ovaries of *Pisum sativum* L. Changes during ovary senescence and early stages of fruit development. *Plant Physiol.* **107**:865-872
- PEREZ-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.* **28**:997-1009
- PEREZ-AMADOR MA, CARBONELL J, NAVARRO JL, MORITZ T, BEALE MH, LEWIS MJ, HEDDEN P. (1996) N<sup>4</sup>-hexanoylspermidine, a new polyamine-related compound that accumulates during ovary and petal senescence in pea. *Plant Physiol.* **110**:1177-1186

## REFERENCIAS

---

- PILLER KJ, BAERSON SR, POLANS NO, KAUFMAN LS. (1990) Structural analysis of the short length ribosomal DNA variant from *Pisum sativum* (L.) cv Alaska. *Nucleic Acid Res.* **18**(11):3135-3145
- PHILLIPS GC, KUEHN GD. (1991) Uncommon polyamines in plant and other mechanisms. En: Slocum R, Flores HE (Eds). *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in plants*, CRC Press, Boca raton, FL pp 121-133
- PRESCOTT A, MARTIN C. (1987) A rapid method for the quantitative assessment of levels of specific mRNA in plants. *Plant Mol. Biol. Report.* **4**:219-224
- RAISON JK, LYONS JM. (1970) Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol* **45**:386-389
- RACZ I, KOVACS M, LASZTITY D, VEISZ O, SZALAI G, PALDI, E. (1996) Effects of short-term and long-term low temperature stress on polyamine biosynthesis in wheat genotypes with varying degrees of frost tolerance. *J. Plant. Physiol.* **136**:115-122
- RICHARDS FJ, COLEMAN. (1952) Occurrence of putrescine in potassium deficient barley. *Nature* **170**:470-461
- RODRIGUES-POUSADA RA, DE RYCKE R, DE DONDER A, VAN CAENEGHEM W, ENGLER G, VAN MONTAGU M, VAN DER STRAETEN D. (1993) The Arabidopsis 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene 1 is expressed during early development. *Plant Cell* **5**(8):897-911
- ROGERS S, WELLS R, RECHETEINER M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364-368
- RORAT T, GRYGOROWITZ WJ, BERBEZY P, IRZYKOWSKY W. (1998) Isolation and expression of cold specific genes in potato (*Solanum tuberosum*) *Plant Science* **133**:57-67
- ROSE MD, WINSTON F, HIETER. (1990) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- ROUNSLEY SD, GLODEK A, SUTTON G, ADAMS MD, SOMMERVILLE CR, VENTER JC, KERVALLAGE AR. (1996) The construction of Arabidopsis expressed sequence tag assemblies. *Plant. Physiol.* **112**:1177-1183
- ROWLAND-BAMFORD AJ, BARLAND AM, LEA PJ, MANSFIELD TA. (1989) The role of arginine decarboxylase in modulating the sensitivity of barley to ozone. *Environ. Pollut.* **64**:375-380
- ROY M, GOSH B. Polyamines, both common and uncommon, under heat stress in rice (*Oryza sativa*) callus. *Plant Physiol.* **147**:736-742

## REFERENCIAS

---

- RUAN H, SHANTZ LM, PEGG AE, MORRIS DR. (1996) The upstream open reading frame of the mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase is a polyamine responsive translational control element. *J. Biol. Chem.* **271**(47): 29576-29582
- SAMBROOK J, FISTCH EF, MANIATIS T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual 2<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANDERMANN H, ERNST D, HELLER W, LANGEBARTELS C. (1998) Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends Plant Sci.* **3**(2):47-50
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467
- SATOH S, YANG SF. (1989) Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by L-vinilglycine as related to the mechanism-based inactivation of the enzyme by S-adenosyl-L-methionine. *Plant Physiol.* **91**:1036-1039
- SAWHNEY KR, GALSTON AW. (1991) Physiological and biochemical studies on the antisenescence properties of polyamines in plants. En: Slocum RD, Flores HE (Eds.) *Biochemistry and Physiology of Polyamines in plants*. CRC Press. Boca Raton. FL. pp 201-211
- SCHRÖDER G, SCHRÖDER J. (1995) cDNAs for S-adenosyl-L-methionine decarboxylase from *Catharantus roseus*, heterologous expression, identification of the proenzyme-processing site, evidence for the presence of both subunits in the active enzyme, and a conserved region in the 5' mRNA leader. *Eur. J. Biochem.* **228**, 74-78
- SHANTZ LM, VISMANATH R, PEGG AE. (1994) Role of the 5'-untranslated region of mRNA in the synthesis of S-adenosylmethionine decarboxylase and its regulation by spermine. *Biochem. J.* **302**:765-772
- SLOCUM RD, GALSTON AW. (1987) Inhibition of polyamine biosynthesis in plant and pathogenic fungi. En: McCann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A (Eds.) *Inhibition of Polyamine Metabolism*. Academic Press. Orlando. pp 305-316
- SMITH MA, DAVIES PJ. (1985) Effect of photoperiod on polyamine metabolism in apical buds of G2 peas in relation to the induction of apical senescence. *Plant Physiol.* **79**:400-405
- SMITH MA, DAVIES PJ, REID JB (1985) Role of polyamines in gibberellin-induced internode growth in peas. *Plant Physiol.* **78**:92-99
- SOUTHERN E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis *J. Mol Biol* **98**:503-517

## REFERENCIAS

---

- STANLEY BA, PEGG AE, HOLM I. (1989) Site of pyruvate formation and processing of mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme. *J. Biol. Chem.* **264**:2817-2822
- STANLEY BA, PEGG A. (1991) Amino acid residues necessary for putrescine stimulation of human S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme processing and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **266**:18502-18506
- SUZUKI Y, HIRASAWA E. (1980) S-Adenosylmethionine decarboxylase of corn seedlings. *Plant Physiol.* **66**: 1091
- TABOR CW, TABOR H, XIE QW. (1986) Spermidine synthase of *Escherichia coli*: Localization of the *speE* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:6040-6044
- TABOR CW, TABOR H. (1984) Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* **53**:749-790
- TAYLOR MA, MAD ARIF SA, KUMAR A, DAVIES HV, SCOBIE LA, PEARCE SR, FLAVELL AJ. (1992) Expression and sequence analysis of cDNAs induced during the early stages of tuberisation in different organs of the potato plant (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Mol. Biol.* **20**:641-651
- TIBURCIO AF, ALTABELLA T, BORRELL A, MASGRAU CM. (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant.* **100**:664-674
- UNFRIED I, STOCKER U, GRUENDLER P. (1987) Nucleotide sequence of the 18S rRNA from *Arabidopsis thaliana* Col 0. *Nucleic Acid Res.* **17**(18):7513
- VAN DER STRAETEN D, VAN MONTAGU M. (1990) Biochemistry and molecular genetics of ethylene biosynthesis and signal transduction. En: Flores HE, Arteca RN y Shannon JC (Eds.). Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology and Interactions. American Society of Plant Physiologists. Rockville MD. pp 36-49
- VERCHER Y, MOLOWNY A, LOPEZ C, GARCIA MARTINEZ JL, CARBONELL J. (1984) Structural changes in the ovary of *Pisum sativum* L. Induced by pollination and gibberellic acid. *Plant Sci. Lett.* **36**:87-91
- VERCHER Y, MOLOWNY A, CARBONELL J. (1987) Gibberellic acid effects on the ultrastructure of endocarp cells of unpollinated ovaries of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* **71**:302-308
- VERCHER Y, CARRASCO P, CARBONELL J. (1989) Biochemical and histochemical detection of endoproteolytic activities involved in ovary senescence or fruit development in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* **76**:405-411
- VERCHER Y, CARBONELL J. (1991) Changes in the structure of ovary tissues and in the ultrastructure of mesocarp cells during ovary senescence or fruit development induced by plant growth substances in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* **81**:518-526

## REFERENCIAS

---

- WALDEN R, FRITZE K, HAYASHI H, MIKLASHEVICH S E, HARTLING H, SCHELL J. (1994) Activation tagging – a means of isolating genes implicated as playing a role in plant-growth and development. *Plant Mol. Biol.* **26**:1521-1528
- WALDEN R, CORDEIRO A, TIBURCIO AF. (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol.* **113**:1009-1013
- WATSON MB, YU W, GALLOWAY G, MALMBERG RL. (1997) Isolation and characterization of a second arginine decarboxylase cDNA from *Arabidopsis* (Accession N° AF009647) (PGR97-114). *Plant Physiol.* **114**:1569
- WATSON MB, EMORY KK, PIATAK RM, MALMBERG RL. (1998) Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibit altered root growth. *Plant J.* **13**(2):231-239
- WILLIAMS-ASHMAN HG, SCHENONE A. (1972) Methylglyoxal bis(guanylhydrazone) as a potent inhibitor of mammalian and *Sachharomyces cerevisiae* S-adenosylmethionine decarboxylases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **46**:288-295
- XIONG H, STANLEY BA, TEKWANI BL, PEGG AE. (1997) Processing of mammalian and plant S-adenosylmethionine decarboxylase proenzymes. *J. Biol. Chem.* **272**:28342-28348
- YAMANOHA B, COHEN SS. (1985) S-Adenosylmethionine decarboxylase and spermine synthase from Chinese cabbage. *Plant Physiol.* **78**:784-790
- YE B, MULLER HH, ZHANG J, GRESSEL J. (1997) Constitutively elevated levels of putrescine generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Coryza canadiensis* and wheat. *Plant. Physiol.* **115**:1443-1451
- YE GN, STONE D, PANG SZ, CREELY N, GONZALEZ K, HINCHU N. (1999) *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium in planta* vacuum transformation. *Plant J.* **19**(3):249-257
- YOSHIDA I, YAMAGATA H, HIRASAWA E. (1999) Blue- and red-light regulation and circadian control of gene expression of S-adenosylmethionine decarboxylase in *Pharbitis Nil.* *J. Exp. Bot* **50**(332):319-326
- YOSHIDA I, YAMAGATA H, HIRASAWA E. (1998) Light-regulated gene expression of S-adenosylmethionine decarboxylase in *Pharbitis Nil.* *J. Exp. Bot* **49**(320):617-620

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAT DE QUÍMICA

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de  
D. FRANCISCO MARCO PICO

la calificación de SOBRESALIENTE "CUM LAUDE"

Valencia, a 26 de SEPTIEMBRE de 2.000

El Secretario



Nº 567 del registro de Facultad

