

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

EFFECTOS DE LA SOBREENPRESIÓN DE S-ADENOSIL-L-  
METIONINA DESCARBOXILASA1 EN LA RESPUESTA A  
ESTRÉS EN ARABIDOPSIS

ENRIQUE BUSÓ SÁEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 de Maig de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Juan Carbonell Gisbert
- D. Antonio Fernández Taburcio
- D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Teresa Lafuente Rodríguez
- D. José Manuel Pardo Prieto
- D. Alejandro Ferrando Monleón

Va ser dirigida per:

D. Pedro Carrasco Sorlí

©Copyright: Servei de Publicacions  
Enrique Busó Sáez

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6353-1

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

Departament de Bioquímica i Biología molecular

**Efectos de la sobreexpresión de S-Adenosil-L-metionina descarboxilasa1 en la respuesta a estrés en *Arabidopsis*.**

Memoria presentada por  
**Enrique Busó Sáez**

Para optar al grado de  
**Doctor en Bioquímica**

Director  
**Dr. Pedro M. Carrasco Sorlí**  
**Valencia, 2005**



# 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 Enrique Busó Sáez, licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Efectos de la sobreexpresión de S-Adenosil-L-metionina descarboxilasa 1 en plantas de *Arabidopsis thaliana*", que presenta para optar al grado de Doctor en Bioquímica.

Para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado a 15 de marzo de 2005.

Firmado: Pedro M. Carrasco Sorlí

## **Agradecimientos.**

Extraño momento es este en el que tengo que resumir todos estos años de tesis. Debo agradecer de forma expresa a todos los que han aportado algo a la realización de este trabajo pero hay que admitir que no podría citar a todos y cada uno de ellos. Por eso debo pedir disculpas a todos aquellos a los que no cite en el siguiente texto.

Primero debo agradecerse a todo mi núcleo familiar en el que también incluyo a todos mis gatos, perros y demás sin los cuales yo no sería tal como soy. Mis padres, mi hermana y mi cuñado que siempre me han visto como algo más grande y a los que me he esforzado en no defraudar. Mis animales que me han enseñado cosas que ningún humano puede enseñarte. Así mismo, y aunque nunca le conocí, creo que le debo mucho a mi abuelo Paco el cual, desde sus libros, despertó en mi el espíritu científico y mi carácter explorador.

Por supuesto debo agradecerle a Pedro que me espabilase desde el principio y me dejase trabajar de forma semi-independiente. Debo destacar que en estos últimos meses me ha sorprendido el tiempo y esfuerzo que ha dedicado a ayudarme en la escritura de este trabajo.

No me dejaré a toda esa gente que me ha ayudado de múltiples formas: Fran García, Pepe Reig y Carmen Carda por la parte de microscopia, Teresa Lafuente por su ayuda en la determinación de hormonas, Pepe Pertusa por el analisis de imagen y a mis compañeros de laboratorio por aguantar mi música. En especial debo agradecer a aquellos que me han hecho reir o pensar de forma distinta.

A Ana por haberme enseñado tantas cosas nuevas, por aguantar mi mal humor y especialmente por ser el resplandor de mi sol en este último año.

Por último quiero dedicar un especial recuerdo a aquellos que me han enseñado cosas nuevas, a los que han estimulado mi imaginación y a los que me han

demostrado que  $2+2$  no siempre son 4: Peter David, Grant Morrison, Warren Ellis,  
Alan Moore y Neil Gaiman.

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

V

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. EL ESTRÉS ABIÓTICO</b>	<b>1</b>
1.1.1. EL ESTRÉS ABIÓTICO: EFECTOS SOBRE LAS PLANTAS	1
1.1.2. SEÑALIZACIÓN DEL ESTRÉS ABIÓTICO	3
<b>1.2. EL ESTRÉS BIÓTICO</b>	<b>7</b>
1.2.1. RECONOCIMIENTO DEL PATÓGENO POR LA PLANTA	8
1.2.2. RESPUESTAS A LA INFECCIÓN POR EL PATÓGENO	8
<b>1.3. LAS POLIAMINAS</b>	<b>10</b>
<b>1.4. BIOSÍNTESIS Y CATABOLISMO DE LAS PAS</b>	<b>11</b>
1.4.1. RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LAS PAS	11
1.4.2. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LAS PAS	14
<b>1.5. LA S-ADENOSILMETIONINA DESCARBOXILASA</b>	<b>15</b>
1.5.1. FUNCIÓN BIOLÓGICA Y CARACTERÍSTICAS	15
1.5.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA SAMDC	17
<b>1.6. PARTICIPACIÓN DE LAS PAS EN LAS RESPUESTAS A ESTRÉS DE LA PLANTA</b>	<b>19</b>
1.6.1. LAS PAS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS ABIÓTICO	20
1.6.2. LAS PAS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS BIOTICO	25
<b>1.7. EFECTOS DE LA MODIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE PAS SOBRE LA RESPUESTA AL ESTRÉS</b>	<b>28</b>
1.7.1. APLICACIÓN EXÓGENA DE PAS Y DE INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PAS	28
1.7.2. MUTANTES DEL METABOLISMO DE PAS	30
1.7.3. SOBREEXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE PAS	31
<b>1.8. EFECTOS DE LA MANIPULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SAMDC EN PLANTAS TRANSGÉNICAS</b>	<b>32</b>
<b>1.9. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>

<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>37</b>
<b>2.1. MATERIAL VEGETAL.</b>	<b>37</b>
<b>2.2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD SAMDC</b>	<b>38</b>
2.2.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD SAMDC	38
2.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	39
<b>2.3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA</b>	<b>39</b>
2.3.1. AISLAMIENTO DE RNA	39
2.3.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA	40
2.3.3. REACCIONES DE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.	40
2.3.4. REACCIONES DE PCR SEMICUANTITATIVA.	43
<b>2.4. ANÁLISIS CON MICROMATRICES DE DNA.</b>	<b>44</b>
<b>2.5. CUANTIFICACIÓN DE POLIAMINAS LIBRES.</b>	<b>45</b>
<b>2.6. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS.</b>	<b>45</b>
2.6.1. CUANTIFICACIÓN DE ETILENO Y ACC.	45
2.6.2. CUANTIFICACIÓN DE ABA.	47
<b>2.7. CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS EN PRESENCIA DE PAS, MGBG O ACC.</b>	<b>47</b>
<b>2.8. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ÓPTICA.</b>	<b>48</b>
2.8.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.	48
2.8.2. OBTENCIÓN DE CORTES SEMIFINOS Y ULTRAFINOS.	49
<b>2.9. TRATAMIENTOS DE ESTRÉS ABIÓTICO.</b>	<b>50</b>
2.9.1. TRATAMIENTOS DE ESTRÉS POR OZONO.	50
2.9.1.1. Estudio de los daños visibles provocados por un estrés por ozono.	50
2.9.1.2. Estudio de la respuesta génica a estrés por ozono.	50
2.9.1.3. Estudio de la recuperación a un estrés por ozono corto e intenso.	50
2.9.1.4. Estudio del efecto del estrés por ozono sobre la germinación.	51
2.9.2. TRATAMIENTOS DE ESTRÉS SALINO O DESECACIÓN.	51
2.9.2.1. Estudio de los daños visibles.	51
2.9.2.2. Estudio de cambios en la expresión en respuesta a estrés salino o desecación.	52
2.9.2.3. Estudio de la recuperación a un estrés salino o por desecación.	52
2.9.2.4. Estudio del efecto de un estrés salino o por desecación sobre la germinación.	53
<b>2.10. TRATAMIENTOS DE ESTRÉS ABIÓTICO.</b>	<b>54</b>

2.10.1. INFECCIÓN CON <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>MACULICOLA</i> Y <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>TOMATO</i> .	54
2.10.2. INFECCIÓN CON <i>PERONOSPORA PARASITICA</i> .	55
<b>2.11. ANÁLISIS DEL ÁREA Y AMARILLEAMIENTO DE LAS HOJAS.</b>	<b>56</b>
<b>2.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</b>	<b>56</b>
<b><u>3.RESULTADOS.</u></b>	<b><u>56</u></b>
<b>3.1. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA <i>SAMDCI</i> SOBRE EL METABOLISMO DE POLIAMINAS.</b>	<b>57</b>
3.1.1. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD SAMDC.	57
3.1.2. ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS.	58
<b>3.2. ANÁLISIS GENÓMICO DE LAS LÍNEAS SOBREEXPRESORAS.</b>	<b>61</b>
3.2.1. ANÁLISIS MEDIANTE MICROMATRICES DE DNA.	61
3.2.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEPENDIENTE DE ETILENO Y ÁCIDO JASMÓNICO.	64
3.2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS ABIÓTICO.	65
3.2.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS BIÓTICO.	67
<b>3.3. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS Y ACC</b>	<b>67</b>
3.3.1. CUANTIFICACIÓN DE ABA.	67
3.3.2. CUANTIFICACIÓN DE ETILENO Y ACC.	68
<b>3.4. ESTUDIO DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN PLACA.</b>	<b>69</b>
<b>3.5. EFECTO DE LA MODIFICACIÓN EXÓGENA DE LOS NIVELES DE PAs SOBRE EL FENOTIPO OBSERVADO.</b>	<b>71</b>
3.5.1. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE PAs.	71
3.5.2. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE MGBG.	74
<b>3.6. EFECTO DE LA MODIFICACIÓN EXÓGENA DE LOS NIVELES DE ETILENO SOBRE EL FENOTIPO OBSERVADO.</b>	<b>77</b>
<b>3.7. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS ABIÓTICO.</b>	<b>80</b>
3.7.1. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS SALINO.	80
3.7.2. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS POR DESECACIÓN.	86

3.7.3. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS POR OZONO.	93
<b>3.8. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS BIÓTICO.</b>	<b>99</b>
<b>3.9. EFECTOS DE LA SOBREENPRESIÓN DE <i>SAMDC1</i> EN LA ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO VASCULAR DEL TALLO Y DE LA HOJA.</b>	<b>105</b>
3.9.1. MICROSCOPIA ÓPTICA DEL TALLO	105
3.9.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA HOJA	108
<b>3.10. EFECTOS DE LA SOBREENPRESIÓN DE <i>ADC2</i> EN GENES INDUCIDOS EN PLANTAS SOBREENPESORAS DE <i>SAMDC1</i>.</b>	<b>111</b>
<b><u>4. DISCUSIÓN.</u></b>	<b><u>113</u></b>
<b>4.1. LA SOBREENPRESIÓN DE <i>SAMDC1</i> PROVOCA UN AUMENTO DE ACTIVIDAD SAMDC Y CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE PAS Y ETILENO.</b>	<b>113</b>
<b>4.2. LA SOBREENPRESIÓN DE <i>SAMDC1</i> AUMENTA LA TOLERANCIA AL ESTRÉS ABIÓTICO</b>	<b>115</b>
<b>4.3. LA SOBREENPRESIÓN DE <i>SAMDC1</i> AUMENTA LA TOLERANCIA AL ESTRÉS BIÓTICO</b>	<b>120</b>
<b>4.4. LAS PLANTAS SOBREENPESORAS DE <i>SAMDC1</i> PRESENTAN ALTERACIONES EN EL DESARROLLO VASCULAR DE LOS TALLOS Y DE LAS HOJAS</b>	<b>122</b>
<b>4.5. LOS AUMENTOS EN LOS NIVELES DE SPM SON RESPONSABLES DEL EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LA <i>SAMDC1</i>.</b>	<b>124</b>
<b><u>5. CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>129</u></b>
<b><u>6. BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b><u>131</u></b>
<b><u>ANEXO</u></b>	<b><u>159</u></b>

# ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
ABRE	ABA responsive element
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACT	actina
ADC	L-arginina descarboxilasa
AVG	aminoetoxivinilglicina
BSA	seroalbúmina bovina
CFU	unidades formadoras de colonias
<i>Col0</i>	ecotipo Columbia de <i>Arabidopsis Thaliana</i>
dcSAM	S-adenosil-5'-3'-metilpropilamina
DFMA	DL-difluorometilarginina
DFMO	DL-difluorometilornitina
DRE	Drought responsive element
DREB	factor transcripcional de unión a DRE
EDTA	ácido etiléndiaminotetraacético, sal disódica
GA <sub>3</sub>	ácido giberélico
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GST	glutación S-transferasa
HR	respuesta hipersensible
MGBG	metilglioxal-bis-(guanilhidrazona)
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MS	Murashige y Skoog
NO	óxido nítrico.
O.D. <sub>600</sub>	densidad óptica a 600nm

ODC	L-ortinina descarboxilasa
PAs	poliaminas
pb	pares de bases
ppb	partes por billón
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Put	Putrescina
qRT-PCR	RT-PCR en tiempo real
RGB	componentes de color roja-verde-azul
RT	transcripción reversa
ROS	especies reactivas del oxígeno
SA	ácido salicílico
SAM	S-adenosil-L-metionina.
SAMDC	S-adenosil-L-metionina descarboxilasa
SAMS	S-adenosil-L-metionina sintasa
SDS	n-dodecil sulfato sódico
Spm	espermina
Spd	espermidina
SPMS	espermina sintasa
SPDS	espermidina sintasa 1
TCA	ácido tricloroacético
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano

# **1. INTRODUCCIÓN.**

## **1.1. El estrés abiótico.**

### **1.1.1. El estrés abiótico: efectos sobre las plantas.**

El estrés abiótico provoca una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente al crecimiento de la planta y su productividad (Wang y col., 2001). Su efectos provocan una disminución media del rendimiento de los terrenos agrícolas de un 50% (Boyer, 1982; Bray y col., 2000) del planeta. La sequía y la salinidad se están extendiendo de forma especial en ciertas regiones y podrían dar lugar a una excesiva salinidad de más del 50% de la tierra arable para el año 2050 (Wang y col., 2003). Aunque estos estreses son claramente distintos en su naturaleza física y cada uno provoca respuestas específicas en la planta, es cierto también que activan algunas reacciones comunes y que los mecanismos de respuesta pueden estar interconectados (Wang y col., 2003; Zhu 2001a). Así, sequía y salinidad se manifiestan como un estrés osmótico que provoca la disrupción de la homeostásis y la distribución de iones en la célula (Serrano y col., 1999; Zhu 2002). Por otra parte el estrés oxidativo que acompaña frecuentemente a las altas temperaturas, la salinidad o la sequía puede provocar desnaturalización de proteínas funcionales o estructurales (Smirnoff, 1998). A su vez las bajas temperaturas conduce a una deshidratación celular y la congelación del medio extracelular reducen la absorción y conducción de agua nivel de la raíz (Levitt, 1980). Consecuentemente existe una compleja red de señalización responsable de la adaptación de la planta a estas condiciones medioambientales adversas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Knight y Knight, 2001; Zhu, 2001b; 2002). Esta adaptación incluye la activación de rutas similares de señalización y respuestas

celulares como la producción de proteínas de estrés, síntesis de antioxidantes y acumulación de solutos compatibles (Vierling y Kimpel, 1992; Zhu y col., 1997; Cushman y Bohnert, 2000).

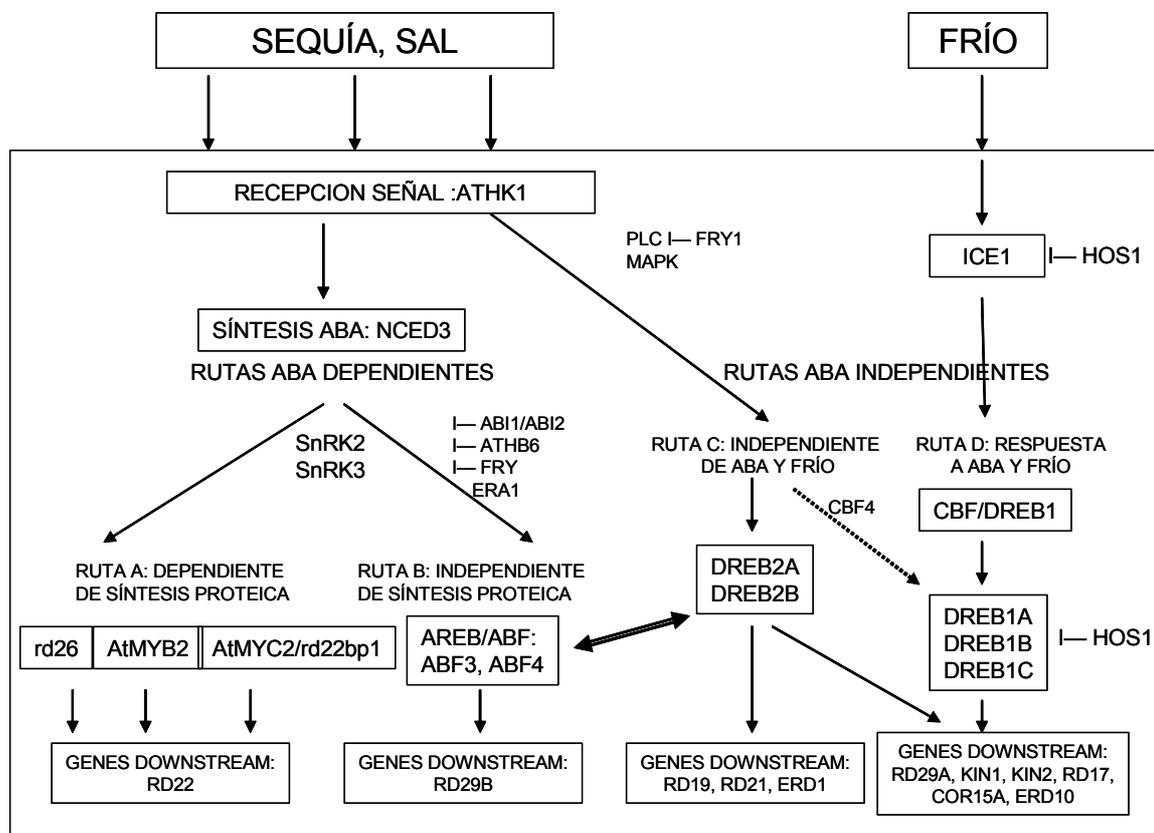
La respuesta más importante de la planta frente al estrés abiótico es la activación transcripcional de genes específicos. La regulación espacial y temporal de patrones de expresión de genes de estrés específicos es una parte importante de la adaptación de la planta al estrés abiótico (Riechmann y col., 2000). Los productos de estos genes se pueden dividir en dos grupos. En el primero de ellos se incluyen aquellas proteínas que probablemente funcionan en la tolerancia al estrés. Se trata de proteínas canal que participan en el movimiento de agua a través de la membrana, de los enzimas requeridos para la biosíntesis de osmoprotectores (azúcares, prolina y glicina-betaína), de proteínas que protegen macromoléculas y membranas (proteínas LEA, osmotina, proteínas de anticongelación, chaperonas y proteínas de unión al mRNA), proteasas para el recambio proteico y de enzimas de detoxificación (glutathiona- S-transferasa, hidrolasa de epóxidos solubles, catalasa, superóxido dismutasa y arcobato peroxidasa) (Ingram y Bartels, 1996; Bray, 1997; Shinozaki y Yamaguchi Shinozaki, 1997). La sobreexpresión de algunos de estos genes inducibles genera fenotipos tolerantes al estrés comprobando así que efectivamente funcionan en la tolerancia a estrés como el enzima clave en la regulación de la biosíntesis de prolina cuya sobreexpresión mejora la tolerancia al estrés osmótico (Kishor y col., 1995), o el factor de transcripción AP2/EREBP cuya sobreexpresión mejora la resistencia al estrés salino en tabaco (Guo y col., 2004). El segundo grupo contiene aquellos factores proteicos que participan en la transducción de la señal que se produce en la respuesta a estrés. Se trata de proteínas quinasas, factores de transcripción, fosfolipasa C, y proteínas 14-3-3 (Shinozaki y Yamaguchi Shinozaki, 1997).

### 1.1.2. Señalización del estrés abiótico.

Los estreses de tipo abiótico en general y el déficit de agua en particular provocan la producción de la hormona ácido abscísico (ABA), que a su vez induce la transcripción de una serie de genes participantes en la respuesta al estrés abiótico. El análisis de la expresión de los genes inducibles por ABA hace evidente que algunos de ellos requieren para su inducción biosíntesis proteica lo que sugiere la existencia de 2 rutas independientes entre la producción de ABA endógeno y la expresión génica consecuente del estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Por otra parte, análisis de la expresión de genes inducibles por déficit hídrico en plantas deficientes en ABA o insensibles al ABA han demostrado que algunos de los genes inducidos por estrés no requerían la acumulación de ABA endógeno bajo condiciones de sequía o frío (Ingram y Bartels, 1996; Bray, 1997; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996, 2003). Así pues no hay sólo rutas de señalización dependientes de ABA sino también rutas independientes participantes en la respuesta al estrés abiótico. Se ha sugerido la existencia de al menos 4 rutas de señalización independientes en la activación de genes inducibles por estrés (Figura 1.1) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996): dos son dependientes de ABA (rutas A y B) y dos independientes de ABA (rutas C y D). A partir de los resultados obtenidos por análisis genómicos y moleculares se ha sugerido que existe una regulación cruzada entre estos sistemas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2003). El inicio del sistema de señalización es común para todas las rutas, y consiste en un sistema de dos componentes receptor de la señal de estrés hídrico por privación de agua o alta salinidad llamado ATHK1. Por otra parte, el estrés por frío es detectado por otra vía parcialmente desconocida donde el primer miembro caracterizado es ICE1.

En las rutas dependientes de ABA, la señal recibida a partir de ATHK1 es transducida hasta la ruta de síntesis de esta hormona, en la cual el enzima clave regulador del flujo es el codificado por el gen NCED3 (Tan y col., 2003). A partir de

la señal de estrés recibida, el ABA es sintetizado *de novo* en la planta, actuando a modo de señalizador endógeno de estrés. Esta nueva "señal endógena" es transducida a partir de dos rutas, las cuales se diferencian en la rapidez de respuesta: la ruta A es dependiente de síntesis proteica, y por tanto es lenta; sin embargo, la ruta B es independiente de síntesis proteica, y por tanto más rápida que la anterior (Figura 1.1). Los elementos implicados en la transducción de señal del ABA comprenden tanto productos de genes activadores de la respuesta al estrés (*ERA1*, *SnRK2* y *SnRK3*) (Umezawa, 2004) como productos de genes represores de estas respuestas (*ABI1*, *ABI2*, *ATHB6* y *FRY1*) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2003, Zhu, 2002)



**Figura 1.1 Rutas de señalización para la activación transcripcional de genes inducidos por estrés abiótico.** Las rutas A y B son dependientes de ABA, mientras que las rutas C y D son independientes de la hormona.

En la ruta B la inducción de los genes se caracteriza por no requerir síntesis de proteínas. Estos genes inducibles por estrés abiótico contienen elementos *cis* conservados que responden a ABA llamados "elementos de respuesta a ABA" (ABRE; ACGTGG/TC) en la región del promotor (Bonetta y McCourt, 1998; Grill y Himmelbach, 1998; Leung y Gidaudat, 1998). Los elementos ABRE fueron descritos por primera vez en los genes *Em* de trigo y *rab* de arroz de forma que se identificó la proteína de unión al DNA por el elemento ABRE, EmBP-1 que se trataba de un factor transcripcional del tipo bZIP (Menkes y col., 1995). Los cDNAs para las proteínas de unión a los elementos ABRE que se han aislado tienen una región básica adyacente a un motivo "cremallera de Leucina" (bZIP) constituyendo una gran familia. Se ha comprobado que los nucleótidos alrededor de la secuencia ACGT del elemento ABRE participan en la especificidad de la unión de las proteínas bZIP (Menkes y col., 1995). Aparte de los elementos ABRE existen otros elementos *cis* que participan en la expresión de genes dependiente de ABA durante el déficit de agua. Es el caso de los motivos "caja Sph" y GTGTC que en maíz regulan la expresión dependiente de ABA durante la sequía y la desecación de la semilla (McCarty, 1995).

En la ruta A la biosíntesis de factores proteicos es necesaria para la expresión de genes dependiente de ABA. Los genes de esta ruta poseen en sus secuencias promotoras motivos de unión de proteínas de unión al DNA como MYC o MYB (Iwasaki y col., 1995). La expresión de estos factores de transcripción, como *rd22BPI* (también llamado *atMYC2*), se induce por sequía o estrés salino de forma que los productos resultantes inducen la transcripción dependiente de ABA de ciertos genes de respuesta a estrés abiótico. Adicionalmente varios factores de transcripción tipo bZIP de maíz, arroz y *Arabidopsis* responden al frío, deshidratación y tratamiento con ABA exógeno (Kusano y col., 1995; Lu y col., 1996; Nakagawa y col., 1996). Estos factores bZIP se unen a secuencias tipo "caja G" indicando que proteínas bZIP

inducibles por ABA también participan en esta ruta de señalización sin la unión a elementos ABRE.

En las rutas independientes de ABA, la señal captada a partir del sensor *ATHK1* en *Arabidopsis* es transducida por la fosfolipasa *AtPLC1*, la cual tiene como represor *FRY1* así como una serie de quinasas de tipo MAPK (*AtMPK3*, *ATMEKK1*) (Xiong y col., 2001). Experimentos realizados con plantas deficientes o insensibles a ABA han demostrado la existencia de genes de respuesta a estrés abiótico cuya inducción no requería ABA bajo condiciones de estrés pero que sí respondían al tratamiento con ABA exógeno (Thomashow, 1994; Ingram y Bartels, 1996; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Bray, 1997). Estos genes implican la existencia de la ruta D, la responsable de la transducción de la señal del estrés por frío y que presenta una regulación cruzada con las rutas de transducción de la señal de estrés hídrico por medio del factor *CBF4*. El primer miembro caracterizado de la ruta D es *ICE1*, un factor bHLH tipo MYC que regula la expresión de *DREB1A*. *DREB1A* es un factor de transcripción que regula la expresión del resto de genes de la familia DREB1 (*DREB1B* y *DREB1C*) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000). Los genes de la familia DREB1 tienen como diana de acción una serie de genes efectores de resistencia a estrés como *rd29a*, *kin1*, *rd17*, *cor15a* y *erd10* (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Al analizar la secuencia de sus promotores se ha encontrado la presencia de una secuencia de 9 pb TACCGACAT llamada elemento DRE (drought responsive element) que es esencial para la inducción de estos genes bajo condiciones de estrés pero que no funciona como elemento ABRE (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). La existencia de elementos ABRE en la secuencia de los promotores de estos genes explica su inducción por ABA. Estos motivos DRE así como motivos similares llamados "repetición C" (CRT) se han descrito en varios genes de respuesta a sequía y frío y constituyen una ruta de señalización independiente de ABA (Baker y col., 1994; Jiang y col., 1996; Shinozaki y

Yamaguchi-Shinozaki 2000; Thomashow 1999). Los factores de transcripción que interaccionan con los elementos DRE han sido caracterizados (Stockinger y col., 1997) y se ha comprobado que todas las proteínas de unión a DRE contienen un motivo de unión al DNA también descrito en las proteínas EREBP y AP2 (motivo EREBP/AP2) las cuales están involucradas en procesos como la respuesta a etileno y la morfogénesis floral respectivamente. Esta ruta de señalización está regulada por *HOS1* que es un represor de *ICE1* y de los genes de la familia *DREB1B* (Figura 1.1).

Por último, existen diversos genes inducibles por estrés abiótico que no responden al tratamiento con ABA lo que sugiere que existe una 4ª ruta de señalización (ruta C) (Thomashow, 1994; Ingram y Bartels, 1996; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Bray, 1997). Esta ruta es también independiente del estrés por frío y tiene como factores de transcripción reguladores los productos de los genes de la familia DREB2 (*DREB2A* y *DREB2B*). Entre los genes regulados por estos factores DREB se encuentran *rd19*, *rd21* que codifican tior proteasas y *erd1* que codifica una subunidad reguladora de una proteasa cloroplástica (Nakashima y col., 1997).

## 1.2. El estrés biótico.

El estrés causado por la infección de patógenos en la planta es otra de las causas de la reducción de la productividad de los cultivos siendo el impacto de estas infecciones especialmente importante en países en desarrollo (McDowell y Woffenden, 2003). Las plantas están dotadas de una serie amplia de mecanismos de defensa que incluyen barreras preformadas como ceras, componentes de la pared celular y metabolitos secundarios (McDowell y Dangl, 2000). La detección del patógeno activa una serie de respuestas como el aumento de la expresión de genes de defensa, la producción de compuestos antimicrobianos, la formación de lignina, el estallido oxidativo y la respuesta hipersensible (HR) (Feys y Parker, 2000). Así pues

la resistencia a la infección por patógeno se debe a una combinación de barreras físicas y químicas previas al ataque por el patógeno o inducidas por éste.

### **1.2.1. Reconocimiento del patógeno por la planta.**

La activación de respuestas de defensa a la infección por el patógeno requiere de la percepción previa de éste por la planta. Esta percepción se lleva a cabo por la interacción de efectores del patógeno con receptores de la planta (Ebel y Cosio, 1994). Los efectores del patógeno se distribuyen en dos grupos. Uno de ellos incluye los determinantes de virulencia (Avr) que son específicos y únicos de un patógeno particular (Flor, 1971, Keen, 1990). El segundo grupo de efectores de patógenos incluye factores no específicos que están presentes de forma constitutiva en el patógeno al ser esenciales para su funcionamiento (Boller, 1995). Por tanto, este reconocimiento más basal y amplio se basa en el reconocimiento de motivos conservados en moléculas procedentes del patógeno que no se encuentran en eucariotas superiores. Estas moléculas se llaman PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) y están presentes en grandes grupos de patógenos, tienen diversas estructuras e incluyen poligalacturonidos,  $\beta$ -glucanos, lípidos y proteínas. Son reconocidos por receptores que poseen en el medio extracelular repeticiones ricas en leucina (LRR) (Ebel y Cosio, 1994). Uno de los PAMPs más estudiados es la flagelina bacteriana cuyo sistema de percepción puede servir de ejemplo de este sistema de reconocimiento (Gómez-Gómez y Boller, 2000).

### **1.2.2. Respuestas a la infección por el patógeno.**

El reconocimiento por la planta de la presencia de un patógeno desencadena una serie muy variada de respuestas. Una de las primeras respuestas que se activan es el rápido aumento de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Baker y col., 1995; Lamb y Dixon, 1997). Estas ROS pueden ser tóxicas para el patógeno invasor o contribuir al refuerzo estructural de la pared celular de la plantas (Baker y

col., 1995; Lamb y Dixon, 1997). El principal componente de estas ROS es el superóxido que dismuta a peróxido de hidrógeno (Lamb y Dixon, 1997). Se ha propuesto también un papel en la señalización de defensa para el radical superóxido (Jabs y col., 1996 y 1997). Así pues el aumento de ROS es requerido a su vez para la inducción posterior de genes de defensa y producción de metabolitos antimicrobianos. Sin embargo el papel más importante de las ROS en la defensa de la planta es su participación en la respuesta hipersensible (HR) (Lamb y Dixon, 1997). La HR consiste en la formación de lesiones necróticas en el lugar de entrada del patógeno (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Dangl y col., 1996). Esta muerte celular localizada previene la extensión del patógeno a tejidos no infectados y normalmente va acompañada de la síntesis de varias familias de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) que poseen actividad antimicrobiana.

Otra de las respuestas tempranas a la infección por patógenos implica al óxido nítrico (NO). El NO actúa como mensajero controlando una multitud de procesos fisiológicos que incluyen las respuestas inmunes (Wendehenne y col., 2001). El NO es requerido para la inducción de la HR (Delledonne y col., 2001) y junto con otras ROS estimula la producción de ácido salicílico (SA) y viceversa (Durner y Klessig, 1999; Van Camp y col., 1998). Por otra parte el ácido salicílico (SA) es una molécula crítica en las rutas de defensa de la planta frente a la invasión por patógenos (Dempsey y col., 1999; Ryals y col., 1996, Shah y Klessig, 1999). De esta forma se establece un bucle de retroregulación positiva entre ROS, NO y SA que es crucial en la activación de las defensas de la planta y en concreto en la activación de la HR (McDowell y Dangl, 2000; Wendehenne y col., 2001). La aplicación exógena de SA induce resistencia en muchas especies de plantas (Malamy y Kleesig, 1992) y activa varios tipos de genes PR como son *PR-1*, *PR2*, y *PR5* (Uknes y col., 1992; Ward y col., 1991). Adicionalmente los aumentos *in vivo* de SA endógeno se correlacionan

con inducción de genes PR y el desarrollo de resistencia en plantas infectadas con patógenos (Dempsey y col., 1997; Malamy y col., 1990; Métraux y col., 1990).

Otros estudios demuestran que el etileno y el ácido jasmónico también participan en la activación de diversas rutas de defensa frente al ataque por patógenos (Dong, 1998; Pieterse y Van Loon, 1999). La relación entre ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico no está bien definida aunque se sabe que el ácido salicílico actúa de forma sinérgica con el etileno y el metil jasmonato en la activación de la expresión de proteínas PR (Lawton y col., 1995; Xu y col., 1994). También se sabe que otras respuestas de defensa están reguladas por etileno y/o ácido jasmónico de una forma independiente al ácido salicílico (Pieterse y col., 1996; Pennicnkx y col., 1996).

Estas respuestas rápidas mediadas por ROS, NO, SA, etileno y ácido jasmónico dan lugar al aumento de expresión de muchos genes de defensa que codifican para peroxidasas, glutatión S-transferasas, inhibidores de proteínas y varios enzimas de la síntesis de compuestos antimicrobianos como los glucosinolatos (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Yang y col., 1997).

### **1.3. Las Poliaminas.**

Las poliaminas (PAs) constituyen un grupo de moléculas de bajo peso molecular de naturaleza policatiónica a pH fisiológico. De presencia ubicua y abundante tanto en plantas como en animales están implicadas en una gran cantidad de procesos fisiológicos y de desarrollo (Malmberg y col., 1998). Aunque se han realizado numerosos estudios para caracterizar su función, el papel exacto de las PAs *in vivo* está aún por determinar (Kumar y col., 1997). Interaccionan con moléculas biológicamente activas como ácidos nucleicos, proteínas o membranas celulares. De igual forma desarrollan un papel fundamental en la regulación de la síntesis y función de ácidos nucleicos y proteínas, estabilidad de membrana, proliferación celular y diferenciación (Galston y Kaur- Sawhney, 1990). Juegan un papel crítico en muchos

procesos de desarrollo como son el crecimiento de las raíces, la embriogénesis somática, la iniciación floral y el desarrollo de flores y frutos (Evans y Malmberg, 1989; Slocum y Flores, 1991). Las PAs podrían proteger el DNA de la degradación enzimática, las especies reactivas del oxígeno (Ha y col., 1998) o la degradación térmica (Khan y col., 1992). Dado su carácter ácido débil, podrían tamponar el citoplasma en estreses ácidos (Slocum y col., 1984). Por otra parte, son precursores en la biosíntesis de metabolitos secundarios, como algunos alcaloides y conjugados de ácido cinámico, que pueden intervenir en los mecanismos de defensa de la planta (Flores, 1991)

Las PAs más comunes y abundantes incluyen la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd) y la tetramina espermina (Spm). También existen PAs menos abundantes de cadena larga como la caldina o la termina que se sintetizan como respuesta a altas temperaturas. Las PAs pueden encontrarse de forma libre (PAs solubles) o conjugadas a compuestos de bajo peso molecular como ácidos fenólicos (PAs solubles en ácido) o unidas a macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos (PAs insolubles en ácidos) (Bagni y Tassoni, 2001; Bouchereau y col., 1999).

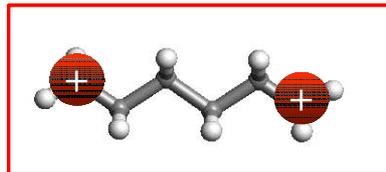
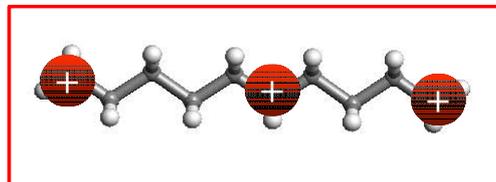
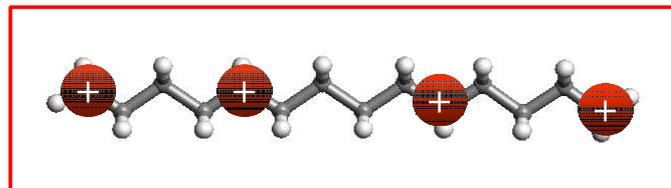
## **1.4. Biosíntesis de las PAs.**

La cantidad de PAs presente en un momento es el resultado de varios factores como son su biosíntesis y transporte a otros tejidos, la conjugación con ácidos fenólicos para dar amidas ácidas hidroxicinámicas (HCCAs), la unión a macromoléculas y su degradación.

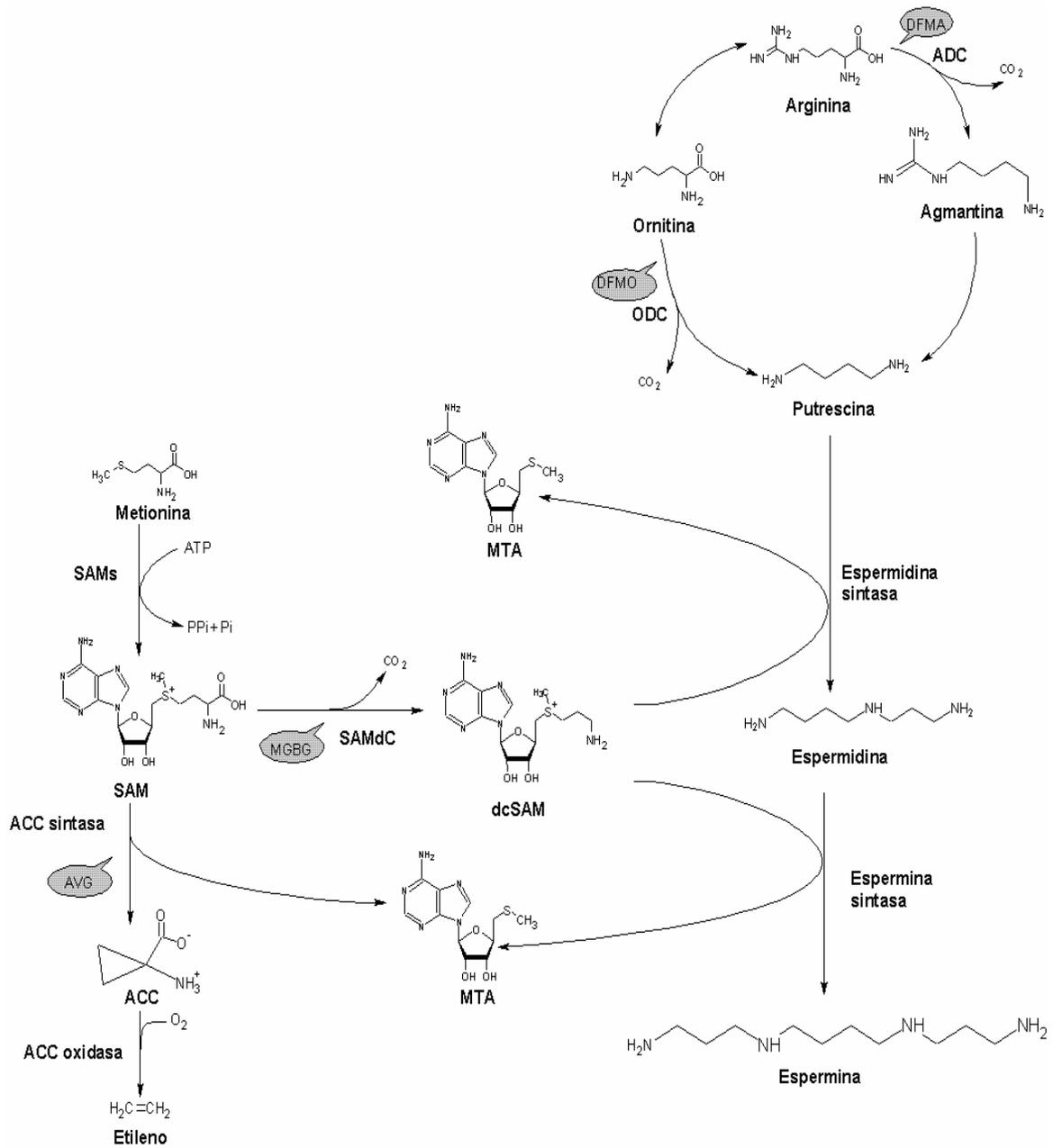
### **1.4.1. Ruta de biosíntesis de PAs.**

El primer paso en la biosíntesis de PAs en plantas superiores es la formación de la diamina Put. La Put se sintetiza directamente a partir de la ornitina por la acción

de la ornitina descarboxilasa (ODC; EC4.1.1.17), actividad que no se ha encontrado en *Arabidopsis* (Hanfrey y col., 2001), e indirectamente desde la arginina por la arginina descarboxilasa (ADC; EC 4.1.1.19) (Figura 1.3). La Spd y la Spm se forman por la adición consecutiva de un grupo aminopropilo a Put y Spd respectivamente. Estas reacciones están catalizadas por las aminopropiltransferasas espermidina sintasa (EC 2.5.1.16) y espermina sintasa (EC 2.5.1.22). Estos grupos aminopropilo proceden de la S-adenosil-5'-3'-metilpropilamina generada en la descarboxilación de las S-adenosilmetionina (SAM) en una reacción catalizada por el enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50). Existen evidencias que sugieren que las actividades enzimáticas de ADC y ODC están reguladas de forma específica según tejido y estadio de desarrollo. (Minocha y col., 1995; Walden y col., 1997). La actividad de las tres descarboxilasas (ODC, ADC y SAMDC) parece constituir un punto de control metabólico importante en la célula como se puede deducir de la corta vida media de estos enzimas (Cohen, 1998)

**Putrescina****Espermidina****Espermina**

**Figura 1.2 Estructura química de las PAs más habituales en células eucariotas: Putrescina, espermidina y espermina.**



**Figura 1.3. Ruta biosintética de las PAAs putrescina, espermidina y espermina en plantas y su relación con la biosíntesis del etileno.** ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; ADC, arginina descarboxilasa; 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.

### 1.4.2. Regulación de la biosíntesis de PAs.

Entre los mecanismos regulatorios que controlan las actividades de ADC, ODC y SAMDC el control por retroalimentación ejercido por las PAs se ha descrito en numerosos sistemas. Existen evidencias de que los niveles de Spm y Spd están sujetos a una fuerte regulación homeostática (Bhatnagar y col., 2002). La adición de Spm exógena a cultivos de células de tabaco suprime la actividad ADC e inhibe la actividad SAMDC lo que sugiere la existencia de un mecanismo regulatorio por retroalimentación (Hiatt y col., 1986). Sin embargo este no parece ser un mecanismo general de la regulación pues la adición de esta PA a cultivos de células de tabaco no suprime la actividad ODC (Hiatt y col., 1986). Por su parte la actividad ODC parece estar regulada en plantas de guisante por un mecanismo simple basado en la acumulación de producto final (Slocum y Richardson, 1991). Esto sugiere la existencia de diferentes mecanismos que participan en la regulación de las actividades ADC, ODC y SAMDC (Tiburcio y col., 1997). Experimentos realizados con plantas transgénicas conducen a conclusiones ligeramente diferentes. Así no se producen cambios significativos en los niveles de mensajeros de SAMDC y SPDS en plantas de arroz transformadas con el cDNA de *SAMDC* de *Datura* que presentan incrementos importantes en los niveles de Spd (Thu-Hang y col., 2002).

Por otra parte, en plantas transgénicas de arroz transformadas con el cDNA antisentido de *ADC* de avena se observa que la reducción en los niveles de Put y Spd provocada por la disminución en la actividad ADC no afectaba a los niveles de los RNAs mensajeros de *ADC*, *ODC* o *SAMDC* (Trung-Nghia, 2003).

Estos resultados sugieren que la retroalimentación por las PAs puede ser un mecanismo de inhibición de la expresión de los genes de su propia síntesis y que la falta de PAs no desencadena una inducción de la expresión de estos genes aliviada por una alteración en los niveles totales de PAs (Trung-Nghia, 2003).

## 1.5. La S-adenosilmetionina descarboxilasa.

### 1.5.1. Función biológica y características.

La SAMDC cataliza la descaboxilación de la SAM para dar lugar a S-adenosil-5'-3'-metilpropilamina (dcSAM), que a su vez actúa como donador de los grupos aminopropilo necesarios para la síntesis de Spd y Spm a partir de Put (Figura 1.3). Un rasgo característico en plantas es que la SAM es asimismo un intermediario de la síntesis de etileno a través de la síntesis previa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Van der Straeten y Montagu, 1990). De esta forma la SAM constituye un punto en común entre ambas rutas metabólicas lo que ha provocado numerosos estudios en los que se analiza el efecto de la variación en los niveles de SAM sobre la biosíntesis del etileno y las PAs.

Estudios realizados en diversos organismos como *Escherichia coli* (Tabor y col., 1986), *Sacharomices cerevisiae* (Kashiwagi y col., 1990) o en mamíferos (Pajunen y col., 1988) han demostrado que la SAMDC constituye una mínima fracción del total de proteínas intracelulares. Su escasa presencia se debe a dos factores: la vida media corta de la proteína y una regulación a múltiples niveles; transcripcional, traduccional y post-traduccional (Tiburcio y col., 1997). En la regulación de la expresión de los genes de la SAMDC participan diversos factores como las propias PAs, hormonas o factores de crecimiento (Tiburcio y col., 1997).

La traducción del mRNA de la SAMDC da lugar a un proenzima que se escinde autocatalíticamente para formar 2 subunidades denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ , generándose en este proceso el grupo prostético piruvato en el extremo 5' de la subunidad  $\alpha$  por serinolisis (Stanley y col., 1989). En el caso de los mamíferos la SAMDC posee una estructura dimérica  $(\alpha \beta)_2$  cuya estructura cristalina se ha obtenido con un resolución de 2.25 Å (Ekstrom y col., 1999), comprobándose que el

monómero formado por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se pliega en un motivo no descrito anteriormente que puede ser el resultado de una antigua duplicación génica.

La SAMDC de plantas presenta características similares a las presentes en otros organismos. La primera detección de actividad SAMDC en plantas fue realizada en extractos de brotes de judía (Coppoc y col., 1971), para posteriormente ser purificada en plántulas de maíz (Suzuki y Hirasawa, 1980) y col china (Yamahona y Cohen, 1985). Trabajos iniciales demostraron que la vida media de este enzima en cultivos celulares de tabaco es de 30-60 minutos y que su nivel de actividad disminuía en cultivos celulares con Spd (Hiatt y col., 1986). Esta inhibición por Spd se produciría, según los autores, a nivel de la síntesis de la SAMDC y no a un nivel post-traduccional, como ocurre en el caso de la SAMDC de mamíferos donde Spd y Spm inhiben la actividad del enzima (Heby y Persson, 1990).

Se han aislado y caracterizado los cDNAs de SAMDC de numerosas plantas como *Solarum tuberosum* (Taylor y col., 1992; Mad Arif y col., 1994), *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, 2000), *Vicia faba* (Fruehling y col., 2000), *Arabidopsis thaliana* (Marco y Carrasco, 1996), *Pisum sativum* (Marco y Carrasco, 2002) entre otras. El análisis de las secuencias de estos clones muestra que su grado de identidad es elevado aunque al compararlas con el resto de organismos los valores de identidad se reducen considerablemente, reduciéndose a regiones conservadas concretas. Estas regiones incluyen en su secuencia los residuos necesarios para la actividad enzimática (Stanley y Pegg, 1991, Ekstrom y col., 1999), así como el sitio de ruptura autocatalítica post-traduccional (Stanley y col., 1989; Kashiwagi y col., 1990; Lee y col., 1997a; Xiong y col., 1997). Al igual que en mamíferos la secuencia de la SAMDC de plantas presenta secuencias PEST (Lee y col., 1997a; Pajunen y col.,

1988) que están implicadas en mecanismos de degradación de proteínas (Rogers y col., 1986). Por otra parte, los cDNAs de la *SAMDC* de plantas se caracterizan por poseer regiones 5' no traducidas largas (5'-UTR) y que contienen una pauta de lectura de 50-54 aminoácidos muy conservados a la que se ha atribuido un posible papel regulador (Schröder y Schröder, 1995; Hanfrey y col., 2002) de forma similar a la región 5' no traducible larga que se encuentra en plantas y que contiene una pauta de lectura para un hexapéptido, [MAGDIS], cuya presencia es necesaria para la inhibición de la síntesis de SAMDC por Spm (Shantz y col., 1994; Ruan y col., 1996).

A nivel genómico la organización de la *SAMDC* de plantas se caracteriza generalmente por la presencia de más de una copia del gen, así en clavel (Lee y col., 1997a), o en patata (Rorat y col., 1998) hay 2 o más copias aunque en *Trithordeum* se ha detectado una única copia (Dresselhaus y col., 1996). El genoma de *Arabidopsis* presenta 6 copias de la *SAMDC* siendo *SAMDC1* la más abundante y ubicua mientras que *SAMDC2* se expresa sólo en hojas e inflorescencias. Las otras 4 copias del gen de la *SAMDC* en *Arabidopsis* se encontraron por homología de secuencia la cual, habiéndose sugerido que los genes *SAMDC5* y *SAMDC6* no codifican proteínas enzimáticamente activas (Franceschetti y col., 2001)

### **1.5.2. Regulación de la expresión de la SAMDC.**

La expresión de la *SAMDC* está regulada por muchos factores. El estudio espacial de la expresión de *SAMDC* según el tejido demuestra niveles detectables del transcrito en todos los tejidos estudiados, comprobándose unos niveles de expresión altos en tejidos jóvenes y de división activa y niveles de expresión bajos en tejidos maduros ya sea vegetativos o reproductivos (Evans y Malmberg, 1989). El análisis de la expresión de la *SAMDC* de patata demostró la existencia de niveles altos de expresión en brotes florales observándose 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). En tejidos de clavel se observa unos niveles altos de expresión de SAMDC en pétalos, siendo menores en ovarios y pistilo (Lee y col., 1997a). El desarrollo de la flor produce también cambios en la expresión de la SAMDC, observándose un aumento de los transcritos en pétalos desde el estadio de brotes jóvenes hasta la antesis, para posteriormente decaer durante la senescencia de la flor (Lee y col., 1997a). Por otra parte, en tejidos vegetativos el mayor nivel de expresión se observa en tallos, siendo más bajos en raíces y hojas (Lee y col., 1997a). En guisante se observa que los mayores niveles de expresión de la SAMDC se encuentran en ovarios en día de antesis mientras que los niveles más bajos se encuentran en hojas adultas (Marco y Carrasco 2002). En este trabajo se comprobó también que la aplicación de AVG, un inhibidor de la síntesis de etileno (Satoh y Yang, 1989), en ovarios emasculados de guisante en el día de antesis retrasa su entrada en senescencia y provoca una disminución en los niveles de SAMDC. Por otra parte, el tratamiento con Spd provoca también la reducción en los niveles de SAMDC y un retraso en la entrada en senescencia (Marco, 2000).

Existe también una oscilación circadiana de los niveles de mensajero de SAMDC en hojas primarias de plantas de *Hordeum vulgare* crecidas en un fotoperíodo de largo (Dresselhaus y col., 1996). Se puede comprobar la existencia de unos niveles máximos de transcrito durante las primeras 8 horas en luz y un nivel mínimo durante la mitad del período de oscuridad. Esta oscilación circadiana se puede observar también en hojas de *Pharbitis nil*, donde plantas crecidas en día largo presentan oscilaciones con un máximo de transcrito de SAMDC tras la primera hora de luz, para luego decaer a un mínimo durante el final del período de oscuridad (Yoshida y col., 1998). Estos estudios revelan además una rápida inducción por la luz de la expresión de SAMDC, en la que están implicados tanto el receptor de luz azul

como el fitocromo PhyB. Más tarde se observa una caída de los niveles del mensajero, con una vida media de 30 minutos (Yoshida y col., 1999).

Los niveles de expresión de SAMDC presentan también variaciones respecto de factores ambientales; así en arroz el estrés salino, la desecación y la aplicación de ABA provocan un aumento en los niveles de su transcrito (Li y Chen, 2000). Así mismo, en plantas de soja el estrés por desecación provoca un aumento de su expresión de la SAMDC (Tian y col, 2004).

También puede observarse una inducción de su expresión en patata como consecuencia del crecimiento a 3-4°C (Rorat y col., 1998). De igual forma, el frío provoca en arroz (Lee y col., 1997c) o en calabacín un aumento de la actividad SAMDC (Kramer y Wang, 1990). El tratamiento con ozono provoca también un aumento en los niveles de expresión de la SAMDC en guisante (Marco y Carrasco, 2002).

## **1.6. Participación de las PAs en las respuestas a estrés de la planta.**

El metabolismo de las PAs se ve afectado por diferentes tipos de estreses tanto de carácter abiótico como biótico. Las PAs están relacionadas con las rutas de señalización de las plantas en la respuesta al ataque por patógenos (Martín-Tanguy, 1987) y al estrés de tipo abiótico causado por un déficit de nutrientes, pH ácido, estrés osmótico, estrés salino y por contaminantes atmosféricos (Flores, 1991; Bouchreau y col., 1989; Langebartels y col., 1991). Se ha relacionado el aumento en los niveles de PAs observado como consecuencia de un estrés con la capacidad que tienen estas moléculas de unirse tanto a cationes como a aniones. La unión de las PAs a aniones como los fosfolípidos de membrana o ácidos nucleicos protegería a estas moléculas de reacciones de tipo oxidativo. Por otra parte la unión a cationes como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,

$\text{Fe}^{+2}$  o  $\text{Ni}^{2+}$  evitaría la formación de radicales libres (Lovaas, 1997). Las PAs se comportan como antioxidantes eficientes en muchos sistemas biológicos y también pueden tener función como quelantes vegetales, con lo que son buenos candidatos para la protección de células vegetales frente al daño oxidativo derivado de la presencia de metales pesados como el cadmio que es deletéreo para el crecimiento y desarrollo de las plantas, causando daños severos incluso a bajas concentraciones. Los trabajos publicados hasta la fecha indican que un aumento excesivo de los niveles de Put es tóxico para la planta, mientras que incrementos en los niveles de Spd y Spm podrían tener un efecto protector (Tiburcio y col., 1994; Galston y col., 1997).

### **1.6.1. Las PAs en la respuesta al estrés abiótico.**

La implicación de las PAs en la respuesta al estrés abiótico ha sido estudiada en gran cantidad de sistemas vegetales. La variación en las condiciones externas como son la falta de nutrientes (Flores, 1991; Bouchereau y col., 1999), el estrés causado por un choque osmótico (Bouchereau y col., 1999), la polución atmosférica (Bouchereau y col., 1999; Marco y Carrasco, 2002) o la contaminación por metales pesados (Groppa y col., 2003) provocan en las plantas superiores variaciones drásticas en el metabolismo de nitrógeno y PAs.

La variación de los niveles de PAs como consecuencia de la falta de nutrientes se observó por primera vez en plantas de cebada (Richards y Coleman, 1952) donde aumentaban los niveles de Put como consecuencia de la deficiencia en  $\text{K}^+$ . Trabajos posteriores han demostrado que la acumulación de Put como consecuencia de la falta de nutrientes, mediada por el aumento de actividad ADC, es un rasgo común en distintas plantas (Flores, 1991; Bouchereau y col., 1999).

El estrés salino por su parte provoca cambios en la actividad ADC y en los niveles de su transcrito en arroz. Se ha observado que los niveles de PAs en las variedades con mayor tolerancia son mayores que en las variedades sensibles al estrés

salino. Bajo condiciones de estrés en las variedades resistentes se observa un aumento de los niveles de Spm y Spd mientras que las variedades sensibles sólo acumulan Put (Chattopadhyay y col., 1997). Sin embargo en explantes de hoja de tomate sometidos a estrés salino se observa una disminución en los niveles de Put y Spd mientras que los niveles de agmatina, diaminoputrescina y Spm aumentan siendo los altos niveles de Dap indicativos de una mayor oxidación de las PAs (Aziz y col., 1998). Bajo dichas condiciones de estrés también se ha observado un aumento en los niveles de prolina que se correlacionan con la disminución de Put y Spd (Aziz y col., 1998). Existen evidencias que sugieren que en condiciones de estrés se establece una relación precursor-producto entre la Put y la prolina a través de la diaminooxidasa (DAO) y del metabolismo del ácido  $\gamma$ -amino butírico (Bouchereau y col., 1999). Esta relación entre los niveles de Put y prolina se han descrito también en *Brassica napus* durante un estrés osmótico (Aziz y Larher, 1995).

Por otra parte, cultivos celulares de alfalfa procedentes de líneas resistentes a déficit hídrico presentan una acumulación de Spd y Spm y pérdida de Put cuando se los somete a una privación de agua añadiendo PEG (Kuehn y col., 1990). Resultados similares se obtuvieron al someter hojas de trigo a un estrés por desecación (Liu y col., 2004). Se ha comprobado también la inducción de la SAMDC de plantas de soja como consecuencia del estrés por desecación (Tian y col., 2004)

El aumento en la concentración de PAs se consigue también al tratar hojas de cebada separadas de la planta con sorbitol. Sin embargo el aumento de Put y actividad ADC como consecuencia de este estrés osmótico esta acompañado en este caso de una disminución en los niveles de Spd y Spm (Flores y Galston, 1984). Se han conseguido resultados similares usando otros agentes osmóticos (manitol, prolina, betaína, sacarosa) o a través de la eliminación de agua (Flores y Galston, 1984). En estos casos el aumento en los niveles de Put está acompañado de evidentes síntomas de estrés en la planta como son el marchitamiento y la pérdida general de proteína

que pueden ser retardados con el tratamiento con Spm o con un pretratamiento con difluorometilarginina (DFMA), inhibidor de la actividad ADC (Besford y col., 1993). Este aumento de Put está mediado por ADC como se demuestra con el rápido marcaje de arginina vía agmatina y N- carbamoyl-Put que se correlaciona con un aumento de la actividad ADC. Aumento que no se observa para ODC. Borrell y col. (1996) aportaron evidencias de una regulación post-transcripcional de la ADC por la Spm la cual actuaría inhibiendo el procesamiento de su proenzima. En el caso concreto de *Arabidopsis thaliana* se ha comprobado que el estrés osmótico provoca ese mismo aumento de Put y actividad ADC como una consecuencia de la activación transcripcional del gen *ADC2* (Feirer y col., 1998; Soyka y Heyer, 1999). El estrés osmótico provoca la acumulación de las PAs de cadena larga caldina y termina, previamente descritas en bacterias termofílicas y halofílicas creciendo en condiciones extremas (Oshima, 1983; Hamana y col., 1985). Por último, se ha comprobado que el estrés osmótico provoca en discos de hojas de colza un aumento de cadaverina y Put al igual que la sequía en sus plántulas (Aziz y col., 1997).

El papel de las PAs en la respuesta al estrés oxidativo ha tomado en los últimos años gran interés. Las PAs parecen actuar como posibles agentes protectores frente al estrés oxidativo como se revela al tratar ciertas variedades resistentes de *Coryza canadiensis* con el oxidante paraquat. En este experimento la resistencia estaba correlacionada con niveles elevados de PAs y actividades altas ADC y ODC (Ye y col., 1997). En el caso de pepino la irradiación con UV-C provoca una acumulación de Put (Kramer y col., 1991). El estudio de la respuesta de las plantas al estrés de tipo oxidativo ha cobrado un especial interés con el considerable aumento de los niveles de ozono (O<sub>3</sub>) en las capas bajas de la atmósfera. El ozono un contaminante de tipo ambiental que provoca graves daños en la vegetación de Europa y América del Norte. Su presencia incluso a bajos niveles da lugar a disminuciones importantes en la fotosíntesis, causar daños en las hoja y acelerar la senescencia

(Heagle, 1989). Existen diversos trabajos centrados en el posible papel protector de las PAs frente al daño causado por el ozono. El tratamiento de hojas de cebada con ozono provoca un rápido aumento de los niveles de Spd y en la actividad ADC (Rowland-Bamford y col., 1989). Aumentos en los niveles de Spm y Spd como consecuencia del tratamiento con ozono se han observado también en *Picea abies* (Dohmen y col., 1990) y trigo (Drolet y col., 1986). En el caso de tabaco, estudios realizados con variedades sensibles y resistentes han permitido comprobar el rápido aumento de Put en la línea resistente a ozono Bel B (Langerbartels y col., 1991); la línea hipersensible Bel W3 sólo presentaba un ligero aumento de Put en fases tardías donde la lesión necrótica ya se había producido. De forma parecida, en plantas de patata se observa un aumento en los niveles de Put y Spm así como de actividad ODC cuando tras el tratamiento con ozono (Reddy y col., 1993). Se ha propuesto que las PAs pueden proteger la planta del estrés oxidativo por la inhibición de la peroxidación de la membrana lipídica (Kidata y col., 1979). Asimismo, se ha comprobado que los conjugados con ácidos cafeico, ferúlico o p-cumárico presentan una gran capacidad de eliminación de radicales libres (Bors y col., 1989). Por otra parte, el papel protector de las PAs podría estar relacionado, al menos en parte, con la competencia con la ruta del etileno por el precursor SAM, ya que el etileno se ha propuesto como mediador de la respuesta al ozono (Mehlhorn y col., 1991; Sandermann y col., 1998). Recientemente se ha comprobado que también los niveles de los mRNAs de SAMs, ADC y SAMDC se ven afectados por ozono en hojas y tallos de plantas de guisante (Marco y Carrasco, 2002; Marco y col., 2003).

Se han realizado numerosos estudios que evidencian la variación en el metabolismo de PAs como consecuencia de cambios drásticos en la temperatura. La respuesta de la planta a este estrés térmico incluye la síntesis de PAs de cadena larga como son la caldina, termina y caldopentamina. Estas PAs, poco comunes y de alto peso molecular habían sido descritas anteriormente sólo en bacterias termofílicas

donde son esenciales para la síntesis proteica a altas temperaturas. Se ha comprobado que estas PAs de cadena larga se acumulan en polen y en cultivos celulares de una variedad de algodón tolerante al calor utilizando para su síntesis el diaminopropano proveniente de la degradación de Spd por la poliamina oxidasa (PAO; EC 1.5.3.3) y los grupos aminopropilo procedentes de dcSAM (Kuehn y col., 1990; Philips y Kuehn 1991). De igual forma el estrés por calor provoca en callos de arroz la síntesis de PAs, acompañada por alteraciones en el metabolismo de PAs. En callos tolerantes al calor se observa una mayor actividad ADC y PAO que en callos sensibles de forma que los primeros acumulan más PAs, libres y conjugadas, así como caldina y termina (Roy y Ghosh, 1996). En general parece ser que las plantas tolerantes frente a un estrés por calor intentan mantener si no aumentar sus niveles de Spm y Spd a expensas de Put (Philips y Kuehn, 1991).

La respuesta en plantas superiores al daño generado por bajas temperaturas está orientada a regular la permeabilidad de la membrana y proteger la integridad estructural de las proteínas embebidas en ella. El daño por frío provoca una alteración en la arquitectura de la membrana a través de una transición de fase en la ordenación de los lípidos de membrana que podría afectar a los anteriores aspectos de la célula (Raison y Lyons, 1970). Se ha descrito que la exposición a bajas temperaturas provoca la acumulación de Put en varias especies de plantas (Martín-Tanguy, 1987). Así en trigo, se ha observado un aumento de Put directamente relacionado con un aumento paralelo de la resistencia al frío (Racz y col., 1996). Por otra parte un aumento uniforme y considerable de los niveles de Spd parece constituir otra de las respuestas de algunas plantas a las bajas temperaturas (Flores, 1991). Así, en algunas plantas como el calabacín la disminución del daño por frío se consigue a través del aumento de los niveles de Spm y Spd que se produce durante un acondicionamiento previo al estrés de 2 días a 10°C (Kramer y Wang, 1989). Este aumento en Spm y Spd va acompañado de una mayor actividad SAMDC (Kramer y Wang, 1990). En una

variedad tolerante de arroz la exposición al frío provoca un aumento en los niveles de Put y actividad ADC en tallos y raíces. Adicionalmente se observa sólo en tallos un aumento de Spm, Spd y actividad SAMDC (Lee y col., 1997c). El aumento de Put podría estar generado, vía ADC, por un aumento anterior de los niveles de ácido abscísico (ABA) (Lee y col., 1997c). Los autores apoyan la idea de que la Spm y la Spd podrían disminuir el daño que el frío provoca a través del retardo de la peroxidación de los lípidos de membrana (Bouchereau y col., 1999; Borrell y col., 1997). Además estas PAs podrían inhibir el movimiento de los fosfolípidos a través de la bicapa lipídica (Bratton, 1994) disminuyendo así las alteraciones en la estructura de la membrana.

Se puede concluir que las PAs están, de diferentes formas, implicadas en la respuesta de las plantas a los diferentes tipos de estrese abiótico. En la mayoría de los casos, los datos aportados indican que elevados niveles de Spd y Spm, pero no Put, aumentan la tolerancia al estrés (Flores, 1991).

### **1.6.2. Las PAs en la respuesta al estrés biótico.**

Aunque existe poca información acerca del papel de las PAs en las interacciones entre planta y patógeno se sabe que participan en las rutas de señalización desencadenadas por dichas interacciones (Martín-Tanguy, 1987). El comportamiento de las PAs en la infección de plantas por bacterias apenas ha sido tratado en la bibliografía. Se ha documentado un aumento de Put en tallos de olivo después de la infección con *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* (Roussos, 2002). Sin embargo, se ha comprobado que los niveles de PAs y en particular el nivel de Spd aumentan considerablemente en hojas de cebada infectadas con el hongo *Puccinia hordei* (Greenland y Lewis, 1984). Posteriormente se demostró que la infección de cebada con el hongo *Blumeria graminis* daba lugar a aumentos en los niveles de

Spd, Spm y Put en hojas debido a un aumento en las actividades enzimáticas de ADC, ODC y SAMDC (Walters y col., 1985; Walters y Wylie 1986).

En trabajos más recientes sobre cebada y su respuesta hipersensible al hongo *B. graminis* f. sp. *hordei*, Cowley y Walters (2002a) encontraron un gran aumento en los niveles de Put, y Spm en forma libre así como de las formas conjugadas de Put, Spd y Spm, de 1 a 4 días después de la inoculación. Estos cambios en los niveles de PAs iban acompañados a su vez por aumentos en la actividad de los enzimas biosintéticos ODC, ADC y SAMDC y en los enzimas catabólicos DAO y PAO. La importancia de DAO en la resistencia de la planta a la infección por patógenos se ha demostrado también en la infección por *Ascochyta rabiei* en garbanzo (Rea y col., 2002). En este trabajo se comprobó que durante la infección los niveles de DAO aumentaban significativamente y que la inhibición de este enzima con 2 – bromoetilamina reducía de forma importante la resistencia al patógeno. La actividad elevada de DAO y PAO se ha relacionado con un mecanismo de defensa frente a la infección por hongos basado en la penetración de la pared celular (Cowley y Walters 2002b). Las actividades de estos 2 enzimas producen peróxido de hidrógeno, requerido para la ligación cruzada de proteínas y polisacáridos y la lignificación (Pellegrini y col., 1994). Con esto es posible que el aumento en las actividades de DAO y PAO observado en cebada pudiera participar en la producción del peróxido de hidrógeno destinado a la defensa por medio de ligamientos cruzados entre fenoles y proteínas en el lugar de entrada del patógeno (Cowley y Walters y 2002b). En el trabajo de Cowley y Walters (2002a) se comprobó también un aumento en la actividad de dos de los enzimas participantes en la conjugación de PAs como son PHT (putrescina hidroxicinamoiltransferasa) y TFT (tiramina feruloil CoA transferasa) posterior a la inoculación del patógeno. Trabajos previos implicaban la participación de las formas conjugadas de las PAs en la infección por hongos. Así la feruloilputrescina se acumula en patata infectada con *Phoma exigua* (Malmberg,

1984) mientras que tiramina y octopamina se sintetizan e integran en la paredes celulares de patata al infectar con hongos (Clarke, 1982). En este trabajo se sugirió que estos conjugados de PAs con ácido cinámico podrían contribuir a la formación de una barrera fenólica haciendo las paredes celulares más resistentes a la hidrólisis enzimática provocada por el hongo. Muchos artículos describen la acumulación de conjugados de PAs como la cumaroilhidroxiputrescina o la cumaroilagmatina en cereales como consecuencia de la infección con hongos conduciendo a una resistencia al patógeno (Samborski y Rohringer, 1970; Smith y Best 1978; Von Ropenack y col., 1998; McClusky y col., 1999) y en los que se demuestra sus propiedades antifúngicas (Walters y col., 2001). Así mismo, a la vista de la existencia de caspasas en plantas superiores, Cowley y Walters (2002a) sugirieron una relación entre la acumulación de Spm y la activación de caspasas en cebada reaccionando de forma hipersensible a la infección con *B. graminis* f. sp. *hordei*. Debido a las evidencias de que la acumulación de Spm conduce a la activación de un conjunto de caspasas que desencadenan a su vez la apoptosis en células leucémicas (Stefanelli y col., 1998).

Las PA también parecer jugar un papel importante en la resistencia de la planta frente a la infección por virus. En la respuesta hipersensible a la infección con el virus del mosaico del tabaco se observa un aumento muy importante en la actividad ODC así como una acumulación de conjugados de PAs en la células vivas alrededor de la zona necrótica (Negrel y col., 1984; Martín – Tanguy y col., 1973 y 1976). En esta infección por el virus del mosaico del tabaco también se observaba un aumento de Put y Spd en sus formas libres (Torrighiani y col., 1997). Existen 2 hipótesis respecto al papel de las PAs y sus conjugados en la resistencia a la infección. Una de ellas incluye la inhibición de la replicación del virus por algunos conjugados de PAs (Martín – Tanguy y col., 1976); la otra implica la participación de las PAs en la inducción de la apoptosis durante la respuesta hipersensible. Esta última hipótesis está apoyada por la observación de un considerable aumento de Spm en los espacios

intercelulares de las hojas necróticas (Yamakawa y col., 1998). En este trabajo se comprobó que la Spm induce las proteínas PR y la resistencia al virus del mosaico del tabaco de forma independiente al salicilato.

## **1.7. Efectos de la modificación de los niveles de PAs sobre la respuesta al estrés.**

### **1.7.1. Aplicación exógena de PAs y de inhibidores de la síntesis de PAs.**

La participación de las PAs en las respuestas a estrés se ha estudiado frecuentemente mediante la modificación de sus niveles en las planta. Históricamente, el enfoque más común para la modificación celular del nivel de PAs en plantas ha sido la aplicación exógena de PAs o de inhibidores químicos específicos de los enzimas de su ruta de biosíntesis. Los inhibidores más utilizados son la difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor irreversible de la ODC (Bey y col., 1987), la difluorometilarginina (DFMA), un inhibidor irreversible de la ADC (Bitonti y col., 1987), la metilglioxal-bisguanilhidrazona (MGBG), inhibidor competitivo de la SAMDC (Williams-Ashman y Schenone, 1972) y la ciclohexilamina, inhibidor competitivo de la espermina sintasa (Hibasami y col., 1980). Con el uso de estos inhibidores se ha puesto en evidencia la correlación existente entre los niveles de PAs y las respuestas fisiológicas en la planta durante el estrés (Evans y Malmberg, 1989; Galston y col., 1997). Así, el daño oxidativo provocado por la luz ultravioleta C (UV-C) provoca una aumento en los niveles de Spm que puede ser evitado con el uso del inhibidor DFMA provocando así un aumento de la sensibilidad de la planta a esta irradiación (Campos y col., 1991). Del mismo modo, la aplicación de DFMA en hojas de cebada agrava el daño visible en la hoja provocado por ozono. Sin embargo el uso de estos inhibidores tiene sus limitaciones como son los problemas derivados de la

distinta velocidad de asimilación de los inhibidores por parte de las plantas, sus conversiones metabólicas, la falta de especificidad y los efectos dañinos sobre las propiedades de membrana. La falta de especificidad del MGBG provoca que también actúe sobre la ADC (Hiatt y col., 1986) y la poliamina oxidasa (Pegg y Williams-Ashman, 1987). Por otra parte un ejemplo de conversión metabólica negativa lo constituye la DFMA que puede ser transformado a DFMO por acción de la enzima arginasa con lo que su uso conllevaría una inhibición adicional de ODC (Slocum y Galston, 1987). Un problema adicional consiste en que el uso de estos inhibidores permite únicamente una modificación poco controlada e indirecta de los niveles de PAs.

La aplicación exógena de PAs constituye una alternativa al estudio de la participación de las PAs en las respuestas a estrés en las plantas. La aplicación de Put, Spd y Spm impide la necrosis en la hoja de tomate provocada por el ozono (Ormrod y Beckerson, 1986). De igual manera, la aplicación de Spd disminuye el daño provocado por UV-C (Campos y col., 1991). También se ha comprobado que la adición de PAs reduce en *Arctotheca calendula* los daños provocados por el oxidante paraquat (Soar y col., 2004). El tratamiento con DFMO, que incrementa la relación (Spd+Spm)/Put de o la adición de Spd producen una mejora de la viabilidad de protoplastos de cereales sometidos a un estrés osmótico (Tiburcio y col., 1993). Se ha comprobado que la aplicación de Spd y Spm reduce los efectos dañinos de la presión osmótica en plantas de avena (Besford y col., 1993), de la infección por el virus del mosaico del tabaco (Yamakawa y col., 1998) y del paraquat en *Arabidopsis* (Kurepa y col., 1998). Los experimentos de Rajasekaran y Blake (1999) con reguladores exógenos demostraron que la Spd y la Spm estimulaban el crecimiento de plántulas de *Pinus bunksana* durante estrés por desecación y que los daños sobre la membrana fruto del estrés eran reducidos por estas PAs. Así mismo, se ha descrito que la adición de Spd y Spm reduce en pepino los efectos del frío (Shen y col., 2000).

### 1.7.2. Mutantes del metabolismo de PAs.

La modificación de los niveles de PAs tiene lugar también en mutantes en su metabolismo. Se han obtenido mutantes resistentes a DFMO (Hiatt y Malmberg 1988) que presentaban niveles elevados de PAs y resistencia al estrés ácido (Hiatt y Malmberg 1988). Esta mayor tolerancia al estrés ácido y el mayor contenido en PAs de estos mutantes llevó a sugerir la participación de las PAs en la resistencia al estrés (Malmberg y col., 1998). También se han encontrado mutantes resistentes al MGBG que presentaban una morfología floral atípica (Malmberg y Rose, 1987, Trull, 1992). Por otra parte existen mutantes resistentes a concentraciones inhibitorias de Spm que presentaban una serie de anomalía en el crecimiento como flores más grandes y hojas con puntas elevadas (Mirza y Iqbal, 1997).

El uso de la técnica de inserción de T-DNA activador ha permitido generar colecciones de mutantes de *Arabidopsis* con ganancia de función que afecten a la señalización por estrés o a la resistencia a inhibidores de la biosíntesis de PAs (Fritze y col., 1995). Con esta estrategia se ha caracterizado un grupo de mutantes resistentes al MGBG (Fritze y col., 1995) que presentan un aumento en el contenido en PAs similar a lo observado por Malmberg y colaboradores (1998).

Así mismo, se han generado colecciones de mutantes de pérdida de función. Es interesante el caso del mutante de *ADC2 en9* obtenido a partir de una búsqueda por PCR en una población de *Arabidopsis* mutagenizada con el transposón autónomo En-1 (Baumann y col., 1998). En-1 es un transposón grande que provoca la disrupción del gen donde se localiza (Cardon y col., 1993) con lo que la mutación *en9* constituye una pérdida de función de *ADC2*. Este mutante no presenta ningún fenotipo característico en condiciones normales aunque carece de la inducción de *ADC2* provocada por estrés osmótico (Soyka y Heyer, 1999).

### 1.7.3. Sobreexpresión de genes implicados en la biosíntesis de PAs.

La expresión de genes transgénicos constituye una forma de regular pasos metabólicos específicos ya sea al alza (Kinney, 1998; Lindsey, 1998; Nuccio y col., 1999) o a la baja (Kinney, 1998; Lindsey, 1998). Esta aproximación puede revelar mecanismos de regulación no observados con el análisis de mutantes o inhibidores. La manipulación del metabolismo de PAs se ha convertido en los últimos años en una herramienta muy importante para estudiar su papel fisiológico en plantas (Kumar y Minocha, 1998; Bhatnagar y col., 2002). El contenido celular de PAs se ha modulado con la sobreexpresión o regulación a la baja de *ADC*, *ODC* o *SAMDC*. La sobreexpresión del cDNA de *ODC* de levadura en plantas de tabaco aumenta el contenido en Put y en nicotina, un alcaloide derivado de la Put (Hamill y col., 1990). La sobreexpresión constitutiva bajo el control del promotor CAMV35S de genes de *ADC*, *ODC* o *SAMDC* suele tener efectos negativos en el crecimiento normal de las plantas transgénicas (Kumar y col., 1997; Capell y col., 1998). Sin embargo, estas plantas transgénicas suelen presentar una mayor tolerancia al estrés salino como las sobreexpresoras de *ODC* (Kumria y Rajam, 2002), las sobreexpresoras de *ADC* (Roy y Wu, 2001), o las de *SAMDC* (Waie y Rajam, 2002). En este último caso, la sobreexpresión de *SAMDC* también confería una mayor resistencia a la infección con hongos (Waie y Rajam, 2002). Con el objetivo de evitar los efectos dañinos que la sobreexpresión constitutiva de estos genes provoca en las plantas se han utilizado más recientemente promotores inducibles por ABA. Así se ha sobreexpresado el cDNA de *ADC* de avena en arroz bajo condiciones de estrés (Su y col., 1998). Estas plantas transgénicas presentan un aumento en la producción de biomasa y una mayor acumulación de Put bajo condiciones de sequía. Resultados similares se obtuvieron al transformar arroz con el gen de *SAMDC* de *Tritordeum* (Roy y Wu, 2002) donde la aplicación exógena de ABA y el estrés con NaCl incrementaban los niveles de expresión de *SAMDC*.

## **1.8. Efectos de la manipulación de la expresión de SAMDC en plantas transgénicas.**

La modificación de los niveles de SAMDC también tiene como consecuencia la manipulación del metabolismo de PAs. Se ha obtenido plantas de patata con el cDNA de SAMDC en orientación antisentido bajo el control del promotor CAMV35S (Kumar y col., 1996). Las líneas transgénicas presentaron una actividad SAMDC reducida en un 10-28% respecto a las plantas control junto a una disminución de un 16% en el contenido de PAs. Fenotípicamente estas plantas presentaban un crecimiento reducido, internados cortos, ramificaciones abundantes, hojas pequeñas y una baja capacidad de enraizamiento en cultivo *in vitro*. Además, presentaban una senescencia avanzada de las hojas maduras y necrosis lo que indica un importante daño oxidativo (Kumar y col., 1996). En ese mismo trabajo se demostró que la severidad de estas alteraciones fenotípicas correlacionaba con el nivel de reducción de los niveles de mRNA de SAMDC (Kumar y col., 1996). También se han obtenido plantas de patata que expresaban la *SAMDC* antisentido bajo el control un promotor inducible por tetraciclina (Gatz y col., 1992). Estas líneas presentaban resultados similares a los obtenidos con el promotor constitutivo pues el tratamiento con tetraciclina provocó descensos en los niveles del transcrito de SAMDC así como reducciones en la actividad SAMDC de hasta un 50% respecto de los controles sin tratar. Sin embargo el descenso en la actividad SAMDC no dió lugar a disminuciones tan elevadas en los niveles de Spd y Spm como en el caso del promotor constitutivo. También se han obtenido plantas transgénicas de patata transformadas con la *SAMDC* antisentido bajo el control del promotor de la patatina, específico de la tuberación (Pedrós y col., 1999). Estos transformantes contenían niveles reducidos de mRNA y actividad SAMDC así como menor cantidad de PAs totales. Sin embargo, no se observó un fenotipo significativo obvio en la tuberización (Pedrós y col., 1999).

La generación de plantas transgénicas de patata sobreexpresoras de *SAMDC* bajo el control del promotor CAMV35S no pudo completarse pues los microcallos obtenidos no daban lugar a brotes aéreos en el medio de selección (Kumar y col., 1996). La obtención de plantas de patata sobreexpresoras de *SAMDC* pudo llevarse a cabo con el uso de un promotor inducible por tetraciclina (Gatz y col., 1992). El uso de este promotor permitió generar plantas cuya expresión de *SAMDC* estaba reprimida de forma que no era letal en los primeros estadios de regeneración. Posteriormente el tratamiento de las plantas con tetraciclina provocó un aumento en los niveles de *SAMDC* de 2 a 6 veces respecto a las plantas sin tratar, así como aumentos en actividad *SAMDC* entre 2 y 4 veces, de 7 veces en los niveles de Spd y 4 en los de Spm (Kumar y col., 1996). Así mismo, el uso del promotor de la patatina permitió obtener plantas de patata que sobreexpresaban la *SAMDC* (Pedrós y col., 1999). En este caso los tubérculos en desarrollo de los transformantes presentaron niveles altos del transcrito y actividad *SAMDC* así como una elevación en los niveles de Spd respecto de los controles. Estos cambios van acompañados de ciertas alteraciones fenotípicas como es la disminución del tamaño de los tubérculos (Pedrós y col., 1999).

El gen de *SAMDC* humana se introdujo en plantas de tabaco bajo el control del promotor constitutivo CAMV35S (Noh y Minocha, 1994). Las plantas transgénicas obtenidas presentaban una actividad *SAMDC* hasta 9 veces superior y unos niveles de Put un 50% inferiores a las plantas control. Por su parte los niveles de Spd eran de 2 a 3 veces más elevados mientras que sólo en algunas líneas se observaron niveles elevados de Spm. Estas plantas presentaban una serie de anomalías fenotípicas que incluían tallos y hojas delgadas y un mal desarrollo general. Sin embargo estas anomalías desaparecían progresivamente con el proceso de subcultivo.

La manipulación de los niveles de SAMDC también se ha realizado en tomate y sus efectos analizados en varios trabajos (Mehta y col., 1999). Así Mehta y col., (1999) llevaron a cabo la introducción del gen de levadura en sentido bajo el control del promotor E8, específico de la maduración del fruto (Kneissl y Deikman, 1996). En los frutos de las líneas transgénicas se observó una acumulación de PAs ausente en el resto de la plantas. Se comprobó que estos frutos transgénicos acumulaban licopeno, producían más etileno y que mostraban una maduración y senescencia retrasada respecto a los frutos control (Mehta y col., 1999).

Se han obtenido plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresaban de forma constitutiva el cDNA endógeno de la *SAMDC1* bajo el control del promotor CAMV35S (Marco, 2000). Estas plantas presentaban unos niveles elevados del transcrito así como unas alteraciones fenotípicas en las fases iniciales del desarrollo. Estas anomalías incluyen un retraso en el desarrollo que se traduce en plantas de un tamaño menor, con hojas y tallos más delgados y con raíces más cortas cuando se las compara con plantas control. Sin embargo estas alteraciones desaparecen conforme las plantas continúan en su desarrollo para dar lugar a plantas adultas aparentemente normales. La desaparición de las alteraciones con el desarrollo ya había sido observada con anterioridad en plantas de tabaco sobreexpresoras de la SAMDC humana (Noh y Minocha, 1994; Waie y Rajam, 2002). En este trabajo también se comprobó que las alteraciones fenotípicas pueden ser reproducidas en parte con el crecimiento en presencia de Spd y Spm lo que implica la importancia de las PAs en los procesos de desarrollo de *Arabidopsis* y en la necesidad de la planta de mantener unos niveles endógenos de éstas para un desarrollo correcto.

Por último, se ha obtenido plantas de arroz que sobreexpresaban la *SAMDC* de *Triticum* bajo el control de un promotor inducible por ABA que presentaban mayores niveles de Spd y Spm durante el estrés salino y una mayor tolerancia a este estrés (Roy y Wu, 2002). Esta acumulación de Spd y Spm podría conferir una

tolerancia al estrés salino por medio del aumento de biomasa así como un aumento en la longitud del tallo de la planta de arroz transgénica (Roy y Wu, 2002).

## **1.9. Objetivos.**

Este trabajo forma parte de un proyecto más amplio dedicado al estudio del metabolismo de PAs y en especial a los efectos que la alteración en dicho metabolismo tiene sobre los mecanismos de respuesta de la planta al estrés biótico y abiótico.

En consecuencia los objetivos del presente trabajo son:

1. Ahondar en el estudio de los efectos de la sobreexpresión de *SAMDC1* en plantas de *Arabidopsis*.
2. Analizar cambios en la expresión génica causados por la sobreexpresión de *SAMDC1*.
3. Estudiar los efectos que la variación en el contenido de PAs en estas plantas transgénicas tiene sobre la respuesta de la planta frente a distintos tipos de estrés biótico y abiótico.



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **2.1. Material vegetal.**

Se han utilizado plantas del ecotipo Columbia de *Arabidopsis Thaliana* (Col0), así como tres líneas transgénicas (S3', S9' y S15) sobreexpresoras del gen *SAMDC1*. Estas líneas se obtuvieron por medio de una fusión del cDNA de la *SAMDC1* de *Arabidopsis* con el promotor constitutivo CAMV35S (Marco, 2000). Las semillas se esterilizaron con HClO al 15%, Triton x-100 0.01% (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), 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) en maceta y regadas con agua destilada. Las semillas se sometieron al proceso de vernalización dejándolas 48 h en cámara fría a 4° C para sincronizar la germinación. A continuación se crecieron en cámara de cultivo Sanyo MLR-350 (Sanyo Electric Co., Japón) con un fotoperíodo de 16h luz a 23° C, 8h oscuridad a 16° C (fotoperíodo largo). Los experimentos realizados con plantas crecidas en día corto se llevaron a cabo en unas condiciones de 8h luz a 23° C, 16h oscuridad a 16° C. El crecimiento en placas se realizó con semillas esterilizadas de igual forma y luego sembradas en placas de agar al 4% en medio MS (Murashige y Skoog 1962). En el caso de las líneas transgénicas, las placas se suplementaron con kanamicina (50 µg/ml) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Los experimentos de germinación se llevaron a cabo sembrando 50 semillas por placa, sometiéndolas al mismo proceso de vernalización y posteriormente creciéndolas en condiciones de día largo. El número de semillas que habían desarrollado cotiledones en ausencia de cualquier tipo de estrés se contó diariamente hasta los 8 días después de la vernalización, momento en el que el número de semillas germinadas se estabiliza. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

## **2.2. Medida de la actividad SAMDC.**

### **2.2.1. Ensayo de actividad SAMDC.**

Se homogeneizó en mortero a 4°C 150 mg de hojas de plantas adultas de 4 semanas en 2.5 volúmenes de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7.4, EDTA 0.2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM frío. Los homogenizados se centrifugaron a 22.000 g durante 15 min a 4° C, manteniéndose el sobrenadante a 4° C durante el ensayo. La actividad SAMDC fue medida por la liberación de CO<sub>2</sub> producida por la descarboxilación de la SAM y su fijación posterior como K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en discos de papel humedecidos con una solución básica de KOH (Icekson y col., 1985). Los ensayos de descarboxilación de la SAM fueron realizados por triplicado, en un volumen final de 150  $\mu$ l, en el siguiente medio de reacción: 0.03  $\mu$ moles SAM (Sigma- Aldrich, St. Louis MO, USA), 0.2  $\mu$ Ci de <sup>14</sup>C-SAM (60.0 mCi/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, España), 0.75  $\mu$ moles ditiotreitól (Merck, Darmstadt, Alemania) y 100  $\mu$ l de extracto de proteína.

Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C durante 1h en tubos sellados con tapas de goma atravesadas con alfileres provistos de un disco de papel Whatmann n° 1 (Whatmann International Ltd, Maidstone, Reino Unido) de 11mm de diámetro, impregnado con 40  $\mu$ l de KOH 0,4 M. La incubación se terminó con la inyección de 200  $\mu$ l de TCA 15% (Merck, Darmstadt, Alemania). La incubación a 30°C se produjo durante 1h para recoger el CO<sub>2</sub> generado por la actividad SAMDC. Al final de este proceso los discos fueron secados en una cámara de extracción de gases durante 30 min para luego pasarlos a viales de centelleo de vidrio conteniendo 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 3 ml de líquido de centelleo, Cocktail 32 Normascint (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España). El conteo se realizó en un contador de centelleo líquido Wallac 1409 (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Warrington, UK). Se hicieron blancos con extractos hervidos previamente que se ensayaron en paralelo y cuyos valores

fueron sustraídos de las muestras. La descarboxilación espontánea de la SAM en ausencia de enzima fue analizada con viales en los que se sustituía el extracto proteico con tampón de extracción. Para comprobar la especificidad de la descarboxilación se incluyeron experimentos de incubación en presencia de 3,3 mM Metil glioxal-bis-guanil hidrazona (MGBG) (Sigma- Aldrich, St. Louis MO, USA) que es el inhibidor más potente y específico de la SAMDC descrito en la bibliografía (Williams-Ashman y Schenone, 1972).

### **2.2.2. Cuantificación de proteínas.**

La cuantificación proteica de los extractos se hizo por el método de Lowry (1951) sobre una alícuota de dicho extracto usando BSA como patrón.

## **2.3. Extracción y cuantificación de RNA.**

### **2.3.1. Aislamiento de RNA.**

El RNA de las hojas se extrajo mediante el Total Quick RNA Cells and Tissues Kit (Talent srl, Italia) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. El RNA obtenido se cuantificó determinando la absorbancia a 260 nm.

La integridad y cantidad del RNA se comprobaron mediante separación electroforética en geles desnaturalizantes de agarosa al 1% en tampón 1x MOPS (2mM MOPS, 0.5 mM NaAc, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 2.2 M formaldehído). Las muestras de electroforesis 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) a un volumen de RNA. Los rRNA se visualizaron añadiendo 1 µl de bromuro de etidio (400 µg/ml) por cada 10 µl de muestra. Las posibles contaminaciones de DNA genómico se eliminaron tratando las muestras de RNA con 10 unidades de DNasa

libre de RNasa (Roche Diagnostics, S.L., Barcelona, España) durante 20° min a 37°C, parándose la reacción incubando 15° a 70°C.

### **2.3.2. Transcripción Reversa.**

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un volumen total de 20µl de 1x tampón de transcriptasa reversa conteniendo 100 mM ditioneitol, 1mM desoxinucleótidos trifosfato, 10µM oligo (dT)<sub>15</sub>, 40 unidades de inhibidor de RNasa (RNase OUT<sup>TM</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitor) y 200 unidades de transcriptasa reversa (Superscript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase, Gibco Brl Life Technologies, Barcelona, España). A esta mezcla se le añadió 1µg de RNA libre de DNA genómico. La reacción se mantuvo durante 60 min a 42°C para luego calentar 10 min a 100°C y enfriar rápidamente en hielo. El cDNA así obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **2.3.3. Reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).**

La PCR se desarrolló en un aparato Gene Amp<sup>R</sup> 5700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Tokyo, Japón). El medio de reacción, 20 µl, contenía 1 µl de cDNA, 100 nM de cada uno de los cebadores y 10 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Warrington, UK). Después de 10 min a 95° C para desnaturalizar el cDNA y activar la *Taq* DNA polymerase, se amplificó durante 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 95° C, durante 30s e hibridación y extensión a 60° C, 30s. Se diseñó pares de cebadores específicos para cada uno de los genes amplificados (Tabla 2.1).

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>
<i>cor15a DIR</i>	TGTTCTCACTGGTATGGCTTCTTCT
<i>cor15a REV</i>	TCTGACAGCGCCGAAGCT
<i>NCED3 DIR</i>	TCGTTCGTACCTGACCAGCAA
<i>NCED3 REV</i>	GACCCACCGGGGATCA
<i>rd22bp1 DIR</i>	GGTTTCCGGGTCAGATCAATT
<i>rd22bp1 REV</i>	ATCCCAAACACTCCTCCTTGCT
<i>rd26 DIR</i>	ACGGTGGTTACGATGCGTTT
<i>rd26 REV</i>	CCGATTCACATGCCCACTCT
<i>rd29a DIR</i>	TGTGCCGACGGGATTG
<i>rd29a REV</i>	CTGATGCCTCACCGTATCCA
<i>Actina 2 DIR</i>	GATTCAGATGCCAGAAAGTCTTG
<i>Actina 2 REV</i>	TGGATTCCAGCAGCTTCCAT
<i>SPMS DIR</i>	CGGAAATGGGTTCCTGGAGATTAC
<i>SPMS REV</i>	AGGGCTAAGCTTGGGTTTGAGAATG
<i>ADC1 DIR</i>	TCCAATCCATAAACTTGACCAAAG
<i>ADC1 REV</i>	CGCTGTACACGTCAAATCC
<i>SPDS1 DIR</i>	GGATCCTCGCGTGAAACCTT
<i>SPDS1 REV</i>	CGTATGATCCTTCAGCAGCATT
<i>SAMDC1 DIR</i>	GCCCAAGCAATTCTGTAGCT
<i>SAMDC1 REV</i>	AAGTCTACAGTAATCTCTGGCTTGTATGA
<i>GST DIR</i>	TTTGACCCTAAGGCCTCTAAGC
<i>GST REV</i>	CAGTGGTCATGCCGAACATG
<i>AOS DIR</i>	CGGGCGGGTCATCAAG
<i>AOS REV</i>	GCCGTTGGATTTAATCACAGAT
<i>AOC1 DIR</i>	CGTCCCATTACAAAACAACCTC
<i>AOC1 REV</i>	CAGAGACCAGCCGTGATTCC
<i>AOC2 DIR</i>	ACTGGAACGCGGTTACG
<i>AOC2 REV</i>	GGCTCCATCGCCTTAGCTT
<i>DAD1 DIR</i>	GGAGACGCCGTGGGTTT
<i>DAD1 REV</i>	GGCGAGTCACGGCTCA
<i>LOX2 DIR</i>	TGATATCCGCGGCAGATCA
<i>LOX2 REV</i>	CTACCGTAATCCGCTGGTCAGT
<i>VSP1 DIR</i>	TCTTCGGCATCCGTTCCA
<i>VSP1 REV</i>	TTCGGCTTCGTTCCCAA
<i>PR-1 DIR</i>	CCACAAGATTATCTAAGGGGTC
<i>PR-1 REV</i>	TTCCACTGCATGGGACCTA
<i>PR2 DIR</i>	CATCCTCGACGTTCCAGTT
<i>PR2 REV</i>	TGTCGGCCTCCGTTTGA
<i>PR5 DIR</i>	AACGGCGGCGGAGTTC
<i>PR5 REV</i>	GCCGCCATCGCCTACTAGA
<i>cyp79f1 DIR</i>	CATCCGTGCCATCACCATAA
<i>cyp79f1 REV</i>	CAAATCTGCGTCCCCTCTCT
<i>FLS2 DIR</i>	CCTGGACCTGTCTCACAACCA
<i>FLS2 REV</i>	ACGTAAGATTCATCCTTCCGAA
<i>WAK1 DIR</i>	TGCTCTCAGGTCAAAGGCATT
<i>WAK1 REV</i>	CGCAAAGTAACTCACCAGATGT

**Tabla 2.1. Secuencias de los cebadores usados en la qRT-PCR.**

La generación del amplificado se siguió midiendo la fluorescencia de la muestra en todos los ciclos al final del paso de extensión. El origen de la fluorescencia es el uso de un agente intercalante (SYBR Green) que adquiere propiedades fluorescentes al unirse al DNA de doble cadena producido como consecuencia de la reacción de PCR. La amplificación de un producto único en cada tubo de reacción se comprobó obteniendo una curva de fusión después de la reacción de amplificación. La curva se construyó aumentando la temperatura desde 65° C hasta 95° C con una tasa de incremento de 0.1°C/s. Además, se comprobó el tamaño de los amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. La presencia de producto debido a contaminaciones resultantes de DNA genómico residual se comprobó mediante controles de amplificación de muestra de RNA sin transcriptasa reversa. También se hicieron controles sin molde para comprobar la formación de dímeros de los cebadores.

La eficiencia de la PCR se determinó retrotranscribiendo y amplificando diluciones seriadas de RNA (2 ng hasta 2 µg). Los valores del ciclo límite crítico ( $C_T$ ), definido como el ciclo al que la fluorescencia se hace detectable por encima del fondo se representaron como función de la cantidad inicial de cDNA presente en la muestra. De esta forma podemos comprobar que  $C_T$  es inversamente proporcional al logaritmo del número inicial de moléculas de molde. En nuestro caso consideramos un valor de 0,1 como una intensidad de fluorescencia significativamente distinta del fondo. Debido a la naturaleza de la PCR una diferencia de 1 en el valor de  $C_T$  entre 2 muestras indica una cantidad doble de RNA mensajero en la muestra original para ese gen. Esto hace que los resultados se expresen como “Número de duplicación” que consiste en el logaritmo en base 2 que hay que usar para conocer la cantidad relativa de un gen en una muestra respecto de otra.

Las medidas de niveles de expresión de cada uno de los genes estudiados se normalizaron entre si a través de la cuantificación del gen *Actina2* cuya expresión se

considera constitutiva en la planta. Para ello las diferencias en el número de duplicación de *Actina2* en cada muestra se sumaron a las diferencias entre los números de duplicación de cada gen.

#### **2.3.4. Reacciones de RT-PCR semicuantitativa.**

Las reacciones de RT-PCR semicuantitativa se llevaron a cabo en un termociclador modelo *Progenie* (Techne, Cambridge, UK). La mezcla de reacción tenía un volumen final de 25  $\mu$ l y contenía 1X PCR Buffer (16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris- HCl pH 8,8 a 25° C, 0,1% Tween-20) (Bioline, Bizkaia, España), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M dNTPs, 1  $\mu$ M de cada uno de los 2 cebadores, 5 unidades de BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline, Bizkaia, España) y como molde 1 $\mu$ l del cDNA obtenido en la reacción de retrotranscripción.

El protocolo de PCR usado consistió en una etapa de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguida de 30-35 ciclos de amplificación, en función del nivel de expresión del gen amplificado. Cada ciclo de amplificación estaba compuesto de una etapa de desnaturalización de 30 s a 94°C, una etapa de hibridación de 45 s entre 58 y 60°C, dependiendo del par de cebadores (Tabla 2.2), y una etapa de extensión de 45 segundos a 72°C. Tras el último ciclo se finalizaba con una etapa de extensión de 10 minutos a 72°C. El producto así obtenido se visualizó en geles de agarosa al 1,5% tiñéndose con bromuro de etidio.

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>
<i>cor15a UP</i>	ATGGCGATGTCTTTCTCAGGA
<i>cor15a DOWN</i>	GCATCCTTAGCCTCTCCTGCT
<i>NCED3 UP</i>	AATCATACTCAGCCGCCATTATC
<i>NCED3 DOWN</i>	ATCTCGACGTCCGGTGATTTAG
<i>rd22bp1 UP</i>	ACTTTATGGCCTCCGGCGT
<i>rd22bp1 DOWN</i>	CTTGACGTACCGTTCTCAAAGT
<i>rd26 UP</i>	TCCGACAGATGAAGAGCTTCTT
<i>rd26 DOWN</i>	GAGTCAACCCGCTCGAGTTC
<i>rd29a UP</i>	GAAGAAGTTGAACATCATGAGAATGGT
<i>rd29a DOWN</i>	TCAGCTCCTGACTCGTCACCT
<i>Actina 2 UP</i>	CCGAGGCTCCTCTTAACCCA
<i>Actina 2 DOWN</i>	TCTGTGAACCATTCTGGACCT
<i>DAD1 UP</i>	CATGGTTGAGAGCGGGTTTTT
<i>DAD1 DOWN</i>	CCGAAGCTCCTTACCGATTTC
<i>LOX2 UP</i>	CCACACTTCAAGGCCATACAAA
<i>LOX2 DOWN</i>	AATGGCAACAGGCCTCAATG
<i>VSP1 UP</i>	CATCAACTACCCCAACTGCAGA
<i>VSP1 DOWN</i>	TTCGATCCGTTTGCTTGAG
<i>SAMDC1Endógeno UP</i>	CTCGAGCGTTGGAGCGAACTCA
<i>SAMDC1Endógeno DOWN</i>	AGACGAACTAAACTTCACAAGTCA
<i>SAMDC2 UP</i>	TCTACAAGAACGAGTCAAGCTCT
<i>SAMDC2 DOWN</i>	AATTCACATAGACCAGACACAAACA
<i>SAMDC3 UP</i>	CTTCTTCTAACTGAAGAATCTGCGGT
<i>SAMDC3 DOWN</i>	TGAGCAACATTCAACAGTCTTGACA
<i>SAMDC4 UP</i>	AATCTTTAGACCAAGTCTTAAACGA
<i>SAMDC4 DOWN</i>	ATAAACGACGGTCCGGAGCCTGGA

Tabla 2.2. Secuencias de los cebadores usados en la RT-PCR semicuantitativa.

## 2.4. Análisis con micromatrices de DNA.

Los datos obtenidos a partir de la hibridación de micromatrices de DNA con RNA de plantas adultas de 4 semanas o de plántulas de 5 días de plantas *Colo* o de líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* se analizaron con los programas *Microarray Suite 4.0* y *Data Minig Tool 1.0* (Affymetrix). Los programas se utilizaron para determinar la expresión cualitativa (ausencia o presencia del mensajero) y para clasificar los genes en base a una serie de criterios. En este trabajo se presentan aquellos genes cuya expresión en las líneas transgénicas es considerablemente

superior o inferior a la expresión del mismo gen en plantas *Colo*. También se presentan una serie de genes seleccionados en base a su relación con la respuesta a diferentes tipos de estrés y cuyo nivel de expresión en las líneas transgénicas es significativamente diferente al de las plantas *Colo*. En ambos casos, el grupo de genes seleccionados se analizó con los programas *Cluster* y *Treeview* (Eisen y col., 1998) generando los árboles que se presentan en la memoria.

## **2.5. Cuantificación de Poliaminas libres.**

El análisis de PAs libres se realizó sobre plántulas de 12 días que se pesaron y congelaron en nitrógeno líquido para posteriormente guardarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La extracción de PAs libres se realizó según el protocolo descrito por Carbonell y Navarro (1989) usando hexanodiamina como patrón interno. La dansilación y el análisis por HPLC se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Acosta (2004).

## **2.6. Cuantificación de hormonas.**

### **2.6.1. Cuantificación de etileno y ACC.**

La producción de etileno en las plantas de 4 semanas, de *Colo* y de las tres líneas transgénicas S3', S9' y S15, se determinó introduciendo una planta entera en tubos de vidrio de 6 ml que se cerraron herméticamente con tapones de goma y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. De cada tubo se extrajeron 3 alícuotas de aire de 1 ml con jeringas hipodérmicas y se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Autosample Analyzer) con detector de ionización de llama. Se utilizó una columna de alúmina (óxido de aluminio activado) de 2m de longitud y de 2 mm de diámetro interno, y nitrógeno como gas portador a un flujo de 45 ml/min. La temperatura de la columna, del inyector y del detector fue

de 80°C, 80°C y 125°C respectivamente. En estas condiciones, el tiempo de retención del etileno fue de 1-1,2 min. La concentración de etileno se calculó por comparación de la altura de los picos de las muestras con la de un estándar conocido de 1,01 ppm de etileno y normalizando con el peso de la planta en el tubo. La cantidad de etileno producido por plántulas se determinó de igual manera pero introduciendo en cada tubo 10 plántulas de 5 días de edad. Los resultados se expresan como la media y desviación estándar de las medidas de 3 tubos distintos para cada una de las líneas en cada uno de los estados o tratamientos estudiados.

El contenido en ACC de plantas o plántulas de *Colo* y de las tres líneas transgénicas se cuantificó pesando y congelando 1g de tejido. Posteriormente el tejido congelado se trituró en un mortero con nitrógeno líquido, se homogeneizó con 5 ml de etanol al 80% y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se concentró a 45°C hasta sequedad y el residuo seco se disolvió en 3 ml de agua destilada. El contenido en ACC se determinó en una alícuota del extracto acuoso de 100 µl. Se adicionaron 100 µl de HgCl<sub>2</sub> 10 mM y 600 µl de agua desionizada. Los tubos se cerraron herméticamente con tapones de goma y se inyectaron 200 µl de una disolución de NaOH saturada e hipoclorito de sodio al 10% en una proporción 1:2 (v/v). En un tubo réplica se añadió 100 µl de una solución de ACC 1,25 µg/ml y se siguió el mismo procedimiento. Después de la adición de la solución oxidante los tubos se agitaron y se incubaron en un baño de hielo durante 15 minutos con agitación periódica. Posteriormente se extrajo de los tubos tres alícuotas de 1ml de gas y se determinó la concentración de etileno. En los tubos a los que se había añadido ACC estándar se calculó el porcentaje de recuperación para cada muestra y con dicho valor se determinó el contenido de ACC de los extractos. Los resultados se expresan como la media y desviación estándar de las medidas de 3 tubos distintos para cada una de las líneas en cada uno de los estados o tratamientos estudiados.

### **2.6.2. Cuantificación de ABA.**

La determinación del contenido en ABA se llevó a cabo en plantas y plántulas *Colo* y de las tres líneas sobreexpresoras de SAMDC1. Se añadió nitrógeno líquido a 0,2 g de tejido en mortero y se trituro el tejido. El pulverizado se incubó durante 16 horas con 5 ml de solución de extracción (acetona 80% v/v, 100mg/l en hidroxitolueno butilado y 0,5 g/l de ácido cítrico). Posteriormente se centrifugó a 120000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se secó a vacío. El producto obtenido se resuspendió en 500  $\mu$ l de TBS (6,05 g/l Tris, 0,20 mg/l  $MgCl_2$  y 8,8 g/l NaCl a pH 7,8). Se analizaron 3 alícuotas de diluciones de este extracto que entraban en el rango lineal de la curva construida con patrones de ABA (15-250 pg/100 $\mu$ l), obtenida por el método de ELISA indirecto de Walter-Simmons (1987). Se utilizaron conjugados ABA-BSA cedidos por la Dra Teresa Lafuente (IATA, CSIC) que habían sido preparados según Weiler (1980) con algunas modificaciones (Norman SM, 1988). Los resultados se expresan como la media y desviación estándar de tres réplicas para cada una de las líneas, en cada uno de los estadios o tratamientos estudiados.

### **2.7. Crecimiento de plántulas en presencia de PAs, MGBG o ACC.**

Los tratamientos con PAs se llevaron a cabo creciendo plantas del ecotipo *Colo*. Se sembró en placas MS suplementadas con concentraciones 0,1, 0,5 ó 1 mM de Put, Spd o Spm (Sigma- Aldrich, St. Louis MO, USA). A los 5 días se recogieron las plántulas para su análisis.

En el caso de los tratamientos con MGBG se crecieron plantas del ecotipo *Colo* y de cada una de las tres líneas transgénicas S3', S9' y S15 en placas MS suplementadas con 0,1 ó 1 mM Metilglioxal-bis-guanilhidrazona (MGBG) (Sigma-

Aldrich, St. Louis MO, USA). De igual forma, se recogió las plántulas de 5 días para su análisis.

Por último se crecieron plantas del ecotipo *Colo* y de cada una de las tres líneas transgénicas S3', S9' y S15 en placas MS suplementadas con 0,01 ó 0,1 mM ACC (Sigma- Aldrich, St. Louis MO, USA). Los análisis se realizaron sobre plántulas crecidas durante 5 días.

En todos los se realizaron controles sembrando semillas de las mismas líneas en placas MS sin suplementar.

## **2.8. Análisis por microscopía óptica y electrónica.**

Los estudios de microscopía óptica y electrónica se llevaron a cabo con el soporte técnico e instrumental de la unidad de Microscopía Electrónica del Departamento de Patología de la Universitat de València.

### **2.8.1. Procesamiento de las muestras.**

El análisis de las muestras se realizó sobre cortes de 2 mm de longitud que se fijaron de la siguiente forma. Bajo una campana de extracción, se seccionó el tejido en una gota de fijador consistente en glutaraldehído al 2,5% (p/v) en tampón fosfato 0,1 M pH 7 y con la ayuda de un pincel para no dañar la muestra. Las muestras se dejaron a 4°C durante 4 horas en el fijador. La aplicación de vacío fue necesaria para la inmersión del tejido vegetal en la solución fijadora. Posteriormente se lavó 2 veces con tampón fosfato 0,1 M pH 7 para luego refijar con tetraóxido de osmio al 1% (p/v) e tampón fosfato durante 1 h. Por último se procedió a lavar con agua destilada durante 1-2h, realizando 4 cambios.

A continuación se deshidrató el tejido y se infiltraron las muestras en resina EPON, primero se deshidrató a temperatura ambiente la muestra con una serie de disoluciones de acetona al 50% durante 30 min, 1h al 70%, 1 h al 90% y 1h al 100%

de forma que el agua es reemplazada paulatinamente por la acetona. Posteriormente se sumergió el tejido 3 veces en acetona al 100% y luego en 25% de resina EPON de baja viscosidad (Polysciences Inc. Warrington PA). El tejido se dejó en esta resina 4h a temperatura ambiente para luego transferirlo a resina EPON al 50% y dejarlo durante 4 h. Por último se transfirió el tejido a resina EPON al 100% donde se dejó toda la noche.

Por último las muestras se incluyeron en resina EPON en cápsulas de gelatina y la resina se dejó polimerizar durante 48 h en estufa.

### **2.8.2. Obtención de cortes semifinos y ultrafinos.**

Los cortes semifinos (0,5  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  de grosor) se usaron para la observación de la muestra al microscopio óptico por medio de la tinción del tejido. Para la obtención de estos cortes se utilizaron ultramicrotomos Ultracut (Reichert-Jung) con cuchillas de vidrio destensado. Estos cortes se colocaron sobre un porta de vidrio para dejarlos secar a 60°C. Para la tinción del tejido se usó una solución de azul de toluidina al 0,5% en solución de tampón bórax (tetraborato de sodio 0,5%) durante 20 seg. Posteriormente se lavó con agua destilada, se dejó secar a 60°C y se selló con un cubre-objetos de vidrio en resina sintética DPX (Gurr). Los cortes así preparados se observaron en un microscopio óptico Olympus BH2-UMA acoplado a una cámara JVC TK-1270 RGB que permitió la captura de las imágenes digitales.

Por otra parte, los cortes ultrafinos de grosor entre 60 y 80 nm se obtuvieron con una cuchilla de diamante (Diatome) en un ultramicrotomo UltracutE y se tiñieron con tetróxido de osmio. Posteriormente se depositaron sobre rejillas de cobre donde se incrementó el contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo. Se observaron con un microscopio electrónico JEOL JEM 1010 con sistema digital de captación de imágenes (Megaview III, Soft Imaging System).

## **2.9. Tratamientos de estrés abiótico.**

### **2.9.1. Tratamientos de estrés por ozono.**

El estudio de los efectos del estrés por ozono se realizó en una cabina de cultivo Fitotron Sanyo SG097 (Sanyo Electric Co., Japón) a la que se acopló un sistema generador de ozono alimentado por oxígeno ECO-LAB.PPM (Multiozono, S.L. Manises-Valencia). El tratamiento utilizado varió en función del experimento y de los parámetros a estudiar tal como se detalla a continuación.

#### **2.9.1.1. Estudio de los daños visibles provocados por un estrés por ozono.**

El daño visible se determinó a partir de la aparición de clorosis y manchas oscuras en las hojas. Se trataron plantas adultas de 3 semanas, *Col0* y de las tres líneas sobreexpresoras (S3', S9' y S15) con 250 ppb de ozono de forma ininterrumpida durante 6 días. Se tomaron fotos el último día de tratamiento.

#### **2.9.1.2. Estudio de la respuesta génica a estrés por ozono.**

El estudio de la expresión génica en respuesta a ozono se estudió en plantas de 3 semanas a las que se sometió a exposiciones de 6 horas (de 10 a 16 h) a 100 ppb de ozono durante seis días. A este efecto, se trataron tres macetas distintas de la variedad *Col0* y de cada una de las tres líneas sobreexpresoras de la *SAMDC1*. De igual forma se mantuvieron 3 macetas de cada línea como control en ausencia de ozono. Las muestras se recogieron justo antes de iniciar el experimento así como al final de la 3ª y 6ª sesión. El análisis se realizó sobre las hojas de la roseta de las plantas adultas, que fueron recogidas y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -80°C hasta su uso.

#### **2.9.1.3. Estudio de la recuperación a un estrés por ozono corto e intenso.**

Se aplicó a plantas de 2 semanas de forma continua una concentración de ozono de 250 ppb durante 2 días. Posteriormente se eliminó el estrés y se dejaron

descansar las plantas 12 días, después de los cuales se realizaron las medidas de peso fresco y longitud de tallo. En paralelo se crecieron plantas control que no fueron sometidas al estrés por ozono. Se realizó una comparación de la recuperación al estrés entre las plantas *Colo* y las plantas transgénicas, así como entre las plantas estresadas y las no sometidas al tratamiento. Los datos recogidos incluyen la media y desviación típica correspondiente a tres experimentos independientes con un mínimo de 10 macetas de cada línea por experimento.

#### **2.9.1.4. Estudio de la germinación durante un estrés por ozono.**

Se sembraron 50 semillas de cada una de las 4 líneas estudiadas en macetas con ayuda de una lupa. Después de una vernalización de 2 días se llevaron las placas al ozonificador donde se sometieron a una exposición de 100, 200 ó 300 ppb de ozono durante 8 días. En ese momento se contó el número de semillas que habían desarrollado cotiledones. En paralelo se sembraron macetas control que no fueron sometidas a exposición al ozono. Para cada línea y situación de estrés o control, los resultados se expresan como el porcentaje de semillas que habían desarrollado cotiledones respecto al número total de semillas sembradas en cada placa y son el resultado de tres experimentos distintos.

#### **2.9.2. Tratamientos de estrés salino o desecación.**

##### **2.9.2.1. Estudio de los daños visibles.**

La aparición del daño visible se determinó en plantas adultas crecidas en maceta que a partir de las 3 semanas fueron regadas continuamente durante 10 días con una solución de NaCl de concentración 50, 100, 150 ó 250 mM. A las plantas control se les continuó añadiendo agua de riego. Para el estudio del efecto de cada una de estas concentraciones se trataron tres macetas distintas de la variedad *Colo* y de cada una de las tres líneas sobreexpresoras de *SAMDC1*.

El daño debido a la desecación se determinó sobre plantas crecidas en maceta a las que a las 3 semanas se les retiró el riego durante 10 días. Al igual que anteriormente, se analizó 3 macetas de cada variedad o línea. En ambos casos, se realizaron las fotografías al cabo de 10 días del comienzo del tratamiento.

#### **2.9.2.2. Estudio de cambios en la expresión en respuesta a estrés salino o desecación.**

Se seleccionó una serie de genes (Tablas 2.1, 2.2) cuyos niveles de expresión se cuantificaron mediante RT-PCR. Macetas con plantas de 4 semanas, de la línea *Col0* y de cada una de las líneas transgénicas, se regaron durante 6 horas con una disolución de NaCl 250mM o con agua en el caso del los controles. Se recogieron hojas de la roseta que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -80° C hasta su uso. El efecto de la desecación se estudió en plantas de 4 semanas crecidas en macetas, que se colocaron sobre papel absorbente durante 10 horas. El control se realizó usando macetas sembradas de igual forma que se mantuvieron con riego normal.

#### **2.9.2.3. Estudio de la recuperación a un estrés salino o por desecación.**

Se trataron plantas de 2 semanas, crecidas en maceta, durante 2 días con una disolución 250 mM en NaCl y se volvieron a regar con agua durante 12 días. El grado de recuperación frente al estrés se determinó midiendo el peso fresco y la longitud del tallo.

La recuperación al daño provocado por privación de agua se estudió colocando macetas con plantas de 2 semanas sobre papel absorbente con el fin de retirar el agua de la tierra. Se mantuvieron sobre papel absorbente y seco durante 2 días para posteriormente continuar con el riego. 12 días después de este estrés se midió el peso fresco y la longitud del tallo.

Los datos recogidos incluyen la media y desviación típica correspondiente a la medida de 10 macetas de cada línea por experimento y se presentan con los valores correspondientes a plantas control tratadas con agua de riego durante el mismo tiempo.

#### **2.9.2.4. Estudio del efecto de un estrés salino o por desecación sobre la germinación.**

El porcentaje de germinación en presencia de un estrés salino se determinó contando el número de semillas que habían desarrollado cotiledones tras sembrar 50 semillas del ecotipo *Colo* y de cada una de las líneas transgénicas en distintas placas MS que se suplementaron con NaCl a concentraciones 50, 100, 150 ó 250 mM. Como control se sembraron semillas de las mismas líneas en placas MS.

El estudio de la germinación durante un estrés por desecación se realizó sembrando 50 semillas del ecotipo *Colo* y de cada una de las líneas transgénicas en distintas placas de medio MS que se abrieron en un incubador con regulador de humedad (Fitotron Sanyo SG097, Sanyo Electric Co., Japón). Este incubador permitió regular la humedad relativa en su interior a los valores de 80, 70, 60 y 50%. El control se realizó sembrando de igual forma en placas de medio MS selladas con parafilm.

En ambos tipos de experimentos el recuento de las semillas que habían desarrollado cotiledones se realizó diariamente hasta el octavo día de experimento, momento a partir del cual no había variación en este número. Los resultados se expresan como el porcentaje de semillas con cotiledones respecto al número total de semillas sembradas en cada placa y son el resultado de tres siembras distintas.

## **2.10. Tratamientos de estrés biótico.**

### **2.10.1. Infección con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.**

Se infectó *Arabidopsis* con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326. Se creció esta bacteria a 28°C en medio King's B (King y col., 1954) al cual se le añadió estreptomicina a 100 µg/ml para seleccionar. Para infectar *Arabidopsis* con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 se creció este patógeno a 28°C en medio King's B suplementado con rifampicina 50 µg/ml. En ambos casos cuando el cultivo alcanzó una absorbancia a 600 nm de 0,1 las bacterias fueron recogidas por centrifugación, lavadas y resuspendidas en 500ml de MgCl<sub>2</sub> 10mM. Se infiltró a vacío sobre el lado abaxial de cada hoja 10 µl de una suspensión de 3·10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias/ml (CFU/ml). El daño visible causado por el patógeno se fotografió a los 2 días después de la infección. Por otra parte, la cuantificación del crecimiento del patógeno se realizó infiltrando plantas con 10 µl de una suspensión de 10<sup>6</sup> CFU/ml. A los 2 y 3 días después de la infección se extrajeron 3 discos foliares de 0,5 cm de diámetro de 10 plantas distintas de cada línea. Se trituraron en presencia de MgCl<sub>2</sub> 10mM y se determinó la densidad de la población bacteriana plaqueando diluciones seriadas de esta suspensión en placas de medio King's B suplementadas con los antibióticos adecuados que se dejaron crecer a 28°C, contándose el número de unidades formadoras de colonias. Los datos se expresan como la media y desviación del número de CFU/disco foliar de 10 plantas distintas.

En ambos casos el control se realizó infiltrando las hojas con 10 µl de MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

### 2.10.2. Infección con *Peronospora parasitica*.

Se infectaron plantas *Col0* y plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* con la cepa *Noks1* de *Peronospora parasitica* partiendo de un pulverizado seco de hojas de plantas infectadas con este hongo que contenía las ooesporas del patógeno. Este pulverizado se espolvoreó sobre macetas húmedas recién sembradas con *Col0*. Estas macetas se colocaron en una bandeja de poliestireno cubiertas con plástico transparente para asegurar la humedad y se pusieron a vernalizar. Posteriormente se llevaron a una cámara de incubación con un fotoperíodo de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad a 18°C y 16°C respectivamente. Las plántulas así obtenidas fueron examinadas a la lupa para comprobar la presencia de esporangioesporas diariamente. Aquellos cotiledones que presentaban una esporulación abundante fueron recogidos en un tubo de vidrio con 3 ml de agua desionizada. El tubo se agitó para liberar las conidioesporas y se retiró el resto de material vegetal con pinzas. La suspensión de conidioesporas fue llevada a un tubo de centrifuga de 1,5 ml y el inóculo se recogió por centrifugación de 5 minutos a 1500g para posteriormente lavarlo con 1 ml de agua. Por último el sedimento se recogió por centrifugación y se resuspendió en 0,5 ml de agua. La concentración del inóculo se ajustó con el uso de la cámara de Neubauer (Hauser ScieNtific Partnership, HORSHAM, PA 19044) a  $5 \cdot 10^4$  conidioesporas por ml. Con 2  $\mu$ l de este inóculo se infectaron los cotiledones de plantas de 14 días de todas las líneas estudiadas. Las plantas se incubaron en una bandeja de plástico a 18°C y 10 horas de luz diarias manteniendo la humedad en las hojas con un atomizador de agua. En paralelo se creció plantas control no infectadas. A los 10 días de la infección se contó el número de esporangioesporas que se habían desarrollado en las hojas. Los resultados se expresan como la media y desviación típica de los valores de 25 hojas por cada línea.

## **2.11. Análisis del área y amarilleamiento de las hojas.**

Las hojas sometidas a estrés por desecación se digitalizaron a 600 pixels por pulgada (ppp) con un escáner y se almacenaron en formato TIFF sin compresión. El análisis de imagen se realizó utilizando el paquete de utilidades *Image Processing Tool Kit 5.0* (Reindeer Graphics Inc.), instaladas sobre el programa Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Inc). Las imágenes se segmentaron utilizando la función de búsqueda de umbrales del paquete de utilidades, eliminando el fondo para formar una máscara binaria de las hojas completas. Las imágenes binarias se procesaron con las funciones de morfología matemática para evitar la persistencia de píxeles residuales correspondientes al ruido de fondo. Una vez obtenidas las máscaras binarias, se usaron para realizar las medidas de las hojas en las imágenes originales. Se determinaron los parámetros de área, nivel de gris medio, porcentaje de luminancia y los niveles medio de las componentes roja, verde y azul de la imagen en color RGB.

## **2.12. Análisis estadístico.**

Los datos de este trabajo se expresan como media  $\pm$  desviación típica. Las diferencias entre las muestras se analizaron con el test de la t de Student y el test U no paramétrico de Mann-Whitney. Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado significativo.

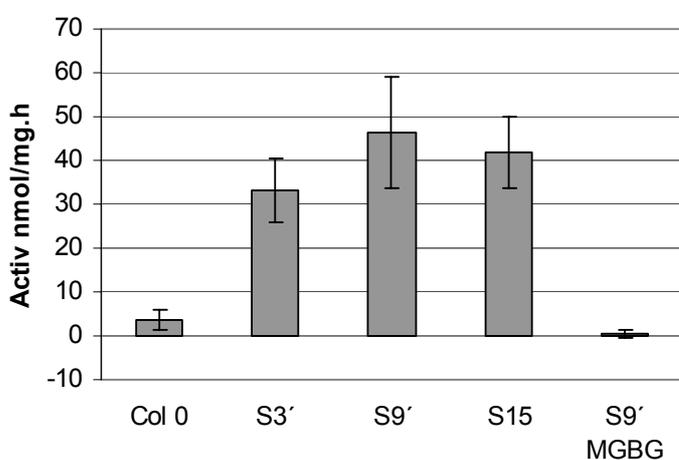
### **3. RESULTADOS.**

#### **3.1. Efecto de la sobreexpresión de la *SAMDC1* sobre el metabolismo de poliaminas.**

##### **3.1.1. Medida de la actividad SAMDC.**

La actividad SAMDC de las plantas control *Col0* así como de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* S3', S9' y S15 se midió en extractos crudos siguiendo la descarboxilación del sustrato (S-Adenosil-L-[carboxil-<sup>14</sup>C] metionina).

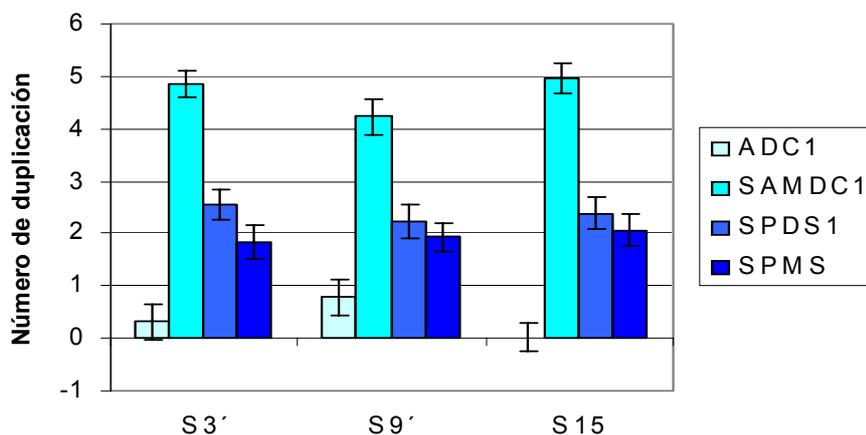
El nivel de actividad específica de las líneas transgénicas es de 10-15 veces superior al del ecotipo *Col0* (Figura 3.1). Adicionalmente se comprobó el carácter proteico de la actividad, dado que cuando el experimento se realizaba con extracto hervido no se detectó actividad alguna (no mostrado). Por último se observa que la descarboxilación no tiene lugar cuando se realiza el experimento en presencia de MGBG (inhibidor de la actividad SAMDC), lo que indica la especificidad de la descarboxilación medida.



**Figura 3.1. Medida de actividad específica SAMDC en extractos de hojas.** Se utilizaron plantas control (*Col0*) y líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* (S3', S9' y S15) de 4 semanas. S9' MGBG, extracto de plantas S9' al que se añadió 1 mM MGBG.

### 3.1.2. Análisis del metabolismo de poliaminas.

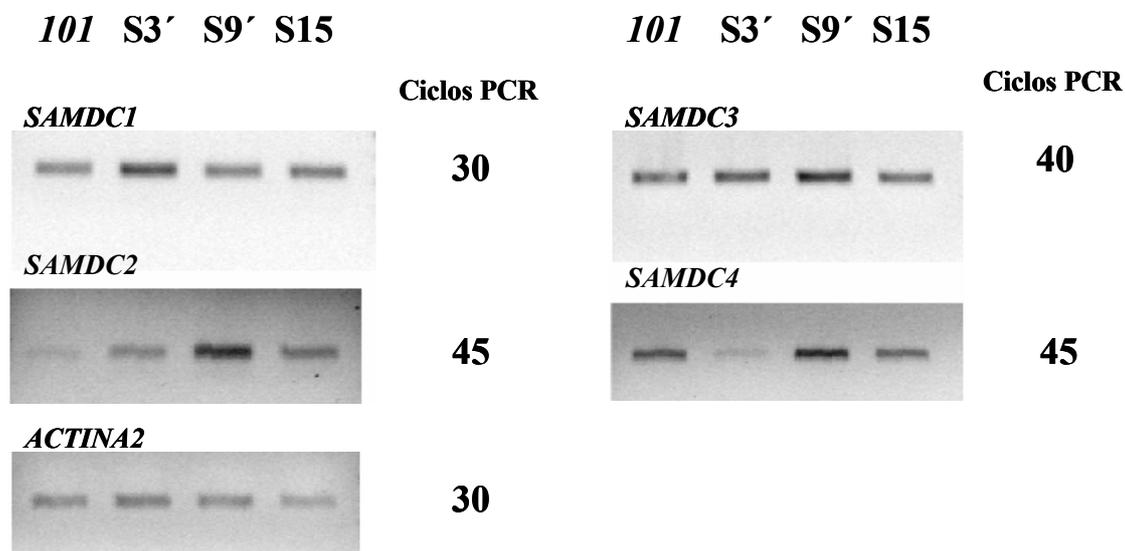
Al objeto de analizar el efecto de la sobreexpresión de *SAMDC1* sobre la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de poliaminas, se determinó en plantas adultas de 4 semanas, los niveles de los mRNAs de *ADC1*, *SPMS*, *SPDS1* y *SAMDC1*, calculando la relación entre los niveles de expresión de estos genes en las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* y en las plantas *Col0* (Figura 3.2). El nivel de *SAMDC1* en las plantas transgénicas es del orden de  $2^5$  veces mayor que en *Col0*. Así mismo, se observó que los niveles de expresión de los genes de *SPMS* y de *SPDS1*, cuyos productos utilizan el SAM descarboxilado como sustrato, son de 4 a 8 veces superiores en las líneas transgénicas que en el ecotipo *Col0*. Sin embargo, no se observó una variación importante para la expresión del gen *ADC1* respecto a sus niveles en las plantas *Col0*.



**Figura 3.2** Niveles de expresión de los genes de *ADC1*, *SAMDC1*, *SPDS1* y *SPMS* en plantas adultas sobreexpresoras de *SAMDC1*. El mRNA se cuantificó por qRT-PCR. El número de duplicación representa el  $\log_2$  de la relación entre la cantidad de mensajero en las líneas transgénicas respecto de la cantidad del mismo mensajero en plantas *Col0*.

Así mismo, se analizó el efecto de la sobreexpresión de *SAMDC1* sobre la expresión del resto de genes que codifican para la SAMDC en *Arabidopsis*. Se pudo comprobar que las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* apenas presentan cambios en

la expresión del gen de la *SAMDC1* endógena ni de los genes *SAMDC3* y *SAMDC4* de *Arabidopsis* (Figura 3.3). No es el caso para *SAMDC2*, que presenta una clara inducción de su expresión en todas las líneas como consecuencia de la sobreexpresión de *SAMDC1* (Figura 3.3)



**Figura 3.3.** Expresión de los genes endógenos de SAMDC en líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* en plantas adultas. Medida por RT-PCR semicuantitativa de la expresión de *SAMDC1* endógena, *SAMDC2*, *SAMDC3* y *SAMDC4* en la línea transformada con vector sin inserto (101) y en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* S3', S9' y S15. Se realizó un control de carga amplificando el gen de actina2.

El número de ciclos empleados para la cuantificación de los diferentes mRNAs de la SAMDC indica que el nivel de expresión de *SAMDC1* es muy superior al resto (Figura 3.3).

A partir de los datos obtenidos por hibridación con micromatrices de DNA, se analizó la expresión de genes implicados en el catabolismo de PAs. Se estudiaron los niveles de genes de aminooxidasas, encargadas de la degradación de Put a pirrolina, y de poliaminoxidasas, encargadas de la degradación de Spm y Spd. La Tabla 3.1 muestra que no existe una alteración generalizada en la expresión de las aminooxidasas dependientes de Cu, excepto para la correspondiente al At4g12280 que presenta una inducción en las líneas transgénicas. La situación es similar para la

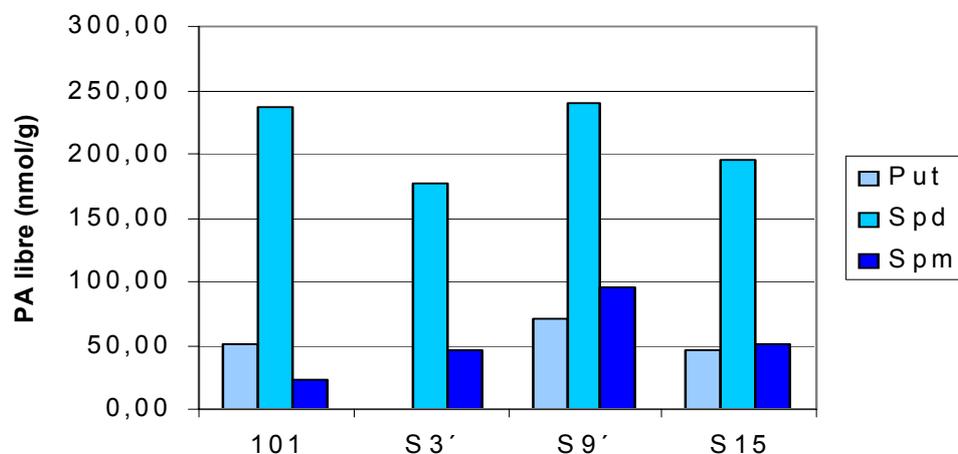
aminoxidasa no dependiente de Cu At2g43020 cuya expresión está aumentada en las plantas transgénicas. Por otra parte, los niveles del At3g43670, correspondiente a otra aminoxidasa independiente de Cu, son inferiores en las líneas transgénicas. En general se puede concluir que las aminoxidasas encargadas de la degradación de Put no presentan cambios significativos en su expresión como consecuencia de la sobreexpresión de *SAMDC1*.

Por otra parte, una de las 3 poliaminoxidasas presentes en la micromatriz, encargadas de degradar Spd y Spm, la correspondiente al At1g65830, manifiesta unos niveles de expresión inferiores en líneas transgénicas.

AGI N°	Descripción	Expresión <i>Col0</i>	Expresión S3'	Expresión S9'	Expresión S15
At1g31700	Cobre aminoxidasa	173,5	42,6	184,1	107,3
At4g12280	Cobre aminoxidasa	25,9	65,7	191,8	782,1
At1g31710	Cobre aminoxidasa	461,4	155,9	547,3	216,3
At2g42490	Cobre aminoxidasa	2045,8	1263,2	1066,2	1140,9
At1g31690	Cobre aminoxidasa	67,1	680,4	533,2	93,4
At1g31680	Cobre aminoxidasa	8,5	98,4	164,3	6
At1g31670	Cobre aminoxidasa	7,6	6,6	5,5	6
At4g12270	Cobre aminoxidasa	2,3	2,3	5	2
At2g43020	Aminoxidasa	359,1	744	901	770,2
At3g43670	Aminoxidasa	213,7	126,7	37,1	80,7
At3g59050	Aminoxidasa	8,7	89,4	17,4	14,3
At1g62810	Aminoxidasa	418,2	220,8	380,4	683,2
At4g14949	ATAO1	165	161,3	93,2	4,2
At1g65840	Poliaminoxidasa	1264,6	659,9	547,7	329,5
At5g13700	Poliaminoxidasa	52,6	17,7	179,2	17,1
At3g59050	Putativa PAO	428,4	945,9	723,8	755,3
At1g62830	FAD-aminoxidasa	227,2	216,2	176,8	178
At3g13682	FAD-aminoxidasa	98,6	58,7	70,7	75,5

**Tabla 3.1. Expresión de genes implicados en el catabolismo de PAs.** Cuantificación de los niveles de expresión por hibridación con la micromatriz "Genechip *Arabidopsis* ATH1 Genome Array" (*Affymetrix*). Los datos proceden de hojas de roseta de 4 semanas del ecotipo silvestre *Col0* y de las líneas transgénicas S3', S9' y S15. Se presenta el N° de identificación AGI (*Arabidopsis* Genome Initiative), descripción del gen y señal cuantificada en el microarray. En rojo se indica aquellos genes cuya expresión en las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* está aumentada y en verde aquellos cuya expresión disminuye respecto al control *Col0*.

Los resultados obtenidos sugieren alteraciones en la síntesis y degradación de PAs por lo que se realizó la cuantificación del contenido en PAs libres de las plantas control transformadas con el vector sin inserto y de las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*. Se observó que en las líneas S3', S9' y S15 el contenido en Spm libre es de 2 a 4 veces superior al presente en las plantas control (Figura 3.4). Sin embargo el contenido en Spd no varía de forma considerable, probablemente debido a la transformación a Spm posterior a su síntesis. La medida de los niveles de Put libre presenta una gran variabilidad pero se puede comprobar que sus niveles no son significativamente distintos a los presentes en el control.



**Figura 3.4. Cuantificación de los niveles de PAs libres.** Medida de los niveles de PAs en plantas de 2 semanas crecidas en placas de la línea transformada con el vector sin inserto (101) y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1*.

## 3.2. Análisis genómico de las líneas sobreexpresoras.

### 3.2.1. Análisis mediante micromatrices de DNA.

Con el uso de la tecnología de Chips de DNA se analizó y comparó el perfil transcripcional de las plantas Col0 con el de las líneas transgénicas S3', S9' y S15. El análisis de los datos obtenidos utilizando el software de *Affymetrix* permite clasificar los genes en grupos ("Clusters") de acuerdo con criterios referentes a sus niveles de

expresión. Se seleccionó uno de estos grupos en base a combinar dos criterios: mostrar diferencias de expresión entre las plantas no transformadas y las líneas transgénicas, y contener genes implicados de alguna forma en la respuesta a estrés. Se utilizó los programas *Cluster* y *Treeview* (Eisen y col., 1998) para una organización y clasificación de estos genes (Figura 3.5).

Algunos de los genes representados en la figura 3.5 se encuentran sobreexpresados en las líneas transgénicas. Entre ellos, *NCED3* (9-cis epoxycarotenoid dioxygenase 3) que codifica un enzima clave en el control de la ruta de síntesis del ABA. Así mismo, los niveles de *DAD1* (*defective anther dehiscence1*), *AOC1* (*allene oxide synthase 1*), *AOC2* (*allene oxide synthase 2*), *AOS* (*allene oxide synthase*), y *JMT* (*jasmonic acid carboxyl methyl transferase*) son superiores en las líneas sobreexpresoras. Estos genes forman parte de la ruta biosintética del ácido jasmónico y del metil jasmonato (Ishiguro y col 2001, Seo y col 2001). Al igual sucede con los genes *VSP1* (*vegetative storage protein 1*) y *LOX2* (*lipoxygenase 2*), relacionados con la señalización por etileno. Por su parte *LOX2* participa tanto en la biosíntesis de ácido jasmónico como del ABA (Bell y col., 1995) y al igual que *VSP1* su expresión es inducida por ácido jasmónico y reprimida por etileno (Tuominen y col., 2004). Por último aparecen también sobreexpresados genes que participan en la respuesta a estrés abiótico, *cor15a* (cold regulated 15a), *rd26* y *rd29a* (responsive to dessication 26 y 29a), *rd22bp1* (rd22 binding protein 1) o al estrés biótico como son *PR-1*, *PR2*, *PR5* (pathogen related 1, 2 y 5), *cyp79f1* (cytochrome P79f1), *WAK1* (wall-associated kinase 1) y *FLS2* (flagellin-sensitive 2). En el agrupamiento se han incluido los genes de biosíntesis de PAs, se observa que la sobreexpresión de *SAMDC1*, apenas tiene incidencia sobre el nivel de expresión del resto de genes de la ruta.

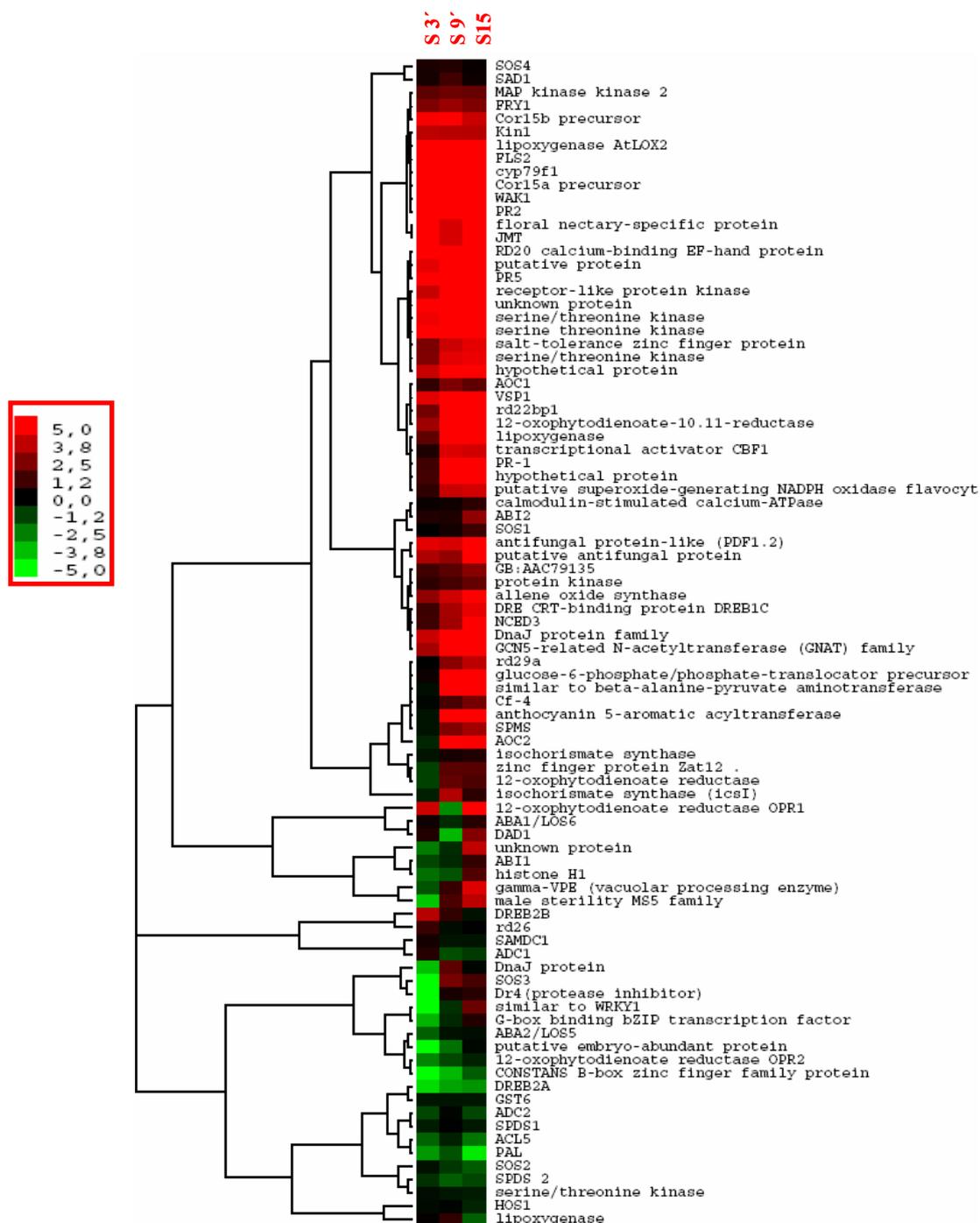
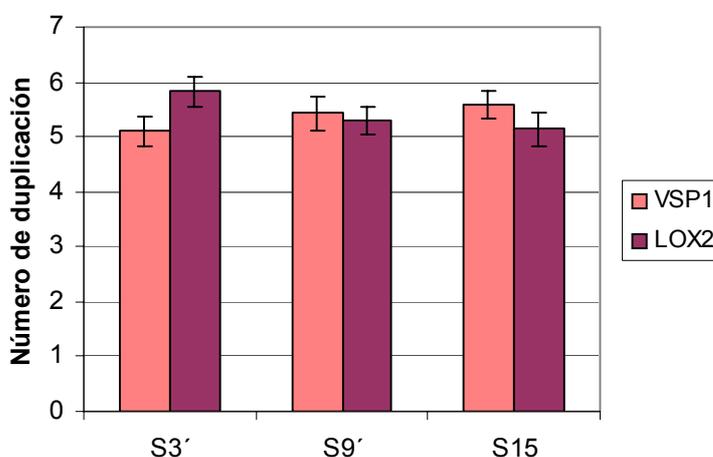


Figura 3.5. Agrupamiento de genes implicados en la respuesta a estrés. Se seleccionaron genes con diferencias de expresión significativas entre las plantas no transformadas y las líneas transgénicas, implicados en la respuesta a estrés. El agrupamiento se realizó con los programas *Cluster* y *Treeview*.

### 3.2.2. Análisis de la expresión génica dependiente de etileno y ácido jasmónico.

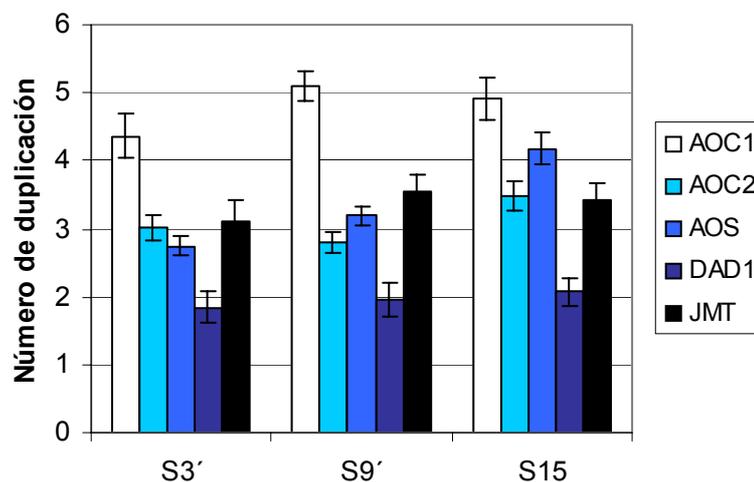
El análisis por micromatrices de DNA reveló una serie de alteraciones en la expresión de los genes *VSP1* y *LOX2*, relacionados con la señalización por etileno (Figura 3.5). Se midieron los niveles de RNA mensajero de dichos genes cuya expresión está inhibida por esta hormona (Tuominen y col., 2004). La figura 3.6 muestra los niveles de expresión de *VSP1* y *LOX2* en las 3 líneas transgénicas respecto a *Col0*. Estos genes alcanzan unos niveles entre  $2^5$  y  $2^6$  veces superiores en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* lo que podría sugerir una menor producción de etileno en estas plantas.



**Figura 3.6. Niveles de expresión de los genes *VSP1* y *LOX2*.** Medida por qRT-PCR de los niveles de los mRNAs en plantas adultas de 4 semanas de *Col0* y de las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*. Los resultados se expresan como  $\log_2$  de la cantidad relativa de mensajero respecto al presente en *Col0*.

Teniendo en cuenta el nivel de expresión de estos 2 genes dependientes de ácido jasmónico en las líneas sobreexpresoras, así como el carácter antagónico entre la señalización por etileno y la señalización por el ácido jasmónico (Tuominen y col., 2004) y los resultados obtenidos con las micromatrices de DNA se analizó el nivel de

expresión de los genes de la biosíntesis del ácido jasmónico y metil jasmonato *AOC1*, *AOC2*, *AOS*, *DAD1* y *JMT*. La expresión de estos genes resultó ser mayor en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* que en las plantas control (Figura 3.7), sugiriendo unos mayores niveles de ácido jasmónico y metil jasmonato.

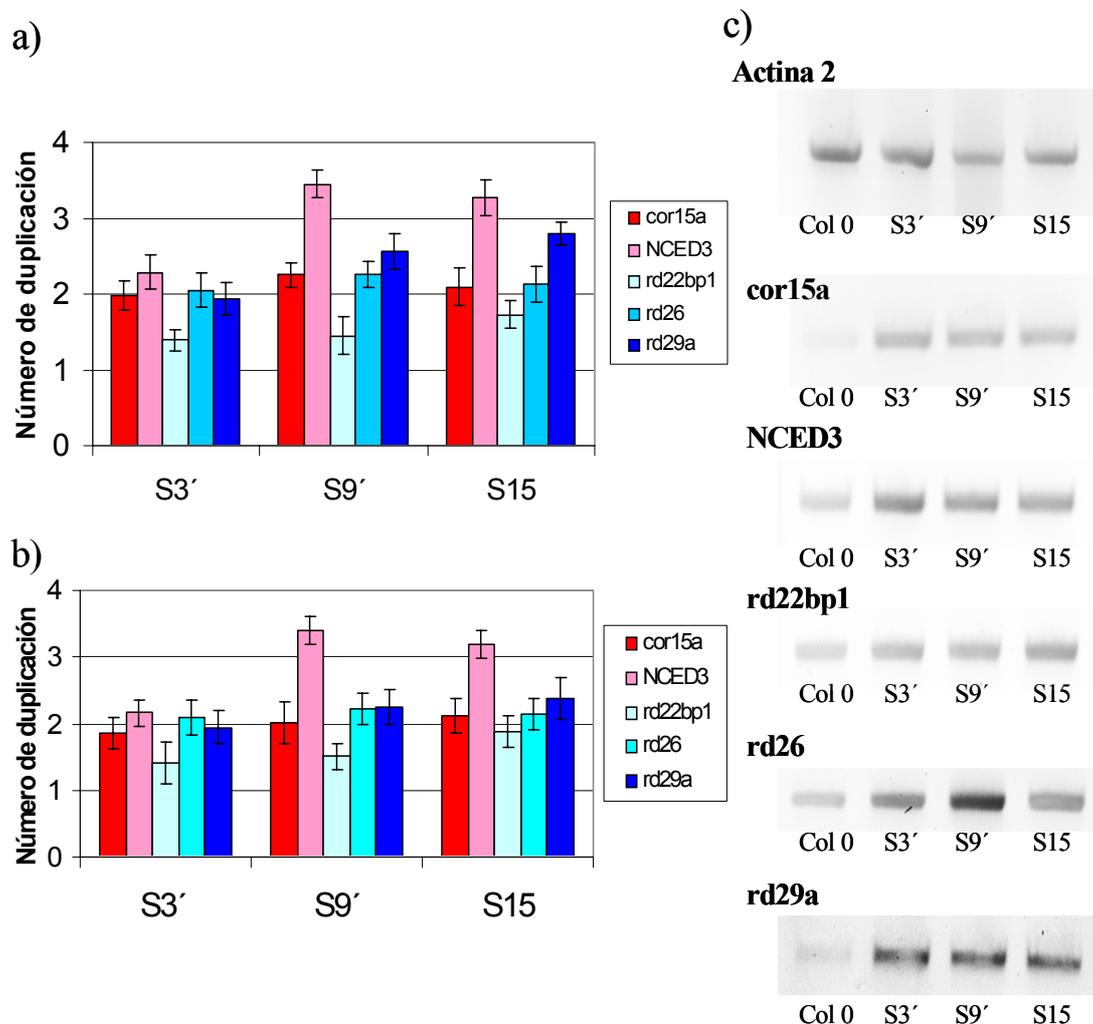


**Figura 3.7. Nivel de expresión de genes implicados en la síntesis de ácido jasmónico y metil jasmonato.** Medida por qRT-PCR de los niveles de RNA mensajero de *AOC1*, *AOC2*, *AOS*, *DAD1* y *JMT* en plantas adultas de 4 semanas *Col0* y de las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*. Los resultados se expresan como  $\log_2$  de la cantidad relativa de mensajero en las líneas sobreexpresoras respecto al presente en *Col0*.

### 3.2.3. Análisis de la expresión de genes inducidos por estrés abiótico.

Los datos de las micromatrices de DNA muestran unos mayores niveles de expresión en una serie de genes participantes en la defensa de la planta al estrés abiótico (Figura 3.5). Para comprobar estas observaciones se decidió cuantificar los niveles de algunos genes cuya expresión es inducida por ABA, como son *cor15a*, *rd26*, *rd29a*, *rd22bp1* y *NCED3*. Se observó que el nivel de expresión de estos genes es superior en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* que en las plantas *Col0* (Figura 3.8). Esto sugiere una preparación previa al estrés de tipo abiótico que podría

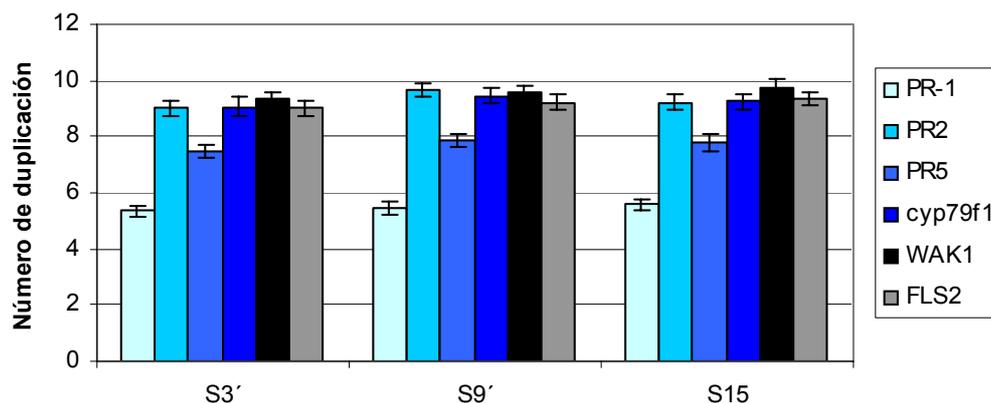
conferir a estas plantas una mayor resistencia frente a este tipo de estrés. Esta mayor expresión en las plantas transgénicas no parece depender del fotoperíodo pues la repetición de estas medidas en plantas crecidas en día corto no provoca cambios importantes en las medidas (Figura 3.8b).



**Figura 3.8. Niveles de expresión de genes de respuesta a estrés abiótico.** Medidas de cantidades de mRNA de cada gen por qRT-PCR en plantas de 4 semanas crecidas en día largo (a) y en día corto (b). El número de duplicación es el  $\text{Log}_2$  de la relación entre la cantidad de mensajero del gen en concreto en cada muestra respecto de la cantidad del mismo mensajero presente en *Col0*. c) RT-PCR semicuantitativo de los mismos genes en plantas crecidas en día largo.

### 3.2.4. Análisis de la expresión de genes inducidos por estrés biótico.

Por otra parte los datos de las micromatrices de DNA revelaron una inducción de la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta al estrés biótico en las plantas transgénicas. Se determinó los niveles de expresión de los genes *PR-1*, *PR2*, *PR5*, *cyp79f1*, *WAK1* y *FLS2*. La medida por qRT-PCR del nivel de expresión de estos genes permite comprobar la diferencia entre las plantas *Col0* y las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* (Figura 3.9).



**Figura 3.9. Niveles de expresión de genes de defensa a estrés biótico.** Medida por qRT-PCR de los niveles de mRNA de *PR-1*, *PR2*, *PR5*, *cyp79f1*, *WAK1* y *FLS2* en plantas adultas de 4 semanas de *Col0* y de las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*. Los resultados se expresan como  $\log_2$  de la cantidad relativa de mensajero respecto al presente en *Col0*.

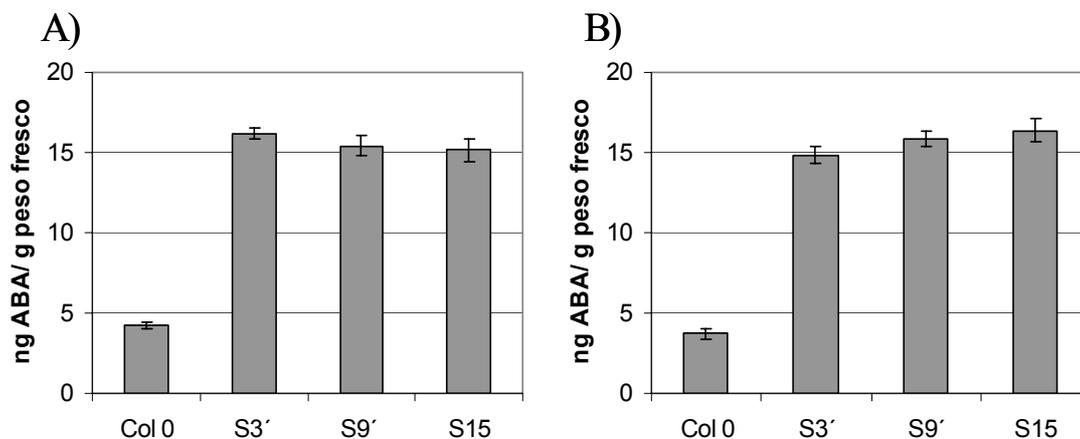
Estos resultados muestran una activación en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* de los genes de respuesta al estrés biótico.

## 3.3. Cuantificación de hormonas y ACC

### 3.3.1. Cuantificación de ABA.

La inducción del gen *NCED3* podría sugerir una alteración de los niveles de ABA en las líneas transgénicas. Se observó que tanto en plantas como en plántulas el

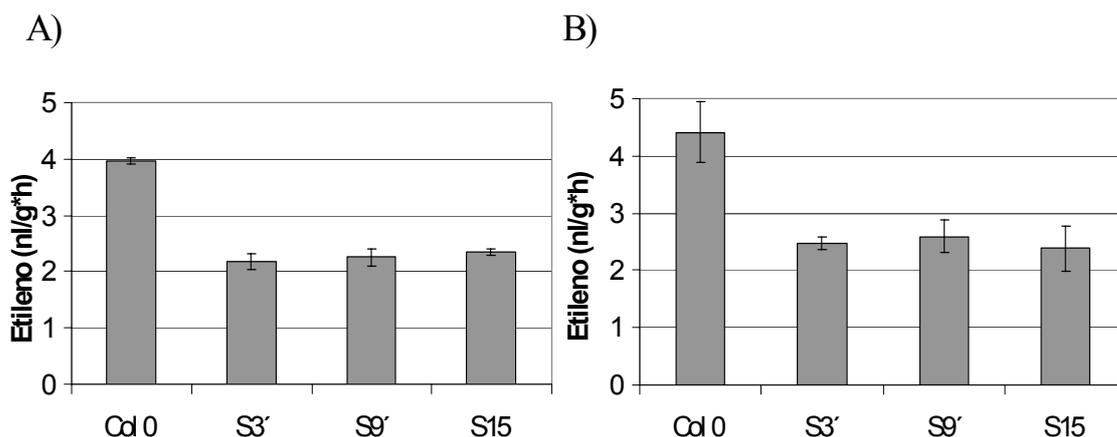
contenido en ABA es 3-4 veces superior en las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* que en el ecotipo salvaje *Col0* (Figura 3.10).



**Figura 3.10. Cuantificación de los niveles de ABA.** Medida del contenido total de ácido abscísico en plantas adultas de 4 semanas (A) y en plántulas de 5 días (B) de la variedad salvaje *Col0* y de las tres líneas sobreexpresoras de *SAMDC1*.

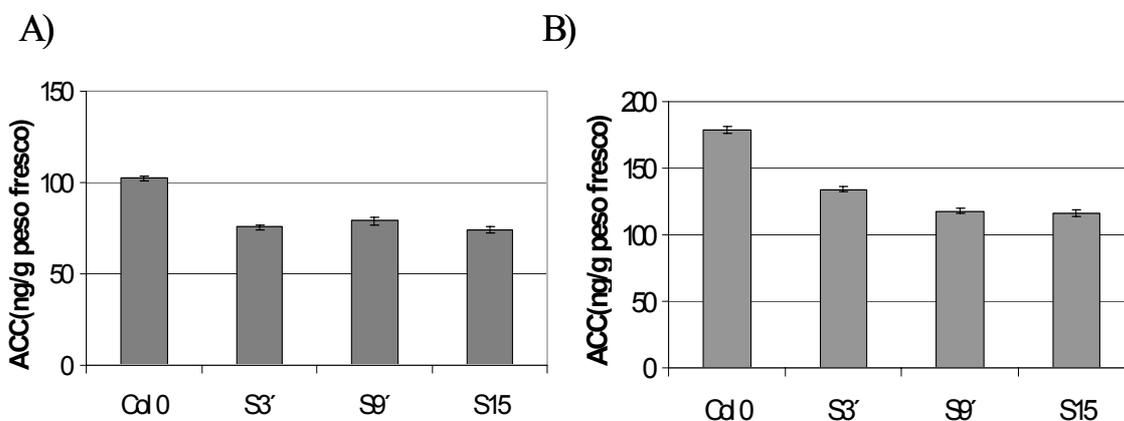
### 3.3.2. Cuantificación de etileno y ACC.

La reducción en los niveles de mRNAs de proteínas implicadas en la señalización por etileno podría sugerir niveles menores de esta hormona en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*. La cantidad de etileno fue determinada en plántulas y en plantas adultas de la línea salvaje *Col0*, así como de las 3 líneas transgénicas utilizadas. Como se muestra en la figura 3.11 las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* producen un 45% menos etileno que el ecotipo salvaje. Esta menor producción se observa así mismo en plántulas de 5 días.



**Figura 3.11. Cuantificación de los niveles de etileno.** Medida de la cantidad de etileno producido durante 2 horas por plantas adultas de 4 semanas (A) o por plántulas de 5 días (B) de la línea salvaje *Col0* y de las 3 líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* por cromatografía de gases.

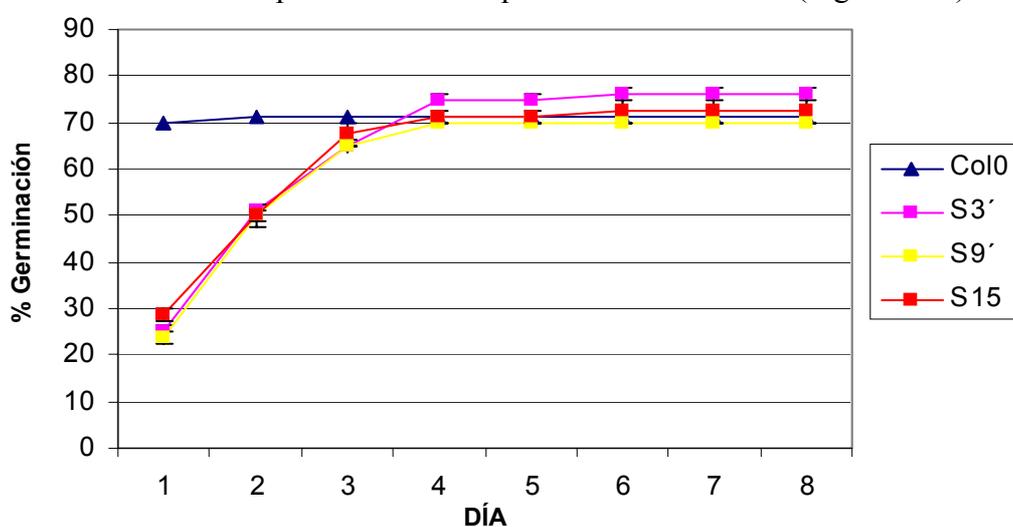
Resultados similares se observaron al medir el contenido en estas plantas del precursor del etileno, ACC. Los niveles de este precursor se encuentran reducidos aproximadamente en un 25% en las líneas transgénicas respecto de la variedad *Col0* tanto en las plantas adultas como en plántulas de 5 días (Figura 3.12). Se puede comprobar también que en todas las líneas la producción de ACC es ligeramente superior en la plántula que en la planta adulta.



**Figura 3.12. Cuantificación de los niveles de ACC.** Determinación del contenido total de ACC en plantas adultas de 4 semanas (A) y en plántulas de 5 días (B) de la línea salvaje *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1*.

### 3.4. Estudio del porcentaje de germinación en placa.

El fenotipo detectado inicialmente en las plantas transgénicas mostraba un retraso en el desarrollo de las plántulas (Marco, 2000). Las líneas sobreexpresoras mostraban un tamaño más reducido, con raíces más cortas y con una parte aérea más pequeña al ser comparadas con el ecotipo silvestre *Col0*. Este fenotipo desaparece conforme la planta se va desarrollando para dar lugar a plantas adultas indistinguibles de *Col0*. En este trabajo se analizó la germinación en placa de las líneas transgénicas al objeto de comprobar si el retraso observado correlacionaba con dificultades en la germinación. Se determinó el porcentaje de semillas que desarrollaban cotiledones de cada línea durante los 8 primeros días después de vernalización. (Figura 3.13)



**Figura 3.13. Germinación en placas de medio MS.** 50 semillas de cada línea fueron sembradas en distintas placas de medio MS. El número de semillas que habían desarrollado cotiledones se contó diariamente durante los 8 días posteriores a la vernalización y se calculó el % de germinación respecto al número total de semillas sembradas.

Se puede comprobar que las plantas transgénicas presentan un retraso de unos 3 días en el desarrollo de cotiledones. El porcentaje de germinación de las plantas sobreexpresoras inicialmente es muy bajo pero aumenta a lo largo del tiempo para igualar a *Col0* a partir del 4º día después de la vernalización. En ese momento los

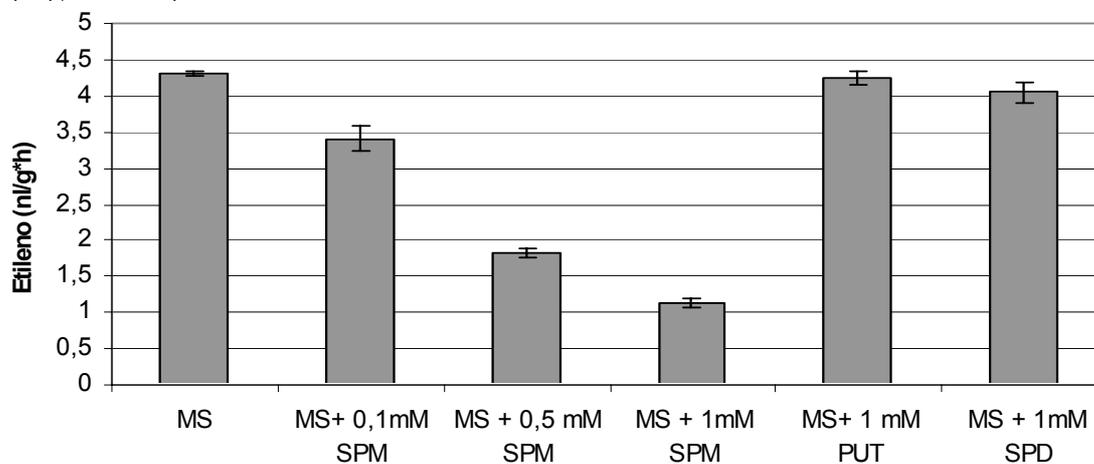
porcentajes de germinación se estabilizan presentando las 4 líneas valores similares en torno al 75%.

### 3.5. Efecto de la modificación exógena de los niveles de PAs sobre el fenotipo observado.

La relación entre los elevados niveles de Spm y los cambios observados en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* se comprobó creciendo plántulas en placa en presencia de las PAs Put, Spd o Spm, o de MGBG, inhibidor de la actividad SAMDC. Al cabo de 5 días se recogieron las plántulas y se midieron los niveles de ACC, etileno y ABA así como la expresión de los genes dependientes de estas hormonas determinados anteriormente.

#### 3.5.1. Análisis de los efectos de la aplicación de PAs.

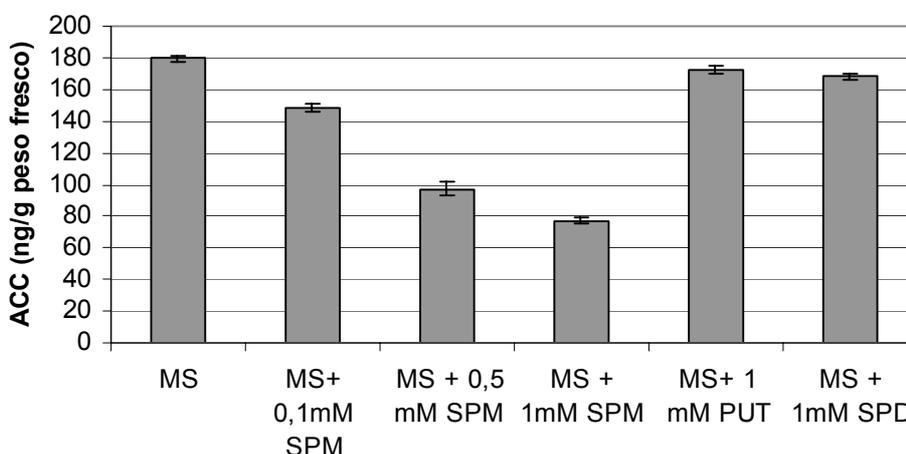
Se crecieron plantas *Colo* en placas MS que contenían diferentes concentraciones de cada una de las 3 PAs. Se observa cómo la aplicación de Spm, incluso a bajas concentraciones, provoca una disminución en los niveles de etileno (Figura 3.14).



**Figura 3.14. Efecto de la adición de PAs sobre los niveles de etileno.** Plántulas *Colo* fueron crecidas durante 5 días en placas MS suplementadas con diferentes concentraciones de cada una de las PAs, Put, Spd o Spm.

Esta disminución es dependiente de la concentración de Spm aplicada y da lugar a unos porcentajes de reducción de etileno similares a los observados en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* (Figura 3.11). La reducción en el contenido en etileno no se observa cuando se crecen las plantas en presencia de concentraciones elevadas de Put y Spd.

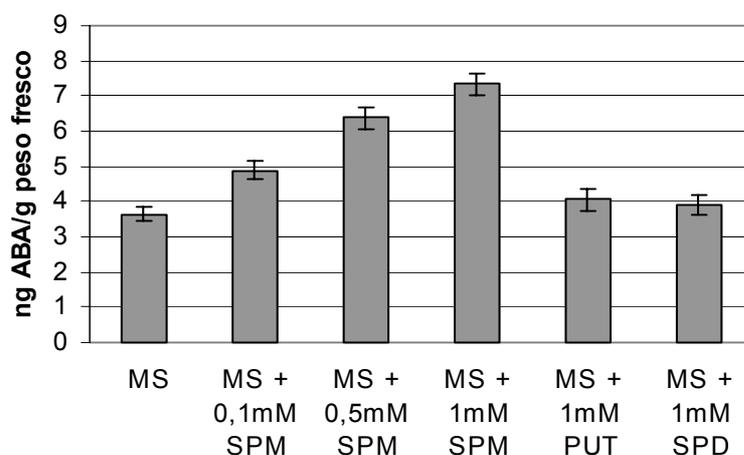
La determinación del contenido de ACC, precursor de la hormona etileno, en plántulas crecidas de igual forma presentó unos resultados similares (Figura 3.15). El crecimiento en presencia de Spm provoca también una reducción, dependiente de la concentración de Spm, en los niveles de ACC producidos (Figura 3.15). En cambio la Put y la Spd no producen una reducción apreciable en los niveles de este metabolito (Figura 3.15).



**Figura 3.15. Efecto de la adición de PAs sobre los niveles de ACC.** Plántulas del ecotipo *Colo* fueron crecidas durante 5 días en placas MS suplementadas con diferentes concentraciones de cada una de las PAs, Put, Spd y Spm.

La medida del contenido de ABA en plantas *Colo* crecidas en presencia de PAs dió como resultado el aumento del contenido en esta hormona como consecuencia del tratamiento con Spm (Figura 3.16), que correlaciona con la concentración de Spm

aplicada. Sin embargo el crecimiento en presencia de las PAs Put y Spd no provocó cambios importantes en el contenido en ABA.



**Figura 3.16. Efecto de la adición de PAs sobre los niveles de ABA.** Plántulas del ecotipo *Col0* fueron crecidas durante 5 días en placas MS suplementadas con diferentes concentraciones de cada una de las PAs, Put, Spd y Spm.

La cuantificación por medio de qRT-PCR de los niveles de RNA mensajero permitió comprobar que el crecimiento de las plantas *Col0* en presencia de Spm provoca así mismo un aumento en la expresión de los genes inducidos en las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1*, mientras que el crecimiento con Put y Spd no provoca ningún cambio en los niveles de dichos genes (Figura 3.17). Este aumento provocado por Spm se correlaciona con la concentración aplicada de esta PA. La inducción conseguida por Spm 0,5mM es similar a la observada en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* en ausencia de tratamiento. Esto confirma la relación entre el aumento de niveles de Spm, alcanzados por la sobreexpresión de *SAMDC*, y la inducción de los estos genes.

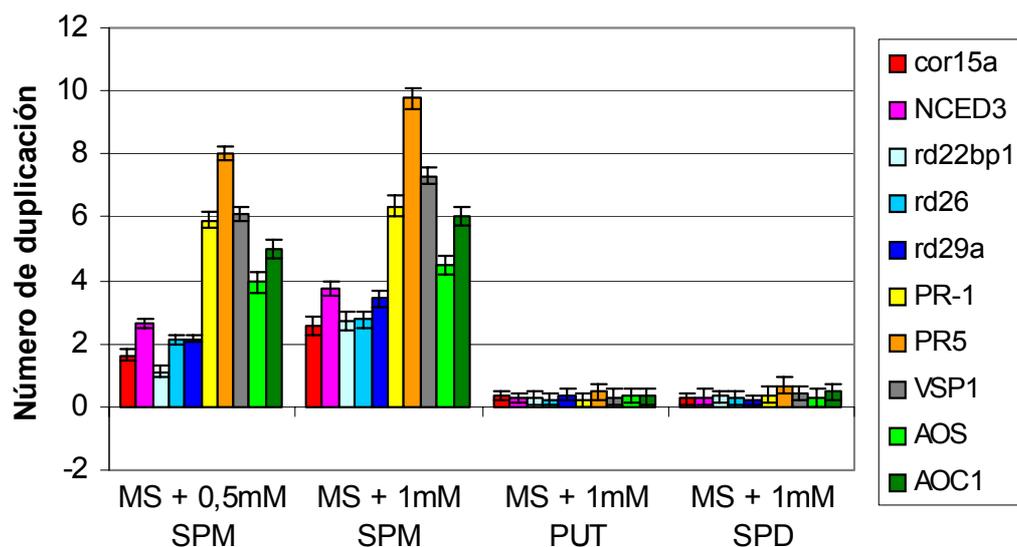
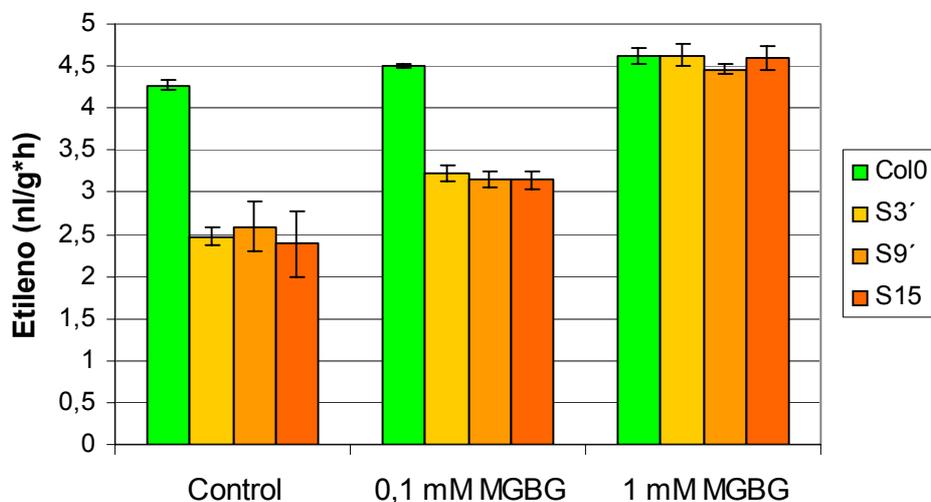


Figura 3.17. Efecto de la adición de PAs sobre los niveles de expresión de genes participantes en respuesta a estrés abiótico, biótico, señalización por etileno y síntesis de ácido jasmónico. Medida de los niveles de mRNA de cada gen por qRT-PCR en plantas crecidas en placas MS suplementadas con diferentes PAs. El número de duplicación es el  $\text{Log}_2$  de la relación entre la cantidad de mensajero del gen en concreto en cada muestra respecto de la cantidad del mismo mensajero presente en *Colo* crecida en placa MS sin adición de PAs. Las medidas se realizaron sobre plántulas de 5 días.

### 3.5.2. Análisis de los efectos de la aplicación de MGBG.

En otra serie de experimentos se estudió qué efecto tenía en las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* la presencia de MGBG en el medio de crecimiento sobre los niveles de etileno, ACC y ABA, así como en la expresión de los genes hasta ahora analizados. El MGBG es un conocido inhibidor de la actividad SAMDC de forma que la adición de este compuesto debe bloquear, cuanto menos, la síntesis de PAs. Se observó que el MGBG provoca un incremento en los niveles de etileno tanto en las plantas no transformadas como en las líneas transgénicas (Figura 3.18). Este aumento se correlaciona con la concentración de MGBG en la placa siendo mucho más acusado en las líneas transgénicas. El crecimiento en presencia de altas concentraciones del inhibidor provoca en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* una producción de etileno parecida a la presente en *Colo* en ausencia de MGBG

(Figura 3.18). Es decir, el MGBG es capaz de revertir los niveles de etileno de las líneas sobreexpresoras hasta alcanzar los de las plantas no transformadas.

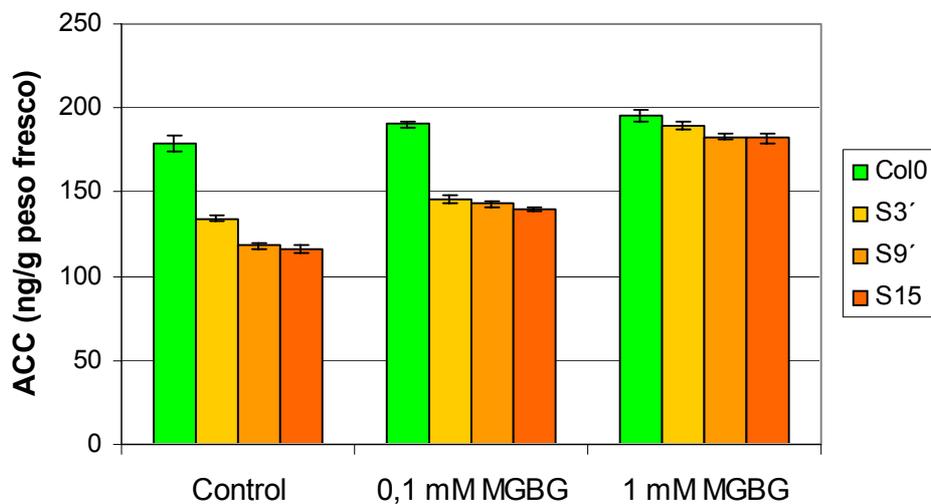


**Figura 3.18. Efecto de la presencia de MGBG sobre la producción de etileno.** Plantas *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron crecidas en placas MS suplementadas con diferentes concentraciones de MGBG. Los niveles de etileno fueron determinados en plántulas de 5 días.

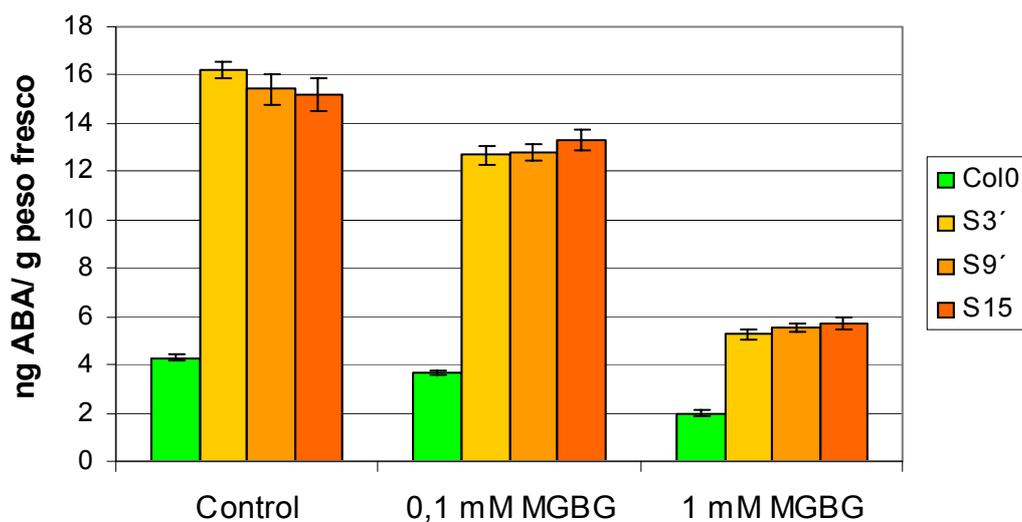
La medida del contenido en ACC condujo a un resultado análogo. El crecimiento en presencia de este inhibidor provoca un aumento en los niveles de ACC que se correlaciona con la cantidad de MGBG aplicado (Figura 3.19). Este aumento es muy poco significativo en *Col0*. Sin embargo y de igual forma que antes, con altas concentraciones de MGBG se puede conseguir en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* unos niveles de ACC similares a los presentes en *Col0* antes de ningún tratamiento (Figura 3.19).

El crecimiento en presencia de MGBG provoca una reducción en el contenido de ABA tanto en las plantas *Col0* como en las líneas transgénicas. Esta disminución es muy poco importante en *Col0*. Sin embargo en las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* la reducción es considerable y dependiente de la concentración de inhibidor usada. Al igual que en los casos anteriores el crecimiento de las plantas S3', S9' y

S15 en presencia de altas concentraciones de MGBG provoca un recuperación de los niveles de ABA hacia los niveles de las plantas control (Figura 3.20).

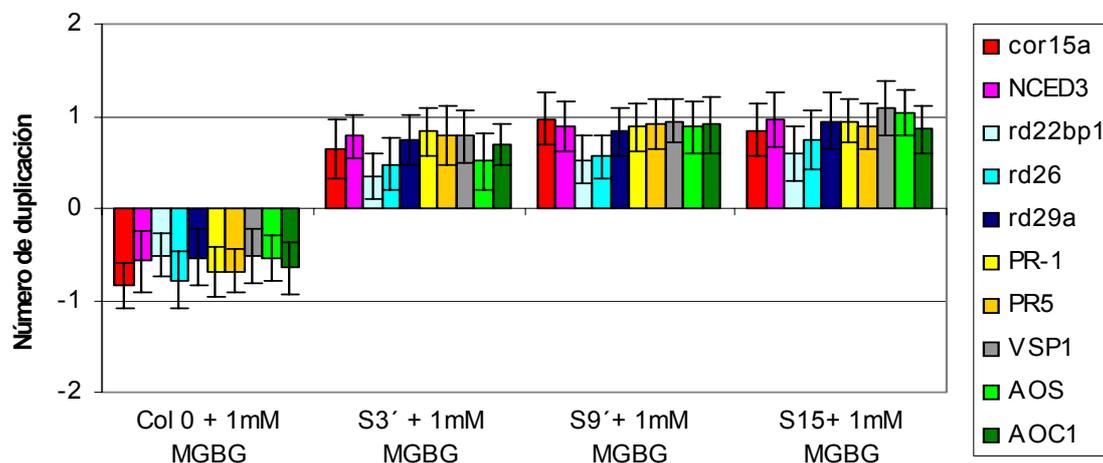


**Figura 3.19. Efecto de la presencia de MGBG sobre la producción ACC.** Plantas *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron crecidas en placas MS suplementadas con diferentes concentraciones de MGBG. Los niveles de ACC fueron determinados en plántulas de 5 días.



**Figura 3.20. Efecto de la presencia de MGBG sobre la producción de ABA.** Plantas *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron crecidas en placas MS suplementadas con diferentes concentraciones de MGBG. Los niveles de ABA fueron determinados en plántulas de 5 días.

El análisis por qRT-PCR ha permitido comprobar cómo la aplicación del inhibidor MGBG en el medio de crecimiento provoca una reducción en la expresión del conjunto de genes analizados anteriormente (Figura 3.21). De forma que en las plantas transgénicas se alcanza unos niveles de expresión similares a los presentes en las plantas *Col0* en ausencia de tratamiento.



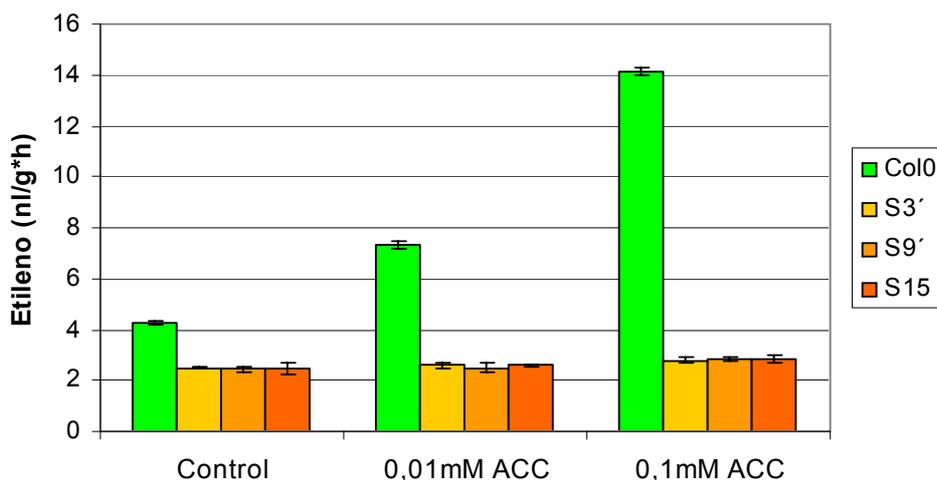
**Figura 3.21. Efecto de la presencia de MGBG en el medio de cultivo sobre los niveles de expresión de genes participantes en respuesta a estrés abiótico, biótico, señalización por etileno y síntesis ácido jasmónico.** Se determinó los niveles de mRNA de cada gen por qRT-PCR en plántulas de 5 días crecidas en placas MS suplementadas con MGBG. El número de duplicación es el  $\log_2$  de la relación entre la cantidad de mensajero del gen en concreto en cada muestra respecto de la cantidad del mismo mensajero presente en *Col0* crecidas en placa MS sin ningún tratamiento

Con estos resultados podemos concluir que el uso del inhibidor MGBG que inhibe la actividad SAMDC puede provocar en las plantas transgénicas una reversión al fenotipo de las plantas *Col0*.

### 3.6. Efecto de la modificación exógena de los niveles de etileno sobre el fenotipo observado.

Con el objetivo de estudiar la aparente relación entre el etileno y las PAs se crecieron plantas *Col0* y plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* en presencia de

distintas concentraciones de ACC, precursor del etileno. Se puede comprobar cómo el crecimiento en presencia de ACC provoca en *Col0* un aumento considerable en los niveles de etileno producidos (Figura 3.22). Este aumento es dependiente de la cantidad de ACC aplicado a las placas. Sin embargo apenas se observa este aumento en las plantas transgénicas lo que indica que la menor producción de etileno característica de las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* no se debe a una falta del precursor ACC.



**Figura 3.22.** Efecto de la presencia de ACC en el medio de cultivo sobre la producción de etileno. Plantas *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron crecidas en placas MS suplementadas con diferentes concentraciones de ACC. Los niveles de etileno fueron determinados en plántulas de 5 días.

La medida del contenido en ABA (Figura 3.23) muestra que el crecimiento en presencia de ACC no provoca en las plantas transgénicas una disminución considerable de los niveles de ABA. En cambio sí se observa esta disminución en las plantas del ecotipo *Col0*.

Por último, el crecimiento en presencia de ACC no provoca una disminución significativa de los niveles de expresión de los genes estudiados en ninguna de las líneas sobreexpresoras (Figura 3.24). Las medidas por qRT-PCR permiten comprobar la ausencia de efecto del ACC sobre la expresión de genes inducidos en las líneas sobreexpresoras.

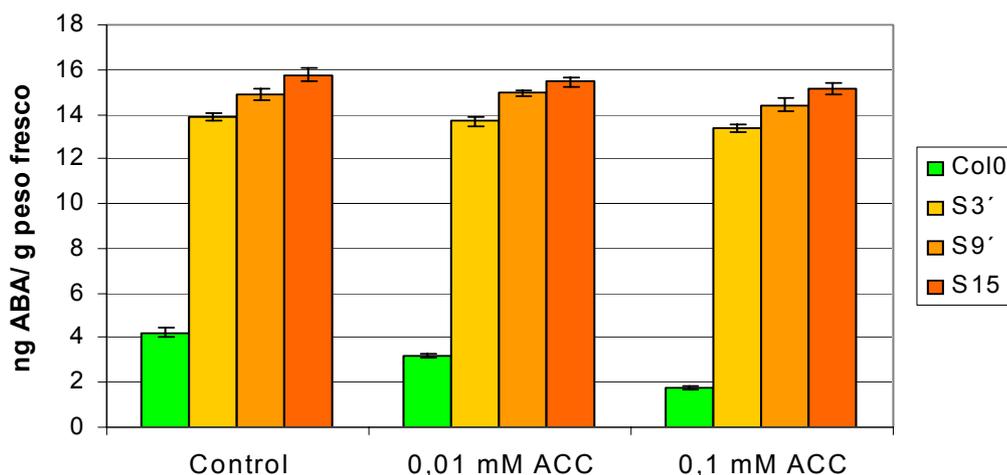


Figura 3.23. Efecto de la presencia de ACC en el medio de cultivo sobre la producción de ABA. Plantas *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron crecidas en placas MS suplementadas con diferentes concentraciones de ACC. Los niveles de ABA fueron determinados en plántulas de 5 días.

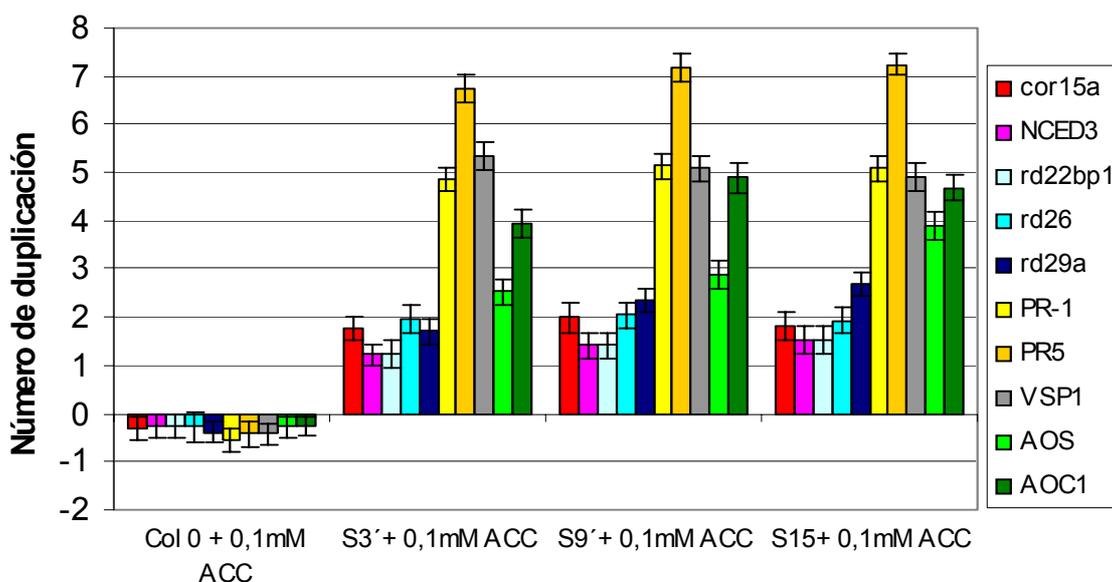


Figura 3.24. Efecto de la presencia de ACC en el medio de cultivo sobre los niveles de expresión de genes participantes en respuesta a estrés abiótico, biótico, señalización por etileno y síntesis ácido jasmónico. Se determinaron los niveles de mRNA de cada gen por qRT-PCR en plántulas de 5 días crecidas en placas MS suplementadas con ACC. El número de duplicación es el  $\log_2$  de la relación entre la cantidad de mensajero del gen en concreto en cada muestra respecto de la cantidad del mismo mensajero presente en *Col0* crecidas en placa MS sin ningún tratamiento.

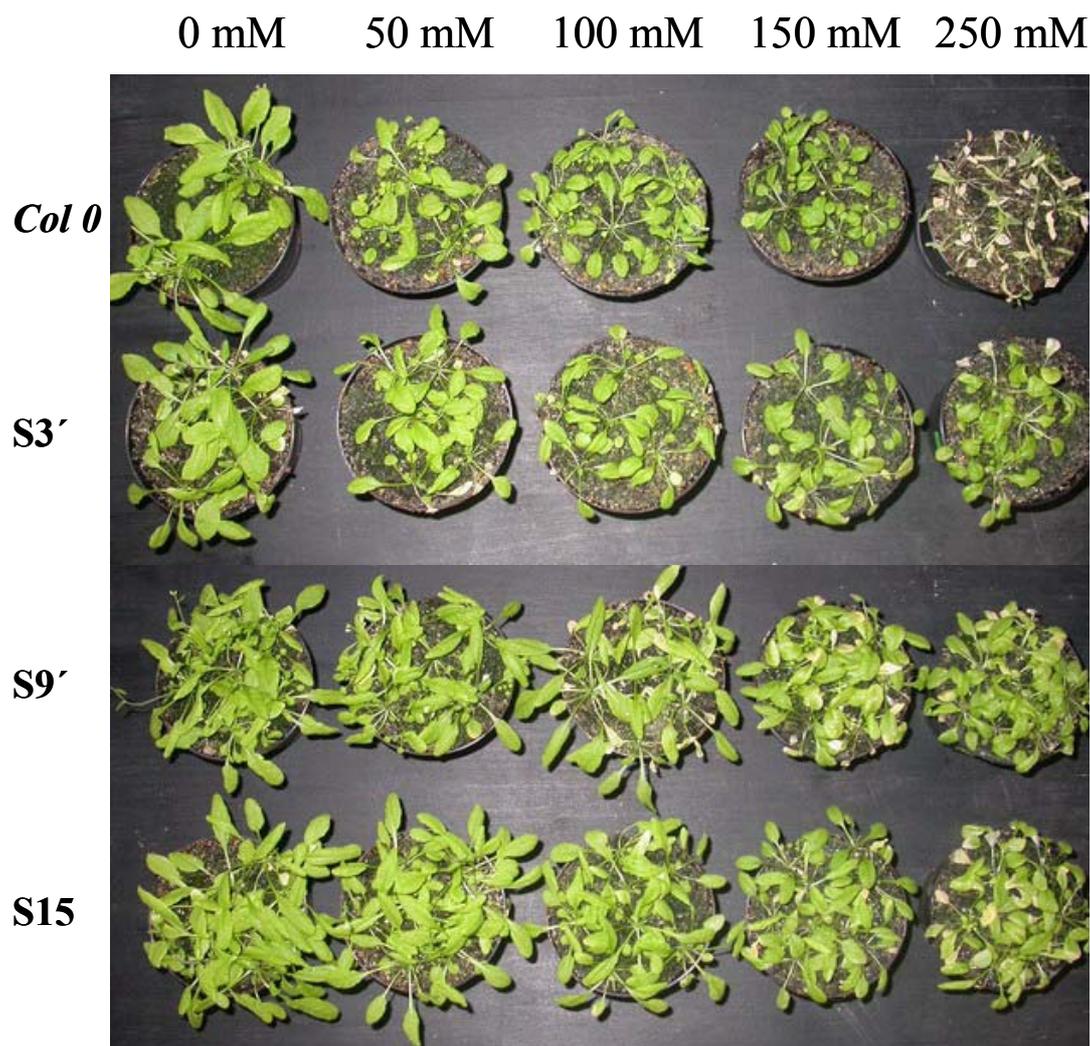
Los resultados obtenidos sugieren que el ACC y la síntesis de etileno no son causantes de los cambios en ABA ni en expresión génica observados en las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1*.

### **3.7. Estudio de la resistencia al estrés abiótico.**

Ante la inducción de la expresión de una serie de genes relacionados con la respuesta al estrés abiótico en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* se abordó el estudio de su respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico: estrés salino, estrés hídrico y estrés por ozono.

#### **3.7.1. Análisis de la resistencia al estrés salino.**

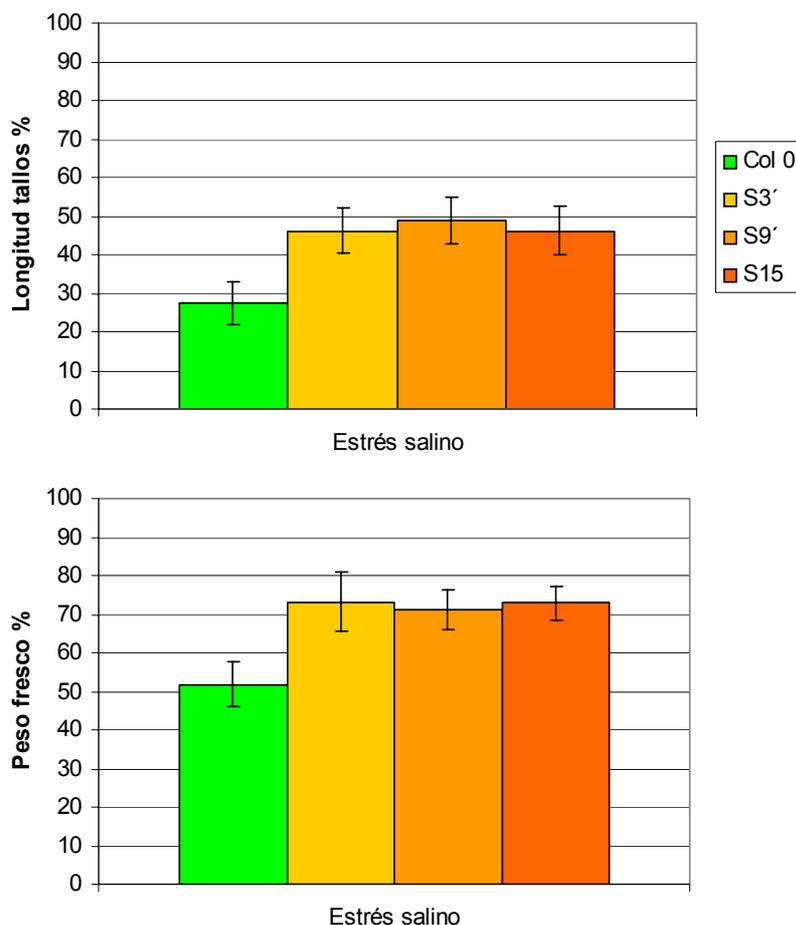
El daño visible provocado durante el estrés salino se caracteriza por una clorosis generalizada, la aparición de manchas oscuras en las hojas y el marchitamiento de la planta. Se mantuvo plantas adultas de 3 semanas sumergidas en diferentes disoluciones de NaCl, en un rango de concentración de 0 a 250 mM, durante 10 días. Se observó que las plantas transgénicas sobreexpresoras de *SAMDC1* presentan en general un daño más atenuado al compararlas con las plantas de la variedad *Col0* (Figura 3.25). Se comprobó que las lesiones aumentan de gravedad conforme aumenta la concentración de NaCl. Posteriormente se estudió la recuperación al daño provocado por un estrés por NaCl de carácter intenso y agudo; para ello plantas de 12 días de cada una de las líneas se mantuvieron durante 2 días en presencia de una disolución de NaCl 250mM y, tras un período de 12 días de recuperación, se determinó el peso fresco de la parte aérea y se midió la longitud del tallo.



**Figura 3.25.** Efectos del tratamiento con NaCl sobre plantas *Col0* y plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*. Plantas de 3 semanas del ecotipo salvaje *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* S3', S9' y S15 fueron sometidas durante 10 días a un estrés con disoluciones de distinta concentración de NaCl.

La longitud del tallo y el peso fresco de la parte aérea de la planta no son significativamente distintos entre las plantas *Col0* y las plantas transgénicas antes del estrés salino. El tratamiento con NaCl provoca en todas las líneas una reducción en el peso fresco de la parte aérea y en la longitud del tallo de la planta (Figura 3.26). En plantas *Col0* se produce una reducción del 70% en la longitud del tallo y del 50% en

el peso fresco de la parte aérea de la planta. Sin embargo, en las líneas transgénicas la reducción es del 55% para la longitud del tallo y 25% para el peso fresco (Figura 3.26).

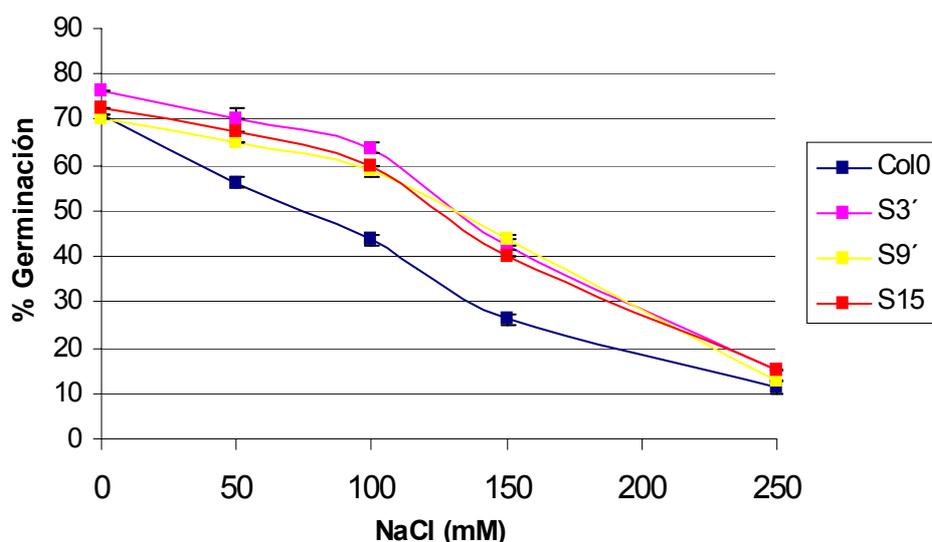


**Figura 3.26. Influencia del estrés salino en la longitud del tallo y en el peso fresco de la parte aérea planta.** Plantas de 2 semanas fueron estresadas durante 2 días con NaCl 250mM. Tras 12 días de recuperación se midió la longitud del tallo y el peso fresco de la planta. Los porcentajes se calcularon respecto del valor de la longitud del tallo y el peso fresco de cada línea antes del tratamiento.

La menor reducción en peso y tamaño de las líneas transgénicas sugiere una mayor tolerancia al estrés salino.

La aparente tolerancia de las líneas transgénicas al estrés salino se comprobó también mediante estudios de germinación en placa. Se sembraron semillas de la

variedad salvaje *Col0* y de las tres líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* en placas con medio MS a las que se añadió NaCl a diferentes concentraciones. Diariamente se contó el número de semillas que habían desarrollado cotiledones hasta que el número de semillas que germinadas se estabilizaba. Los resultados se expresan como el porcentaje de semillas germinadas respecto al número total de semillas sembradas en cada placa.

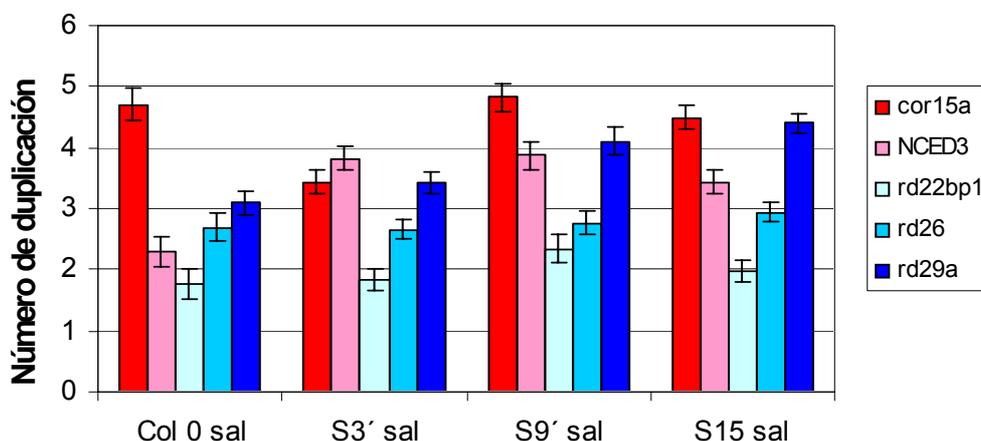


**Figura 3.27. Efecto de la concentración de NaCl sobre la germinación.** 50 semillas de cada línea fueron sembradas en placas de medio MS suplementadas con la concentración de NaCl indicada. El número de semillas que habían desarrollado cotiledones se contó a los 8 días después de la vernalización y se calculó el % de germinación respecto del número de semillas sembradas.

El crecimiento en presencia de NaCl reduce significativamente el porcentaje de semillas que germinan (Figura 3.27). Esta reducción respecto al control en ausencia de sal es más importante cuanto mayor es la concentración de NaCl en las placas. Se puede comprobar que esta reducción no es tan acusada en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* en las que la proporción de semillas germinadas en el último día de recuento, es en torno a un 15% mayor que la correspondiente a *Col0* en plantas crecidas entre 50-150 mM NaCl (Figura 3.27).

En las plantas *Col0* la capacidad de germinación se ve disminuida de una forma gradual conforme aumenta la intensidad del estrés salino, muy pocas semillas llegan a germinar en presencia de 250mM NaCl. Por el contrario, las líneas sobreexpresoras presentan un descenso importante en su capacidad de germinación solamente a partir de 150 mM NaCl. Sin embargo, a concentraciones mayores de NaCl estas diferencias disminuyen de forma que en el caso de 250mM apenas hay diferencias (Figura 3.27).

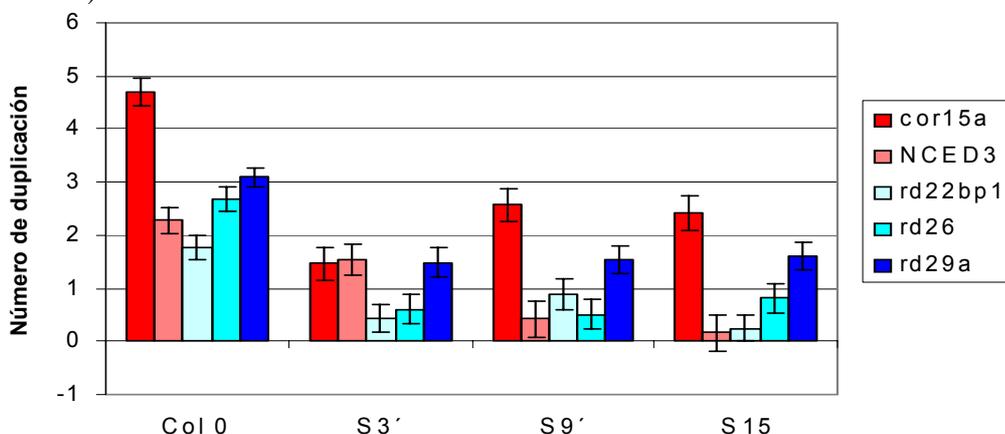
La mayor resistencia de las plantas transgénicas al estrés salino podría estar relacionada con los elevados niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés abiótico presentes en ellas. Para comprobar su participación en la respuesta a estrés salino se cuantificaron por qRT-PCR los niveles de los genes estudiados anteriormente (Figura 3.28).



**Figura 3.28. Efecto del estrés salino sobre la expresión de genes de respuesta al estrés abiótico.** Los niveles de mRNA se determinaron por qRT-PCR después de un estrés salino durante 6h con 250 mM de NaCl sobre plantas de 4 semanas. Los valores están normalizados respecto al valor en la muestra *Col0* antes de tratamiento.

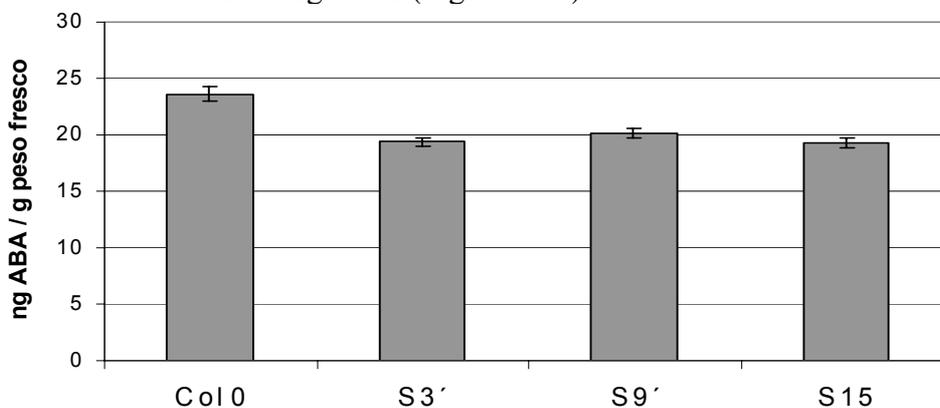
Hay que destacar que después del estrés salino, las diferencias en los niveles de expresión de estos genes entre las plantas *Col0* y las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* se reducen considerablemente, siendo muy similares entre todas las líneas. Posteriormente, se compararon en cada línea los niveles de expresión de estos genes

después del estrés con los presentes en la misma línea antes del tratamiento. Se puede comprobar que el aumento en la expresión de estos genes respecto a la situación previa al estrés es mucho mayor en las plantas *Col0* que en las plantas transgénicas (Figura 3.29).



**Figura 3.29. Efecto del estrés salino sobre la expresión de genes de respuesta al estrés abiótico.** Los niveles de mRNA se determinaron por qRT-PCR después de un estrés salino durante 6h con 250 mM de NaCl sobre plantas de 4 semanas. Para cada una de las líneas los valores de expresión de cada gen están normalizados respecto al valor presente en la misma línea antes de tratamiento.

El aumento en el nivel de expresión de los genes de respuesta al estrés salino se correlaciona con un aumento en los niveles de ABA. Aumento, que es más acusado en *Col0*, de forma que, después del tratamiento sus niveles son incluso superiores a los presentes en las líneas transgénicas (Figura 3.30).



**Figura 3.30. Efecto del estrés salino sobre el contenido en ABA.** Plantas *Col0* y de las tres líneas transgénicas de 4 semanas fueron tratadas durante 6 horas con 250mM de NaCl.

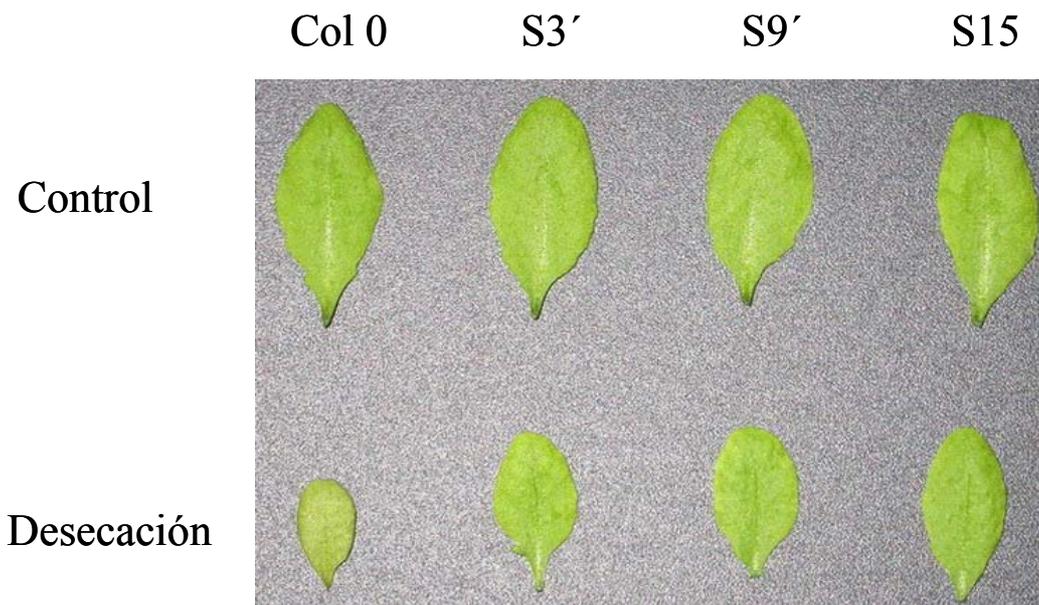
### **3.7.2. Análisis de la resistencia al estrés por desecación.**

De los genes cuya expresión se encuentra inducida en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* muchos de ellos participan asimismo en la respuesta de la planta al estrés por desecación. Este tipo de estrés está muy relacionado con el estrés salino de forma que existe un solapamiento entre las respuestas a ambos tipos de estreses. En consecuencia, se estudió el comportamiento de las plantas transgénicas frente al estrés por déficit de agua. El déficit en el contenido de agua provoca en las plantas una pérdida de turgencia así como clorosis en las hojas. El estudio se llevó a cabo retirando totalmente el aporte de agua a las plantas durante varios días y comparándose el daño visible en las plantas *Col0* y en las líneas transgénicas. Se comprobó que los daños provocados por el déficit de agua son mucho más importantes en las plantas *Col0* que en las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1*. Así, después del mismo tiempo en condiciones de privación de agua, las plantas *Col0* presentaron una clorosis mucho más desarrollada que las líneas transgénicas (Figura 3.31).

El estrés por déficit hídrico se manifiesta entre otros factores por la reducción del área de las hojas de la roseta de la planta. Esta reducción, provocada por el déficit de agua, es considerablemente más importante en las plantas *Col0*. De igual forma, la disminución en el contenido de clorofila, que se manifiesta por la aparición de color amarillo, es mayor en el ecotipo salvaje (Figura 3.32).

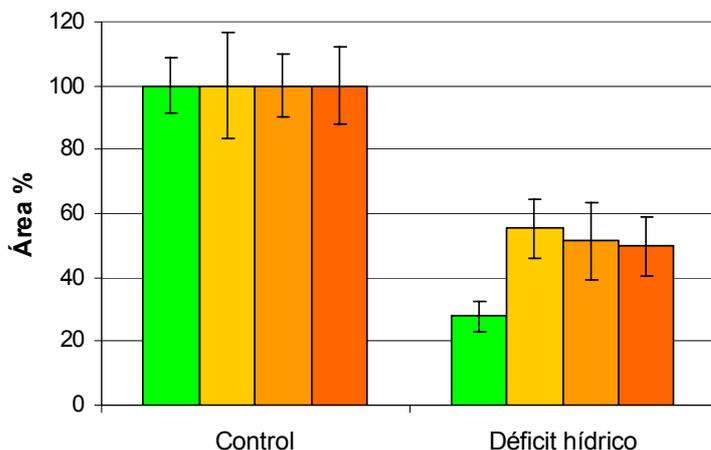


**Figura 3.31.** Efectos del estrés por desecación en plantas *Col0* y en plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*. Plantas de 3 semanas del ecotipo salvaje *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron sometidas durante 10 días a un estrés por déficit de agua.



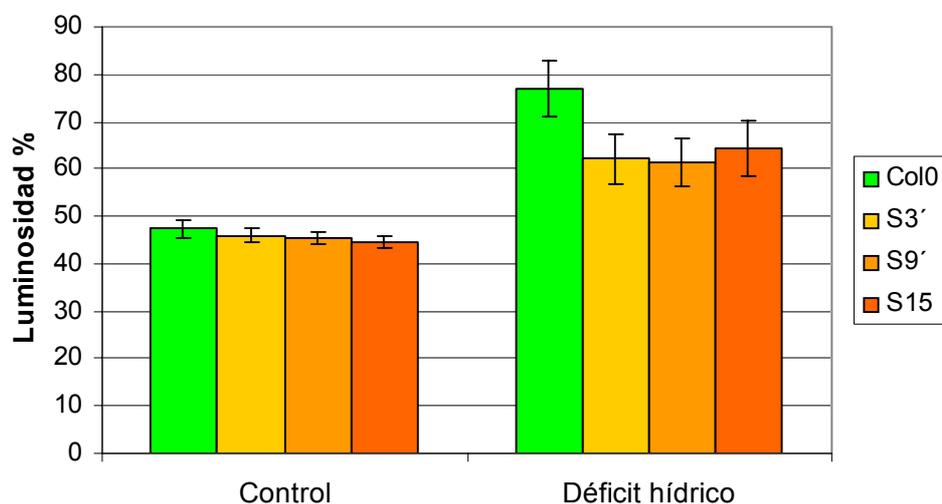
**Figura 3.32. Reducción del tamaño y amarilleamiento de las hojas de la roseta debidos a desecación.** Plantas de 3 semanas del ecotipo *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron mantenidas durante 10 días en condición de privación de agua.

La medida del área de las hojas (Figura 3.33) demuestra la menor sensibilidad de las plantas transgénicas al estrés por desecación. Se observa que la reducción del área de las hojas de *Col0* es del orden del 70% mientras que en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* esta reducción es del orden del 50%.



**Figura 3.33. Medidas del área de las hojas en plantas sometidas a estrés por déficit hídrico.** Plantas de 3 semanas del ecotipo *Col0* (en verde) y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron mantenidas durante 10 días en condición de privación de agua.

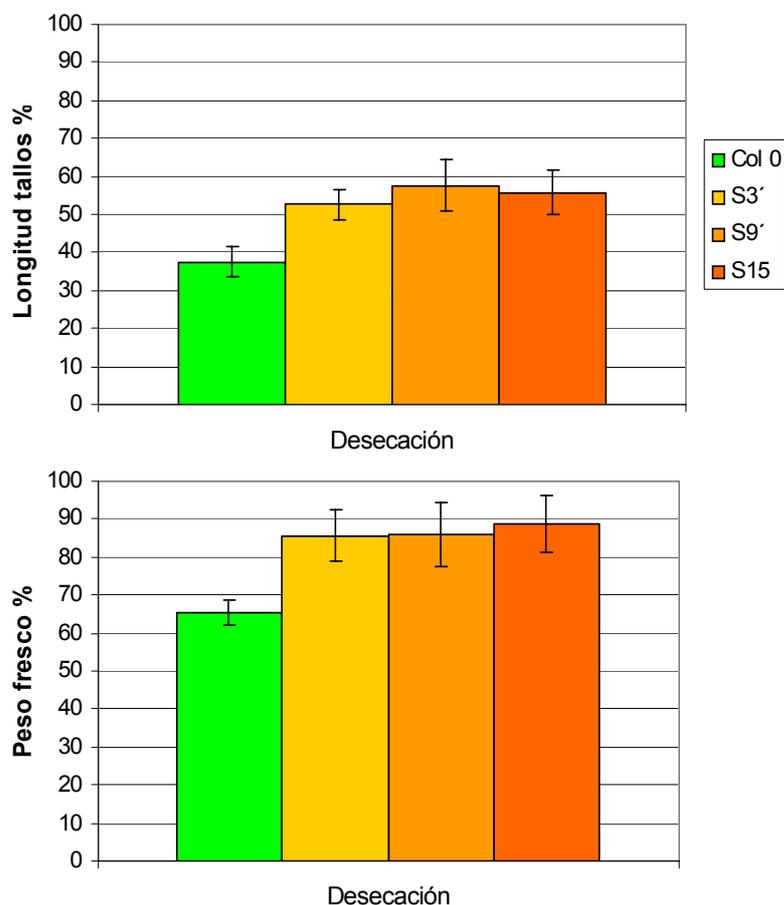
La clorosis provocada por el déficit de agua se cuantificó mediante un programa de análisis de imagen que permitió separar los colores básicos de fotos de hojas de plantas. Puesto que las hojas son inicialmente verdes y gracias a una transformación previa a tonos de gris, el amarilleamiento se puede seguir a través del aumento de luminosidad. De esta forma las zonas más amarillas aparecerán con tonos de gris muy claros mientras que el color verde aparece como zonas de gris oscuro. La cuantificación de la luminosidad así medida en hojas de todas las líneas permite estimar los efectos de la desecación. Se observó que el déficit por agua provoca en todas las plantas un aumento de luminosidad que se corresponde con la clorosis de la hoja (Figura 3.34). Se observa que este aumento de la luminosidad es significativamente menor en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* en las que la clorosis parece ser menos severa.



**Figura 3.34. Medidas de luminosidad en plantas sometidas a estrés por déficit hídrico.** Plantas de 3 semanas del ecotipo *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* se mantuvieron en condiciones de privación de agua durante 10 días. La clorosis fue medida a través de la luminosidad en las hojas de la roseta de forma que una mayor luminosidad indica mayor clorosis.

Al igual que en el estrés salino, también se realizó un estudio de la recuperación al estrés por desecación. La medida del peso fresco de la parte aérea y la longitud del tallo permitió comprobar la mayor capacidad de recuperación de las

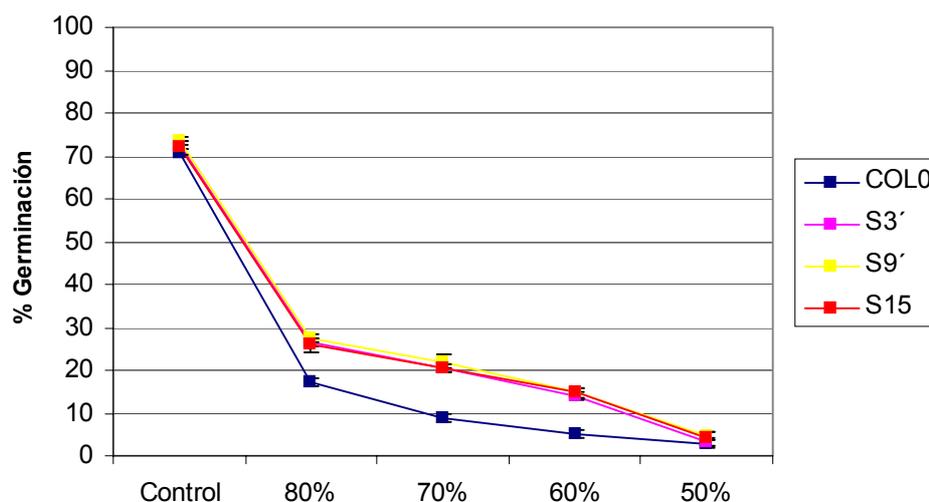
plantas transgénicas. Se puede comprobar como el déficit en agua durante 2 días provoca en *Col0* una disminución de la longitud del tallo de un 65% así como una reducción del peso fresco de un 35% (Figura 3.35). En cambio en las plantas transgénicas esta reducción es inferior al 45% en la longitud del tallo y de un 15% en el peso fresco de la parte aérea.



**Figura 3.35. Influencia del estrés por desecación en la longitud del tallo y en el peso fresco de la parte aérea de la planta.** Plantas de 2 semanas fueron sometidas a un estrés por desecación de 2 días. Tras 12 días de recuperación se midió la longitud del tallo y el peso fresco de la parte aérea de la planta. Los porcentajes se calcularon respecto del valor de la longitud del tallo y el peso fresco de cada línea antes del tratamiento.

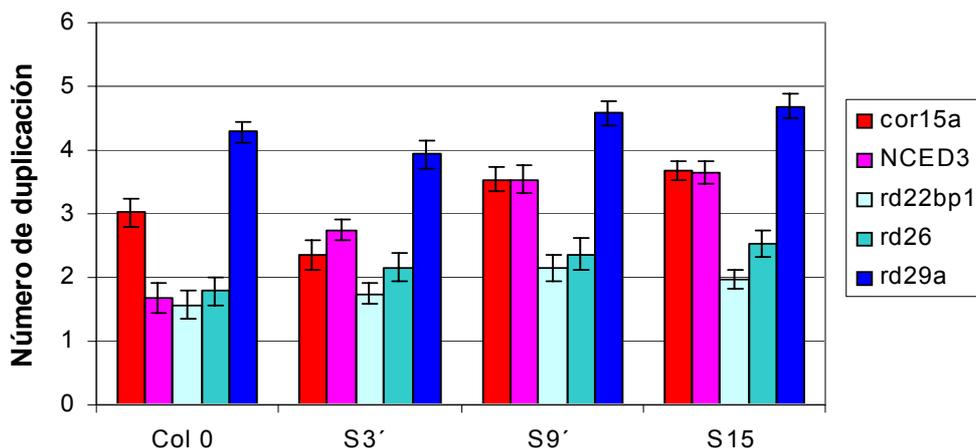
Así mismo, se comprobó el efecto de la privación de agua sobre la capacidad de germinación de las plantas; se sembró en placa semillas de plantas *Col0* y de las

tres líneas sobreexpresoras. El crecimiento de estas semillas en distintos porcentajes de humedad relativa resultó en una reducción en el porcentaje de semillas que desarrollaron cotiledones (Figura 3.36). Esta reducción es más importante cuanto menor es la humedad ambiental de forma que a 50% de humedad relativa apenas hay plantas capaces de desarrollar cotiledones. Se puede observar que el número de semillas que habían desarrollado cotiledones de las 3 líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* es siempre significativamente superior que el de *Col0* en las mismas condiciones de humedad.



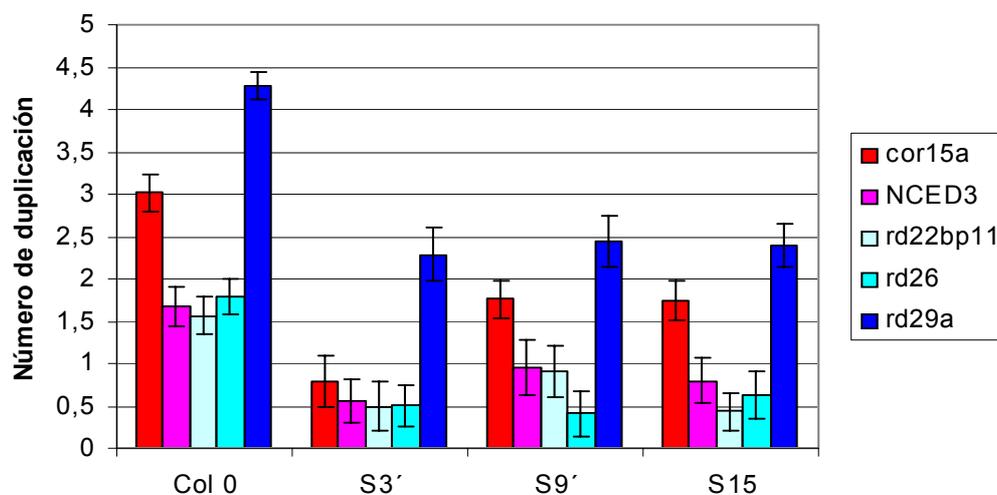
**Figura 3.36. Germinación durante el estrés hídrico.** 50 semillas de cada línea fueron sembradas en placas en medio MS que después de la vernalización se abrieron en un incubador al porcentaje de humedad indicado. El control se realizó con placas que se mantuvieron cerradas. El número de semillas que habían desarrollado cotiledones se contó a los 8 días después de la vernalización y se calculó el % de germinación respecto al número total de semillas sembradas.

De igual forma que en el apartado anterior, se analizó los niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés abiótico durante un estrés por desecación de carácter corto e intenso. La medida por qRT-PCR mostró una inducción de los niveles de expresión de estos genes como consecuencia de la desecación (Figura 3.37). Posteriormente al estrés, los niveles de estos mensajeros respecto a *Col0* son muy similares en todas las líneas (Figura 3.37).



**Figura 3.37. Efecto del estrés por desecación sobre la expresión de genes de respuesta al estrés abiótico.** Los niveles de mRNA se determinaron por qRT-PCR después de un estrés por desecación durante 10h sobre plantas de 4 semanas. Los valores están normalizados respecto al valor en la muestra *Col0* antes de tratamiento.

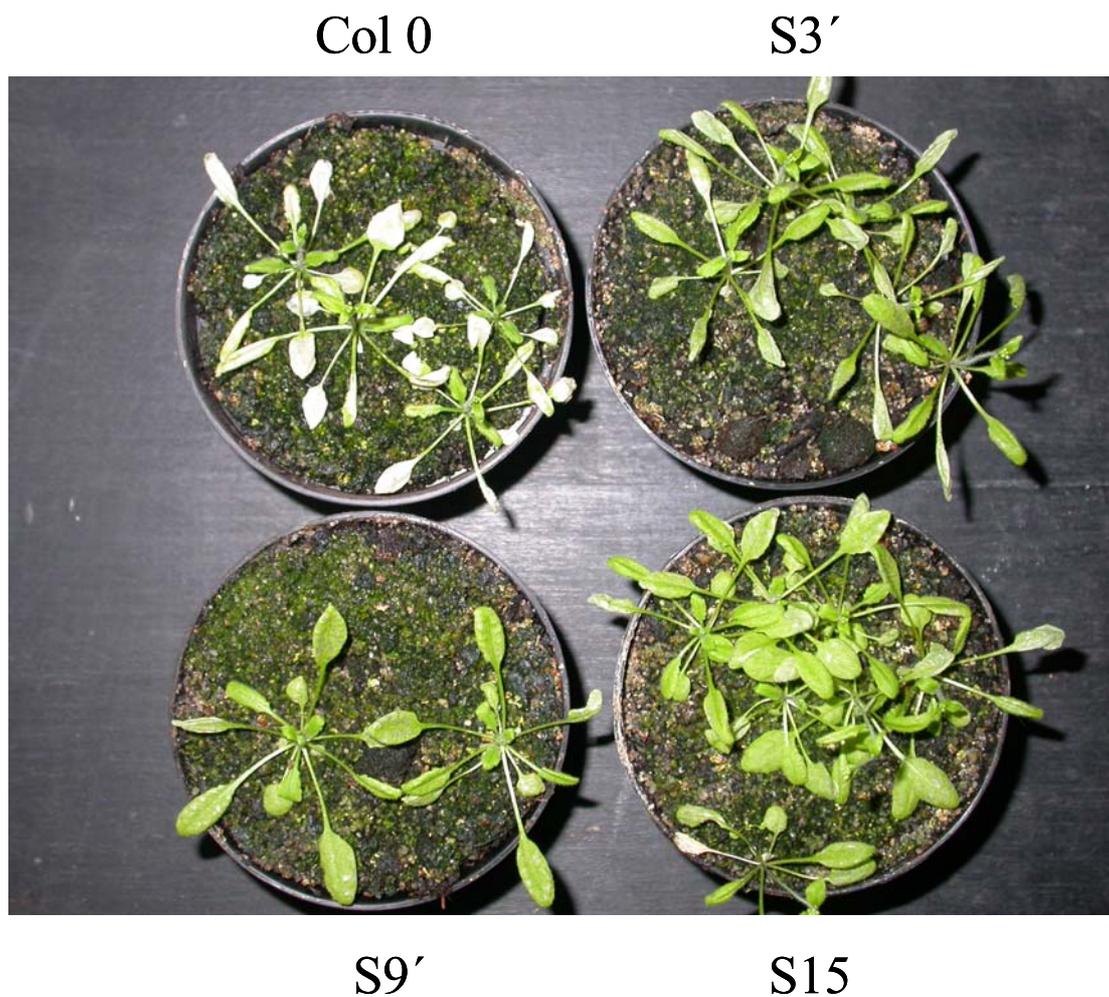
El aumento en la expresión de estos genes es mucho más importante en las plantas *Col0* que en las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1*. Esto se observa con más claridad en la figura 3.38 donde para cada línea la normalización no se realiza frente a *Col0* sino frente al nivel de expresión previo al estrés en la misma la línea.



**Figura 3.38. Efecto del estrés por desecación sobre la expresión de genes de respuesta al estrés abiótico.** Los niveles de mRNA se determinaron por qRT-PCR después de un estrés por desecación durante 10h sobre plantas de 4 semanas. Para cada una de las líneas los valores de expresión de cada gen están normalizados respecto al valor presente en la misma línea antes de tratamiento

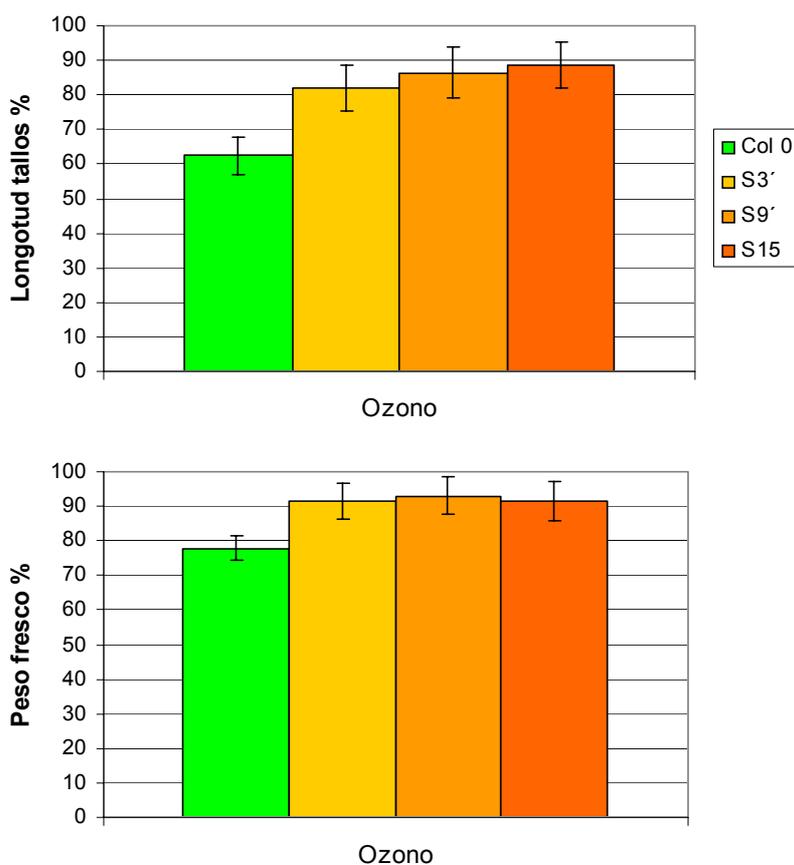
### 3.7.3. Análisis de la resistencia al estrés por ozono.

El estrés oxidativo provocado por ozono provoca inicialmente la aparición de manchas oscuras en las hojas, luego clorosis y marchitamiento. El tratamiento con 250 ppb de las plantas durante 6 días originó la aparición de estos síntomas en todas las plantas. Sin embargo la intensidad del daño era mucho mayor en las plantas *Col0* (Figura 3.39).



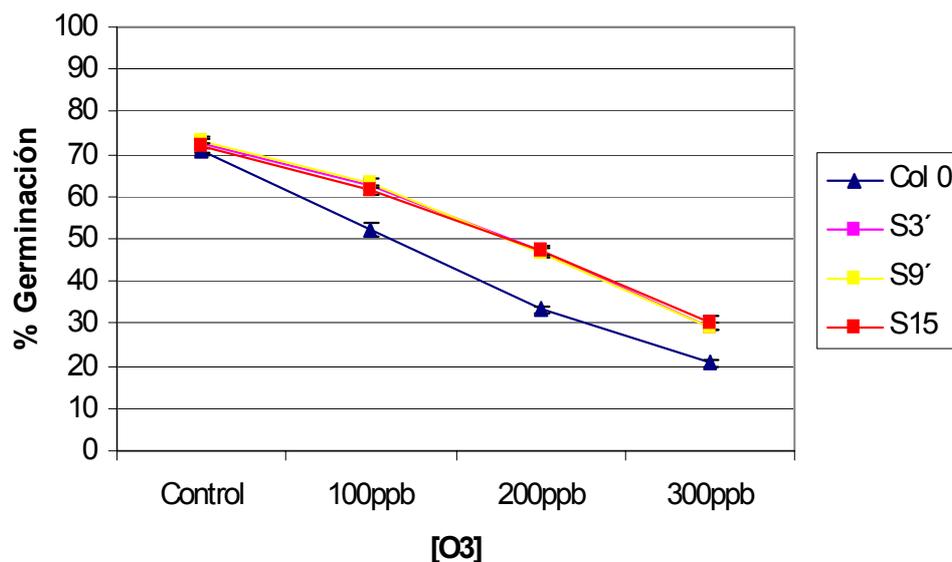
**Figura 3.39.** Efectos del tratamiento con ozono en plantas *Col0* y en plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*. Plantas de 3 semanas del ecotipo salvaje *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron tratadas con 250 ppb de ozono durante 6 días.

La resistencia de las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* se comprobó mediante la medida de la longitud del tallo y el peso fresco de la parte aérea de la planta después de un tratamiento con 250 ppb de ozono durante 2 días y 12 días de recuperación. La figura 3.40 recoge los datos de estas medidas para todas las líneas estudiadas. Se comprueba que las plantas *Col0* presentan una reducción de la longitud del tallo de un 38% y del 22% en el peso fresco. En cambio, esta disminución en las plantas transgénicas es de un 17% en la longitud del tallo y de un 8% en el peso fresco de la parte aérea.



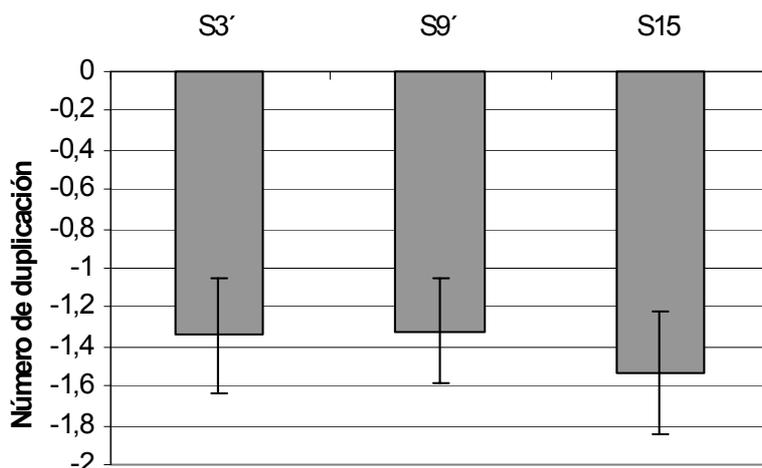
**Figura 3.40. Influencia del estrés por ozono en la longitud del tallo y en el peso fresco de la parte aérea de la planta.** Plantas de 2 semanas fueron expuestas a una concentración de 250 ppb de ozono durante 2 días. Tras 12 días de recuperación se midió la longitud del tallo y el peso fresco de la parte aérea de la planta. Los porcentajes se calcularon respecto del valor de la longitud del tallo y el peso fresco de cada línea antes del tratamiento.

Posteriormente se realizó un experimento de germinación en presencia de ozono de semillas de plantas *Col0* y de las líneas S3', S9' y S15. En la figura 3.41 se observa que el ozono provoca una disminución considerable en el número de semillas germinadas de todas las líneas. Esta disminución en el porcentaje de semillas germinadas es más importante conforme aumenta la concentración del ozono aplicado. Se observa además que esta reducción es más evidente en el ecotipo *Col0* que en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*.



**Figura 3.41. Germinación durante estrés por ozono.** 50 semillas de cada línea fueron sembradas en macetas, después de vernalización, fueron sometidas a un estrés por ozono continuo de cada una de las concentraciones indicadas. El número de semillas que habían germinado se contó a los 8 días después de la vernalización y se calculó el % de germinación respecto del número total de semillas germinadas.

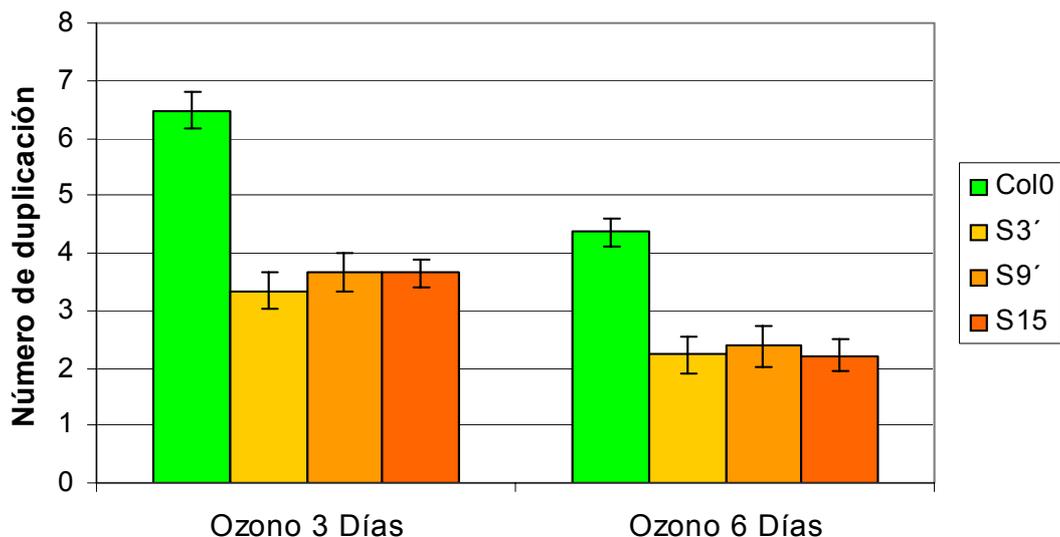
Se realizó la medida por qRT-PCR de los niveles del mensajero del gen *GST6* (Glutación S- transferasa 6), considerado un indicador del estado oxidativo general de la planta. Se observó que los niveles de expresión de este gen en las líneas transgénicas son claramente inferiores a los de las plantas *Col0* (Figura 3.42).



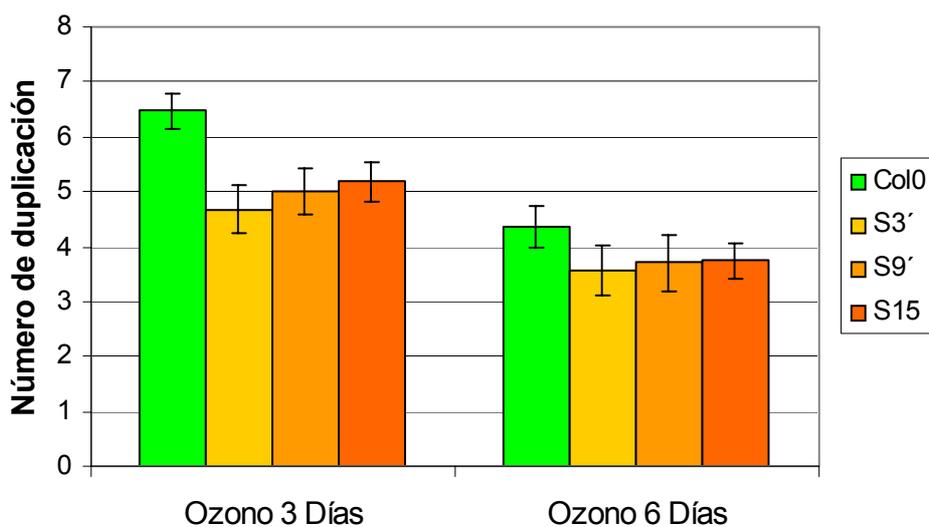
**Figura 3.42. Niveles de expresión de *GST6* en plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*.** Medida por qRT-PCR de los niveles de mensajero de *GST6* en plantas de 4 semanas de las 3 líneas sobreexpresoras de *SAMDC1*. El número de duplicación es el  $\text{Log}_2$  de la relación entre la cantidad de mensajero del gen en concreto en cada muestra respecto de la cantidad del mismo mensajero presente en *Col0*.

Se comprobó que la exposición al ozono provoca la inducción de la expresión de *GST6* en todas las líneas analizadas (Figura 3.43) lo que confirma el daño de tipo oxidativo que este agente provoca. También se pudo observar que los niveles de expresión de este gen tienden a recuperar su expresión inicial al sexto día de tratamiento sugiriendo una adaptación por parte de la planta al estrés. La expresión de *GST6* fue siempre mayor en las plantas *Col0* que en las líneas transgénicas.

El aumento en la expresión de *GST6* causado por la exposición a ozono es más importante en las plantas *Col0* que en las líneas transgénicas lo que sugiere un mayor daño en estas plantas (Figura 3.44).

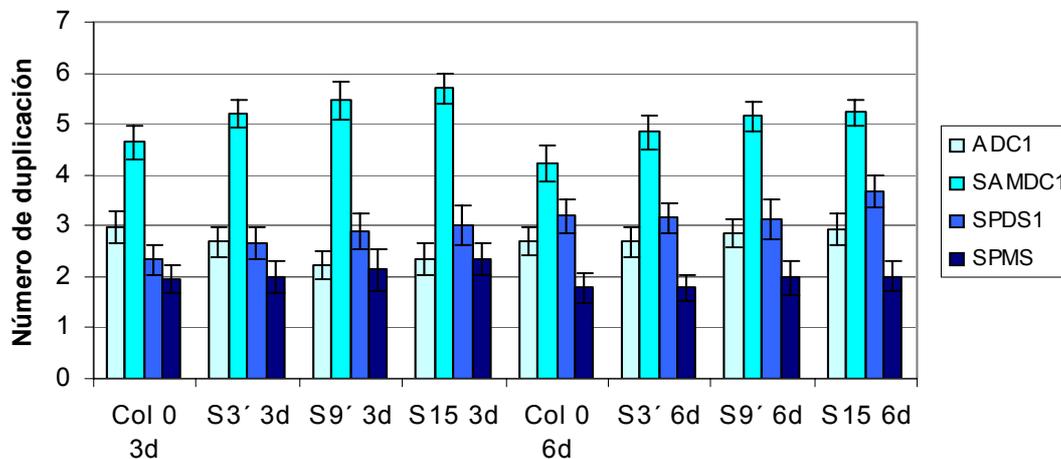


**Figura 3.43. Expresión de *GST6* en plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* de 4 semanas después de un estrés por ozono.** Medidas de cantidades de mensajero de cada gen por qRT-PCR en plantas sometidas a un tratamiento diario de 6h con 100 ppb de ozono durante 3 días (3d) o durante 6 días (6d). Los niveles de expresión están referidos a los niveles presentes en *Col0* antes de tratamiento.



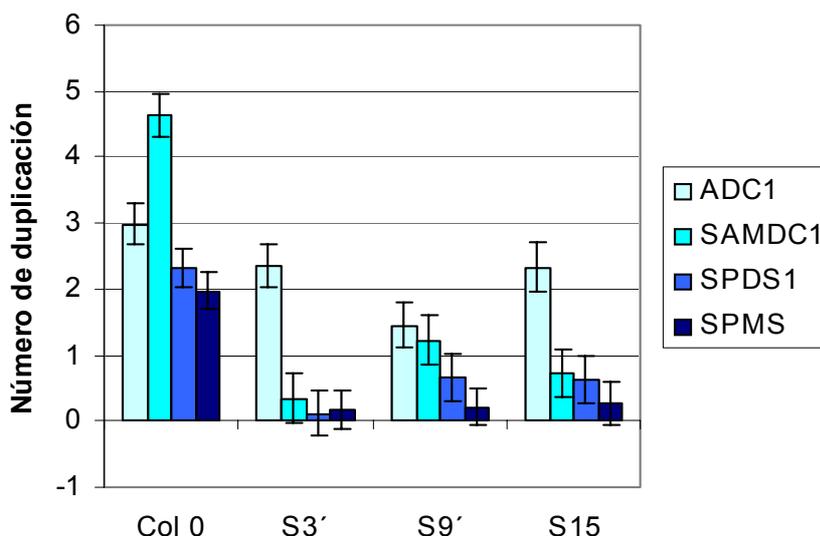
**Figura 3.44. Aumento relativo de la expresión de *GST6* durante estrés por ozono.** Niveles de expresión de *GST6* medidos por qPCR después de un estrés por 100 ppb de ozono durante 3 días. El número de duplicación es el  $\log_2$  de la relación entre la cantidad de mensajero presente después del estrés por ozono respecto de la presente antes de tratamiento en la misma línea.

Dado que se ha sugerido la participación de las PAs en la respuesta al estrés por ozono se sometieron plantas de todas las líneas a un estrés con 100 ppb de ozono, 6h al día, durante 6 días. El tratamiento con ozono provoca un aumento en la expresión de los genes de síntesis de PAs (Figura 3.45).



**Figura 3.45. Expresión de genes de síntesis de poliaminas en plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* de 4 semanas después de un estrés por ozono.** Se determinó por qRT-PCR la cantidad de los mRNA de los genes *ADC1*, *SAMDC1*, *SPDS1*, *SPMS* tras tratar plantas de 4 semanas con 100 ppb de ozono 6h al día durante 3 días (3d) o durante 6 días (6d). Los niveles de expresión están referidos a los niveles presentes en *Col0* antes del tratamiento.

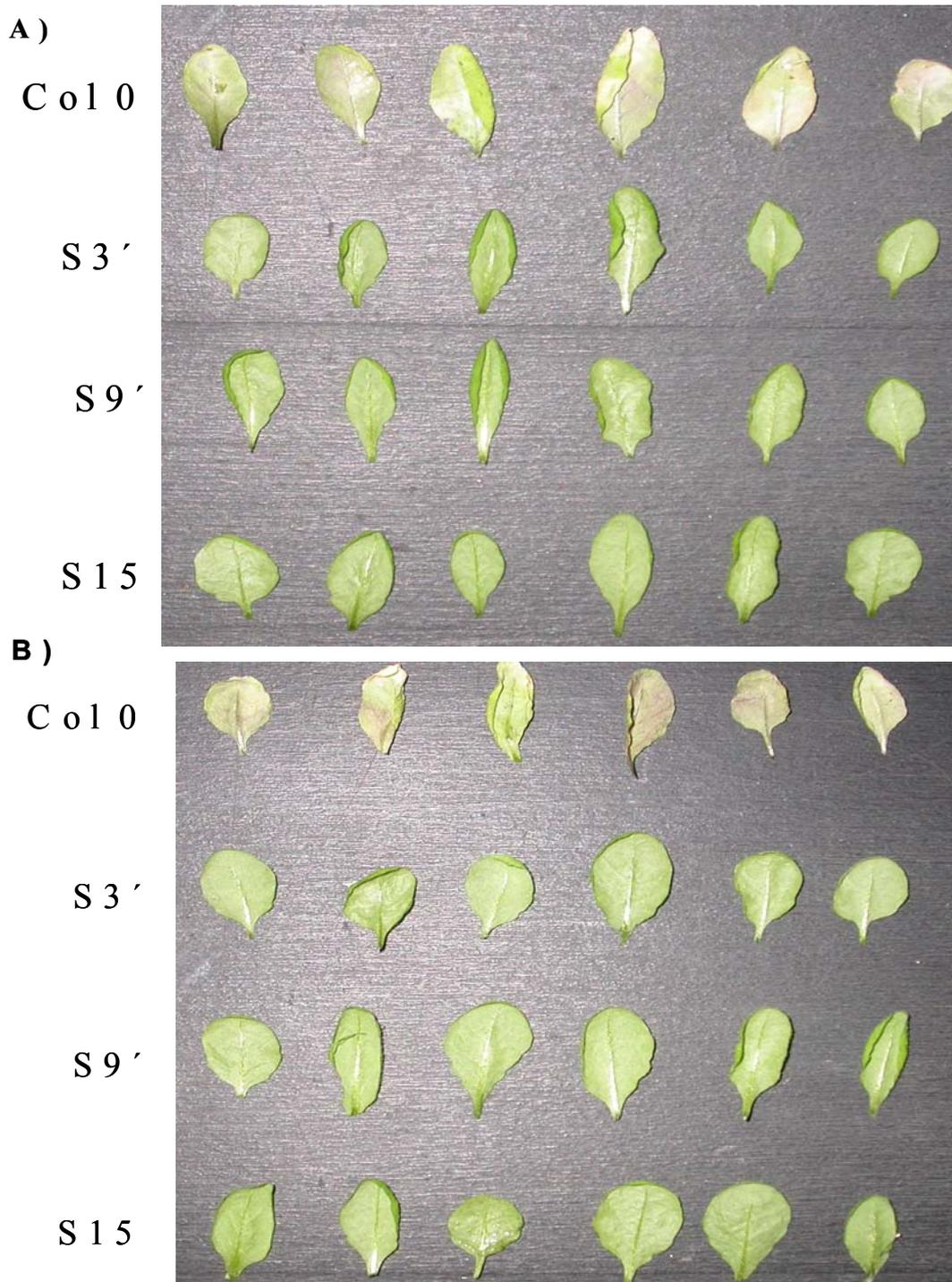
Se puede comprobar que, después del tratamiento crónico con ozono, los niveles de expresión de los genes de síntesis de PAs son muy similares en todas las plantas. El aumento experimentado por *Col0* en los niveles de expresión de estos genes fue mucho mayor que en las plantas transgénicas las cuales ya presentaban unos niveles elevados de los mismos antes del tratamiento (Figura 3.46).



**Figura 3.46. Aumento relativo de la expresión de genes de síntesis de poliaminas durante estrés por ozono.** Se determinó por qRT-PCR la cantidad de los mRNA de los genes *ADC1*, *SAMDC1*, *SPDS1*, *SPMS* tras tratar plantas de 4 semanas con 100 ppb de ozono 6h al día durante 3 días. El número de duplicación es el  $\log_2$  de la relación entre la cantidad de mensajero presente después del estrés por ozono respecto de la presente antes del tratamiento.

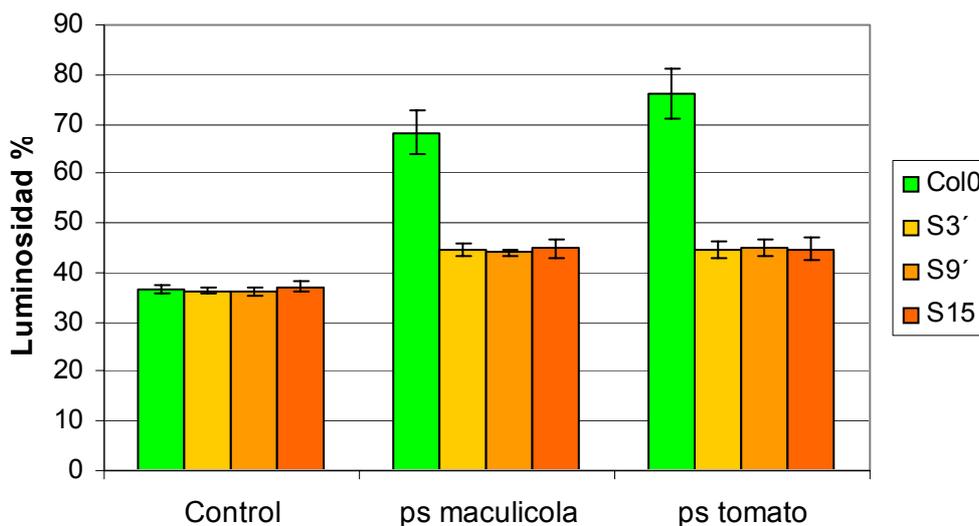
### 3.8. Estudio de la resistencia al estrés biótico.

El mayor nivel de expresión de genes que codifican proteínas PR y otras proteínas de defensa observado en las micromatrices de DNA, sugiere una mayor resistencia de la planta frente a la infección por patógenos. Esta posibilidad se analizó infectando plantas de *Col0*, así como de las líneas transgénicas con las bacterias *Pseudomonas syringae maculicola* ES4326 y *Pseudomonas syringae tomato* DC3000. Ambos patógenos infectan *Arabidopsis* provocando en las hojas una clorosis inicial seguida de la aparición de manchas oscuras. La infiltración a vacío de estos 2 patógenos en las hojas produce en las plantas *Col0* un daño más severo que en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* (Figura 3.47).



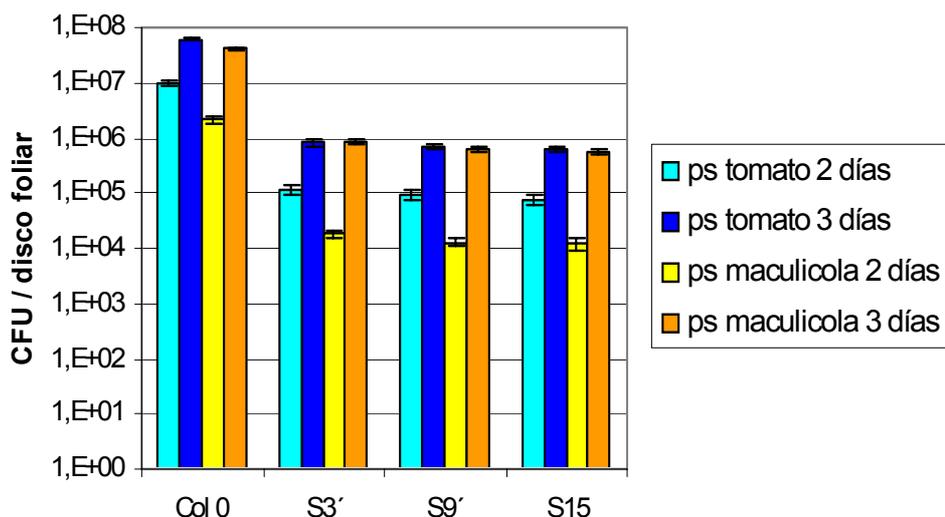
**Figura 3.47. Efectos de la infección con *Pseudomonas* en plantas de *Arabidopsis* de 4 semanas.** Hojas de roseta de plantas del ecotipo *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron infectadas durante 3 días con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 (A) o con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (B).

La clorosis inicial que presentan las hojas infectadas con estas bacterias se cuantificó mediante el análisis de la luminosidad (Figura 3.48). Se comprobó que la infección con cualquiera de ellos provoca un aumento de la luminosidad que se correlaciona con el amarilleamiento de la hoja. Este aumento de luminosidad es más importante en las hojas de plantas *Col0* que en las de plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* (Figura 3.48) lo que sugiere un menor desarrollo de los síntomas en las plantas transgénicas a la infección por estos patógenos.



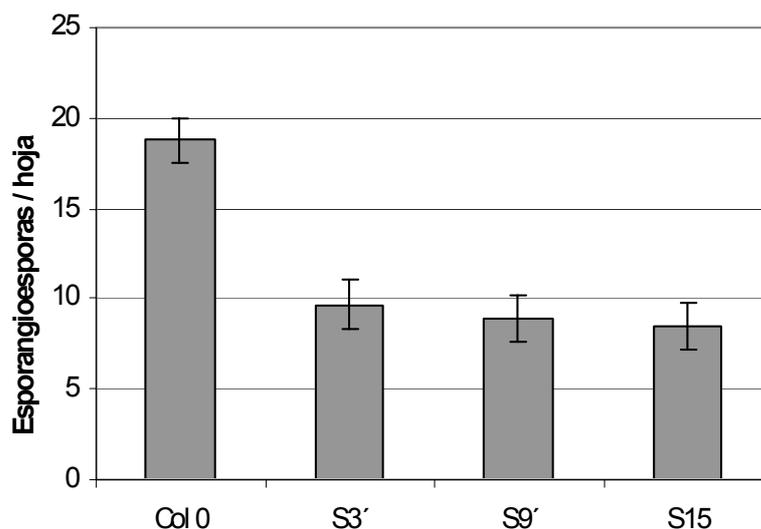
**Figura 3.48. Medidas de luminosidad en plantas sometidas a infección por *Pseudomonas syringae maculicola* ES4326 y *Pseudomonas syringae tomato* DC3000.** Hojas de roseta de plantas del ecotipo *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron infectadas durante 2 días con *Pseudomonas syringae maculicola* ES4326 (ps Maculicola) y *Pseudomonas syringae tomato* DC3000 (ps Tomato). La clorosis se cuantificó por la luminosidad de las hojas de la roseta de las plantas.

La resistencia de las plantas a la infección se determinó a partir del número de unidades formadoras de colonias (CFU) capaces de crecer a partir de discos de hojas infectadas con cada uno de los patógenos. Se comprobó que el número de CFU obtenido por disco foliar aumenta en todas las líneas con el tiempo de infección. También se observó que en las plantas *Col0* el número de CFU obtenido es alrededor de dos órdenes de magnitud mayor que en los discos procedentes de las líneas transgénicas (Figura 3.49).



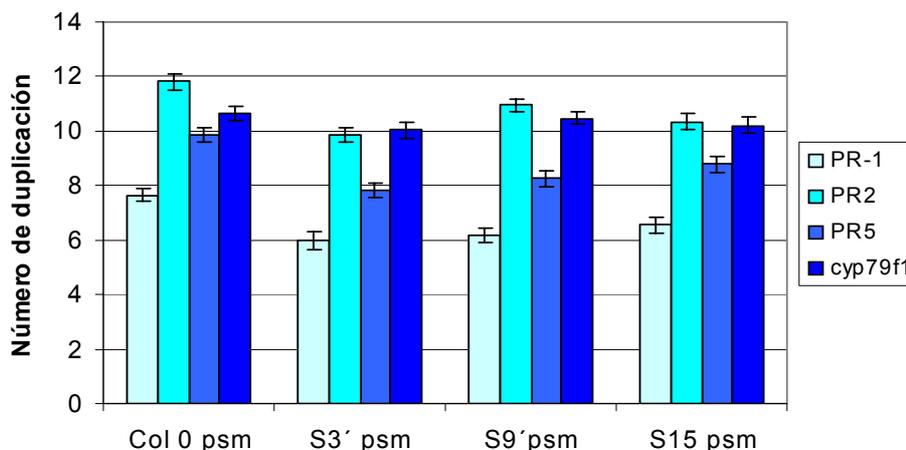
**Figura 3.49.** Número de unidades formadoras de colonias (CFU) por disco foliar de 0,5 cm de diámetro crecidas en placa. Hojas de roseta de plantas del ecotipo *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron infectadas durante 2 ó 3 días con *Pseudomonas syringae maculicola* ES4326 y con *Pseudomonas syringae tomato* DC3000. Discos de 0,5 cm de diámetro fueron separados y triturados, sembrándose posteriormente en placa y contándose el número de colonias aparecidas.

Un estudio similar se realizó con el hongo *Peronospora parasítica*. Este hongo infecta *Arabidopsis* dando lugar a la aparición de clorosis y de esporangioesporas. Las esporangioesporas son estructuras ramificadas del tamaño de un tricoma que salen de los estomas de la cara abacial de la hoja y que en sus extremos producen las conidioesporas. La medida del grado de infección sufrido por las hojas se realizó a través del recuento del número de esporangioesporas presentes en cada hoja. Así, plantas de 2 semanas fueron infectadas con este hongo y a los 10 días se contó el número de esporangioesporas que habían crecido (Figura 3.50). Se comprobó que el número de esporangioesporas en las hojas de las plantas *Col0* es mucho mayor que el de las líneas transgénicas.



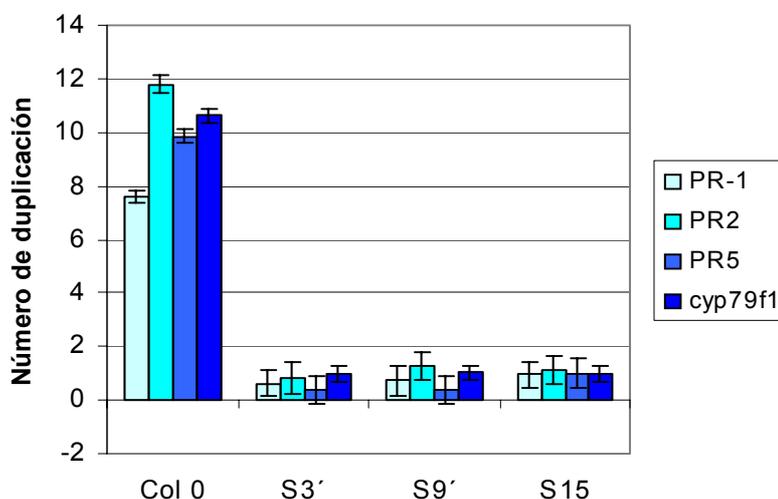
**Figura 3.50.** Recuento del número de esporangioesporas en hojas de *Arabidopsis* infectadas con *Peronospora parasitica*. Plantas de *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* de 2 semanas fueron infectadas con *Peronospora parasitica*. La medida del número de esporangioesporas se realizó a los 10 días después de la infección.

La medida por qRT-PCR de los niveles de expresión de genes participantes en la defensa frente a patógenos muestra su inducción como consecuencia de la infección con *Pseudomonas syringae maculicola* (Figura 3.51).



**Figura 3.51.** Variación de la expresión de genes de respuesta frente a patógenos durante infección con *Pseudomonas syringae maculicola* ES4326. Hojas de roseta de plantas del ecotipo *Col0* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* fueron infectadas durante 2 días con *Pseudomonas syringae maculicola* ES4326. Los niveles de expresión están referidos a los niveles presentes en *Col0* antes de tratamiento.

Se puede comprobar que posteriormente al estrés biótico los niveles de mensajero estudiados son en todas las líneas muy similares. Sin embargo, las plantas *Col0* han experimentado un aumento mucho más importante de los niveles de expresión de estos genes que las plantas transgénicas en las que el aumento es apenas perceptible. Esto se puede comprobar representando el aumento de cada gen durante la infección respecto de su nivel antes del estrés biótico (Figura 3.52). Estos resultados apoyan la idea de que la resistencia al estrés de tipo biótico de las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* se debe a los elevados niveles de expresión de genes de defensa frente a patógenos que estas plantas presentan en condiciones de no infección.

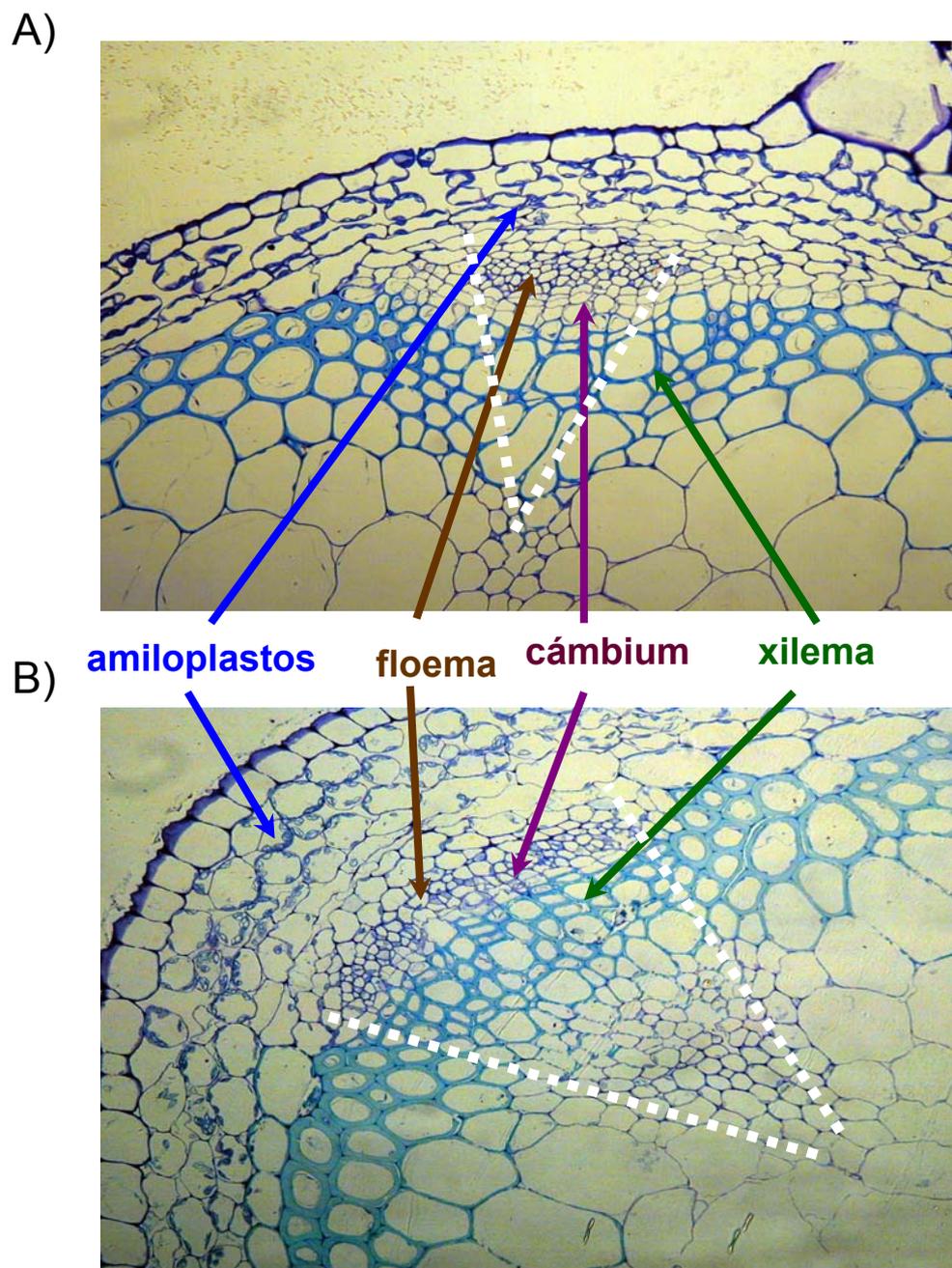


**Figura 3.52. Variación de la expresión de genes defensa durante infección por *Pseudomonas syringae maculicola*.** Niveles de expresión de genes de defensa frente a patógenos medidos por qRT-PCR después de la infección por *Pseudomonas syringae maculicola ES4326* durante 2 días. El número de duplicación es el  $\log_2$  de la relación entre la cantidad de mensajero presente después de la infección respecto de la presente antes del tratamiento.

### **3.9. Efectos de la sobreexpresión de *SAMDC1* en la organización del tejido vascular del tallo y de la hoja.**

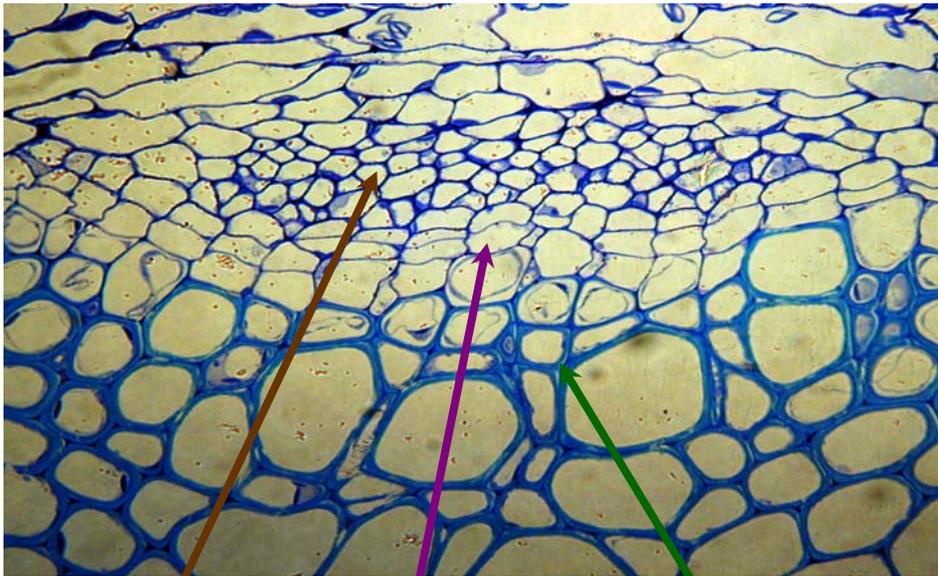
#### **3.9.1. Microscopía óptica del tallo.**

Se realizó un estudio de la estructura histológica del tallo de las plantas *Colo* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1*. Tras incluir las muestras en resina EPON, se obtuvieron una serie de cortes semifinos (1  $\mu\text{m}$  de grosor) transversales de tallo que se visualizaron al microscopio óptico en los que se pueden apreciar diferencias significativas en el tejido vascular (Figura 3.53 y 3.54). Se puede comprobar que en la línea sobreexpresora de *SAMDC1* S15 hay un mayor número de amiloplastos que en la planta *Colo* (Figura 3.53). Así mismo, la sobreexpresión de *SAMDC1* origina una organización atípica de las células de los haces vasculares de forma que el xilema y el floema de las plantas S15 se expanden lateralmente. Esto da lugar a que la típica disposición radial de los haces vasculares presente un ángulo más obtuso que el presente en las plantas *Colo* (Figura 3.53). La expansión lateral del floema hace que tome una disposición en forma de arco frente a la organización más compacta observada en las plantas *Colo* (Figura 3.53). Así mismo, se observa que las plantas S15 presentan un xilema en el que las paredes secundarias de las células están muy poco desarrolladas (Figura 3.54). El cámbium vascular también se ve afectado en las plantas S15, pues presenta un cierto grado de desorganización, pudiendo resultar poco funcional, que hace difícilmente distinguible la separación entre el xilema y el floema (Figura 3.54).



**Figura 3.53.** Cortes semifinos (x400) de secciones transversales del tallo de las plantas *Col0* (A) y de la planta sobreexpresora de *SAMDC1 S15* (B). En las figuras A y B se muestra la disposición general de los haces teñidos con azul de toluidina. Se muestra con líneas blancas punteadas la disposición general de los haces vasculares

A)



B) floema cámbium xilema

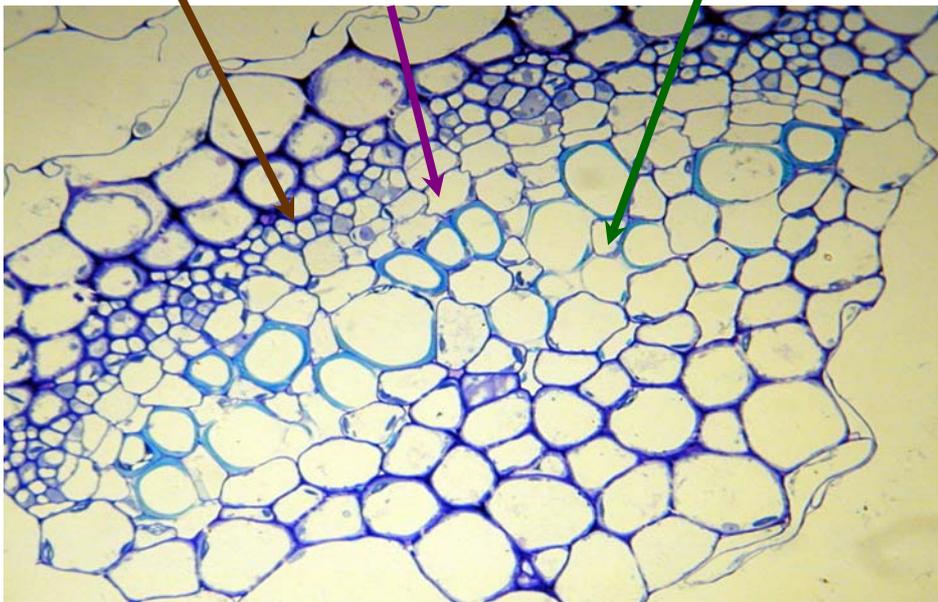
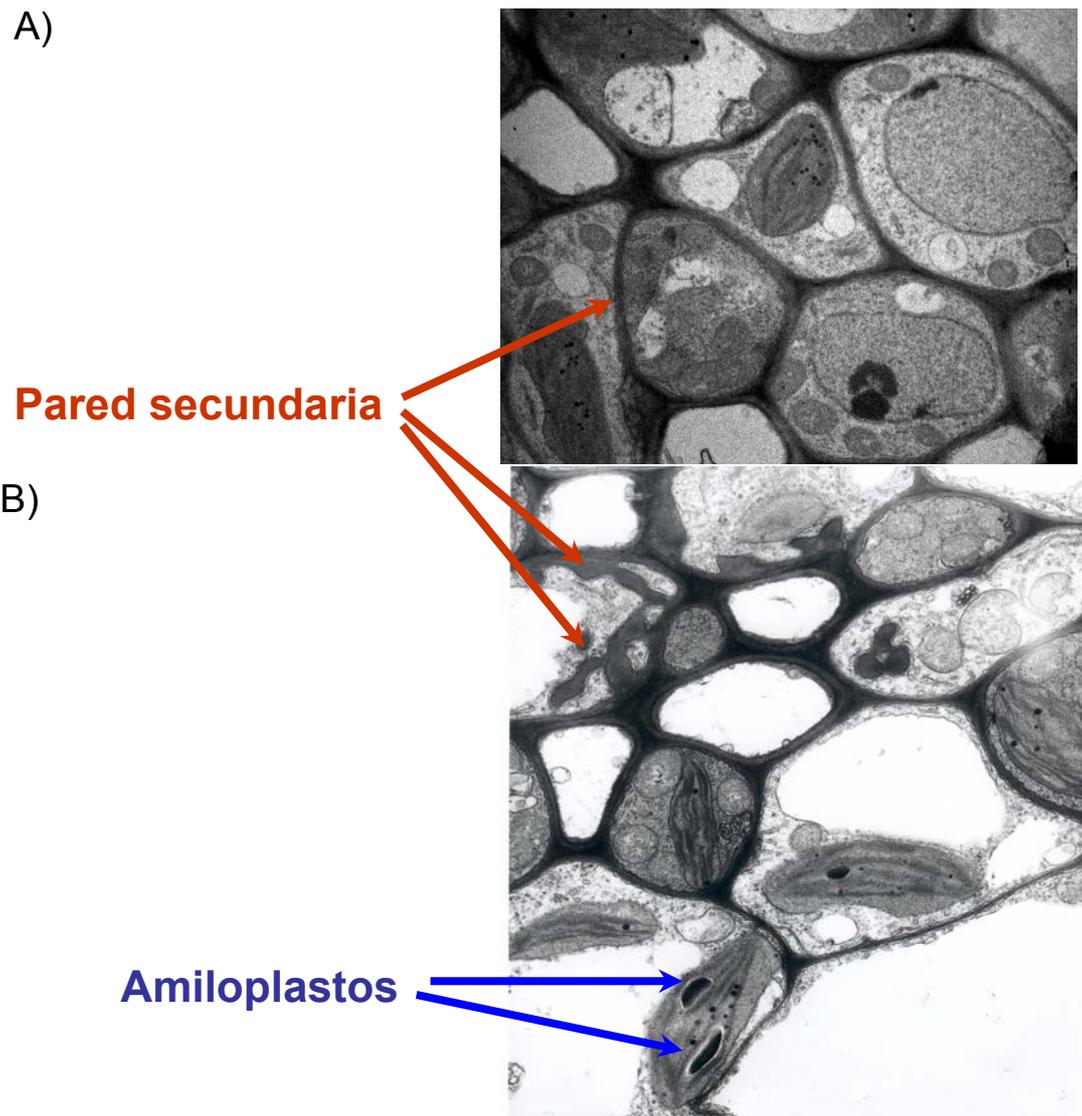


Figura 3.54. Cortes semifinos ( $\times 1000$ ) de secciones transversales del tallo de las plantas *Col0* (A) y de la planta sobreexpresora de *SAMDC1 S15* (B). En las figuras A y B se muestra un detalle de las células de los haces vasculares teñidos con azul de toluidina.

### 3.9.2. Microscopía electrónica de las hojas.

Posteriormente, se estudió la estructura histológica de las hojas de las plantas *Colo* y de las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* por microscopía electrónica. Tras incluir las muestras en resina, se obtuvieron una serie de cortes ultrafinos (60 nm de grosor) de las hojas que se visualizaron al microscopio electrónico en los que se pueden apreciar diferencias significativas en el tejido vascular (Figuras 3.55, 3.56 y 3.57). Se observa que las células del xilema de las plantas S15 presentan una mayor cantidad de amiloplastos que las células de las plantas *Colo* (Figura 3.55). Así mismo, la pared secundaria de las células del xilema de las plantas transgénicas presenta un aspecto deforme e irregular frente a la homogeneidad de la pared secundaria de las células de *Colo* (Figura 3.55). Por otra parte, las células del xilema de las plantas S15 presentan unos cloroplastos cuya estructura interna está desorganizada y donde el apilamiento de los tilacoides es irregular (Figura 3.56). En esta misma fotografía se puede comprobar también la desorganización de la pared secundaria del xilema de las células de las plantas S15. Así mismo, se observa que los cloroplastos de las células del parénquima de las plantas S15 son más aplanados y presentan una mayor densidad al microscopio electrónico por un mayor contenido en membranas internas que los presentes en las plantas *Colo* (Figura 3.57).



**Figura 3.55.** Cortes ultrafinos de hojas de las plantas *Colo* (x4500) (A) y de la planta sobreexpresora de *SAMDC1 S15* (x 5000) (B). En las figuras A y B se muestra un detalle de las células de los haces vasculares.

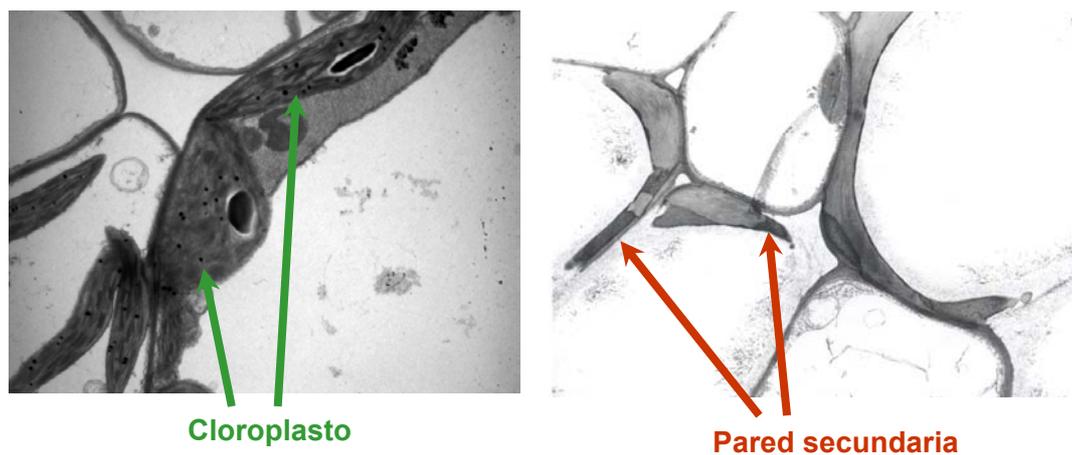


Figura 3.56. Cortes ultrafinos (x5000) de hojas de las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1 S15*. En las fotografías se muestra un detalle de los cloroplastos y de la pared secundaria de las células del xilema.

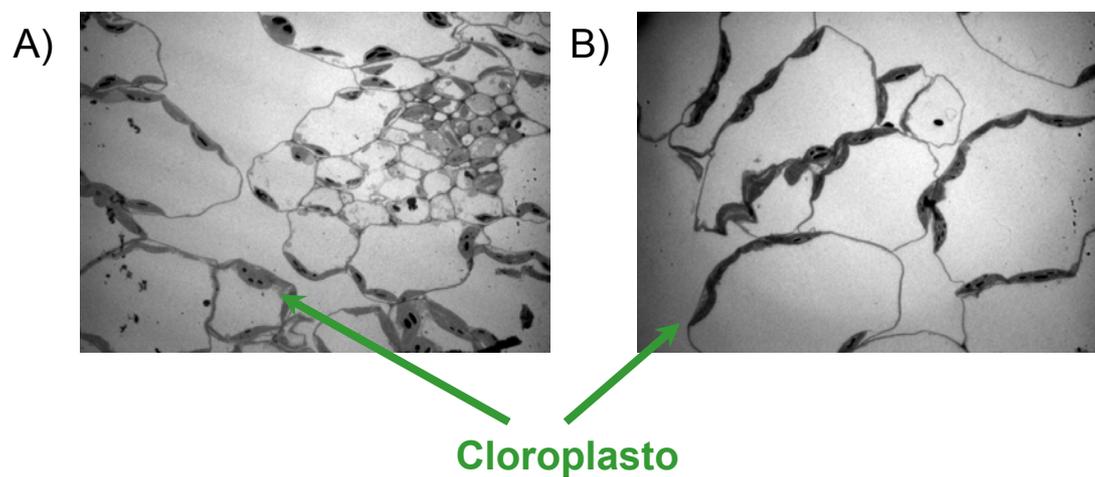


Figura 3.57. Cortes ultrafinos (x2500) de las hojas de las plantas *Col0* (A) y de las planta sobreexpresoras de *SAMDC1 S15* (B). En las figuras A y B se muestra un detalle de las células del parénquima de los haces vasculares.

### 3.10. Efectos de la sobreexpresión de *ADC2* en genes inducidos en plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*.

Recientemente se han obtenido una serie de plantas transgénicas que sobreexpresan de forma constitutiva el gen de la *ADC2* de *Arabidopsis* de forma que acumulan Put (Alcázar, 2004). Se analizó por qRT-PCR la expresión de los genes cuyos niveles en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* se encontraban aumentados. Como se observa en la figura 3.58 las plantas sobreexpresoras de *ADC2* (líneas 1-8 c, Pc y 5c) no presentan cambios importantes en los niveles de expresión de los genes estudiados los cuales participan en la defensa de la planta frente al estrés biótico y abiótico.

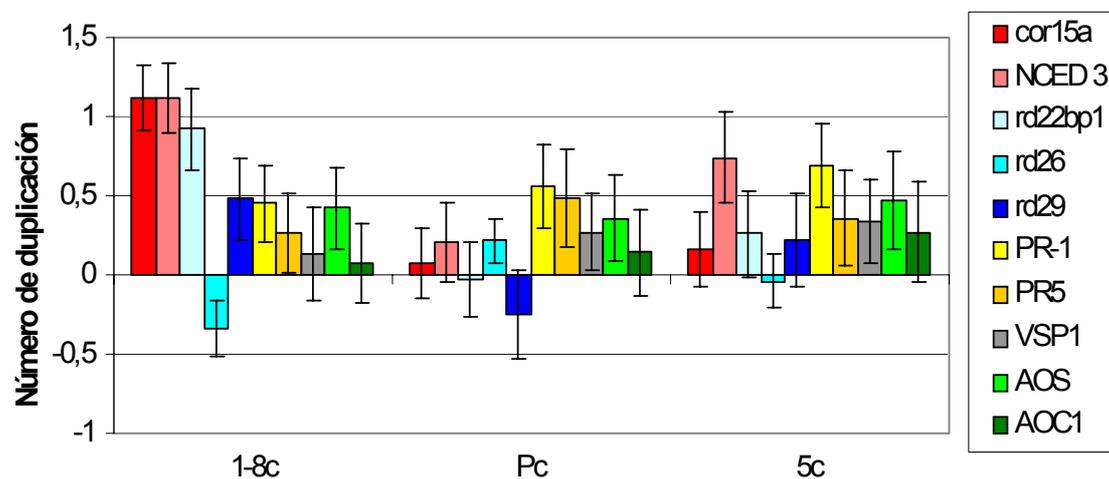


Figura 3.58. Efecto de la sobreexpresión de *ADC2* en los niveles de expresión de genes participantes en respuesta a estrés abiótico, biótico, señalización por etileno y síntesis ácido jasmónico. Medidas de cantidades de mensajero de cada gen por RT-PCR en tiempo real en plantas sobreexpresoras de *ADC2* (1-8c, Pc y 5c) y en la planta control Kc de 4 semanas. El número de duplicación es el  $\text{Log}_2$  de la relación entre la cantidad de mensajero del gen en concreto en cada muestra respecto de la cantidad del mismo mensajero presente en el control Kc.



## **4. DISCUSIÓN.**

En este trabajo se ha profundizado en el estudio de los efectos de la sobreexpresión constitutiva del gen *SAMDC1* en plantas de *Arabidopsis*. Se han seleccionado tres líneas sobreexpresoras, S3', S9' y S15, que presentaban unos niveles de mRNA del orden de 3 veces superiores a las plantas control no transformadas. Estos transformantes presentan un fenotipo a nivel de plántula, de enanismo y menor longitud de las raíces, que sugiere un retraso en el crecimiento respecto a las plantas *Col0* (Marco, 2000). La ausencia de fenotipo a nivel de planta adulta y los resultados del análisis transcriptómico nos llevaron a realizar un estudio en mayor profundidad de los efectos de la sobreexpresión de *SAMDC1*.

### **4.1. La sobreexpresión de *SAMDC1* provoca un aumento de actividad SAMDC y cambios en el contenido de PAs y etileno.**

La medida de la actividad SAMDC en las plantas transgénicas mostró que éstas presentaban una actividad 10- 15 veces superior a la presente en las plantas *Col0* (Figura 3.1). Estos niveles de actividad son superiores a los obtenidos al introducir el gen de la SAMDC humana bajo el control del promotor constitutivo CAMV35S en plantas de tabaco (Noh y Minocha, 1994; Waie y Rajam, 2002) en los que la actividad en las líneas transgénicas era de 5-9 veces superior a la línea no transformada. También son considerablemente mayores a los obtenidos al usar un promotor inducible por tetraciclina en patata (Kumar y col., 1996) o por ABA en arroz (Roy y Wu, 2002). Por otra parte el análisis por qRT-PCR muestra que la sobreexpresión de *SAMDC1* da lugar a un incremento en la expresión de los genes *SPMS* y *SPDS1* (Figura 3.2). Estos niveles de expresión provocan un aumento en el contenido de Spm en las plantas transgénicas pero no de Spd. Resultados diferentes se obtuvieron al sobreexpresar la *SAMDC* humana en hojas de tabaco, donde se determinaron niveles elevados de Spd y reducidos de Put (Noh y Minocha, 1994). Así

mismo, la sobreexpresión de SAMDC bajo el control de promotores inducibles, provocó un aumento de 7 veces en los niveles de espermidina y 4 en los de espermina (Kumar y col., 1996) en plantas de patata o de 2 a 4 veces en los niveles Spd y Spm en arroz (Roy y Wu, 2002). Las diferencias con nuestros resultados pueden deberse al hecho de que en nuestro caso el gen sobreexpresado es homólogo lo que permite que tengan lugar los mecanismos de regulación de este sistema. De esta forma en nuestras plantas transgénicas tendría lugar una regulación que conduce al aumento de los niveles de *SPMS*, *SPDSI* y de Spm y evita la acumulación de Spd. Por otra parte, tampoco se puede descartar que plantas como patata o arroz regulen los niveles de Spm o PAs libres de forma diferente a *Arabidopsis thaliana*.

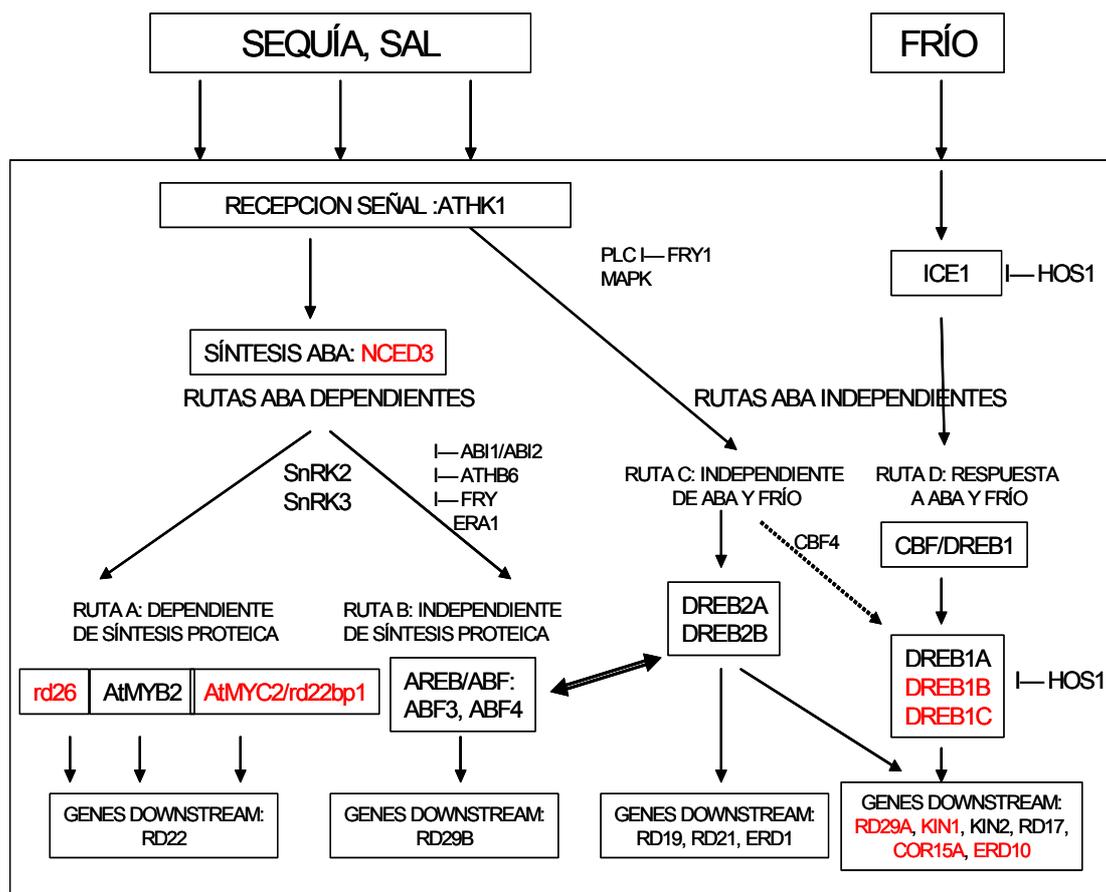
La biosíntesis de PAs es un proceso bien conocido en el que se han sugerido diferentes niveles de regulación. Así, en plantas de *Arabidopsis* se ha sugerido que el paso limitante sería la conversión de Put a Spd (Alcázar, 2004); en plantas de tabaco se ha situado en el control traduccional de la *SAMDC* (Hanfrey y col., 2002) mientras que en arroz se ha sugerido que sería la actividad SAMDC la responsable de dicho control (Thu-Hang, 2002). Puesto que la construcción usada en nuestro trabajo no incorpora la 5' uORF responsable del control traduccional de los niveles de SAMDC, en las líneas transgénicas estudiadas la sobreexpresión de la *SAMDC1* tiene lugar sin control traduccional dando lugar a incrementos en el contenido de Spm. Sin embargo el hecho de que no se produzca un aumento en el contenido de Spd sugiere la existencia de mecanismos de regulación del contenido de esta PA en la planta, sobretodo dado que los niveles de *SPMS* como de *SPDSI* están aumentados en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* (Figura 3.2).

La medida del contenido en etileno (Figura 3.4) y ACC (Figura 3.5) muestra que las plantas transgénicas presentan una reducción significativa en los niveles de estos metabolitos. A pesar de que se ha sugerido una competencia por la SAM entre las rutas de biosíntesis de PAs y etileno (Van der Straeten y Montagu, 1990; Kushad

y Dumbroff, 1991) nuestros resultados indicarían que en *Arabidopsis* no existe tal competencia y que los menores niveles de etileno y ACC se deben a una reducción en los niveles de los mRNAs de ACC sintasa y/o ACC oxidasa (Figura 3.22).

#### **4.2. La sobreexpresión de *SAMDC1* aumenta la tolerancia al estrés abiótico.**

La sobreexpresión de *SAMDC1* provoca un aumento en los niveles del mRNA de *NCED3* así como de una serie de genes como, *cor15a*, *rd29a*, *rd26* y *rd22bp1* participantes en la respuesta al estrés abiótico, ya sea por desecación (Ingram y Bartels, 1996; Bray 1997; Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki, 1996, 2000, 2003), salino y frío (Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki, 1996, 2000, 2003; Thomashow, 1999) (Figuras 3.5 y 3.9). *NCED3* es el enzima limitante de la biosíntesis de ABA (Tan y col., 2003) por lo que su inducción podría ser la responsable del incremento de unas 4 veces en los niveles de ABA en las plantas transgénicas (Figura 3.12.). El ABA participa en una gran cantidad de procesos de señalización, destacando entre ellos las rutas de defensa frente al estrés abiótico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Estos datos parecen indicar la existencia de una activación previa a ningún tratamiento de las rutas de respuesta a estrés salino, por desecación y frío (Figura 4.1). Los genes de respuesta a estos estreses que están inducidos en nuestras plantas transgénicas son dependientes (*rd22bp1*, *rd26*) o independientes de ABA pero responden a la hormona (*rd29a*, *cor15a*) (Figura 4.1), habiéndose comprobado que en su región promotora contienen elementos ABRE de respuesta a ABA (Bonetta y McCourt 1998; Grill y Himmelbach 1998; Leung y Gidaudat 1998). Otros trabajos en nuestro laboratorio demuestran que, además de los genes comentados en este trabajo, las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* presentan una inducción de otros genes de respuesta a estrés abiótico (Collado, 2004) como *DREB1B*, *DREB1C*, *KIN1* y *ERD10* que aun siendo independientes de ABA responden a esta hormona (Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki, 1996, 2000, 2003).



**Figura 4.1 Rutas de señalización para la activación transcripcional de genes inducidos por estrés abiótico.** Las rutas A y B son dependientes de ABA, mientras que las rutas C y D son independientes de ABA. En color rojo están marcados los genes de respuesta a estrés abiótico inducidos en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1*.

Las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* han mostrado mayor tolerancia al estrés salino. Esto se comprueba tanto en la menor severidad del daño visible causado (Figura 3.25) como en la mayor recuperación al estrés (Figura 3.26). La capacidad para desarrollar cotiledones también parece estar mucho menos afectada en las plantas transgénicas que en las plantas *Colo* sometidas a estrés (Figura 3.27). Estos resultados coinciden con los obtenidos al sobreexpresar la *SAMDC* humana en tabaco (Waie y Rajam, 2002) o al sobreexpresar la *SAMDC* de *Tritordeum* en arroz (Roy y Wu, 2002) donde los daños visibles provocados por el tratamiento con NaCl eran

menos importantes en las plantas transgénicas. También hemos comprobado que la sobreexpresión de la *SAMDC1* da lugar a una mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico. Las plantas transgénicas presentan un daño visible mucho menos importante que las plantas *Col0* (Figura 3.31). La tolerancia al estrés hídrico se revela también con la menor reducción del tamaño (Figuras 3.33) y el menor grado de amarilleamiento (Figura 3.34) que presentan las hojas de las líneas transgénicas después de la privación de agua. Igualmente, las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* se recuperan más rápidamente que las plantas *Col0* a un estrés de corta duración como revela la medida de la longitud de tallos y peso fresco (Figura 3.35). Por último, el análisis del número de semillas germinadas durante la desecación confirma la mayor tolerancia de las plantas transgénicas a este tipo de estrés (Figura 3.36).

La tolerancia observada puede deberse a los elevados niveles de expresión de *cor15a*, *NCED3*, *rd22bp1*, *rd26* y *rd29a* que presentan las plantas transgénicas y que participan en la defensa de *Arabidopsis* frente al estrés salino y por desecación (Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki, 1996, 2000, 2003). Se ha comprobado que el estrés salino (Figura 3.29) y por desecación (Figura 3.38) provoca un aumento en los niveles de expresión de estos genes tanto en *Col0* como en las líneas transgénicas. Este aumento no es tan importante en las plantas transgénicas pues éstas ya presentan una inducción previa de los genes en cuestión que podría ser la responsable de la mayor resistencia a este tipo de estrés abiótico. Podemos decir que la respuesta a estrés abiótico a nivel de expresión es mucho mayor en las plantas *Col0* que en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* las cuales ya tienen activadas las respuestas a este tipo de estrés (Figuras 3.29 y 3.38). De forma que podemos concluir que las líneas sobreexpresoras se comportan como si hubieran sufrido una aclimatación frente al estrés.

La PAs Spd y Spm pueden actuar interaccionando con las membranas e inhibiendo el movimiento de los fosfolípidos a través de la bicapa lipídica (Bratton,

1994), estabilizando complejos moleculares en la membrana tilacoidal (Besford y col., 1993) o como se ha comprobado para Spm, inhibiendo la peroxidación de lípidos en hojas estresadas osmóticamente (Borrell y col., 1997). La acumulación de Spm como consecuencia del estrés salino se ha observado en diferentes variedades de arroz (Maiale y col., 2004). Por otra parte, la participación de la Spd y Spm en las respuestas a estrés hídrico y la inducción de la SAMDC de arroz durante un estrés por desecación ya había sido descrita en arroz donde la sobreexpresión de la ADC de *Datura* confería a plantas de arroz una resistencia al estrés por desecación (Capell y col., 2004). Se ha comprobado que en plantas de arroz transformadas con la SAMDC de *Tritordeum* bajo el control del promotor PSB109, inducible por ABA, se produce una acumulación de Spm y Spd en respuesta a un tratamiento con sal, que puede contribuir a la resistencia al estrés mediante un aumento de la biomasa o por medio del aumento de la longitud del tallo (Roy y Wu, 2002). De igual modo, la sobreexpresión constitutiva de SAMDC en tabaco (Waie y Rajam, 2002) también originó plantas con mayor resistencia al estrés salino.

Las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* resultan también más tolerantes al daño oxidativo causado por ozono. Esta tolerancia se manifiesta tanto en un retraso en la aparición de daño visible en las hojas (Figura 3.39), como en la mayor recuperación tras un tratamiento corto e intenso (Figura 3.40) y en la mayor capacidad para desarrollar cotiledones durante un estrés por ozono (Figura 3.41). Al analizar las posibles causas de esta resistencia se comprobó que los niveles de genes participantes en la síntesis de PAs, aumentados en los transformantes antes de tratamiento (Figura 3.2), sufrían un aumento como consecuencia del estrés por ozono (Figura 3.45). Este aumento era mucho más acusado en las plantas *Colo* que en las líneas transgénicas (Figura 3.46) indicando que las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* presentaban una protección previa a este estrés oxidativo. Esto se confirma con los menores niveles de inducción de *GST6* observados en las plantas transgénicas

como consecuencia del tratamiento (Figura 3.44). La expresión de *GST6* se considera un marcador del daño oxidativo generado por el ozono (Sharma y Davis, 1994). El aumento en la expresión de los enzimas de la síntesis de PAs en respuesta al ozono ha sido documentado con anterioridad para el caso de la ADC de avena (Rowland-Bamford y col., 1989) o del mRNA de la SAMDC de guisante como (Marco y Carrasco, 2002). Por tanto los mayores niveles de Spm presentes en las líneas transgénicas pueden ser los responsables de su mayor tolerancia al estrés por ozono. La participación de las PAs en la defensa frente al estrés por ozono ha sido comprobada anteriormente *in vitro* demostrando su comportamiento como "scavengers" de radicales libres (Drolet y col., 1986), en tomate (Ormrod y Beckerson, 1986), en *Picea abies* (Dhomen y col., 1990) y en tabaco (Navakoudis y col., 2003). Hay que destacar los estudios realizados con variedades sensibles y resistentes donde se ha comprobado un rápido aumento de Put en la línea resistente a ozono Bel B (Langerbartels y col., 1991) mientras que la línea hipersensible Bel W3 sólo presentaba un ligero aumento de Put en fases tardías donde la lesión necrótica ya se había producido. Las PAs parecen actuar como posibles agentes protectores frente al estrés oxidativo como se revela al tratar ciertas variedades resistentes de *Coryza canadienses*, que presentan niveles elevados de poliaminas y actividades altas ADC y ODC, con el oxidante paraquat (Ye y col., 1997). Asimismo, la aplicación exógena de Put reduce significativamente el daño visible causado por el ozono en variedades de tabaco hipersensibles a este agente (Navakoudis y col., 2003). El papel de las PAs en la protección de la planta al estrés oxidativo puede consistir en la inhibición de la peroxidación de la membrana lipídica (Kidata y col., 1979) o bien en su actuación en su forma conjugada con ácidos hidroxicinámicos como secuestradores (*scavenger*) de radicales libres (Drolet y col., 1986).

### 4.3. La sobreexpresión de *SAMDC1* aumenta la tolerancia al estrés biótico.

Al infectar las plantas con los patógenos *Pseudomonas syringae maculicola* (Figura 3.47), *Pseudomonas syringae tomato* (Figura 3.48) y *Peronospora parasítica* (Figura 3.50), se observa que las líneas transgénicas son menos sensibles a la infección. En realidad no se observa una inmunidad total al patógeno, sino un retraso en la aparición del daño experimentado y en su extensión. La menor capacidad de formación de colonias por hoja infectada observada en las líneas transgénicas (Figura 3.49) indica que la menor sensibilidad a la infección se debe a la dificultad en la reproducción o el transporte del patógeno. Resultados similares se obtuvieron mediante la sobreexpresión constitutiva de SAMDC humana en tabaco, lo que confirió tolerancia a la infección con los hongos *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum* (Waie y Rajam 2002).

La tolerancia al estrés biótico de las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* se puede atribuir a los altos niveles de Spm presentes en las líneas transgénicas. El papel protector de las PAs se ha observado previamente, se sabe que los niveles de PAs, y especialmente de sus conjugados, aumentan en avena durante la infección por *Blumeria graminis* f. Sp. *Hordei* (Von Ropenack y col., 1998; Cowley y Walters 2002a) y en cebolla al infectar con *Botrytis allii* (McLusky y col., 1999) y que algunos de sus conjugados tienen propiedades antifúngicas sobre los patógenos *Pyrenophora avenae* y *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Walters y col., 2001).

El análisis transcriptómico (Figura 3.5) y las experiencias de qRT-PCR (Figuras 3.6 y 3.7) han mostrado la existencia en las plantas transgénicas de unos niveles de expresión superiores a las plantas *Colo* de genes participantes en la síntesis de ácido jasmónico y metil jasmonato como son *LOX2*, *DADI*, *AOC1*, *AOC2*, *AOS* (Ishiguro y col., 2001) y *JMT* (Seo y col., 2001) sugiriendo así unos mayores niveles

de estos metabolitos implicados en la defensa de la planta contra heridas y patógenos (Devoto y Turner, 2003; Thomma y col., 2001; Wang y col., 2002). Así mismo, se ha observado que las plantas transgénicas presentan unos niveles de expresión elevados de los mRNAs de PR-1, PR2, PR5, *cyp79fl*, *WAK1* y *FLS2* (Figuras, 3.5 y 3.9). PR-1, PR2 y PR5 participan en la defensa de la planta frente a la invasión por patógenos (Uknes y col., 1992; Yamakawa y col., 1998). Así mismo, *cyp79fl* está implicado en la síntesis de glucosinolatos alifáticos (Hansen y col., 2001) cuyos productos de degradación participan en la defensa de la planta frente a la infección por patógenos (Rask y col., 2000). *WAK1* es una proteína-quinasa receptora asociada a pared celular, participa en la comunicación entre la pared y la membrana celular durante el ataque de un patógeno (Verica y He, 2002). Por último, *FLS2* es un receptor encargado del reconocimiento de la flagelina, proteína presente en el flagelo de las bacterias (Gómez-Gómez y Boller, 2000).

Se ha comprobado que la Spm induce la expresión de proteínas PR en tabaco (Yamakawa y col., 1998), lo que confiere resistencia frente al virus del mosaico del tabaco. La sobreexpresión de *SAMDC* en tabaco provoca la acumulación de isoformas de PR-1 (Franceschetti y col., 2004). La Spm también actúa en la inducción de genes implicados en la respuesta hipersensible de la planta a la infección por patógenos (Hiraga y col., 2000; Yamakawa y col., 1998). Estos resultados coinciden con lo observado en nuestro trabajo en el que hemos comprobado cómo la sobreexpresión de *SAMDC1* y el consiguiente aumento en los niveles de Spm dan lugar a elevados niveles de mRNA de *PR-1*, *PR2*, *PR5*, *cyp79fl*, *WAK1* y *FLS2*. Así pues, el incremento en la expresión de estos genes podría dar lugar a la mayor resistencia al estrés de tipo abiótico observada en las plantas transgénicas.

También hay que tener en cuenta el papel de la inducción de la ruta de síntesis del ácido jasmónico (Figura 3.7) y la reducción en el contenido de etileno en las líneas transgénicas (Figura 3.11). Aunque los genes PR-1, PR2, PR5 están regulados

por el ácido salicílico, también se conoce la existencia de rutas de defensa independientes de ácido salicílico, mediadas por etileno y ácido jasmónico, que inducen la expresión de estos genes en tabaco (Xu y col., 1994; Knoester y col., 1998), y *Arabidopsis* (Pennickx y col., 1998; Staswick y col., 1998; Thomma y col., 1998; Vijayan y col., 1998; Nandi y col., 2003). Se ha demostrado que el papel de las diferentes rutas de defensa, dependientes o independientes de ácido salicílico, varía según el patógeno en cuestión (Thomma y col., 1998). Se ha comprobado que mutantes insensibles al etileno presentan una mayor resistencia a la infección por *Xanthomonas* sp. y por *Pseudomonas* sp. en *Arabidopsis* y tomate (Bent y col., 1992; Lund y col., 1998). Estos trabajos están de acuerdo con nuestros resultados, donde se observa una mayor resistencia a *Pseudomonas syringae maculicola*, *Pseudomonas syringae tomato* y *Peronospora parasítica* que podría estar relacionada con la disminución en la señalización por etileno, revelada por el aumento en la expresión de *LOX2* y *VSP1* (Figura 3.6). Por tanto, en las plantas transgénicas, la reducción en el contenido en etileno podría estar relacionada con los elevados niveles de expresión de genes de enzimas participantes en la ruta de síntesis del ácido jasmónico; lo que a su vez, puede dar lugar a elevados niveles de esta hormona provocando la inducción de algunos genes de defensa frente a patógenos como las proteínas PR. Así pues, ya sea por acción directa de la Spm, o debida a los cambios en el contenido en etileno y ácido jasmónico, la sobreexpresión de la *SAMDC1* daría lugar a la mayor tolerancia al estrés biótico observada.

#### **4.4. Las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* presentan alteraciones en el desarrollo vascular de los tallos y de las hojas.**

Hemos comprobado por microscopía óptica (Figuras 3.54 y 3.55) y electrónica (Figura 3.55, 3.56 y 3.57) que las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* presentan una serie de alteraciones en el tejido vascular del tallo y de las hojas. Estas alteraciones consisten en un mayor contenido en amiloplastos tanto en tallos (Figura

3.53) como en hojas (Figura 3.55). Así mismo, la microscopía óptica ha revelado que el xilema y el cámbium del tallo de las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* están poco desarrollados y que presentan una expansión lateral que da lugar a una organización de los haces vasculares atípica (Figura 3.54). Por otra parte, las células del xilema de las hojas tienen paredes secundarias irregulares y poco homogéneas (Figura 3.55) y presentan unos cloroplastos cuya estructura interna está desorganizada y deformada y donde el apilamiento de los tilacoides es irregular (Figura 3.56). De igual manera se ha comprobado que las células parenquimáticas de las hojas de las plantas transgénicas presentan una serie de irregularidades en la estructura de los cloroplastos consistentes en un mayor contenido en membranas tilacoidales y en un apilamiento irregular de éstas (Figura 3.57).

Las PAs participan en muchos procesos de desarrollo como son el crecimiento de las raíces, la embriogénesis somática, iniciación floral y el desarrollo de flores y frutos (Evans y Malmberg, 1989; Slocum y Flores, 1991). La modificación de los niveles de PAs da lugar a importantes alteraciones en el desarrollo como en tabaco donde mutantes con elevados niveles de PAs presentan alteraciones en el patrón de desarrollo floral en tabaco (Malmberg y Mc Indoo, 1983). Así mismo, la sobreexpresión de *ADC* en *Avena sativa* L. da lugar a plantas con internodos cortos, tallos y hojas delgadas y un crecimiento reducido de la raíz (Masgrau y col., 1997). Un fenotipo similar se obtiene al expresar la *SAMDC* antisentido en patata (Kumar y col., 1996). La implicación de las PAs en el desarrollo de los haces vasculares se ha descrito en el mutante del gen *ACL5*, que codifica para una espermina sintasa que se expresa específicamente en el floema, donde se observa que los haces vasculares están rodeados de células organizadas de formas anormal y con paredes celulares gruesas (Hanzawa y col., 1997). Recientemente, se ha comprobado que la sobreexpresión de *ADC2* en *Arabidopsis* provoca en los tallos un aumento en el número de haces vasculares, una menor lignificación de las células de los arcos

interfasciculares y un mayor crecimiento primario del Xilema que daba a los haces un aspecto rectangular (Alcázar, 2004).

En las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* las irregularidades observadas en la pared secundaria de las células del tallo y de las hojas dan lugar a una mayor comunicación de las células del xilema. De esta forma, en las plantas transgénicas existirían una serie de trayectos alternativos de circulación xilemática de nutrientes, lo que podría estar relacionado con la tolerancia de las plantas al estrés salino ya que parte del daño provocado por este estrés se debe a un bloqueo del ascenso de nutrientes por la planta.

#### **4.5. Los aumentos en los niveles de Spm son responsables del efecto de la sobreexpresión de la *SAMDC1*.**

Las líneas sobreexpresoras de *SAMDC1* presentan una serie de diferencias respecto al ecotipo *Col0* que parecen estar relacionadas con el aumento de los niveles de Spm. Así, en este trabajo se ha comprobado que el crecimiento de plantas *Col0* en presencia de Spm provoca un descenso en los niveles de etileno (Figura 3.14) y ACC (Figura 3.15) similar a la presente en las plantas transgénicas. La reducción en la síntesis de etileno por acción de las Spm exógena se ha observado en melocotón (Bregoli y col., 2002). La reducción en los niveles de ACC y etileno en melocotón por acción de Spm sugiere una inhibición de las actividades ACC sintasa y ACC oxidasa por esta PA, descartándose la idea de que la reducción del contenido en ACC y etileno sea debido a una falta de SAM. La reducción de la síntesis de etileno por inhibición de ACC sintasa a nivel de actividad o de acumulación de su transcrito ya había sido sugerida en tomate previamente (Li y col., 1992; Davis y col., 1991). Esta hipótesis se ve apoyada por la observación de que el crecimiento en presencia de altas concentraciones de ACC provoca en *Col0* un aumento en los niveles de etileno, pero no ocurre lo mismo en las plantas transgénicas (Figura 3.22). El crecimiento de *Col0*

en presencia de Spm provoca también un aumento en los niveles de ABA (Figura 3.16). Este resultado establece una relación directa entre esta hormona y Spm. Esta relación ya había sido observada anteriormente en arroz donde la aplicación exógena de ABA provocaba un aumento en la expresión de SAMDC y acumulación de Spm (Roy y Wu, 2002). Nuestros resultados demuestran que esta relación tiene también en sentido inverso pues la aplicación de Spm exógena provoca un aumento en los niveles de ABA. En la bibliografía existen evidencias de una relación entre elevados niveles de ABA y una reducción en la síntesis de etileno a través de una reducción en los niveles de ACC oxidasa y un aumento de la conjugación de ACC (Hoffman y col., 1982; Corbineau y col., 1989; Tan y Thiman, 1989). Aunque en esos trabajos no se comprobó el efecto de la Spm sobre el etileno, es muy probable que esa inhibición de ACC oxidasa causada por ABA estuviera mediada por Spm. De igual forma la aplicación de Spm provoca una inducción de la expresión de los genes de síntesis de ácido jasmónico, de señalización de etileno y de respuesta al estrés abiótico y biótico similares a los presentes en las líneas transgénicas (Figura 3.17). La inducción de proteínas de respuesta al estrés abiótico como las PR por la Spm ya había sido descrita anteriormente en tabaco (Yamakawa y col., 1998). En cambio, no se observa ninguna de estas variaciones ni cambios en el contenido en etileno (Figura 3.14), ACC (Figura 3.15) o ABA (Figura 3.16) al aplicar Put o Spd. El crecimiento de las plantas transgénicas en presencia de MGBG da lugar a unos niveles de etileno (Figura 3.18), ACC (Figura 3.19), ABA (Figura 3.20) y de los genes estudiados por qRT-PCR (Figura 3.21) similares a los presentes en plantas *Colo* no tratadas. El aumento de la síntesis de etileno por acción del inhibidor de la síntesis de PAs MGBG se había observado previamente en tabaco (Scaramagli y col., 1999). Estos resultados indican que los cambios observados en las plantas transgénicas son debidos a los altos niveles de Spm.

La responsabilidad de la Spm en los cambios observados en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* se reveló al compararlas con plantas sobreexpresoras de *ADC2*, que acumulan Put. El análisis por qRT-PCR demuestra diferencias importantes en los niveles de expresión de genes participantes en la síntesis de PAs. Mientras que en las plantas sobreexpresoras de *ADC2* no se observan cambios importantes en otros genes de la síntesis de PAs, la sobreexpresión de *SAMDC1* provoca un aumento en los niveles de *SPMS* y *SPDS1* (Figura 3.2). Las plantas sobreexpresoras de *ADC2* presentan un aumento de la expresión de varias aminooxidasas dependientes de cobre y un descenso de la expresión de *ATAOI* (Alcázar, 2004). El análisis por micromatrices de DNA en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* muestra que en estas plantas no existe esa inducción generalizada de las aminooxidasas dependientes de cobre encargadas de la degradación de la Put a pirrolina ni cambios significativos en la expresión de poliaminooxidasas (Tabla 3.1).

Otra diferencia significativa se encuentra en el efecto de la sobreexpresión de *SAMDC1* o *ADC2* sobre los niveles de expresión de enzimas relacionados con la síntesis de ABA y ácido jasmónico, defensa frente a estrés abiótico o biótico o señalización por etileno. Así como la sobreexpresión de *SAMDC1* da lugar a un claro aumento en la expresión de muchos enzimas relacionados con estos procesos, la sobreexpresión de *ADC2* no provoca tales efectos (Figura 3.55). En consecuencia con la no inducción de la expresión de genes relacionados con la defensa al estrés abiótico las plantas sobreexpresoras de *ADC2* no presentan una mayor resistencia al estrés salino que las plantas silvestres (Alcázar, 2004). El hecho de que las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* sí presenten una mayor resistencia a este tipo de estrés confirma resultados anteriores obtenidos en arroz (Krishnamurthy y col., 1987) o tabaco (Bors y col., 1989) donde se comprueba que las PAs participantes en la respuesta al estrés abiótico son Spm y Spd y no Put.

En cuanto a la respuesta frente al estrés causado por patógenos se comprueba que aunque las plantas sobreexpresoras de *ADC2* no presentan una inducción de los genes analizados en este trabajo sí presentan una activación de otros genes de defensa frente a patógenos. Estos genes, entre los que se encuentran *EDS1* (enhanced disease susceptibility 1), *EDS5* (enhanced disease susceptibility 5), *PAD4* (phytoalexin-deficient 4), *NPR1* (nonexpressor of pr genes 1), *PR-1* y *PR2* están implicados en la defensa frente a estrés biótico mediada por ácido salicílico (Alcázar, 2004).

AGI N°	Sonda Affymetrix	Descripción	Expresión <i>Col0</i>	Expresión S15
At3g48090	252373	<i>EDS1</i>	115,3	475,4
At4g39030	252921	<i>EDS5</i>	185,2	681,4
At3g52430	252060	<i>PAD4</i>	68,9	288,3
At1g64280	259764	<i>NPR1</i>	396,7	1106,6

**Tabla 4.1. Genes de respuesta a estrés biótico mediada por ácido salicílico aumentados en S15.** Cuantificación de los niveles de expresión por micromatriz *Affymetrix* "Genechip *Arabidopsis* ATH1 Genome Array". Los datos proceden de hojas de roseta de 4 semanas del ecotipo silvestre *Col0* y de la línea transgénica S15. Se presenta el N° de identificación AGI (*Arabidopsis* Genome Initiative), N° de sonda *Affymetrix*, descripción del gen y expresión en ambas líneas.

La medida por micromatrices de DNA demuestra (Tabla 4.1) que nuestras plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* también presentan la inducción de estos genes. Esto sugiere que la inducción de *EDS1*, *EDS5*, *PAD4*, *NPR1*, *PR-1* y *PR2* no sería un efecto específico de la Put sino una consecuencia general del aumento en los niveles de PAs. No sería ese el caso de la inducción de los genes de respuesta al estrés biótico *PR5*, *cyp79f1*, *WAK1* y *FLS2* cuya inducción parece deberse de forma específica al aumento en los niveles de Spm (Figura 3.17). Así pues, en las plantas sobreexpresoras de *ADC2* la mayor resistencia al ataque por patógenos sería debida a una activación previa de la ruta de síntesis de ácido salicílico mientras que en las

plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* la mayor resistencia sería debida a la activación tanto de rutas dependientes de ácido jasmónico como a rutas dependientes de ácido salicílico.

Así pues, los efectos causados por la sobreexpresión de *ADC2* y *SAMDC1* son significativamente distintos. Esto demuestra que los cambios observados en cada uno de los 2 tipos de transformantes son debidos de forma específica a la poliamina, Put o Spm, cuyo nivel se encuentra aumentado en dicha transgénica o en formas conjugadas de ellas.

## **5. CONCLUSIONES.**

1. La sobreexpresión de *SAMDC1* provoca en *Arabidopsis thaliana* una inducción de la expresión de *SPDS1* y de *SPMS* así como un aumento en los niveles de Spm pero no de Put o Spd.

2. La sobreexpresión de *SAMDC1* y la consiguiente acumulación de Spm da lugar a una mayor tolerancia al estrés por desecación, salino y por ozono. Esta mayor tolerancia puede deberse a la acción directa de la Spm o a la inducción de la expresión de diversos genes de respuesta al estrés abiótico.

3. Las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* presentan una mayor tolerancia a la infección por patógenos que podría ser debida a la inducción de rutas de defensa frente a patógenos dependiente de ácido jasmónico y ácido salicílico.

4. Las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* presentan alteraciones en el tejido vascular de los tallos consistentes en un xilema poco desarrollado, un floema de disposición irregular, un cámbium poco diferenciado y un mayor número de amiloplastos. Así mismo, la sobreexpresión de *SAMDC1* da lugar a unos haces vasculares de organización atípica.

5. Los efectos observados en las plantas sobreexpresoras de *SAMDC1* pueden deberse al aumento en los niveles endógenos de Spm. La aplicación exógena de Spm provoca en *Col0* unas variaciones en la expresión génica y en el contenido en ACC, etileno y ABA similares a las presentes en las plantas transgénicas. En cambio la aplicación de Put o Spd no provoca tales cambios. Así mismo, la sobreexpresión de

*ADC2* y consecuente aumento de Put no da lugar a unos resultados similares a los obtenidos al sobreexpresar *SAMDC1*.

6. La sobreexpresión de *SAMDC1* y el aumento de Spm provoca una disminución en la síntesis de etileno que puede ser debida a una inhibición por la Spm de la actividad ACC sintasa y/o oxidasa. Esta reducción en los niveles de etileno podría ser la responsable de la inducción de la síntesis del ácido jasmónico y ácido abscísico observadas en las plantas transgénicas. A su vez, la inducción de estas rutas de síntesis daría lugar al aumento de expresión de genes de respuesta a estrés biótico y abiótico.

## **6. BIBLIOGRAFÍA.**

- ACOSTA C (2004) Genes de la biosíntesis de poliaminas: localización de sus transcritos en tomate y alteración de la expresión de *ADC* y *ODC* tomate y *Arabidopsis*. Tesis Doctoral.
- ALCÁZAR R (2004) Efectos de la sobreexpresión de *Arginina descarboxilasa2* en el desarrollo de *Arabidopsis*. Tesis Doctoral.
- AZIZ, A, LARHER F (1995) Changes in polyamine titers associated with the proline response and osmotic adjustment of rape leaf discs submitted to osmotic stresses. *Plant Science*. **112**, 175-186
- AZIZ A, MARTIN-TANGUY J, LARHER F (1998). Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. *Physiologia Plantarum*. **104**: 195-202
- BAGNI N, TASSONI A (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**: 301-317
- BAKER CJ, ORLANDI EW (1995) Active Oxygen in Plant Patogénesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**, 299-321.
- BAKER S.S., WILHELM K.S., THOMASHOW M.F. (1994) The 5' region of *Arabidopsis thaliana* cor 15a has cis-acting elements that confer cold-, drought-, and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology* **24**, 701-713
- BAUMANN E, LEWALD J, SAEDLER H, SCHULZ B, WISMAN E. (1998) Successful PCR-based reverse genetic screens using an En-1-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via singla-seed descent. *Theoretical Applied Genetics*. **97**:729-734
- BELL E, CREELMAN RA, MULLET JE (1995) A chloroplast lipoxigenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*; **92**(19):8675-9.
- BENT AF, INNES RW, ECKER JR, STASKAWICZ BJ.(1992) Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent

- Pseudomonas and Xanthomonas pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**:372-378
- BESFORD RT, RICHARDSON CM, CAMPOS JL, TIBURCIO AF (1993) Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes of thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* **189**, 201-206
- BEY P, DANZIN C, JUNG M (1987). Inhibition of basic amino acid decarboxylases involved in polyamine biosynthesis. McCann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A (Eds) *Inhibition of Polyamine metabolism*. Academic Press, Orlando. 1-32
- BHATNAGAR P, MINOCHA R, MINOCHA S. (2002) Genetic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. The regulation of putrescine catabolism. *Plant Physiology*. **128**:1455-1469
- 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
- BOLLER T (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214.
- BONETTA D, McCOURT P. (1998) Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends in Plant Science* **3**, 231-235
- BORRELL A, BESFORD RT, ALTABELLA T, MASGRAU C, TIBURCIO AF (1996) Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Physiologia Plantarum* **98**, 105-110
- BORRELL A, CARBONELL L, FARRAS, PUIG-PARELLADA, TIBURCIO AF (1997) Inhibition of lipid peroxidation by polyamines in senescent oat leaves in vivo. *Physiologia Plantarum* **99**, 385-390.
- BOUCHEREAU A, AZIZ A, LARHER F, MARTIN-TANGUY J (1999) Polyamines and environmental changes: recent development. *Plant Sci.* **140**:103-125

- BORS W, LANGERBARTELS C, MICHEL C, SANDERMAN HJ (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry* **28**: 1580-1595
- BOYER JS (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448
- BRATTON DL. (1994) Polyamine inhibition of transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the erythrocyte ghost. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:22517-22523
- BRAY EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**: 48-54
- BRAY E.A., BAILEY-SERRES J., WERETILNYK E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: Gruissen W. Buchannan B., Jones R. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD; pp 1158-1249.
- BREGOLI AM, SCARAMAGLI S, COSTA G, SABATINI E, ZIOSI V, BIONDI S, TORRIGIANI P (2002). Peach (*Prunus persica*) fruit ripening: aminoethoxyvinylglycine (AVG) and exogenous polyamines affect ethylene emission and flesh firmness. *Physiol Plant*. **114** (3):472-481.
- CAMPOS JL, FIGUERAS X, BORONAT A, PINOL MT, TIBURCIO F (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.
- CAPELL T, ESCOBAR C, LIU H, BURTIN D, LEPRI O, CHRISTOU P.(1998) Overexpression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) affects normal development patterns in vitro and results in putrescine accumulation in transgenic plants. *Theoretical Applied Genetics*. **97**:246-254
- CAPELL T, BASSIE L, CHRISTOU P (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc Natl Acad Sci*; **101**(26):9909-14.

- CARDON GH, FREY M, SEADLER H, GIERL A.(1993). Mobility of the maize transposable element En/Spm in *Arabidopsis Thaliana*. *The Plant Journal*. **3**:773-784
- CARBONELL J, NAVARRO JL (1989) Correlation of spermine level with ovary senescence and fruit set and development in *Pisum Sativum* L. *Planta* **178**, 482-487.
- CHATTOPADHAY MK, GUPTA S, SENGUPTA DN, GHOSH B (1997). Expression of arginine decarboxylase in seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as affected by salinity stress. *Plant Molecular Biology*. **34**: 477-483
- CLARKE DD (1982) The accumulation of cinnamic acid amides in the cell walls of potato tissue as an early response to fungal attack. In Wood RKS (Ed), *Active Defence Mechanisms in Plants*. Plenum Press, London, p.321.
- COHEN E, ARAD S, HEIMER YM, MIZRAHI Y. (1982) Participation of ornithine decarboxylase in early stages of tomato fruit development. *Plant Physiol*. **70**:540
- COHEN SS (1998). *A guide to the Polyamines*. Oxford University Press, Oxford.
- COLLADO M (2004) Caracterización de la respuesta a estreses abióticos de plantas de *Arabidopsis* sobreexpresoras del gen de la S-adenosil-L-metionina descarboxilasa-1. Trabajo De investigación.
- COPPOC GL, KALLIO P, WILLIAMS-ASHMAN HG. (1971) Characteristics of S-adenosylmethionine decarboxylase from various organisms. *Int. J. Biochem*. **2**:673
- CORBINEAU F, RUDNICKI RM, COME D (1989) ACC conversion to ethylene by sunflower seeds in relation to maturation, germination and thermodormancy. *Plant Growth Regul* **8**: 105-115
- COWLEY T, WALTERS DR (2002a) Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. Sp. *Hordei*. *Plant, Cell and Environment* **25**, 461-468.

- COWLEY T, WALTERS DR (2002b) Polyamine metabolism in an incompatible interaction between barley and the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. Sp. *Hordei*. *Journal of Phytopathology* **150**, 1-7.
- CUSHMAN JC, BOHNERT HJ (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* **3**:117–124
- DANGL JL, DIETRICHRA, RICHBURG MH (1996) Death don't have mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, **8**, 1793-1807.
- DAVIS PJ, RASTOGI R, LAW DM.(1991) Polyamines and their metabolism in ripening tomato fruit. In: FLORES HE, ARTECA RN. (Eds.), Polyamines and Ethylene: Biosynthesis, Physiology and Interactions. pp:112-125. Rockville, Maryland American Society of Plant Physiology.
- DELLEDONNE M, ZEIER J, MAROCCO A, LAMB CJ (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 13454-59.
- DEMPSEY DA, PTHIRANA MS, WOBBE KK, KLESSIG DF (1997) Identification of an Arabidopsis locus required for resistance to turnip crinkle virus. *Plant J.* **11**, 301-311.
- DEMPSEY D, SHAH J, KLESSIG DF (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit.Rev. Plant Sci.* **18**, 547-575.
- DEVOTO A, TURNER JG (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in Arabidopsis. *Ann. Bot.* **92**:329-337
- 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
- DONG X (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 316-323.
- DRESSELHAUS T, BARCELO P, HAGEL C, LÖRZ H, HUMBECK K. (1996) Isolation and characterization of a tritordeum cDNA encoding S-

- adenosilmethionine 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
- DURNER J, KLESSIG DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Sci* **2**, 369-374.
- EBEL J, COSIO EG (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev.Cytol.* **148**, 1-36.
- 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
- EISEN, MB, SPELLMAN PT, BROWN PO AND BOSTEIN D (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14863-14868.
- EL-KAZAZ MK, CHORDAS A, KADER AA (1983a) Physiological and compositional changes in orange fruit in relation to modification of their susceptibility to *Penicillium italicum* by ethylene treatments. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* **108**:618-62
- EL-KAZAZ MK, SOMMER NF, FORTLAGE RJ. (1983b) Effects of different atmospheres on postharvest decay and quality of fresh strawberries. *Phytopathology.* **73**:282-285
- EVANS PT, MALMBERG RL. (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Annual Review of Plant Physiology.* **40**:235-269
- FEIRER RP, HOCKING KL, WOODS PJ, (1998) Involvement of arginine decarboxylase in the response of *Arabidopsis thaliana* to osmotic stress. *Journal of Plant Physiology* **153**, 733-738.
- FEYS BJ, PARKER JE (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet* **10**, 449-455

- FLOR H (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275-296
- FLORES HE. (1991) Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. En: Slocum R, Flores HE (Eds). *The Biochemistry and Physiology of Poliamines 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 Physiology* **75**, 102-109
- FRANCESCHETTI M, HANFREY C, SCARAMAGLI S, TORRIGIANI P, BAGNI N, BURTIN D, MICHAEL AJ (2001) Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-l-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *Biochem J.* **353**(Pt 2):403-9.
- FRANCESCHETTI M, PERRY B, THOMPSON B, HANFREY C, MICHAEL AJ (2004). Expression proteomics identifies biochemical adaptations and defense responses in transgenic plants with perturbed polyamine metabolism. *FEBS Lett.* **576**(3):477-80.
- 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 as polyamine biosynthetic inhibitor. *Plant J.* **7**:261-271
- FRUEHLING M, PUEHLER A, PERLICK AM (2000). Isolation and characterization of a full-length c-DNA (accession no.AJ250026) encoding S-adenosylmethionine decarboxylase from broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol.* **122**: 620-620
- GALSTON AW, KAUR-SAWHNEY RK (1990). Polyamines in plant physiology. *Plant physiology* **94**, 406-410
- GALSTON AW, KAUR-SAWHNEY R, ALTABELLA T, TIBURCIO AF (1997) Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot. Acta.* **110**, 197-207.

- GATZ C, FROHBERG 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.* **2**(3):397-404.
- GÓMEZ-GÓMEZ L, BOLLER T (2000) FLS2: An LRR receptor like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagelin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* **5**, 1003-1011 (2000).
- GREENLAND, A.J., LEWIS, D.H., 1984. Amines in barley leaves infected with brown rust and their possible relevance to formation of 'green islands'. *New Phytologist* **96**, 283-291
- GRILL E, HIMMELBACH A (1998) ABA signal transduction. Current opinion in *Plant Biology* **1**: 412-418
- GROPPA MD, BENAVIDES MP, TOMARO ML (2003) Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under calcium or copper stress. *Plant Science* **164**, 293-299
- GUO ZJ, CHEN XJ, WU XL, LING JQ, XU P (2004) Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol.* **55**(4):607-18.
- HA HC, SIRISONA NS, KUPPUSAMY P, ZWEIER JL, WOSTER PM, CASERO RA Jr (1998) The natural polyamide spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11140-11145
- HAMANA K, MASAHIMO K, ONISHI H, AKAZAWA T, MATSUZAKI S.(1985) Polyamines in photosynthetic eubacteria and extreme halophile archaeobacteria. *Journal of Biochemistry.* **97**:1653-1658
- 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.
- HAMMOND- KOSACK KE, JONES JDG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773-1791.

- HANFREY C, FRANCESCHETTI M, MAYER MJ, BURTIN D, MICHAEL AJ (2002) Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *J Biol Chem.* **277**, 44131-44139
- HANFREY C, SOMMER S, MAYER MJ, BURTIN D, MICHAEL AJ (2001). Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J.* **27**(6):551-60.
- HANSEN CH, WITTSTOCK U, OLSEN CE, HICK AJ, PICKETT JA, HALKIER BA (2001) Cytochrome P450 CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates. *J Biol Chem.* **276**(14):11078-85.
- HANZAWA Y, TAKAHASHI T, KOMEDA Y (1997). ACL5: an Arabidopsis gene required for internodal elongation after flowering. *Plant J.* **12**(4):863-74.
- HEBY O, PERSSON L. (1990) Molecular genetics of polyamine synthesis in eucaryotic cells. *Trends Biochem. Sci* **15**: 475-479
- HEAGLE AS. (1989) Ozone and crop yield. *Annu. Rev. Phytopatol.* **27**:397-412
- 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 spermine synthase in mammalian cells. *FEBS Lett.* **116**: 99-101
- HIRAGA S, ITO H, YAMAKAWA H, OHTSUBO N, SEO S, MITSUHARA L, MATSUI H, HONMA M, OHASHI Y (2000) An HR- induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine but not to salicylate, methyl jasmonate and ethephon. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 210-216.

- HOFFMAN NE, YANG SF, MCKEON T (1982) Identification of 1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan **29**;104(2):765-70.
- ICEKSON I, GOLGLUST A, APELBAUM A (1985) Influence of ethylene on S-adenosylmethionine decarboxylase activity in etiolated pea seedlings. *J. Plant. Physiol.* **119**. pp. 335-345.
- INGRAM J, BARTELS D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Biol* **47**:377-403
- ISHIGURO S, KAWAI-ODA A, UEDA J, NISHIDA I, OKADA K (2001) The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell.* **13**(10):2191-209.
- IWASAKI T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K (1995) Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 391-398
- JABS T, COLLING C, TSCHÖPE M, HAHLBROCK K, SCHEEL D (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and reactive oxygen species from the oxidative burst signal defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* **94**, 4800-5.
- JABS T, DIETRICH RA, DANGL JL (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**, 1853-56.
- JIANG C, LU B, SINGH J. (1996). Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the *BN115* gene from winter *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **30** 679-684
- 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

- KEEN NT (1990) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet* **24**, 447-463.
- KHAN AU, MEI YH, WILSON T (1992) A proposed function for spermidine and spermine : protection of replicated DNA against damage by singlet oxygen. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1126-1127
- KIDATA M, IGARASHI K, HIROSE S, KITAGAWA H (1979) Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **87**: 388-394
- KINNEY AJ (1998) Manipulating flux through plant metabolic pathways. *Curr Opin Plant Biol* **1**:173-178
- KING EO, WARD MK, RANEY DE (1954). Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med* **44**, 301-307.
- KISHOR KPB, HONG Z, MIAO GH, HU CAA, VERMA DPS (1995) Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* **108**:1387-1394
- KNEISSL ML, DEIKMAN J (1996) The tomato E8 gene influences ethylene biosynthesis in fruit but not in flowers. *Plant Physiol* **112**: 537-547.
- KNIGHT H, KNIGHT MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* **6**:262-267
- KNOESTER M, VAN LOON LC, VAN DEN HEUVEL J, HENNING J, BOL JF, LINTHORST HJM.(1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:1933-1937
- 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
- KRAMER GF, WANG CY.(1989) Correlation of reduced chilling injury with increased spermidine 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
- KUEHN GD, RODRIGUEZ-GARAY B, BAGGA S, PHILLIPS GC (1990). Novel occurrence of uncommon polyamines in higher plants. *Plant Physiology.* **94**: 855-857
- KUMAR A, ALTABELLA T, TAYLOR MA, TIBURCIO A. (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant. Sci.* **2**(4): 124-130
- 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, MINOCHA SC (1998) Transgenic manipulation of polyamine metabolism. In K Lindsey, ed, *Transgenic Research in Plants*. Harwood Academic Publishing, London, pp:189-199
- KUMRIA R, RAJAM MV (2002) Ornithine decarboxylase transgene in tobacco affects polyamines, in vitro morphogenesis and response to salt stress. *J. Plant Physiol.* **159**, 183-190.
- KUREPA J, SMALLE J, MONTAGU MV, INZE D (1998) Polyamines and paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology.* **39**, 987-992.
- KUSANO T, BERBERICH T, HARADA M, SUZUKI N, SUGAWARA K (1995) A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature. *Mol. Gen. Genet.* **248**: 507-517
- 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
- LAMB C, DIXON RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.
- 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
- LAWTON K, WEYMANN K, FRIEDRICH L, VERNOOIJ B, UKNES S, RYALS J (1995) Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant-Microbe Interact* **8**:863-870
- 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
- LEUNG J, GIRAUDAT J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **49**:199-222
- LEVITT J (ED) (1980). Chilling, freezing and high temperature stress. Responses of Plants to Environmental Stress, vol 1. New York: Academic Press.
- LI ZY, CHEN SY. (2000) Isolation and characterization of a salt and drought-inducible gene for S-adenosylmethionine decarboxylase from wheat (*Triticum aestivum* L.) *J. Plant Physiol.* **156**:386-398
- LINDSEY K, editor (1998) Transgenic Research in Plants, Harwood Academic Publishing, London, pp:1-286
- LIU HP, LIU J, ZHANG YY, LIU YL (2004) Relationship between AtPase activity and conjugated polyamines in mitochondrial membrane from wheat seedling roots under osmotic stress. *J Environ Sci.* **16**(5):712-6.
- LOVAAS, E. (1997) Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv. Pharmacol.* **38**: 119-149

- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. (1951) Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275
- LUND ST, STALL RE, KLEE H (1998) Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell.* **10**, 371-382.
- 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
- MAIALE S, SÁNCHEZ DH, GUIRADO A, VIDAL A, RUIZ OA (2004) Spermine accumulation under salt stress. *J. Plant. Physiol.* **161**, 35-42.
- MALAMY J, CARR JP, KLESSIG DF, RASKIN I (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, **250** 1002-1004.
- MALAMY J, KLESSIG DF (1992) Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J.* **2**, 643-654.
- MALMBERG A (1984) N-feruoylputrescine in infected potato tubers. *Acta Chemica Scandinavica* **B38**, 153-155.
- MALMBERG RJ, McINDOO J (1983) Abnormal floral development of a tobacco mutant with elevated polyamine levels. *Nature*, **305**, 623-625.
- MALMBERG RL, ROSE DJ. (1987) Biochemical genetics of resistance to MGBG in tobacco: mutants that alter SAM decarboxylase or polyamine ratios and floral morphology. *Molecular and General Genetics.* **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
- MARCO F, CARRASCO P (1996) Arabidopsis thaliana S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) mRNA, complete cds. Accesión Number U63633. Genebank.

- MARCO F (2000) Regulación de la S-adenosilmetionina descarboxilasa durante el desarrollo de *Pisum Sativum* y *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral.
- MARCO F, CARRASCO P (2002) Expression of the pea S-adenosylmethionine decarboxylase gene is involved in developmental and environmental responses. *Planta*; **214**(4):641-7.
- MARCO F, CALVO E, CARRASCO P, SANZ MJ (2003) Physiological and molecular responses of pea plants to ozone stress. *Recent Res. Plant Mol. Biol.* **1**, 66-77.
- MARTÍN-TANGUY J, MARTÍN C, GALLET M, (1973) Presence de composés aromatiques liés à la putrescine dans divers *Nicotiana* virus. *Comptes Rendus des Seances de L'Academie des Sciences*, Paris **D276**, 1433-1435.
- MARTÍN-TANGUY J, MARTÍN C, GALLET M, VERNROY R (1976) Sur les puissants inhibiteurs de multiplication du virus de la mosaïque de tabac. *Comptes Rendus des Seances de L'Academie des Sciences*, Paris **D282**, 2231-2234.
- MARTÍN-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.
- 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**(3):465-73.
- McCARTY DR (1995) Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* **46**, 71-93
- McDOWELL JM, DANGL JL (2000) Signal transduction in the plant innate immune response. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 79-82.
- McDOWELL JM, WOFFENDEN BJ (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends Biotechnol.* **21**(4):178-83. Review.
- McLUSKY SR, BENNET MH, BEALE MH, LEWIS MJ, GASKIN P, MANSFIELD JW (1999) Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by

- Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant Journal* **17**, 523-534.
- 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
- 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
- MENKES AE, SCHINDLER U, CASHMORE AR (1995) The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by GBF family of bZIP proteins. *Trends in Biochemical Science* **20**: 506-510
- MÉTRAUX JP, SIGNER H, RYALS J et al (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, **250**, 1004-1005.
- MINOCHA, R., MINOCHA, S., SIMOLA, L.K., 1995. Somatic embryogenesis, polyamines in woody plants. In: Jain, S.M., Gupta, P.K., Newton, R.J. (Eds.), *Somatic Embryogenesis and Polyamines in Woody Plants*, Vol I. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 337–359.
- MIRZA JI, IQBAL M. (1997) Spermine-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with developmental abnormalities. *Plant Growth Regulation*, **222**:151-156
- MURASHIGE T, SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. **15**:473-497
- NAKAGAWA H, OHMIYA K, HATTORI T (1996) A rice bZIP protein, designated OSBZS, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant J* **9**: 221-227
- NAKASHIMA K, KIYOSUE T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K (1997) A nuclear gene *erd1* encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally upregulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **12**, 851-861.

- NANDI A, KACHROO P, FUKUSHIGE H, HILDEBRAND DF, KLESSIG DF, SHAH J (2003) Ethylene and jasmonic acid signaling affect the NPR1-independent expression of defense genes without impacting resistance to *Pseudomonas syringae* and *Peronospora parasitica* in the Arabidopsis ssi1 mutant. *Mol Plant Microbe Interact.* Jul; **16**(7):588-99.
- NEGREL J, VALLE JC, MARTÍN C (1984) Ornithine decarboxylase activity and the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **23**, 2747-2751.
- 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
- NORMAN SM, POLLING SM, MAIER VP (1988) An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for (+) – abscisic acid in Citrus Ricinus, and Xanthium leaves. *J. Agric. Food Chem.* **36**: 225-231.
- NAVAKOUDIS E, LUTZ C, LANGEBARTELS C, LUTZ-MEINDL U, KOTZABASIS K (2003) Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochim Biophys Acta.* **1621**(2):160-9.
- NUCCIO ML, RHODES D, McNEIL SD, HANSON AD (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**:128-134
- ORMROD DP, BEKERSON DW. (1986) Polyamines as antiozonants for tomato. *Hortsci.* **21**:1070-1071
- 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
- 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 5-methylthion-adenosine metabolism. En: McCann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A (Eds.) Inhibition of Polyamine Metabolism. Academic Press. Orlando. pp: 33-48
- PELLEGRINI L, ROHFRIETSCH O, FRITIG B, LEGRAND M (1994) Phenylalanina ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiology* **106**, 877-886.
- PENNINCKX IAMA, EGGERMONT K, TERRAS FRG, THOMMA BPHJ, DE SAMBLANT GW, BUCHALA A, METRAUX JP, MANNERS JM, BROEKAERT WF (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309-2323.
- PENNINCKX IA, THOMMA BP, BUCHALA A, METRAUX JP, BROEKAERT WF.(1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell*; **10**(12):2103-13.
- PHILLIPS GC, KUEHN GD (1991) Uncommon polyamines in plants and other mechanisms. In: Slocum RD, Flores HE (Eds), Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants, pp: 121-133.- Boca Raton, FL, CRC Press
- PIETERSE CMJ, VAN LOON LC (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* **4**, 52-58.
- PIETERSE CMJ, WEES SCM, VAN HOFFLAND E, PELT JA, VAN LOON LC (1996) Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**, 1225-1237..
- RACZ I, KOVACS M, LASZTITY D, VEISZ O, SZALAI G, PALDI E. (1996) Effects of short-term and long-term low temperatures stress on polyamine biosynthesis in wheat genotypes with varying degrees of frost tolerance. *Journal of Plant Physiology.* **148**:368-373

- RAISON JK, LYONS JM. (1970) Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.* **45**:386-289
- RAJASEKARAN WY, BLAKE TJ (1998) Early growth inbigation of jack pine seedlings by natural plant growth regulators. *Trees.* **12**, 420-423.
- RASK L, ANDREASSON E, EKBOM B, ERIKSSON S, PONTOPPIDAN B, MEIJER J (2000) Myrosinase: Gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*. *Plant Mol. Biol.* **42** 93–113.
- REA G, METOUI O, INFANTINO A, FEDERICO R, ANGELINI R (2002). Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiol.* **128**(3):865-75.
- REDDY GN, ARTECA RN, DAI YR, FLORES HE, NEGM FB, PELL EJ. (1993) Changes in ethylene and polyamines in relation to mRNA levels of the large and small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in ozone stressed potato foliage. *Plant Cell Environment.* **16**:819-826
- RICHARDS FJ, COLEMAN EG (1952) Ocurrence of putrescine in potassium defecient barley. *Nature* **170**: 160-161
- RIECHMANN JL, HEARD J, MARTIN G, REUBER L, JIANG C, KEDDIE J, ADAM L, PINEDA O, RATCLIFFE OJ, SAMAHA RR. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**:2105–2110
- ROGERS S, WELLS R, RECHETEINER M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hipotesis. *Science* **234**:364-368
- RORAT T, GRYGOROWITZ WJ, BERBEZY P, IRZYKOWSKY W. (1998) Isolation and expression of cold specific genes in potato (*Solanum soganandium*). *Plant Science* **133**:57-67
- ROUSSOS PA, PONTIKIS CA, TSANTILI E (2002) Root promoting compounds detected in olive knot extract in high quantities as a response to infection by the bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*. *Plant Science* **163**, 3, 533-541.

- 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, GHOSH B (1996) Polyamines, both common and uncommon, under stress in rice (*Oryza sativa*) callus. *Physiologia Plantarum.* **98**: 196-200
- ROY M, WU R.(2001) Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Sci.* **160**, 869-879.
- ROY M, WU R.(2002) Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Science.* **163**:987-992
- 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
- RUSHTON PJ, SOMSSICH IE (1998). Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **1**:311-315.
- RYALS JA, NEUENSCHWANDER UH, WILLIS MG, MOLINA A, STEINER HY, HUNT MD (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819.
- SAMBORSKI DJ, ROHRINGER R (1970) Abnormal metabolites of wheat: occurrence, isolation and biogenesis of 2-hydroxy-putrescine amides. *Phytochemistry* **9**, 1939-1945.
- SANDERMANN H, ERNST D, HELLER W, LANGERBARTELS C (1998). Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends Plant Sci* **3** (2): 47-50
- SATOH S, YANG SF (1989) Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by L-vinylglycine as related to the mechanism-based inactivation of the enzyme by S-adenosyl-L-methionine. *Plant Physiol.* **91**: 1036-1039.
- SCARAMAGLI S, BIONDI S, CAPITANI F, GEROLA P, ALTAMURA M M, TORRIGIANI P (1999) Polyamine conjugate levels and ethylene biosynthesis: inverse relationship with vegetative bud formation in tobacco thin layers. *Physiologia Plantarum.* **105**, (2), 366.

- 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
- SEO HS, SONG JT, CHEONG JJ, LEE YH, LEE YW, HWANG I, LEE JS, CHOI YD (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci.* **98** (8):4788-93.
- SERRANO R, MULET JM, RIOS G, MARQUEZ JA, de LARRINOA IF, LEUBE MP, MENDIZABAL IM, PASCUAL-AHUIR A, PROFT M, ROS R, MONTESINOS C (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during SALT stress. *J. EXP. BOT.* **50**, 1023-1036.
- SHAH J, KLESSIG DF (1999) Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones. Eds, HOOYKAS PPJ, HALL MA, LIBBENGA KR (Elsevier, Amsterdam) , pp 513-541.
- 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
- SHARMA YK, DAVIS KR (1994)\_Ozone-Induced Expression of Stress-Related Genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **105** (4):1089-1096.
- SHEN W, NADA K, TACHIBANA S (2000) Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiology.* **124**, 431-439.
- SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology* **7**: 161-167
- SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* **115**:327-334
- SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**:217-223

- SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Op. Plant Physiol.* **6**: 410-417
- SLOCUM RD, FLORES H.E., 1991. Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 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
- SLOCUM RD, KAUR-SAWHNEY R, GALSTON AW (1984) The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch Bioch Biophys* **235**: 283-303
- SLOCUM RD, RICHARDSON DP (1991) Purification and characterization of ornithine transcarbamylase from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* **96**:262-8.
- SMIRNOFF N (1998) Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* **9**:214-219
- SMITH TA, BEST GR (1978) Distribution of the hordatines in barley. *Phytochemistry* **17**, 1093-1098.
- SOAR CJ, PRESTON C, KAROTAM J, POWLES SB (2004) Polyamines can inhibit paraquat toxicity and translocation in the broadleaf weed *Arctotheca calendula*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **80**, 94-105.
- SOYKA S, HEYER A (1999) *Arabidopsis* knockout mutation of ADC2 gene reveals inducibility by osmotic stress. *FEBBS Letters* **458**, 219-223
- STANLEY BA, PEGG AE, HOLM I. (1989) Site of pyruvate formation and processing of mammalian S-adenosilmethionine 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 catalitic activity. *J. Biol. Chem.* **266**:18502-18506

- STASWICK PE, YUEN GY, LEHMAN CC. (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* **15**; 747-754
- STEFANELLI C, BONAVITA F, STANIC I, MIGNANI M, FACCHINI A, PIGNATTI C, FLAMIGNI F, CALDARERA CM (1998) Spermine causes caspase activation in leukemia cells. *FEBS Letters* **437**, 233-236.
- STOCKINGER EJ, GILMOUR SJ, THOMASHOW MF (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **94**, 1035-1040
- SU J, SHEN Q, HO T-HD, WU R.(1998) Dehydration-stress-regulated transgene expression in stably transformed rice plants. *Plant Physiology*. 117:913-922
- 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.
- TAN BC, JOSEPH LM, DENG WT, LIU L, LI QB, CLINE K, MCCARTY DR (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* **35**(1):44-56.
- 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
- THOMASHOW MF (1994) *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In E Meyrowitz, C Somerville, eds, *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- THOMASHOW MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**,571-599

- THOMMA BPHJ, EGGERMONT K, PENNINCKX IAMA, MAUCH-MANI B, VOGELSANG R, CAMMUE BPA, BROEKAERT WF (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci*; **95**(25):15107-11.
- THOMMA BPHJ, PENNINCKX IAMA, BROEKAERT WF, CAMMUE BPA. (2001) The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:63-68
- THU-HANG P, BASSIE L, SAFWAT G, TRUNG-NGIA P, CHRISTOU P, CAPELL T (2002). Expression of a heterologous *S-Adenosylmethionine Decarboxylase* cDNA in plants demonstrates that changes in S-Adenosyl-L-Methionine Decarboxylase activity determine levels of the higher polyamines spermidine and spermine. *Plant Physiol.* **129**: 1744-1754
- TIAN AG, ZHAO JY, ZHANG JS, GAI JY, CHEN SY (2004). Genomic characterization of the S-adenosylmethionine decarboxylase genes from soybean. *Theor Appl Genet.* **108**(5):842-50.
- TIBURCIO AF, CAMPOS JL, FIGUERAS X, BESFORD RT (1993) Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant Gr. Regul.* **12**, 331-340.
- TIBURCIO AF, BESFORD RT, BORRELL A (1994) Posttranslational regulation of arginine decarboxylase synthesis by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Biochem. Soc. Trans.* **22** (4), 455S.
- TIBURCIO AF, ALTABELLA T, BORRELL A, MASGRAU CM. (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant.* **100**:664-674
- TORRIGIANI P, RABITI AL, BORTOLOTTI G, BETTI L, MARANI F, CANOVA A, BAGNI N (1997) Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist* **135**, 467-473.
- TRULL MC, HOLAWAY BL, MALMBERG RL. (1992) Development of stigmatoid anthers in a tobacco mutant – implications for regulation of stigma differentiation. *Canadian Journal of Botany.* **70**:2339-2346

- TRUNG-NGHIA P, BASSIE L, SAFWAT G, THU-HANG P, LEPRI O, ROCHA P, CHRISTOU P, CAPELL T.(2003) Reduction in the endogenous arginine decarboxylase transcript levels in rice leads to depletion of the putrescine and spermidine pools with no concomitant changes in the expression of downstream genes in the polyamine biosynthetic pathway. *Planta.* ; **218**(1):125-34
- TUOMINEN H, OVERMEYER K, KEINÄNEN M, KOLLIST H, KANGASJÄRVI J (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **39**, 59-69.
- UKNES S, MAUCH-MANI B, MOYER M et al (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **4** , 645-656.
- UMEZAWA T, YOSHIDA R, MARUYAMA K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K(2004) SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*.
- VAN CAMP W, VAN MONTAGU M, INZÉ D (1998) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance *Trends Plant Sci.* **3**, 330-334.
- 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
- VERICA J, HE ZH (2002) The cell wall-associated kinase (*WAK*) and *WAK*-like kinase gene family. *Plant Physiol* **129** (2002), pp. 455–459.
- VIERLING E, KIMPEL JA (1992) Plant responses to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* **3**:164–170
- VIJAYAN P, SHOCKEY J, LEVESQUE CA, COOK RJ, BROWSE J.(1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:7209-7214
- VON ROPENACK E, PARR A, SCHULZE-LEFERT P (1998) Structural analysis and dynamics of soluble cell wall bound barley phenolics and their role in a

- broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus. *Journal of Biological of Biological Chemistry* **273**, 1289-1300.
- WAIE B, RAJAM MV (2002) Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Science*, May, vol. **164**, no. 5, 727-734(8)
- WALDEN R, CORDEIRO A, TIBURCIO AF. (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol.* **113**:1009-1013
- WALTER-SIMMONS M (1987) ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol* **84**: 61-66
- WALTERS, D.R., WILSON, P.W.F., SHUTTELTON, M.A., 1985. Relative changes in levels of polyamines and activities of biosynthetic enzymes in barley infected with the powdery mildew fungus, *Erysiphe graminis* DC. Ex Merat f. sp. hordei Marchal. *New Phytologist* **101**, 695–705.
- WALTERS DR, MEURER-GRIMES B, ROVIRA I (2001). Antifungal activity of three spermidine conjugates. *FEMS Microbiology Letters* **10030**, 1-4.
- WALTERS, D.R., WYLIE, M.A., 1986. Polyamines in discrete regions of barley leaves infected with the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*. *Physiologia Plantarum* **67**, 630–633.
- WANG KLC, LI H, ECKER JR. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell.* **14**:131-151
- WANG WX, VINOCUR B, SHOSEYOV O, ALTMAN A (2001). Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort* **560**:285–292
- WANG WX, BARAK T, VINOCUR B, SHOSEYOV O, ALTMAN A (2003). Abiotic resistance and chaperones: possible physiological role of SP1, a stable and stabilizing protein from *Populus*. In: Vasil IK (ed) *Plant biotechnology 2000 and beyond*. Kluwer, Dordrecht, pp 439–443

- WARD ER, UKNES SJ, WILLIAMS SC, DINCHER SS, WIEDERHOLD DL, ALEXANDER DC, AHL-GOY P, METRAUX JP, RYALS JA (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **3**, 1086-1094.
- WEILER EW (1980) Radioimmunoassays for the differential and direct analysis of free and conjugated acisisc acid in plant extracts. *Planta* **148**, 262-272
- WENDEHENNE D, PUGIN A, KLESSIG DF, DURNER J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci. Apr*; **6**(4):177-83. Review.
- WILLIAMS-ASHMAN HG, SCHENONE A. (1972) Methyl glyoxal bis (guanylhydrazone) as a potent inhibitor of mammalian and yeast S-adenosylmethionine decarboxylases. *Biochem Biophys Res Commun.* **14**; **46**(1):288-95.
- XIONG H, STANLEY BA, TEKWANI BL, PEGG AE. (1997) Processing of mammalian and plant S-adenosylmethionine decarboxylase proenzymes. *J. Biol. Chem.* **272**:28342-28348
- XU Y, CHANG PFL, LIU D, NARASINHAN ML, RAGHOTHANMA KG, GASEGAWA PM, BRESSAN RA (1994) Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *Plant Cell* **6**, 1077-1085.
- YAMAKAWA H, KAMAD H, SATOH M, OHASHI Y (1998) Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **118**, 1213-1222.
- YAMANOHA B, COHEN SS. (1985) S-Adenosylmethionine decarboxylase and spermine synthase from Chinese cabbage. *Plant Physiol.* **78**:784-790
- YANG Y, SHAH J, KLESSIG DF (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* **11**, 1621-1639.
- YOSHIDA I, HIRASAWA E (1998) Photoinduction of arginine decarboxylase activity in leaves of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry Dec*; **49**(8):2255-9.

- 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.
- ZHU JK (2001a) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* **6**:66–71
- ZHU JK (2001b) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology* **4**:401–406
- ZHU JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**:247–73
- ZHU JK, HASEGAWA PM, BRESSAN RA (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit Rev Plant Sci* **16**:253–277

# ANEXO

## Descripción de genes analizados

Abreviatura	Descripción	Implicado en
<i>ACC oxidasa</i>	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa	Síntesis etileno
<i>ACC sintasa</i>	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa	Síntesis etileno
<i>ADC1</i>	arginine decarboxylase 1	Síntesis PAs
<i>ADC2</i>	arginine decarboxylase 2	Síntesis PAs
<i>AOC1</i>	allene oxide cyclase 1	Síntesis ácido jasmónico
<i>AOC2</i>	allene oxide cyclase 2	Síntesis ácido jasmónico
<i>AOS</i>	allene oxide synthase	Síntesis ácido jasmónico
<i>cor15a</i>	cold regulated 15a	Respuesta a estrés abiótico
<i>cyp79f1</i>	cytochrome P79f1	Respuesta a estrés biótico
<i>DAD1</i>	defective anther dehiscence1	Síntesis ácido jasmónico
<i>EDS1</i>	enhanced disease susceptibility 1	Respuesta a estrés biótico
<i>EDS5</i>	enhanced disease susceptibility 5	Respuesta a estrés biótico
<i>FLS2</i>	flagellin-sensitive 2	Respuesta a estrés biótico
<i>JMT</i>	jasmonic acid carboxyl methyl transferase	Síntesis metiljasmonato
<i>LOX2</i>	lipoxygenase 2	Síntesis ácido jasmónico
<i>NCED3</i>	9-cis epoxycarotenoid dioxygenase 3	Respuesta a estrés abiótico
<i>NPR1</i>	nonexpressor of pr genes 1	Respuesta a estrés biótico
<i>PAD4</i>	phytoalexin-deficient 4	Respuesta a estrés biótico
<i>PR-1</i>	pathogen related 1	Respuesta a estrés biótico
<i>PR2</i>	pathogen related 2	Respuesta a estrés biótico
<i>PR5</i>	pathogen related 5	Respuesta a estrés biótico
<i>rd22bp1</i>	rd22 binding protein 1	Respuesta a estrés abiótico
<i>rd26</i>	responsive to dessication 26	Respuesta a estrés abiótico
<i>rd29a</i>	responsive to dessication 29a	Respuesta a estrés abiótico
<i>SAMDC1</i>	S-adenosil-L- metionina descarboxilasa 1	Síntesis PAs
<i>SPDS1</i>	espermidina sintasa 1	Síntesis PAs
<i>SPMS</i>	espermina sintasa	Síntesis PAs
<i>VSP1</i>	vegetative storage protein 1	Señalización por etileno
<i>WAK1</i>	wall-associated kinase 1	Respuesta a estrés biótico