



V Reunión de Biología Molecular de Plantas

Alicante, 25-27 de noviembre de 1999

Organizador: *José Luis Micol Molina*

División de Genética

Universidad Miguel Hernández

**V Reunión
de
Biología Molecular de Plantas**

**25-27 de noviembre de 1999
Alicante**

**Organizador:
José Luis Micol Molina**

**División de Genética
Universidad Miguel Hernández**

Entidades colaboradoras

Universidad Miguel Hernández
Generalitat Valenciana
Ayuntamiento de Alicante
Caja de Ahorros del Mediterráneo
Bancaja
Sociedad Española de Biotecnología
Sociedad Española de Fisiología Vegetal
Sociedad Española de Genética
Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular
Perkin Elmer Biosystems Hispania
Ecogen
Fundación Antama
Jardinería Huerto del Cura

Organiza: Universidad Miguel Hernández
Coordina: José Luis Micol Molina
Depósito Legal: A-1011-1999
Imprime: Limencop S.L. Elche

Indice general

Programa de la reunión.....	7
Indice de las comunicaciones orales	9
Indice de los pósters	13
Resúmenes de las comunicaciones orales	23
Resúmenes de los pósters	87
Indice de autores	231

Programa de la reunión

Jueves, 25 de noviembre, en el Hotel Meliá Alicante

- 8:00-9:30 Entrega de documentación en la recepción del Hotel Meliá
9:30-9:45 Bienvenida
9:45-11:30 Sesión I.- *Regulación de la expresión génica*
Moderador: Gregorio Nicolás Rodrigo, Universidad de Salamanca.
11:30-12:00 Descanso para tomar café
12:00-14:15 Sesión II.- *Desarrollo*
Moderadora: Carmen Fenoll Comes, Universidad de Castilla-La Mancha, Toledo.
14:15-16:00 Comida de trabajo, en el Hotel Meliá
16:00-17:30 Pósters
17:30-18:00 Descanso para tomar café
18:00-20:00 Sesión III.- *Metabolismo*
Moderador: Albert Boronat Margosa, Universidad de Barcelona.
20:30-22:30 Cóctel de bienvenida, en el Castillo de Santa Bárbara, ofrecido por el Ayuntamiento de Alicante

Viernes, 26 de noviembre, en el Hotel Meliá Alicante

- 9:00-11:00 Sesión IV.- *Estrés abiótico*
Moderadora: Montserrat Pagés Torrent, Centro de Investigación y Desarrollo, Barcelona.
11:00-11:30 Descanso para tomar café
11:30-13:30 Sesión V.- *Estrés biótico*
Moderadora: Carmen Castresana, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid.
13:30-15:00 Comida de trabajo, en el Hotel Meliá
15:00-16:00 Pósters
16:00-17:00 Sesión VI.- *Fitopatógenos*
Moderador: Ricardo Flores Pedauye, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia.
17:00-17:30 Descanso para tomar café
17:30-18:30 Sesión VII.- *Otras comunicaciones*
Moderador: Luis Navarro, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia.
18:30-20:00 Mesa redonda: *El futuro de la genómica de plantas en España*
Moderador: José Pío Beltrán Porter, Centro de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia.
Ponentes:
Pere Puigdomènech i Rosell, Instituto de Biología Molecular, Barcelona.
José Miguel Martínez Zapater, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid.
Rafael Lozano Ruiz, Universidad de Almería.
Javier Paz-Ares, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid.
20:00-22:00 Recogida de pósters

Sábado, 27 de noviembre, en el Hotel Meliá

- 9:00-12:30 *Plant biotechnology* (Sesión patrocinada por la Sociedad Española de Biotecnología)
- 9:00-10:30 *From projects to reality*
Modification of starch structure and functionality in transgenic potato tubers. Dr. James Lloyd, Max-Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Golm, Alemania.
Improving fruit quality through biotechnology. Dr. Rachel Hackett, University of Nottingham, Reino Unido.
The way to reality from a Spanish University. Prof. Francisco García Olmedo, Universidad Politécnica de Madrid, España.
- 10:30-11:00 Descanso para tomar café
- 11:00-12:30 *Some industrial perspectives*
Plant Biotechnology in Agriculture. Dr. Georges Freyssinet, RHOBIO (Rhone Poulenc, Limagrain), Francia.
Production of Carotenoids and Xanthophylls in Brassica seeds. Dr. Luis Pérez Grau, CALGENE (Grupo Monsanto), USA.
CropDesign: A functional genomics company with a focus on the cell cycle. Prof. Dirk Inzé, CropDesign, Bélgica.
- 12:30-13:00 Conclusiones y perspectivas
Entrega del "Premio al mejor póster", dotado por Ecogen con 100.000 pesetas
Jurado:
Albert Boronat Margosa, Universidad de Barcelona
Rafael Lozano Ruiz, Universidad de Almería
Antonio J. Palomares Díaz, Universidad de Sevilla
Entrega del "Premio a la mejor comunicación oral presentada por un investigador joven", dotado por PE Biosystems Hispania con 100.000 pesetas
Jurado:
Francisco García Olmedo, Universidad Politécnica de Madrid
Gregorio Nicolás Rodrigo, Universidad de Salamanca
Blanca San Segundo de los Mozos, Centro de Investigación y Desarrollo, Barcelona
- Clausura de la reunión.
- 13:15 Desplazamiento de los congresistas, en autobús, desde el Hotel Meliá al Hotel Huerto del Cura
- 14:00-14:30 Visita al Palmeral de Elche y al Jardín Huerto del Cura
- 14:30-... Comida de clausura en el Hotel Huerto del Cura

Índice de las comunicaciones orales

Regulación de la expresión génica

IDENTIFICACIÓN DE UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN MYC ESPECÍFICO PARA EL ELEMENTO DE RESPUESTA A JASMONATO PRESENTE EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN LEUCINA AMINOPEPTIDASA. Boter, M., Ruíz-Rivero, O., y Prat, S.....	26
FACTORES TRANSCRIPCIONALES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA SEMILLA DE MONOCOTILEDÓNEAS Y DICOTILEDÓNEAS. Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Díaz, I., y Carbonero, P.....	28
CLONAJE Y MODELO DE EXPRESION DE UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE TIPO myb DE FRESA (<i>Fragaria x ananassa</i> cv Chandler). López Raéz, J.A., Blanco Portales, R., Caballero, J.L., Moyano, E., y Muñoz Blanco, J.....	29
ABI3 FUNCIONA COMO COACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN EMBRIONARIA DE UN GEN sHSP. Rojas, A., Almoguera, C., y Jordano, J.....	30
CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN GRUPO DE GENES IMPLICADOS EN LA CASCADA DE RESPUESTA AL ETILENO EN SEMILLAS DE HAYA. Calvo, A.P., Lorenzo, O., Nicolás, C., Nicolás, G., y Rodríguez, D.....	31
CONTROL DE LA TRANSPONICION Y SILENCIAMIENTO GENICO. Beguiristain, T., Puigdomènech, P., y Casacuberta, J.M.	32
REQUERIMIENTO DEL SPLICING DEL INTRÓN PARA QUE SE EDITE EL PUNTO III DEL TRANSCRITO DEL GEN <i>ndhA</i> . del Campo, E.M., Sabater, B., y Martín, M.....	33

Desarrollo

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA QUINASA CK2 DURANTE EL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR EN LAS CÉLULAS DE TABACO BY-2. Espunya, M.C., y Martínez, M.C.....	36
CRIOCRÓMOS: UNA FAMILIA DE RECEPTORES DE LUZ AZUL EN PLANTAS Y ANIMALES. Jarillo, J.A., Ahmad, M., y Cashmore, A.R.	37
REGULACIÓN DEL TIEMPO DE FLORACIÓN POR EL RELOJ CIRCADIANO Y EL FOTOPERÍODO A TRAVÉS DE <i>CONSTANS</i> . Suárez López, P., Wheatley, K., Igeño, M.I., Robson, F., y Coupland, F.....	38
<i>FALSIFLORA</i> , EL GEN ORTÓLOGO A <i>FLORICAULA</i> Y <i>LEAFY</i> , CONTROLA EL TIEMPO DE FLORACIÓN Y LA IDENTIDAD DEL MERISTEMO FLORAL EN TOMATE. Molinero-Rosales, N., Jamilena, M., Angosto, T., Zurita, S., Capel, J., y Lozano, R.....	39

AGL2, 4 Y 9 SIRVEN DE NEXO DE UNIÓN ENTRE LOS GENES DE IDENTIDAD DE MERISTEMO FLORAL Y LOS DE ÓRGANO FLORAL. Pelaz, S., y Yanofsky, M.F.....	40
ESTUDIO FUNCIONAL DE GENES MADS DE GUISANTE EN SISTEMAS HETERÓLOGOS. Berbel, A., Madueño, F., Cañas, L.A., y Beltrán, J.P.....	41
ESTUDIO DE LA FUNCION DE TCP1, EL GEN ORTOLOGO A <i>cycloidea</i> EN <i>Arabidopsis</i> . Cubas Domínguez, P., y Martínez-Zapater, J.M.....	42
GENETICA MOLECULAR DEL DESARROLLO DE LAS CELULAS DE TRANSFERENCIA DEL GRANO DE MAIZ. ¿ES ZmMRP-1 EL REGULADOR MAESTRO DEL PROCESO?. Royo, J., Gómez, E., Dávila, J., Sanz, Y., y Hueros, G.	43
REGULATION OF RIPENING-RELATED GENES IN BELL PEPPER: METABOLIC CONTROL OF A GENE ENCODING A PR-10 TYPE PROTEIN (<i>Sn-1</i>) IN TRANSGENIC TOBACCO AND TOMATO PLANTS. Pozueta-Romero, J., Moreno-Bruna, B., Houlné, G., Chamarro, J., y Schantz, R.....	44

Metabolismo

FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASAS QUIMERICAS CON REGULACION REDOX DEPENDIENTE DE LA LUZ. Cazalis, R., Chueca, A., y López Gorgé, J.....	48
ENZIMAS DESRAMIFICADORAS DE ALMIDON EN TUBERCULO DE PATATA. Bustos, R., Smith, A., y Martin, C.....	49
REGULACION CIRCADIANA DE LA BIOSINTESIS DEL ALMIDON. Mérida, A., Tenorio, G., y Romero, J.M.....	50
BIOSINTESIS DE ISOPRENOIDES: EFECTO DE LA SOBREEXPRESION DE LA ENZIMA FARNESILDIFOSFATO SINTASA EN PLANTAS TRANSGENICAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . Masferrer, A., Arró, M., Boronat, A., y Ferrer, A.....	51
RELACIÓN DE LA VÍA DE SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES INDEPENDIENTE DE MEVALONATO (VÍA DE ROHMER) CON LA CAROTENOGÉNESIS DURANTE LA MADURACIÓN DEL FRUTO DE TOMATE. Lois, L.M., Rodríguez-Concepción, M., Campos, N., y Boronat, A.....	52
CONTROL DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS POR CITOQUININAS ENDOGENAS EN PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO Y MUTANTES DE <i>Arabidopsis</i> . Cordeiro, A., Panicot, M., Bortolotti, C., Altabella, T., Koncz, C., Schmölling, T., y Tiburcio, A.F.....	53
ESTUDIOS DE LA ASIMILACIÓN DE NITRATO EN LA ESTIRPE SILVESTRE Y PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>Lotus japonicus</i> . Orea, A., Pajuelo, P., Pajuelo, E., Romero, J.M., y Márquez, A.J.....	54
XYL-1: EL GEN DE UNA α -XILOSIDASA DE PARED CELULAR EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . Sampedro, J., Sieiro, C., Revilla, G., Villa, T.G., y Zarra, I.....	55

Estrés abiótico

- IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES DE *Arabidopsis thaliana* ALTERADOS EN SU RESPUESTA AL AYUNO DE FOSFATO. Rubio, V., Martín, A.C., Solano, R., Iglesias, J., del Pozo, J.C., de la Peña, A., Leyva, A., y Paz-Ares, J. 58
- LA ACTIVIDAD ADOMET SINTETASA ES ESENCIAL PARA LA LIGNOSUBERIZACION DE LOS TEJIDOS VASCULARES Y SU ADAPTACION AL ESTRÉS HIDRICO Y SALINO. Sánchez Aguayo, I., Rodríguez Galán, J.M., Espartero, J., y Pardo, J.M. 59
- ARABIDOPSIS THALIANA a1HAL3: UNA FLAVOPROTEÍNA RELACIONADA CON EL CRECIMIENTO Y EL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO. Espinosa-Ruiz, A., Cutanda, M.C., Cortina, C., Romero, C., Hernández-Acosta, P., Bellés, J. M., y Culiáñez Macià, F.A. 60
- CARACTERIZACION DE LOS MUTANTES *salobreño* DE *Arabidopsis thaliana*. Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M.R., y Micol, J.L. 61
- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL ABA EN MAÍZ. Lumbreras, V., Kizis, D., y Pagés, M. 62
- CHAPERONAS DE BAJO PESO MOLECULAR: PROTECCION IN VIVO FRENTE A TEMPERATURAS ALTAS Y BAJAS. Soto, A., Allona, I., Collada, C., Guevara, M.A., Casado, R., Rodríguez-Cerezo, E., Aragoncillo, C., y Gomez, L. 63
- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN GEN DE ARABIDOPSIS INDUCIBLE POR FRIO QUE CODIFICA UNA PROTEINA CON SIMILITUD A UN INTERCAMBIADOR DE H⁺/Ca²⁺. Catalá, R., y Salinas, J. 64
- UNA LIPOXIGENASA DE LA RUTA DE SINTESIS DE ALDEHIDOS C-6 EN PATATA ES NECESARIA PARA LA RESISTENCIA A BACTERIAS. León, J., Sanz, C., Royo, J., Vancanneyt, G., Sánchez Serrano, J.J. 65

Estrés biótico

- MECANISMOS MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN ENTRE BACTERIAS DEL GÉNERO *ERWINIA* Y SUS PLANTAS HOSPEDADORAS. López-Solanilla, E., Miguel, E., Poza-Carrión, C., Aguilar, I., Llama-Palacios, A., García-Olmedo, F., y Rodríguez-Palenzuela, P. 68
- PROMOTORES DE GEMINIVIRUS Y SU REGULACIÓN. Muñoz-Martín, A., Herreros, E., Collin, S., Fernández-Lobato, M., y Fenoll, C. 94
- MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A PATÓGENOS MEDIADOS POR ETILENO. Solano, R., Berrocal, M. y Molina, A. 70
- PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARROZ QUE EXPRESAN UN INHIBIDOR DE PROTEASAS DE MAÍZ (gen *mpi*) SON RESISTENTES FRENTE AL INSECTO LEPIDÓPTERO *Chilo suppressalis*. Vila, L., Murillo, I., Marfá, V., Meynard, D., Messeguer, J., Guiderdoni, E., y San Segundo, B. 71

ANÁLISIS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS CARACTERÍSTICAS DE UNA EXPLOSIÓN OXIDATIVA EN LA SIMBIOSIS *Sinorhizobium meliloti*-ALFALFA. Soto, M.J., Bueno, P., Sanjuan, J., Donaire, J.P., y Olivares, J. 72

UNA NUEVA RUTA DE SINTESIS DE OXILIPINAS INVOLUCRADA EN LA RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL. Sanz, A., Ponce de León, I., Hamberg, M., y Castresana, C. 73

GENES DE PECTIN METIL-ESTERASA EN *Medicago truncatula*: DOS MECANISMOS DE EVOLUCIÓN MOLECULAR DISTINTOS EXPLICAN EL RECLUTAMIENTO DE ACTIVIDAD PME EN LA SIMBIOSIS CON *Sinorhizobium meliloti*. Pérez-Hormaeche, J., Kondorosi, A., Ratet, P. y Palomares, A.J. 74

UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS RESISTENTES A GEMINIVIRUS. Franco, M., Flores, A., Morilla, G., y Bejarano, E.R. 187

Fitopatógenos

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL HONGO *Spilocaea oleagina*, AGENTE QUE CAUSA LA ENFERMEDAD DEL REPILO EN EL OLIVO. Gonzalez, R., Trapero, A., Valpuesta, V. y Botella, M.A. 76

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE REPLICACIÓN DEL POTYVIRUS PLUM POX VIRUS (PPV). Escribano, V., Ribera, E., García, J.A., y Rodríguez-Cerezo, E. 77

SITIOS DE INICIACIÓN DE LA SINTESIS DE LOS RNAs DE AMBAS POLARIDADES EN UN VIROIDE CON RIBOZIMAS DE CABEZA DE MARTILLO. Navarro, J.A., y Flores, R. 78

CORRELACIÓN ENTRE DOMINIOS SECUENCIALES DE LA MOLÉCULA VIROIDAL 'CEVd' Y SU FUNCIONALIDAD. Bordas, M., Lisón, M.P., y Conejero, V. 79

Otras comunicaciones

PAPEL DE *BARE-1* EN LA EVOLUCIÓN DEL GENOMA EN EL GÉNERO *HORDEUM*. Vicient, C.M., Suoniemi, A., Anamthawat-Jonsson, K., Tanskanen, J., Beharav, A., Nevo, E., y Schulman, A.H. 82

MAPADO DE ALTA RESOLUCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES DEL MELÓN. INICIO DE UN PROYECTO GENOMA. Garcia-Mas, J., van Leeuwen, H., Morales, M., Arús, P., Puigdomènech, P., y Monfort, A. 83

ANÁLISIS DE VARIACIÓN EN PLANTAS REGENERADAS DE *Arabidopsis thaliana* MEDIANTE AFLPs. Polanco de la Puente, C., y Ruiz Sánchez, M.L. 84

MEJORA DE CÍTRICOS MEDIANTE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA. Peña, L., Cervera, M., Ghorbel, R., Domínguez, A., Fagoaga, C., Juárez, J., Pina, J.A., y Navarro, L. 85

Índice de los pósters

Regulación de la expresión génica

REGULACION DEL GEN γZ : RELEVANCIA DE LAS SECUENCIAS PROLAMIN-BOX Y GZM. Marzabal, P., Torrent, M., Vicente-Carvajosa, J., Schmidt, R.J., y Ludevid, D.	90
CARACTERIZACION DE TRES VARIANTES DE UNA NUEVA SUBCLASE DE bHLH ORIGINADAS MEDIANTE SPLICING ALTERNATIVO EN XILEMA DE PINO. Allona, I., Lu, J., Quinn, M., y Whetten, R.W.	91
CLONAJE DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS E INACTIVACIÓN DE LAS GIBERELINAS EN ADELFA. ESTUDIO DE SU POLIADENILACIÓN. Úbeda, S., García-Martínez, J.L., y López-Díaz, I.	92
REGULACION DE LA EXPRESION DE UN GEN DE <i>Arabidopsis thaliana</i> QUE CODIFICA LA ASNASA 2. Casado Díaz, A., Botella, M.A., y Muñoz Blanco, J.	93
ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN <i>LEMM19</i> : IDENTIFICACION DE SECUENCIAS IMPLICADAS EN LA ACTIVACIÓN GENICA POR NEMÁTODOS. Sanz-Alfárez, S., Aristizábal, F., González, V., Boronat, A., y Fenoll, C.	95
ESTRUCTURA, ORGANIZACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN FACTOR 5 DEL INICIO DE LA TRADUCCIÓN EN EUKARIOTAS, eIF-5, EN <i>Zea mays</i> . López Ribera, I., y Puigdomènech, P.	96
A NOVEL RNA-BINDING PROTEIN PUTATIVELY INVOLVED IN THE POST-TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF A CYTOSOLIC ASCORBATE PEROXIDASE GENE. Carrasco, J.L., Gadea, J., Conejero, V., y Vera, P.	97
REGULACION POR LA LUZ DE LA EXPRESION DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS DEL METABOLISMO DE GIBERELINAS EN PLANTULAS ETIOLADAS DE GUISANTE. Gil, J., Alvarez, I., y García-Martínez, J.L.	98
LA FAMILIA DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES DOF DE CEBADA: AISLAMIENTO DE GENES Y CARACTERIZACION DE SUS PATRONES DE EXPRESION. Isabel, I., Mena, M., y Carbonero, P.	99
ELEMENTOS EN <i>CIS</i> REQUERIDOS PARA LA EXPRESIÓN ESPECÍFICA EN SEMILLAS DE UN GEN Shsp. Carranco, R., Almoguera, C., y Jordano, J.	100
CARACTERISTICAS MOLECULARES Y DE EXPRESION DE UN GEN DE FRESA (<i>Fragaria x ananassa</i> cv Chandler) QUE CODIFICA UNA ENDO-POLIGALACTURONASA. Redondo-Nevado, J., Yubero, E., Caballero, J.L., y Muñoz Blanco, J.	101
ESTUDIO DE LOS PATRONES DE EXPRESION DE LOS GENES FPS1 Y FPS2 DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . Cunillera, N., Manzano, D., Boronat, A., y Ferrer, A.	102

Desarrollo

GIBERELINAS Y FOTOPERIODO EN EL PROCESO DE TUBERIZACIÓN. Rodríguez, M., y Prat, S.	104
PHOR16 DE PATATA: IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO GRUPO DE PROTEÍNAS VEGETALES CON HOMOLOGÍA A ARMADILLO DE DROSOPHILA, CON UNA FUNCIÓN EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL DE GIBERELINAS. Amador, V., Monte, E., y Prat, S.	105
EL GEN MADS-BOX <i>FRUITFULL</i> DETERMINA LA IDENTIDAD DE LAS VALVAS EN LOS CARPELOS DE <i>Arabidopsis</i> . Ferrándiz, C., Sato, S., Liljegren, S.J., y Yanofsky, M.F.	107
GA 3 β -HIDROXILASA DE PATATA. Bou, J., García-Martínez, J.L., y Prat, S.	108
IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA MORFOGÉNESIS DEL FRUTO EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . CARACTERIZACIÓN GENÉTICO-MOLECULAR DE MUTANTES SEÑALIZADOS MEDIANTE INSERCIONES DE T-DNA. Martínez- Laborda, A., Ripoll, J.J., y Vera, A.	109
IDENTIFICACION DE GENES IMPLICADOS EN LA EMBRIOGENESIS DEL MAIZ. Bastida, M., Jahrman, T., Stiefel, V., y Puigdomènech, P.	110
RELACION DE DOS GENES DE FRESA (<i>Fragaria x ananassa</i> cv Chandler) CON LOS PROCESOS DE LIGNIFICACION QUE OCURREN EN EL FRUTO A LO LARGO DE SU CRECIMIENTO Y MADURACION. Blanco Portales, R., Medina-Escobar, N., Moyano, E., Caballero, J.L., y Muñoz Blanco, J.	111
ANÁLISIS GENÉTICO DEL DESARROLLO FLORAL EN <i>Pisum sativum</i> . Navarro, C., Ferrándiz, C., Madueño, F., y Beltrán, J.P.	112
EL PROMOTOR <i>END1</i> DE GUISANTE DIRIGE LA EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE GENES FORÁNEOS HACIA LAS ANTERAS. Gómez, M.D., Cañas, L.A., y Beltrán, J.P.	113
DESARROLLO DE RAICES LATERALES EN <i>Arabidopsis</i> : NITRATO Y AUXINA. Lorenzo, H., Zhang, H., y Forde, B.	114
IMPLICACIÓN DE PECTATO LIASAS DE FRESA EN EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL FRUTO. Benitez-Burraco, A., Redondo-Nevado, J., Muñoz Blanco, J., y Caballero, J.L.	115
MUERTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE EL DESARROLLO Y LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE TRIGO. Domínguez, F., González, M.C., Serrato, A.J., Sánchez, R., Moreno, J., y Cejudo, F.J.	116
CARACTERIZACION DE UN RECEPTOR QUINASA ATIPICO EXPRESADO EN TEJIDOS MERISTEMATICOS DEL MAIZ. Llompert, B., Río, A., Puigdomènech, P., y Casacuberta, J.M.	117
CONTROL DE LA EXPRESION DEL GEN <i>MIXTA</i> DE <i>ANTIRRHINUM MAJUS</i> . Pérez- Rodríguez, M.J., y Martin, C.R.	118

ANÁLISIS CLONAL DE LA EXPANSIÓN DE LA EPIDERMIS FOLIAR DE ARABIDOPSIS. Serna, L., Torres, J., y Fenoll, C.....	119
UN DOMINIO PEPTIDICO RICO EN CISTEINAS ES RESPONSABLE DEL ANCLAJE DE LAS PROTEINAS TLRP A LA PARED CELULAR. Domingo, C., Sauri, A., y Vera, P.....	120
EXPRESION DE GENES DE EXPANSINA Y ACTINA Y CAPACIDAD DE ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO EN <i>PINUS</i> sp. Y <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . Garrido, G., Martín, M., Sabater, B., y Díaz-Sala, C.....	121
ANALISIS GENETICO Y MOLECULAR DE MUTANTES DE <i>Arabidopsis thaliana</i> CON ALTERACIONES EN LA MORFOLOGIA DE LA HOJA. Robles, P., Candela, H., Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., Piqueras, P., Vera, A., Martínez-Laborda, A., y Micol, J.L.....	122
EL GEN <i>HEMIVENATA</i> PARTICIPA EN LA FORMACION DEL PATRON VASCULAR DE LAS HOJAS DE <i>Arabidopsis thaliana</i> . Candela, H., Martínez-Laborda, A., y Micol, J.L.	123
ANALISIS GENETICO Y MOLECULAR DE LOS MUTANTES <i>ultracurvata</i> DE <i>Arabidopsis thaliana</i> . Pérez-Pérez, J.M., Ponce, M.R., y Micol, J.L.	124
PATRÓN TISULAR DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO DE PINO. Suárez, M.F., Claros, M.G., y Cánovas, F.M.....	125
CARACTERIZACION DE PSCP: UNA SERIN-CARBOXIPEPTIDASA INDUCIDA DURANTE EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE GUISANTE. Cercos, M., Urbez, C., y Carbonell, J.	126
LA HIPOMETILACION RETRASA LA FLORACION EN PRIMULA. Gisbert, E., Fraga, M., Arrollo, R., Sánchez Serrano, J.J., Martínez-Zapater, J.M., y Borja, M.	127
EL DESARROLLO ESTOMATAL COMO PARTE DEL PROGRAMA FOTOMORFOGÉNICO. Torres Contreras, J., y Fenoll, C.	128
IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA FAMILIA GÉNICA POSIBLEMENTE IMPLICADA EN EL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE <i>Arabidopsis</i> . Franco-Zorrilla, J.M., Cubas, P., Jarillo, J.A., Fernández-Calvín, B., Salinas, J., y Martínez-Zapater, J.M.	130
CAP 28, UN cDNA DE <i>Cicer arietinum</i> IMPLICADO EN EL PROCESO DE CRECIMIENTO. Romo, S., Dopico, B., y Labrador, E.....	131
CARACTERIZACIÓN DE <i>esd1</i> , UN MUTANTE DE FLORACIÓN TEMPRANA DE <i>Arabidopsis thaliana</i> . Gómez-Mena, C., Martín-Trillo, M.M., Ruiz-García, L., Salinas, J., y Martínez-Zapater, J.M.....	132
EXPRESIÓN DE DOS PROTEÍNAS FOSFATASAS DEL TIPO 2C (FsPP2C1 Y FsPP2C2) REGULADAS POR ÁCIDO ABCSÍCO EN SEMILLAS DURMIENTES DE HAYA. Lorenzo, O., Calvo, A.P., Nicolás, G., Rodríguez, D., y Nicolás, C.	133

UNA PROTEÍNA NUCLEAR DE GUISANTE COMPARTE CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES CON LAS VICILINAS Y CON LAS LEA. Castillo, J., Rodrigo, M.I., y Franco, L.	134
CLONACION DE GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A GIBERELINAS. Urbez, C., Cercos, M., y Carbonell, J.	136
LA SOBREEXPRESION DE UNA GA 20-OXIDASA ATIPICA DE CALABAZA (<i>Cm20ox1</i>) CONFIERE, CONTRARIAMENTE A LO ESPERADO, UN FENOTIPO ALARGADO EN TABACO. Gisbert, C., García-Martínez, J.L., Hedden, P., Phillips, A.L., Croker, S.J., y López-Díaz, I.	137
CLONACIÓN DE UN C-DNA CON POSIBLE FUNCIÓN RECEPTOR QUINASA EN CONÍFERAS. Avila, C., y Cánovas, F.M.	138
REDUCCION DE LA ALTURA DE PLANTAS DE TABACO MEDIANTE RNA ANTISENTIDO Y COSUPRESION CON UN GEN DE UNA GA 20-OXIDASA DE NARANJO. Gisbert, C., Vidal, A., García-Martínez, J.L., y López-Díaz, I.	139
COORDINACION GENETICA Y MOLECULAR DE LOS PROGRAMAS QUE DETERMINAN LA ARQUITECTURA FLORAL. Egea-Cortines, M.	140

Metabolismo

EXPRESIÓN DE $xPPAR\alpha$ EN PLANTAS DE <i>NICOTIANA TABACUM</i> : EFECTO SOBRE EL METABOLISMO OXIDATIVO Y DE ÁCIDOS GRASOS. Nila, A.G., Sandalio, L.M., López, M.G., Gómez, M., Gómez-Lim, M., y del Rfo, L.A.	142
BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN PLANTAS: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ACETOACETIL-CoA TIOLASA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . Ahumada, I., Campos, N., y Boronat, A.	143
LOCALIZACION SUBCELULAR Y POSIBLE FUNCION FISIOLÓGICA DE UNA METALOTIONEÍNA DE FRESA (<i>Fragaria x ananassa</i> cv Chandler). Moyano, E., López-Raéz, J., Blanco Portales, R., Muñoz, E., Caballero, J.L., y Muñoz Blanco, J.	144
ANÁLISIS MOLECULAR DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN Y HOMOGLUTATIÓN EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS. Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Clemente, M.R., y Becana, M.	145
STUDY OF MAIZE LIGNIN BIOSYNTHETIC PATHWAY. Ruelland, E., Rigau, J., y Puigdomènech, P.	147
FLS2: UN RECEPTOR-QUINASA INVOLUCRADO EN EL RECONOCIMIENTO DE LA FLAGELINA EN <i>ARABIDOPSIS</i> . Gomez Gomez, L., y Boller, T.	148
MODELO DE EXPRESION DE UN GEN DE FRESA (<i>Fragaria x ananassa</i> cv Chandler) QUE CODIFICA UNA PIRUVATO DESCARBOXILASA ESPECIFICA DE FRUTO. Moyano, E., López-Raéz, J.A., Caballero, J.L., y Muñoz Blanco, J.	149

CARACTERIZACIÓN DE ‘PINALATE’, UN MUTANTE DE NARANJA CON FRUTOS DE COLORACIÓN ALTERADA. AISLAMIENTO DE cDNAs Y EXPRESIÓN DE GENES DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN CÍTRICOS. Marcos, J.F., Alférez, F., Mallent, D., Lafuente, T., y Zacarías, L.	150
ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PEPC DE SEMILLAS DE <i>AMARANTHUS EDULIS</i> SILVESTRE Y DEL MUTANTE LaC ₄ 2.16. Alvarez, R., García-Mauriño, S., Vidal, J., y Echevarría, C.	151
LOCALIZACION DE ENZIMAS BIOSINTETICAS DE POLIAMINAS EN TABACO. Bortolotti, C., Cordeiro, A., Alcazar, R., Borrell, A., Tiburcio, A.F., y Altabella, T.	152
UNA NUEVA ISOFORMA DE LA Cu/Zn SUPEROXIDO DISMUTASA CLOROPLASTICA EN EL ECOTIPO Cvi DE <i>Arabidopsis thaliana</i> . Abarca, D., Roldán, M., Sabater, B., y Martín, M.	153
REGULACION ESPACIAL Y TEMPORAL DE TRES GENES DIFERENTES DE LA OLEATO DESATURASA MICROSOMAL (<i>FAD2</i>) DE GIRASOL NORMAL Y ALTO OLEICO. Martínez-Rivas, J.M., y Heinz, E.	154
CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA 3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL-CoA SINTASA DE <i>Arabidopsis thaliana</i> . Diez, E., y Boronat, A.	155
PROPIEDADES DE LA DESOXIXILULOSA-5-FOSFATO REDUCTOISOME-RASA, EL ENZIMA QUE CATALIZA LA PRIMERA ETAPA ESPECÍFICA DE LA VÍA DE SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN CLOROPLASTOS. Besumbes, O., Querol, J., Boronat, A., e Imperial, S.	156
ANÁLISIS MEDIANTE LA TÉCNICA DEL DOBLE-HÍBRIDO DE INTERACCIONES ENTRE LAS ENZIMAS QUE CATALIZAN LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA VÍA DE BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . Leivar, P., González, V., Ahumada, I., Diez, E., Campos, N., y Boronat, A.	157
CLONACION Y EXPRESION DE ENZIMAS DE <i>Digitalis purpurea</i> : HOMOLOGIA CON ALDOSA REDUCTASAS. Gavidia, I., Pérez-Bermúdez, P., y Seitz, H.U.	158
PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-HYDROXY KINASE IN THE LEGUME- <i>Rhizobium</i> INTERFACE. Hernández, L.E., Escobar, C., Drøbak B.K., Bisseling, T., y Brewin, N.J.	159
CLONAJE DE SUSTRATOS PROTEICOS DE P69A, UNA PROTEASA DEL TIPO SUBTILISINA DE PLANTAS DE TOMATE. Jordá, L., Sotolongo, M., Conejero, V., y Vera, P.	161
PRENILACIÓN Y REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA CALMODULINA DE PETUNIA CaM53. Rodríguez-Concepción, M., y Gruissem, W.	162
CLONACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA COPALILDIFOSFATO SINTASAS DEL HÍBRIDO CITRANGE CARRIZO. ANÁLISIS DE LOS PARENTALES. Alapont, C.P., Vidal, A.M., Talón, M., y García-Martínez, J.L.	163
S-ADENILMETIONINA DESCARBOXILASA DE GUISANTE: UN GEN IMPLICADO EN PROCESOS DE DESARROLLO Y RESPUESTA A ESTRES AMBIENTAL. Carrasco, P., y Marco, F.	164

HOMOLOGOS DE FACTORES DE LA HOMEOTASIS DEL COBRE EN <i>Arabidopsis thaliana</i> . Mira, H., Sancenón, V., Martínez-García, F., y Peñarrubia, L.	165
TRANSFORMACION DE TOMATES CON UN GEN QUE AUMENTA LOS NIVELES DE ACIDO INDOL-3-ACÉTICO, BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR DE LA POLIGALACTURONAS. Rambla, J.L., y Chamarro, J.	166
CARACTERISTICAS DE EXPRESION ESPACIAL DEL PROMOTOR DE LA ASPARRAGINASA-1 DE <i>Arabidopsis thaliana</i> . Casado Díaz, A., Botella, M.A., y Muñoz Blanco, J.	167
RESPUESTA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> AL ANTISENSE DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA CLOROPLASTÍDICA DE GUISANTE. Sahrawy, M., Avila, C., Chueca, C., Ortega, C., Cánovas, F., y López Gorgé, J.	168

Estrés abiótico

IDENTIFICATION OF A SMALL HEAT SHOCK PROTEIN (Cp shsp1) AND ANALYSIS OF THE HEAT SHOCK RESPONSE IN <i>Craterostigma plantagineum</i> . Schiliro, E., Bartels, D., y Salamini, F.	170
EXPRESION DEL GEN DE LEVADURA TPS1 (TREHALOSA-6-FOSFATO-SINTETASA) EN PLANTAS DE TOMATE. Cortina, C., Romero, C., Espinosa-Ruiz, A., Cutanda, M.C., Hernández-Acosta, P., Bellés, J.M., y Culiáñez-Macià, F.A.	171
EXPRESIÓN DEL GEN DOGR2 (2-DEOXYGLUCOSA-6-FOSFATO FOSFATASA) DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN EL MUTANTE TPS1 (TREHALOSA-6-FOSFATO SINTETASA) DE LEVADURA Y EN TABACO TRANSGÉNICO : PAPEL DE LOS METABOLITOS EN LA SEÑALIZACIÓN POR GLUCOSA Y TOLERANCIA A LA CARENCIA DE FÓSFORO. Cutanda, M.C., Romero, C., Espinosa-Ruiz, A., Cortina, C., Hernández-Acosta, P., Bellés, J.M., y Culiáñez-Macià, F.A.	172
SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> AFECTADOS EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE PROLINA. Hernández-Acosta, P., Cutanda, M.C., Aguado, C., Espinosa-Ruiz, A., Romero, C., Cortina, C., Bellés, J.M., y Culiáñez-Macià, F.A.	173
ANÁLISIS GENÉTICO DE LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO EN TOMATE. Borsani, O., Laguna, L., Cuartero, J., Valpuesta, V., y Botella, M.A.	174
Qs_HSP17 Y OTRAS smHSPs CLASE I DE ALCORNOQUE. Figueras, M., Jofré, A., Pla, M., Puigderrajols, P., Verdaguer, D., Mir, G., Huguet, G., y Molinas, M.	175
LAS BAJAS TEMPERATURAS DISMINUYEN LOS NIVELES DE cLTP, UN mRNA QUE CODIFICA UNA "PROTEINA TRANSPORTADORA DE LIPIDOS", EN FRUTOS CITRICOS SENSIBLES AL FRIO. Sanchez-Ballesta, M.T., Lafuente, M.T., Zacarías, L., y Granell, A.	176
FUNCION DE LAS FOSFATASAS 2Ac EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES EN RESPUESTA A HERIDA Y ACIDO JASMONICO EN <i>Arabidopsis thaliana</i> . Pernas, M., Rojo, E., y Sánchez Serrano, J.J.	177

IDENTIFICACIÓN DE UN ANTIPORTADOR Na ⁺ /H ⁺ DE ARABIDOPSIS. Quintero, F.J., Blatt, M.R., y Pardo, J.M.....	178
ANALISIS DE LA EXPRESION DEL GEN <i>rcila</i> DURANTE EL DESARROLLO DE ARABIDOPSIS Y EN RESPUESTA A DIFERENTES FACTORES BIOTICOS Y ABIOTICOS. Fernández-Calvín, B., Leyva, A., Martínez-Zapater, J.M., y Salinas, J.	179
REGULACIÓN TRADUCIONAL Y ESPECIFICIDAD DE TEJIDO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS sHSP EN RESPUESTA AL CALOR. Almoguera, C., Rojas, A., Coca, M.A., y Jordano, J.....	180
UN GEN DE ARABIDOPSIS, INDUCIBLE POR FRIO, CODIFICA UNA PROTEINA CON SIMILITUD A MONOXIGENASAS. López-Cobollo, R.M., Catalá, R., y Salinas, J.	181
EXPRESIÓN Y TRADUCCIÓN <i>in vitro</i> DE UN GEN DE FRESÓN QUE CODIFICA UNA QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO. Llop-Tous, I., Domínguez-Puigjaner, E., Palomer, X., y Vendrell, M.	182

Estrés biótico

EL ETILENO Y EL ACIDO SALICILICO COMO MEDIADORES DEL BLOQUEO POR PATOGENOS DE LA SINTESIS DE INHIBIDORES DE PROTEASAS DE RESPUESTA A HERIDA. Fayos, J., Medina, M.E., Bellés, J.M., y Conejero, V.....	69
CISTATINAS Y MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS: NUEVAS ACTIVIDADES ACARICIDAS Y ANTIFUNGICAS Y PATRONES DE EXPRESION DE UN INHIBIDOR DE <i>Castanea sativa</i> . Pernas, M., Sánchez-Monge, R., López-Solanilla, E., Sanchez-Ramos, I., Lombardero, M., Castañera, P., Rodríguez-Palenzuela, P., y Salcedo, G.	184
AISLAMIENTO, CLONAJE Y ANALISIS DE ANALOGOS A GENES DE RESISTENCIA (RGA) DE <i>Aegilops ventricosa</i> Y <i>Aegilops triuncialis</i> USANDO PRIMERS CONSERVADOS. López Braña, I., Montes, M.J., Delibes, A., Martín Sánchez, J.A., Romero, M.D.	185
ACUMULACIÓN ESPACIO-TEMPORAL COORDINADA DE PROTEÍNAS ANTIFÚNGICAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA DE CASTAÑO. Garcia-Casado, G., Collada, C., Allona, I., Soto, A., Casado, R., Rodríguez-Cerezo, E., Gomez, L., y Aragoncillo, C.	186
CARACTERIZACION DE UNA PROTEINA CELULAR QUE INTERACCIONA CON LA REPLICASA DEL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE (TYLCV). Donoso, I., Garriga, A.C., Antúnez, C., y Bejarano, E.R.	188
PAPEL DEL PERÓXIDO DE NITRÓGENO EN INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO. Alamillo, J.M., y García-Olmedo, F.	189
EL ÁCIDO GENTÍSICO COMO SEÑAL ADICIONAL AL ÁCIDO SALICÍLICO PARA LA ACTIVACIÓN DE DEFENSAS EN PLANTAS DE TOMATE. Bellés, J.M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J., y Conejero, V.	190

PROTECCIÓN FRENTE AL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) MEDIANTE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CÍTRICOS CON DIFERENTES VERSIONES DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE CÁPSIDA. Domínguez, A., Pina, J.A., Guerri, J., Navarro, L., Moreno, P., y Peña, L.	191
INDUCCIÓN POR NEMATODOS DE GENES VEGETALES RELACIONADOS CON EMBRIOGÉNESIS Y ESTRÉS HÍDRICO. Escobar, C., Herreros, E., Robertson, L., Estévez, R., Aubareda, A., y Fenoll, C.	192
IDENTIFICACIÓN DE UN HEXAPÉPTIDO ACTIVO FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS CAUSANTES DE PODREDUMBRES DE FRUTOS DURANTE LA POSTCOSECHA. López-García, B., González-Candelas, L., Pérez-Payá, E., y Marcos, J.F.	193
FUNCIONALIDAD DE UNA α -FUCOSIDASA DE GUISANTE: ¿ PROTEÍNA DE DEFENSA FRENTE A PATÓGENOS ?. Tarragó, T., Codina, A., Torrent, M., y Ludevid, M.D.	194
SNAKINS: UNA NUEVA FAMILIA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS. Berrocal, M., Segura, A., Moreno, M., García-Olmedo, F., y Molina, A.	195
LA EXPRESIÓN DE UN GEN INDUCIDO POR PATÓGENOS PUEDE SER MIMIFICADA POR UNA INSENSIBILIDAD A AUXINAS. Mayda, E., Marqués, M.C., Conejero, V., y Vera, P.	197
UTILIZACIÓN DEL GEN njjs46 DE FRESA (<i>Fragaria x ananassa</i> c.v. Chandler) QUE CODIFICA UNA PROTEÍNA DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS (LTP) EN MECANISMOS DE DEFENSA DEL FRUTO A PATÓGENOS. Yubero-Serrano, E.M., Moyano, E., Muñoz Blanco, J., y Caballero, J.L.	198
SOBREEXPRESION DE LA PROTEINA CENTRINA EN PLANTAS TRANSGÉNICAS LIMITA LA MUERTE CELULAR CARACTERÍSTICA DE UNA REACCIÓN HIPERSENSIBLE. Piqueras, R., García-Luque, I., Serra, M.T., y Castresana, C.	199
ISOLATION OF DISEASE RESISTANCE GENE ANALOGS IN PEPPER. Egea-Gilabert, C., Dickinson, M.J., Candela, M., y Candela, M.E.	200
CARACTERIZACION MOLECULAR DE UN AISLADO DEL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS (CEVd) QUE INDUCE UNA REACCION SUAVE EN <i>GYNURA AURANTIACA</i> . Chaffai, M., Hernández, C., Flores, R., y Durán-Vila, N.	201
AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE ADNc CORRESPONDIENTES A ARNms INDUCIDOS DE MANERA DIFERENCIAL EN LA INTERACCION <i>Spilocaea oleagina</i> -olivo. Benítez Alonso, Y., Caballero, J.L., y Muñoz Blanco, J.	202
CARACTERIZACION DE PLANTAS MUTANTES ALTERADAS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL. Moreno, J.I., Martín, R., y Castresana, C.	203
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE <i>MsPG3</i> , EL PRIMER GEN CON ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA IMPLICADO EN LA INTERACCIÓN <i>RHIZOBIUM</i> -LEGUMINOSA. Pérez-Hormaeche, J., Coronado, C., Muñoz, J.A., Rodríguez-Llorente, I.D., Dary, M., Caviedes, M.A., y Palomares, A.J.	204

PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN DE POLIGALACTURONASA <i>MsPG3</i> EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>Medicago truncatula</i> . Rodríguez-Llorente, I.D., Dary, M., Ratet, P., Trinh, T.H., Kondorosi, A., Caviedes, M.A. y Palomares, A.J.	205
LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA MSPG3 MEDIANTE EXPRESIÓN TRANSITORIA Y OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>Medicago truncatula</i> . Rodríguez-Llorente, I.D., Pérez-Hormaeche, J., Dary, M., Kondorosi, A., Ratet, P., Caviedes, M.A., y Palomares, A.J.....	206
ALTERACIONES EN LA CAPACIDAD NODULANTE Y FIJADORA DE N ₂ EN ISOLINEAS MUTAGENIZADAS DE <i>Lupinus</i> sp. Y <i>Cicer arietinum</i> . Chamber Pérez, M.A., Liró Hernández, L., y Carrión Rodríguez, A.	207

Fitopatógenos

COMPLEMENTACIÓN DEL MOVIMIENTO VIRAL EN EL TOBAMOVIRUS DEL MOSAICO DE LA COLZA (ORMV). Mansilla Mansilla, C., Sánchez Sánchez, F., Aguilar Pastor, I., y Ponz Ascaso, F.....	210
VARIABILIDAD NATURAL EN LA INTERACCION <i>Arabidopsis-erwinia</i> . Aguilar, I., Alamillo, J.M., García-Olmedo, F., y Rodríguez-Palenzuela, P.....	211
IDENTIFICACIÓN DE GENES BACTERIANOS DE <i>Erwinia chrysanthemi</i> QUE SE EXPRESAN ESPECIFICAMENTE EN PLANTA. Aguilar, I., Poza-Carrión, C., García-Olmedo, F., y Rodríguez-Palenzuela, P.....	212
TIPIFICACION MOLECULAR DE CEPAS DE <i>Brenneria (Erwinia) quercina</i> AISLADAS EN DIVERSAS MASAS FORESTALES DE <i>Quercus</i> DE LA PENINSULA IBERICA. Poza-Carrión, C., Aguilar, I., López, M.M., González, R., García-Olmedo, F., y Rodríguez-Palenzuela, P.	213
COMPLEJOS ENTRE UN VIROIDE Y PROTEINA(S) DE LA PLANTA HUESPED FORMADOS POR IRRADIACION CON LUZ ULTRAVIOLETA. Darós, J.A., y Flores, R.....	214
DETECCIÓN DE <i>Erwinia amylovora</i> , AGENTE CAUSANTE DEL FUEGO BACTERIANO, MEDIANTE NESTED-PCR EN UN TUBO. Llop, P., Bonaterra, A., López, M.....	215

Otras comunicaciones

MEJORA MOLECULAR EN MELÓN: EL CASO DE LA RESISTENCIA GENÉTICA A MNSV. Noguera, J., Capel, J., y Lozano, R.....	218
IDENTIFICACIÓN DE VARIEDADES DEL GÉNERO <i>Prunus</i> MEDIANTE MARCADORES AFLP. Balaguer, B., Aznar, R., y Lorences, E.P.	219
ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD INTRAVARIETAL EN LA VARIEDAD DE VID "ALBILLO" BASADO EN EL EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES AFLP. Cabezas, J.A., Cervera, M.T., Rodríguez, I., Cabello, F., y Martínez-Zapater, J.M.....	220

UTILIZACIÓN DE LOS CEBADORES F13 Y F17 EN LA DETECCIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA. Díaz-Perales, A., Linacero, R., y Vázquez, A.M.....	221
UTILIZACION DE MICROSATELITES (STMS) PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PORTAINJERTOS DE VID (<i>Vitis vinifera</i>). De Andres, M.T., Borrego, J., Ibañez, J., y Jouve, N.....	222
PUNTOS CALIENTES DE INESTABILIDAD EN EL DNA DETECTADOS MEDIANTE EL ESTUDIO DE VARIACIÓN SOMACLONAL EN CENTENO. Vázquez, A.M., Alves, E., y Linacero, R.....	223
UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE OLIVO PARA SU CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN. Claros, M.G., Bautista, R., Crespillo, R., y Cánovas, F.M.	224
ENSAYO DE LAS RELACIONES GENETICAS ENTRE ESPECIES DEL GENERO <i>Digitalis</i> BASADO EN MARCADORES RAPD. Nebauer, S.G., del Castillo-Agudo, L., y Segura, J.	225
PROTEÍNAS DE DEFENSA DE PLANTAS COMO ALERGÉENOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL. Sánchez-Monge, R., Díaz-Perales, A., Blanco, C., Collada, C., Lombardero, M., Garcia-Sellús, F.J., Barber, D., Aragoncillo, C., y Salcedo, G.	226
EXTRACCION DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE HOJAS DE LEGUMINOSAS LEÑOSAS. Fernández, E., Viader, S., Moysset, L., y Simón, E.....	227
DISEÑO DE AS-PCR PARA HMW-GLUTENINAS DE TRIGO. de Bustos Rodríguez, A., Rubio de la Moya, P., y Jouve de la Barreda, N.	228
LOCALIZACION DE QTL ASOCIADOS A CALIDAD DE TUBERCULO EN PATATA: CONTENIDO EN AZUCARES REDUCTORES DURANTE EL ALMACENAMIENTO. Menéndez, C., Ritter, E.‡, Schäfer-Praegl, R., Salamini, F., y Gebhardt, C.	229
PROTECCIÓN FRENTE A <i>Phytophthora citrophthora</i> EN NARANJOS TRANSGÉNICOS SUPERPRODUCTORES DE LA PROTEÍNA PR P23. Fagoaga, C. , Arnau, J., Pina, J.A., Navarro, L., Hinarejos, C., Tuset, J.J., y Peña, J.J.	230

COMUNICACIONES ORALES

Regulación de la expresión génica

IDENTIFICACIÓN DE UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN MYC ESPECÍFICO PARA EL ELEMENTO DE RESPUESTA A JASMONATO PRESENTE EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN LEUCINA AMINOPEPTIDASA

Boter, M., Ruíz-Rivero, O., y Prat, S.

Dpto. de Genética Molecular. Instituto de Biología Molecular de Barcelona-C.S.I.C. Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona.

Las plantas responden a una herida o daño mecánico mediante la activación coordinada de una serie de genes implicados en la reparación de los tejidos dañados y en mecanismos de defensa frente a predadores y patógenos. Algunos de estos genes se expresan exclusivamente a nivel de la herida (respuesta local) mientras que otros se expresan también en tejidos alejados de esta (respuesta sistémica).

Ante la producción de una herida se observa un aumento del polipéptido sistemina que parece ser que actúa como señal sistémica de herida. La unión de este péptido a su hipotético receptor daría lugar a un incremento en la concentración de ácido linolénico, el cual es un precursor biosintético del ácido jasmónico (JA), de manera que también se observa un incremento de esta fitohormona. Existen numerosas evidencias de que el JA actúa como señal intracelular de herida, regulando la expresión de los genes de defensa aunque, de momento, se desconoce el mecanismo exacto de regulación.

El gen de la leucina aminopeptidasa (LAP) es uno de dichos genes inducibles por herida y por JA. Se propone que la enzima LAP podría estar involucrada en el recambio proteico, es decir, proporcionaría aminoácidos para la síntesis "de novo" de proteínas involucradas en mecanismos de defensa de la planta.

En nuestro laboratorio se aislaron dos clones genómicos del gen LAP de tomate (*L. esculentum*) y se llevó a cabo un estudio de sus promotores. Mediante análisis por delección y fusión con un gen reportero GUS se delimitó una región de 300pb suficiente para inducir la expresión del reportero en respuesta al tratamiento con MeJA. Con el objetivo de identificar elementos cis de respuesta a JA se llevó a cabo un experimento de "in vivo" footprinting en el que se detectaron dos residuos de guanina parcialmente protegidos. Dichos residuos estaban incluidos en dos motivos idénticos de DNA de secuencia GAGTA. Ensayos de retardo en gel evidencian la existencia de dos proteínas que se unen específicamente a estos motivos.

Con el objetivo de identificar los posibles factores de transcripción que se unen a la región proximal del promotor del gen LAP y que serían los responsables de la activación de dicho gen por MeJA se ha realizado un experimento de "One Hybrid". Se clonó la región -306/-86 del promotor de LAP, que contiene los motivos GAGTA, delante de un promotor mínimo que controla la expresión de un gen reportero (His o LacZ). La cepa de levadura portadora de esta construcción se transformó con una librería de cDNAs fusionados al dominio de activación de GAL4 obtenida a partir de plantas de tomate inducidas con MeJA. Por análisis de secuencia de los clones positivos obtenidos en el screening se han detectado varios clones que presentan elevada homología con el dominio de unión a DNA de los genes PG1 y PG2 (phaseolin G-box binding

protein). Se trata de un factor de transcripción del tipo helix-loop-helix que reconoce elementos del tipo G-box reportados como elementos cis candidatos para el control de la inducción de distintos genes en respuesta a herida y JA.

Se presentaran evidencias de que la proteína codificada por dichos clones reconoce específicamente los motivos GAGTA identificados por "in vivo" footprinting como elementos de respuesta a MeJA, así como de que los transcritos correspondientes se inducen por tratamiento con MeJA. Estos resultados indican que se ha aislado un factor de transcripción implicado en la activación de los genes LAP y, posiblemente, de otros genes inducibles por MeJA durante la respuesta a herida producida por el ataque de insectos predadores y plagas.

Bibliografía.

- Bowles, J.D. (1997) The wound response of tomato plants: analysis of local and long-range signalling events, *Essays in Biochem.* 2, 161-168.
- Bowles, D. (1998) Signal transduction in the wound response of tomato plants, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 353,1495-1510.
- Chao et al. (1999) Leucine Aminopeptidase RNAs, Proteins, and Activities increase in response to water deficit, salinity and the wound signals Systemin, Methyl Jasmonate and Abscisic Acid, *Plant Physiol.* 120, 979-992.
- Menke, F.L.H. et al. (1999) A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor- inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2, *The EMBO J.* 18, 4455-4463.
- Ruíz-Rivero, O.J. and Prat, S. (1998) A -308 deletion of the tomato LAP promoters is able to direct flower-specific and MeJA-induced expression in transgenic plants, *Plant Mol. Biol.* 36, 639-648.
- Wasternack, C. And Parthier, B. (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression, *Trends in Plant Sci.* 2,302-307.

FACTORES TRANSCRIPCIONALES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA SEMILLA DE MONOCOTILEDÓNEAS Y DICOTILEDÓNEAS

Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Díaz, I., y Carbonero, P.

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

La expresión génica específica de semilla ha sido fundamentalmente investigada a partir de dos estrategias: (I) la caracterización de mutantes con expresión alterada en este órgano y (II) el análisis de promotores de genes cuya expresión se restringe a la semilla. Ambas aproximaciones han permitido la identificación de factores transcripcionales y de elementos reguladores en cis que participan en este proceso. En monocotiledóneas el motivo conservado en cis en la mayoría de los promotores de los genes que codifican proteínas de reserva de la semilla es la caja de endospermo (EB), un motivo bipartito localizado en la región -300 y que contiene dos secuencias de unión a proteínas nucleares: la caja de las prolaminas (PB = 5'-TGTAAG-3') y un motivo similar al unido por el factor transcripcional de tipo bZIP GCN4 de levaduras (GLM = 5'-ATGAG/CTCA-3'). El trabajo de nuestro grupo se ha centrado en el estudio funcional de estos motivos en el endospermo de cebada y en la identificación de los factores transcripcionales que interaccionan con ellos. Se ha podido establecer en conjunción con otras investigaciones la implicación de una familia de factores de tipo bZIP que interacciona con el motivo GLM y la identificación de factores tipo DOF como participantes en la regulación a través de la caja PB. En el caso de las dicotiledóneas, existen datos funcionales del análisis de promotores específicos de semilla que permiten detectar secuencias reguladoras del tipo de la caja de endospermo. Sin embargo no se han identificado aún los factores transcripcionales implicados en dicha regulación. Por las ventajas que presenta la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, hemos iniciado la caracterización de factores bZIP (AtBZ1-3 y DOF (AtDOF15-16) ortólogos a los que participan en la expresión específica de semilla en cereales. Se presentará información relativa a dichos factores y el posible establecimiento de un modelo de regulación común a monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Referencias

- Vicente-Carbajosa J., et al. (1998) Plant J. 13: 629-640
Vicente-Carbajosa J., et al. (1997) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94: 7685-7690
Mena M., et al. (1998) Plant J. 16: 53-62
Oñate L., et al. (1999) J.Biol.Chem. 274: 9175-9182

CLONAJE Y MODELO DE EXPRESION DE UN FACTOR DE TRANSCRIPCION DE TIPO myb DE FRESA (*Fragaria x ananassa* cv Chandler)

López Raéz, J.A.; Blanco Portales, R.; Caballero, J.L.; Moyano, E.; Muñoz Blanco, J.

Dpto de Bioquímica y Biología Molecular.Fac de Ciencias.Univ. Córdoba.

Los genes myb de plantas superiores son genes que codifican factores de transcripción que presentan una homología estructural muy significativa con genes que codifican los proto-oncogenes de mamíferos c-myb. Se ha involucrado a los factores de transcripción de tipo myb tanto en la regulación del metabolismo de los fenilpropanoides, en procesos de morfogénesis celular, en las rutas de transducción de señales, en respuesta a reguladores de crecimiento de la planta, a distintos estímulos tales como la luz, estrés salino, giberelinas y ácido abscísico (ABA). Mediante el escrutinio de una genoteca genómica de fresa hemos clonado un gen que presenta un alto grado de identidad con los genes que codifican factores de transcripción de tipo myb de plantas. Este gen ha sido completamente secuenciado y se ha determinado la estructura de su zona codificante y promotora. Su zona promotora presenta secuencias de tipo cis que potencialmente pueden responder a ABA. Se han detectado niveles de transcrito en todos los estadios de elongación y maduración del fruto (tanto en receptáculo como en achenios), sin embargo no fué posible detectar expresión del gen en tejidos vegetativos. También se observaron niveles altos de transcrito en cultivos celulares de fresa. Utilizando la técnica de GeneScan se ha cuantificado la expresión del gen, observándose que el máximo de expresión se obtiene en los estadios de desarrollo del fruto relacionados con división celular, para disminuir claramente con la elongación y maduración del fruto. Los resultados sugieren que este factor de transcripción está relacionado con los procesos fisiológicos responsables de proliferación celular.

ABI3 FUNCIONA COMO COACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN EMBRIONARIA DE UN GEN sHSP

Rojas, A., Almoguera, C., y Jordano, J.

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. C.S.I.C. Apartado 1052. 41080, Sevilla

Algunos genes de la familia sHSP (*small Heat Shock Protein*) se expresan durante la embriogénesis zigótica en ausencia de estrés térmico. Mutaciones en un factor transcripcional embrionario de *Arabidopsis*, ABI3, eliminan la expresión de algunas sHSP en semillas sin afectar a su acumulación en respuesta al calor (Wehmeyer *et al.*, 1996). Esto ha sugerido mecanismos reguladores distintos a la activación transcripcional debida al choque térmico, controlada por HSFs (*Heat Shock Factors*). Mediante experimentos de expresión transitoria en embriones de girasol hemos observado la inducción de un gen quimérico *Ha hsp 17.7 G4::GUS* tanto por ABI3 como por Lp-HSFA1, un HSF de tomate. La co-expresión de ambos factores resultó en un efecto sinérgico sobre la transcripción del gen quimérico. Análisis funcionales adicionales demostraron ciertos requerimientos para este efecto, tales como: la presencia de HSEs (*Heat Shock Elements*) proximales y distales intactos, o el dominio de activación del HSF. Además se observó una menor, o nula, contribución de ABI3 en la activación del promotor en ausencia de HSFs, o HSEs, funcionales. Experimentos de ganancia de función con un promotor mínimo (35S CaMV -46) demostraron que los HSEs de *Ha hsp17.7 G4* son necesarios y suficientes para obtener una activación sinérgica con Lp-HSFA1 y ABI3. Por lo tanto, ABI3 funciona como un coactivador de la transcripción embrionaria mediada por HSF a través de los HSEs.

CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN GRUPO DE GENES IMPLICADOS EN LA CASCADA DE RESPUESTA AL ETILENO EN SEMILLAS DE HAYA

Calvo, A.P., Lorenzo, O., Nicolás, C., Nicolás, G., y Rodríguez, D.

Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca. Plaza Doctores de la Reina (s/n). 37007 Salamanca.

La ruta de percepción del etileno comienza por un receptor tipo histidina kinasa situado en el plasmalema, cuya unión al etileno inactiva el gen CTR1, una MAPK que actúa como regulador negativo de esta ruta, sugiriendo la implicación de una cascada de MAP Kinasas en la respuesta hormonal. En ella participan distintos genes, como EIN3 y los genes EIL, existiendo claras evidencias de que son elementos "trans" cuya diana en el núcleo son las proteínas de unión a elementos de respuesta a etileno (EREBPs), que activarán los genes que generarán la respuesta. Mediante una aproximación diferencial por RT-PCR, utilizando oligos degenerados, se aislaron varios clones. Uno de ellos presenta una alta homología con un receptor del tipo histidina kinasa y otro con una MAPK denominada CTR1. Estos fragmentos se utilizaron como sondas en el "screening" de una genoteca de cDNA y se obtuvieron dos clones: FSHK1 (un fragmento de 1700 pb), semejante a receptores histidina kinasa y que está inducido por ethephon; FSPK2 (clon completo), que tiene una elevada homología con MAP kinasas y proteín kinasas como CTR1 y que está inducido por ABA y por calcio. Adicionalmente, mediante "screening" de una genoteca de cDNA, se obtuvo el clon completo FsEINL1 de elevada homología con EIN3 que presenta una mayor expresión con GA3, es específico de semillas y, según los resultados del Southern blot, aparece como un gen simple por genoma haploide, a diferencia de lo observado en *Arabidopsis*. Por último, se están realizando ensayos de retardo en gel para comprobar su papel como factor de transcripción.

CONTROL DE LA TRANSPOSICION Y SILENCIAMIENTO GENICO

Beguiristain, T., Puigdomènech, P., y Casacuberta, J.M.

Dep. Genètica Molecular. IBMB-CSIC. Jordi Girona 18. 08034 Barcelona.

En estos últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de los mecanismos epigenéticos de control de la expresión génica, y en particular del silenciamiento génico. La teoría de el silenciamiento génico es un mecanismo de los genomas contra la proliferación de secuencias extrañas, ya sean virus (mecanismos de silenciamiento post-transcripcional) o transposones (mecanismos de silenciamiento transcripcional) toma cada día mas fuerza. La eficacia de este control explica el porque, a pesar de que los transposones representan una proporción altísima del DNA genómico en plantas, la mayoría de ellos no han conservado la capacidad de transponer a lo largo de la evolución y no son sino restos de elementos defectivos. Esto es especialmente cierto en el caso de los retrotransposones que son elementos genéticos móviles que, debido a su particular mecanismo de transposición, son especialmente mutágenos. Sin embargo, al igual que algunos virus de plantas han desarrollado estrategias para escapar al silenciamiento génico y mantener su capacidad infectiva, existen unos pocos retrotransposones capaces de transponer activamente en plantas. Entre ellos el retrotransposón Tnt1 de tabaco es uno de los mejor caracterizados. Tnt1 se encuentra presente en centenares de copias en el genoma de tabaco, así como en el de otras especies del genero Nicotiana, pero solo transpone asociado a determinadas situaciones de estrés. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que distintas familias de Tnt1 han desarrollado promotores específicos para distintas situaciones de estrés. Por otra parte, experimentos recientes que hemos realizados en colaboración con Herve Vaucheret (INRA, Versailles) muestran que en las situaciones en las que Tnt1 se expresa existe un levantamiento transitorio y general de los mecanismos de silenciamiento. En esta comunicación se analizaran los mecanismos de control de la expresión de Tnt1 y se discutirá de su importancia evolutiva tanto desde el punto de vista del retrotransposón como del del genoma en que se hospeda.

REQUERIMIENTO DEL SPLICING DEL INTRÓN PARA QUE SE EDITE EL PUNTO III DEL TRANSCRITO DEL GEN *ndhA*

del Campo, E.M., Sabater, B., y Martín, M.

Dto. Biología Vegetal. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. MADRID.

El Descubrimiento de los genes *ndh* en cloroplastos, sugería que el complejo NAD(P)H-deshidrogenasa podría participar en clororrespiración. De hecho, en plantas superiores, la transcripción de estos genes es activa y algunos de sus transcritos sufren procesamientos post- transcripcionales como “splicing” y “editing” para poder dar lugar a un transcrito maduro susceptible de ser traducido. Ensayos de “western blot” han evidenciado la presencia de polipéptidos NDH, codificados en los genes *ndh* (como el *ndhA* y el *ndhF*) en los tilacoides. Seis de los once genes *ndh* identificados en el genoma de cloroplastos está situados en la región SSC del genoma y se transcriben como una unidad transcripcional, junto con el gen *psaC*. Hemos secuenciado el operón completo en cebada e identificado en cDNA, cinco puntos diferentes de edición, cuatro en transcritos del gen *ndhA* y uno en transcritos del gen *ndhD*. En los ocho transcritos diferentes obtenidos en ensayos de “northern blot” hemos estudiado en que etapa de maduración tienen lugar el “splicing” del intrón de los transcritos correspondientes al gen *ndhA*, así como la edición en los transcritos de los genes *ndhA* y *ndhD*. Hemos comprobado, en transcritos aislados de geles que la edición ocurre en las primeras etapas de la maduración de transcritos, salvo para el punto III del transcrito del gen *ndhA* que no ocurre mientras no ha tenido lugar el “splicing”. El intrón del gen *ndhA* pertenece al grupo II de “auto-splicing”, presentando los seis dominios característicos; la configuración secundaria que adquiere el intrón cuando está unido al segundo exón no permite la actuación de la maquinaria de edición sobre el punto III, quedando en cambio accesible este punto cuando ha ocurrido el “splicing”.

Desarrollo

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA QUINASA CK2 DURANTE EL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR EN LAS CÉLULAS DE TABACO BY-2

Espunya, M.C., y Martínez, M.C.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. Campus de Bellaterra. 08193 Bellaterra (Barcelona).

La proteína quinasa CK2, previamente llamada caseína quinasa II, es una Ser/Thr quinasa esencial para la viabilidad celular. Nosotros hemos utilizado la línea celular de tabaco BY-2, altamente sincronizable, para investigar si la actividad enzimática de la CK2 y su expresión están reguladas durante la división celular. Para ello, hemos obtenido sondas de cDNA específicas de las subunidades α y β de la CK2 de tabaco, así como anticuerpos para cada una de las dos subunidades por separado, y hemos determinado los niveles de mRNA y de proteína presentes en las diferentes fases del ciclo de división celular. Nuestros resultados muestran que la actividad enzimática de la CK2 oscila durante el ciclo celular, con picos en las fases G1/S y M, a pesar de que las cantidades de mRNA y proteína de sus dos subunidades permanecen constantes a lo largo del ciclo. La inhibición *in vivo* de la CK2 utilizando un inhibidor específico corrobora la necesidad de su actividad enzimática para la progresión del ciclo celular, y sugiere que la actividad CK2 en G1/S es necesaria para la ejecución del "checkpoin" en G2/M. Finalmente, la determinación del contenido de putrescina, espermidina y espermina en las mismas células mostró variaciones paralelas a las de la actividad CK2, sugiriendo que, al menos en parte, las poliaminas podrían ser las causantes de la activación post-traducciona del enzima durante el ciclo celular. Además, en la transición del estado quiescente al estado proliferativo, la concentración de la subunidad β , regulada por un mecanismo post-transcripcional, determina la aparición de la actividad CK2, sugiriendo que, al igual que en las células animales, la subunidad β es el principal regulador fisiológico de la CK2 y la diana de acción de las poliaminas.

CRIOCROMOS: UNA FAMILIA DE RECEPTORES DE LUZ AZUL EN PLANTAS Y ANIMALES

Jarillo, J.A.¹, Ahmad, M., y Cashmore, A.R.

Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, 19104-6018.

¹Dirección actual: Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de la Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid.

La luz azul regula diversos procesos del desarrollo de las plantas tales como la elongación del hipocótilo, la biosíntesis de antocianinas, o el control del tiempo de floración. Estas respuestas están mediadas en parte por fotoreceptores denominados criptocromos. Los criptocromos son flavoproteínas que muestran homología a nivel de secuencia con fotoliasas, enzimas que reparan los dímeros de pirimidina generados por la acción de la luz ultravioleta-B sobre el ADN, si bien los criptocromos carecen de dicha actividad.

En *Arabidopsis* se han identificado dos criptocromos: CRY1 y CRY2. Nosotros hemos demostrado con proteínas quiméricas que los dominios de ambos fotoreceptores son intercambiables y que su nivel de actividad es proporcional a los niveles de expresión de estas proteínas recombinantes en plantas transgénicas. Aunque ni CRY1 ni CRY2 se unen al ADN, como las fotoliasas, la localización de proteínas de fusión CRY1-GFP o CRY2-GFP es preferentemente nuclear.

Muchas de las respuestas mediadas por los criptocromos dependen de los niveles de fitocromo activo, el receptor de luz roja-infrarroja en plantas. De hecho, nosotros hemos demostrado que CRY1 interacciona con fitocromo A *in vitro*, y que el dominio C-terminal tanto de CRY1 como de CRY2 funciona como sustrato de una actividad serina-treonina quinasa asociada con los fitocromos.

Cry1, junto con fitocromo, media también el ajuste por luz del reloj circadiano endógeno de *Arabidopsis*. Nosotros hemos identificado proteínas de *Arabidopsis* que poseen homología con componentes del reloj de animales. Su posible implicación en el reloj endógeno de *Arabidopsis* será discutida.

Finalmente, tanto CRY1 como CRY2 participan junto con NPH1, una flavoproteína con características de serina-treonina quinasa, en el proceso de fototropismo de *Arabidopsis*.

REGULACIÓN DEL TIEMPO DE FLORACIÓN POR EL RELOJ CIRCADIANO Y EL FOTOPERÍODO A TRAVÉS DE *CONSTANS*

Suárez López, P., Wheatley, K., Igeño, M.I., Robson, F., y Coupland, F.

El tiempo de floración de muchas especies vegetales está regulado, entre otras condiciones ambientales, por el número de horas diarias de luz o fotoperíodo. En *Arabidopsis*, los días largos aceleran la floración, mientras que los días cortos la retrasan. *CONSTANS* (*CO*) es uno de los genes involucrados en este control de la floración. Mutaciones en *CO* retardan la floración en día largo pero no en día corto, sugiriendo que este gen es necesario para promover la floración en día largo. Por otro lado, la respuesta a la duración del día depende de un mecanismo capaz de medir el tiempo, es decir, de un reloj circadiano. Mutaciones en los genes *LHY*, *GI* y *ELF3* de *Arabidopsis* alteran tanto la regulación fotoperiódica de la floración como varios procesos circadianos, y se ha postulado que *LHY* podría formar parte del mecanismo central del reloj o estar estrechamente asociado a él. En esta comunicación presentamos el primer estudio sobre la conexión molecular entre el reloj circadiano y el control de la floración. Nuestros resultados muestran que la expresión de *CO* varía a lo largo del día y está regulada por el fotoperíodo, el reloj circadiano y los genes *LHY*, *GI* y *ELF3*. En día largo, la expresión de *CO* presenta dos máximos, al atardecer y al amanecer, mientras que en día corto la expresión es máxima durante la noche. En plantas entrenadas en día largo y transferidas a luz continua, *CO* sigue expresándose rítmicamente, lo cual indica un control circadiano del gen. Los mutantes *lhy* y *gi* florecen tarde en día largo y tienen bajos niveles de *CO*, mientras que *elf3* florece temprano y muestra una expresión elevada de *CO*. Además, la sobreexpresión de *CO* corrige el fenotipo de floración tardía de los mutantes *lhy* y *gi*, indicando que *CO* media entre estos genes y el control del tiempo de floración.

FALSIFLORA, EL GEN ORTÓLOGO A FLORICAULA Y LEAFY, CONTROLA EL TIEMPO DE FLORACIÓN Y LA IDENTIDAD DEL MERISTEMO FLORAL EN TOMATE

Molinero-Rosales, N., Jamilena, M., Angosto, T.[#], Zurita, S., Capel, J., y Lozano, R.

Dpto. de Biología Aplicada (Lab. de Genética y Mejora) y [#] Dpto. de Biología Vegetal y Ecología, E. Politécnica Superior, Universidad de Almería. 04120 Almería.

El mutante *falsiflora* de tomate se caracteriza por un desarrollo anormal de la inflorescencia, que adquiere un patrón de desarrollo indeterminado donde las flores aparecen sustituidas por tallos vegetativos. Junto a ello, es manifiesto el retraso en el tiempo de floración, con independencia de las condiciones de fotoperiodo. Estos datos sugieren que el gen *FALSIFLORA* (*FA*) participa en el control de la identidad del meristemo floral y del tiempo de floración en tomate, de forma similar a como lo hacen los genes *FLORICAULA* (*FLO*) de *Antirrhinum* y *LEAFY* de *Arabidopsis*. Para analizar si el fenotipo *falsiflora* está causado por una mutación en el gen ortólogo de tomate *LFY* y *FLO* se ha clonado este gen en plantas silvestres y mutantes *fa*. En el genotipo silvestre, el gen clonado codifica para una proteína que comparte el 90% con NFL1 (*Nicotiana*) y ALF (*Petunia*), y más de un 70% con *FLO* y *LFY*. En plantas mutantes, sin embargo, el gen presenta una delección de 16 pb que daría lugar a una proteína truncada en la región C-terminal, la región más conservada en las distintas especies analizadas. El estudio de expresión mediante hibridación *in situ* indica que *FA* se expresa en meristemos vegetativos y florales, en primordios de hojas y hojas jóvenes, así como en los cuatro órganos florales. El análisis molecular, unido al hecho de que la delección cosegrega con el fenotipo *fa* en un total de 240 plantas F2 analizadas, apoyan la idea de que el gen *FA* es el ortólogo de tomate a *FLO* y *LFY*. En este trabajo se discuten las implicaciones funcionales del gen *FA* en la mejora genética de esta especie.

AGL2, 4 Y 9 SIRVEN DE NEXO DE UNIÓN ENTRE LOS GENES DE IDENTIDAD DE MERISTEMO FLORAL Y LOS DE ÓRGANO FLORAL

Pelaz, S., y Yanofsky, M.F.

Department of Biology University of California at San Diego La Jolla, CA 92093-0116 USA.

Para el desarrollo floral es necesaria la acción coordinada de los genes que especifican tempranamente la identidad del meristemo floral y la de los que posteriormente determinan la identidad de los órganos florales. Mientras que muchos de los genes implicados en estos dos procesos consecutivos han sido identificados y caracterizados, se conoce muy poco acerca de los mecanismos que los conectan espacial y temporalmente. Se ha postulado, en base a su patrón de expresión, que algunos de los genes pertenecientes a la familia MADS-box de *Arabidopsis*, como son *AGL2*, *4* y *9*, podrían formar parte del nexo de unión entre estos dos procesos. Para comprobar esta hipótesis, hemos analizado distintas colecciones generadas por inserciones de elementos Spm o de T-DNA a la búsqueda de posibles mutantes y aislado positivos en los tres loci. Ninguna de las mutaciones individuales afecta gravemente la morfología floral. Los mutantes *agl2* y *agl4* no presentan ningún fenotipo visible, mientras que mutaciones en el gen *AGL9* dan lugar a una transformación parcial de los pétalos hacia sépalos. Sorprendentemente, la identidad de los órganos del triple mutante está severamente afectada, produciendo flores con tres verticilos de sépalos y una flor en el cuarto verticilo que repite el mismo patrón. Este fenotipo es idéntico al de falta de función de los genes de identidad de órgano *AP3*, *PI* y *AG*, indicando que *AGL2*, *4* y *9* conjuntamente son indispensables para la función de dichos genes, bien vía interacción proteína-proteína o bien siendo responsables de su activación transcripcional. Estudios preliminares sugieren que ambos escenarios podrían coexistir. Este modelo actual de trabajo se discutirá junto con los resultados que llevan a proponerlo.

ESTUDIO FUNCIONAL DE GENES MADS DE GUISANTE EN SISTEMAS HETERÓLOGOS

Berbel, A., Madueño, F., Cañas, L.A., y Beltrán, J.P.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (C.S.I.C.- U.P.V.).
Departamento de Biología del Desarrollo. Campus de la Universidad Politécnica de Valencia, Av. De los Naranjos s/n., 46022 Valencia.

En nuestro laboratorio se han aislado y caracterizado molecularmente varios miembros de la familia MADS-box de guisante (*PM1-PM8*). El análisis funcional de varios de estos genes, *PM1*, *PM4* y *PM6* se ha llevado a cabo mediante su expresión constitutiva en sistemas heterólogos (*A. thaliana* y *N. tabacum*) como complemento a su definitivo estudio en plantas transgénicas de guisante. *PM1* y *PM4* por homología de secuencia y patrones de expresión se pueden considerar homólogos funcionales de genes homeóticos de tipo B y A respectivamente. Por otro lado varias evidencias sugieren que *PM6* está relacionado con la mutación *veg1* de guisante cuyo fenotipo es la completa supresión de la iniciación floral. La expresión constitutiva de *PM1* en *A. thaliana* origina la conversión parcial de sépalo a pétalo y además este gen rescata, al menos parcialmente, la mutación *pistillata*. En *N. tabacum* esta conversión es de sépalo a pétalo y de carpelo a estambre. Estos resultados sugieren que *PM1* funciona como un gen de clase B. La expresión constitutiva de *PM4* causa adelanto de floración tanto en *A. thaliana* como en *N. tabacum* y el 2º verticilo de pétalos, ausente en el mutante *ap1-1 A.thaliana*, es parcialmente rescatado en varias de las líneas transgénicas que expresan *PM4*. Así pues, *PM4* parece estar implicado en la especificación de la identidad del meristemo floral. Por otro lado, líneas transgénicas de *A.thaliana* que expresan constitutivamente *PM6* muestran floración temprana y aparición de flores terminales y axilares, lo cual sugiere que *PM6* está implicado en la iniciación floral. Paralelamente se haya en proceso la transformación de guisante con construcciones sentido y antisentido de *PM6* así como la complementación de la mutación *veg1*.

ESTUDIO DE LA FUNCION DE TCP1, EL GEN ORTOLOGO A *cycloidea* EN *Arabidopsis*

Cubas Domínguez, P., y Martínez-Zapater, J.M.

Centro Nacional de Biotecnología. Campus de la UAM. Cantoblanco. 28049, Madrid INIA, Departamento de Mejora genética y Biotecnología. Carretera de la Coruña km 7. 28040, Madrid.

El gen *cycloidea* (*cyc*) fué originalmente aislado en *Antirrhinum majus*. En esta especie, *cyc* desempeña un papel clave en la generación de la asimetría floral: en ciertos fondos genéticos los mutantes *cyc* tienen flores radialmente simétricas en las que todos los pétalos y estambres son como los correspondientes órganos ventrales de la flor silvestre. Durante el desarrollo floral, *cyc* se transcribe en la región dorsal del meristemo floral y posteriormente su expresión se mantiene en los primordios del estambre y pétalos dorsales. El gen *cyc* codifica una proteína con características de factor de transcripción y contiene un dominio conservado al que hemos llamado dominio TCP (Teosinte branched, Cycloidea, Pcf, miembros originales de esta familia). Posiblemente *cyc* pone en marcha un programa genético que genera las diferencias morfológicas de los órganos dorsales de la flor.

La asimetría floral es un rasgo que apareció tarde en la evolución de las plantas Angiospermas. Es probable que *cyc* fuera reclutado a partir de un gen preexistente que desempeñaba una función diferente en Angiospermas más antiguas con flores simétricas. Para estudiar la posible función de este hipotético gen *cyc* ancestral estamos caracterizando el gen ortólogo de *cyc* en *Arabidopsis*, TCP1. *Arabidopsis* está bastante alejada filogenéticamente de *Antirrhinum* y además tiene flores simétricas. Por tanto el análisis de la función génica de TCP1 y su comparación con *cycloidea* puede arrojar alguna luz sobre el origen y función del gen *cycloidea* durante la evolución. Se presentará el patrón de expresión de TCP1 durante el desarrollo de *Arabidopsis* y se relacionará con el patrón de expresión de *cycloidea* en *Antirrhinum*. Además se presentarán resultados del análisis funcional de TCP1.

GENETICA MOLECULAR DEL DESARROLLO DE LAS CELULAS DE TRANSFERENCIA DEL GRANO DE MAIZ. ¿ES ZmMRP-1 EL REGULADOR MAESTRO DEL PROCESO?

Royo, J., Gómez, E., Dávila, J., Sanz, Y., y Hueros, G.

Depto. de Biología Celular y Genética, Univ. Alcalá. ES-28871 Alcalá de Henares (Madrid).

Nuestro grupo está interesado en la caracterización de los mecanismos moleculares del desarrollo y funcionamiento de las células de transferencia del endospermo de maíz, un tipo celular cuya actividad es determinante en el proceso de llenado del grano. En el marco del proyecto europeo TCI (BIO4-CT97-2158), hemos aislado 13 genes específicamente expresados en las células de transferencia, analizado parcialmente sus secuencias promotoras e identificado un promotor capaz de dirigir la expresión de GUS a las células de transferencia en plantas transgénicas de maíz. En esta comunicación, presentaremos uno de los últimos genes identificados, *ZmMRP-1*, que posee características propias de un activador transcripcional, relacionado con los genes tipo myb. *ZmMRP-1* se expresa exclusivamente en las células de transferencia desde los estadios más tempranos de su desarrollo. Sorprendentemente, al expresar la proteína ZmMRP-1 en hojas de plantas transgénicas de maíz que contienen el gen *GUS* bajo el control de un promotor específico de células de transferencia, se induce la expresión ectópica de GUS en dichas hojas. Estos resultados nos llevan a proponer un modelo en el que el gen *ZmMRP-1* tendría un papel relevante en la iniciación de la diferenciación de las células del endospermo en células de transferencia. Este modelo está siendo testado mediante la obtención de plantas de maíz *antisense* para *ZmMRP-1* en colaboración con AgrEvo, y de plantas *knockout* en colaboración con Pioneer Hi-Breed.

REGULATION OF RIPENING-RELATED GENES IN BELL PEPPER: METABOLIC CONTROL OF A GENE ENCODING A PR-10 TYPE PROTEIN (*Sn-1*) IN TRANSGENIC TOBACCO AND TOMATO PLANTS

Pozueta-Romero, J.¹, Moreno-Bruna, B.¹, Houlné, G.², Chamarro, J.³, and Schantz, R.²

1. Centro de Biotecnología Agrícola Vegetal, UPNA/CSIC Ctra. de Mutilva s/n, Mutilva Baja 31192 Navarra, Spain.

2. Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Université Louis Pasteur, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cédex, France.

3. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPVA-CSIC), Campus de la Universidad Politécnica de Valencia, Av. de los Naranjos s/n, 46022, Valencia, Spain.

Abstract

Wounding and exogenous application of ethephon, but not of ethylene, to the pericarp of mature green (MG) bell pepper fruits stimulate the accumulation of carotenoids and the expression of ripening-related genes. To understand the molecular aspects governing the expression of ripening-related genes in the non-climacteric type bell pepper fruit, we have studied the expression of the upstream region of a gene encoding a PR-10 type protein (*Sn-1*) in transgenic tomato and tobacco plants. This region contains several motifs potentially involved in the developmental and environmental control of the downstream gene. *Sn-1* expression in tomato, a climacteric type fruit, is developmentally regulated in a manner similar to that observed in bell pepper. Wounding and exogenous application of ethylene or ethephon to MG tomato fruits stimulates *Sn-1*. Surprisingly, although *Sn-1* is a molecular marker for ripening, its expression can be activated in tobacco and tomato leaves by both physical and chemical treatments exclusively when the plants are cultured on a sugar-containing medium. The patterns of sugar and ascorbic acid accumulation in both bell pepper and tomato plants correlate with that of *Sn-1* expression, supporting a model according to which expression of some ripening-related genes in non-climacteric fruits is a metabolically regulated process.

Introduction

Fruit ripening is a genetically regulated developmental process involving shifts in the metabolism of carbohydrates, proteins, lipids, etc. as well as extensive structural reorganization of the plastids (Brady, 1987).

Many aspects of the ripening process of climacteric fruits are controlled by the action of the ethylene (Oeller et al. 1991; Yang and Hoffman, 1994). External application of ethylene to this kind of fruits initiates autocatalytic ethylene production and stimulates ripening (McGlasson, 1985). On the other hand, the non-climacteric fruits do not produce ethylene autocatalytically. This kind of fruits are nonetheless sensitive to exogenous ethylene and some aspects of the ripening process can be induced under continuous presence of ethylene (Alonso et al., 1995; Ferrarese et al., 1995). Although different mechanisms have been proposed to be involved in the control of the ripening process in climacteric and non-climacteric fruits (McMurchie et al., 1972) our knowledge about the

molecular and physiological factors governing the later stages of development of non-climacteric fruits is scanty. The results concerning the effect of the gas hormone ethylene on the ripening of bell pepper (*Capsicum annuum*) are often inconsistent. Mikal and Salveit (1977) and Pretel et al. (1995) reported that application of ethylene analogs like propylene to bell pepper do not induce the ripening process, nor a climacteric rise in the respiration and ethylene production. The unaltered expression of a ripening-specific gene of bell pepper after treatment with an ethylene releasing compound, the ethephon (Deruere et al., 1994), tends to indicate that ethylene does not play an important role during bell pepper ripening. However, other reports showing red color enhancement (Knavel and Kemp, 1973; Sims et al., 1974; Worku et al., 1975) and activation of a ripening-promoter (Kuntz et al., 1998) upon ethephon treatment suggest that ethylene plays an important role in the control of ripening of bell pepper.

To investigate the factors which modulate the expression of developmentally regulated genes during the ripening of the non-climacteric bell pepper fruit, we have characterized various ripening-related genes: *Sn-1*, which encodes a protein sharing homology with PR-10 type pathogenesis-related proteins (Pozueta-Romero et al., 1995; Osmark et al., 1998; Nam et al., 1999), *J1-1*, which encodes a defensin (Meyer et al., 1996), *KCS* which encodes an enzyme involved in the synthesis of carotenoids (Houlné et al., 1994; Scolnick and Bartley, 1996, also named ChrA by Cervantes et al., 1990) and *PAP*, a ubiquitous gene which encodes a plastid lipids associated protein (Pozueta-Romero et al., 1997, also named *fibrillin* by Deruere et al., 1994). As for the case of climacteric fruits in which mechanical stress activates the ripening process (Theologis, 1992), the expression of these genes is induced/stimulated upon mechanical damage of the pericarp of bell pepper fruits at their mature-green stage (Pozueta-Romero et al., 1995; Meyer et al., 1996). This climacteric-like behavior of the non-climacteric bell pepper fruit leads us to analyze the regulatory properties of the ripening-related genes as well as the effect in their expression of some hormones and metabolites. Results presented here showing the different action of ethylene and ethephon in the bell pepper ripening process and the existence of sugar- and ascorbic acid-inducible sequences in the upstream region of *Sn-1* are of interest to understand the mechanisms controlling gene expression in non-climacteric fruits.

Referencias bibliográficas

- Alonso JM, Chamarro J, Granell A (1995) *Plant Mol Biol* 29: 385-390
Brady CJ (1989) *Ann Rev Plant Physiol* 38: 155-178
Cervantes-Cervantes M, Hadjeb M, Newman LA, Price CA (1990) *Plant Physiol* 92: 1241-1243
Deruère J, Romer S, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kuntz M, Camara B (1994) *Plant Cell* 6: 119-133
Ferrarese L, Trainotti L, Moretto P, Polverino de Laureto P, Rascio N, Casadoro G (1995) *Plant Mol Biol* 29: 735-747
Houlné G, Schantz M-L, Meyer B, Pozueta-Romero J, Schantz R (1994) *Curr Genet* 26: 524-527
Knavel DE, Kemp TR (1973) *Hort Science* 8: 403-404

Kuntz M, Chen HC, Simkin AJ, Römer S, Shipton CA, Drake R, Schuch W, Bramley PM (1998) *Plant J* 13: 351-361
McGlasson WB (1985) *Hortscience* 20: 51-54.
McMurchie EJ, McGlasson WB, Eaks IL (1972) *Nature* 237: 235-236
Meyer B, Houlné G, Pozueta-Romero J, Schantz ML, Schantz R (1996) *Plant Physiol* 112: 615-622
Nam Y-W, Tichit L, Leperlier M, Cuercq B, Marty I, Lelievre J-M (1999) *Plant Mol Biol* 39: 629-636
Oeller P.W, Min-Wong L, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991) *Science* 254: 437-439
Mikal E, Salveit Jr (1977) *J Amer Soc Hort Sci* 102: 523-525
Osmark P, Boyle B, Brisson N (1998) *Plant Mol Biol* 38: 1243-1246
Pozueta-Romero J, Klein M, Houlné G, Schantz ML, Meyer B, Schantz R (1995) *Plant Mol Biol* 28: 1011-1025
Pozueta-Romero J, Rafia F, Houlné G, Cheniclet C, Carde JP, Schantz ML, Schantz R(1997) *Plant Physiol* 115: 1185-1194
Pretel MT, Serrano M, Amoros A, Riquelme F, Romojaro F (1995) *Postharvest Biol Technol* 5(4): 295-302
Scolnick PA, Bartley GE (1996) *Plant Mol Biol Rep* 14: 305-319
Sims WL, Ririe D, Brendler RA, Snyder MJ, Wright DN, Schweers VH, Osterli PP (1974) *Calif. Agricult.* June 3-4.
Theologis A (1992) *Cell* 70: 181-184
Worku Z, Herner R, Carolus RL (1975) *Scientia Horticult.* 3: 239-245
Yang SF, Hoffman NE (1994) *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* 35: 115-189

Metabolismo

FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASAS QUIMERICAS CON REGULACION REDOX DEPENDIENTE DE LA LUZ

Cazalis, R., Chueca, A., y López Gorgé, J.

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, E.E. del Zaidín (CSIC), Granada.

La transformación por ingeniería genética de enzimas no regulables por procesos rédox en otras que sí lo son, puede ser importante en la creación de plantas transgénicas, y en el diseño de procesos donde un interruptor "on-off" estaría basado en una modificación del nivel rédox del sistema via cambios en los ciclos oscuridad-luz. Es el caso de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa), de la que hay dos formas en la célula fotosintética: una cloroplastídica regulada por la luz via procesos rédox, y otra citosólica insensible a la iluminación. Un análisis computerizado de la estructura de las FBPasas quiméricas bajo estudio predijo su viabilidad. Se construyeron dos tipos de FBPasas quiméricas. En el tipo X1 se enlazó la mitad N-terminal del gen codificante para las FBPasas humana y citosólica de remolacha azucarera, con la mitad C-terminal del gen que codifica la FBPasa cloroplastídica de guisante, que porta el denominado "lazo 170", implicado en la regulación rédox de esta enzima. En los tipos X2 se insertó dicho "lazo" en el lugar correspondiente de las FBPasas humana y citosólica. Las proteínas quiméricas expresadas en *E. coli* exhibían actividad FBPasa, y se identificaron con anticuerpos frente a la enzima cloroplastídica. Estas quimeras son mas inestables que las homólogas silvestres recombinantes, y necesitan del sustrato FBP como estabilizador para mantener su actividad. Se manifiesta un incremento de actividad de las FBPasas quiméricas en presencia de DTT o tiorredoxina, aunque la activación no alcanzó los niveles de la enzima cloroplastídica. Ello confirma el papel del "lazo 170" como zona reguladora, y a las cisteínas del mismo como sede del intercambio electrónico con la tiorredoxina. La entidad HL2 (del tipo X2 construido con la enzima humana), que presenta los mejores parámetros cinéticos, conserva muchas características de la enzima citosólica.

ENZIMAS DESRAMIFICADORAS DE ALMIDON EN TUBERCULO DE PATATA

Bustos, R., Smith, A., y Martin, C.

John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, UK.

El almidón es la forma mas importante de almacenaje de carbono en términos de cantidad y distribución en diferentes especies de plantas e importancia económica. Está compuesto de dos tipos principales de polímeros de glucano, amilosa -esencialmente cadenas lineales de (α 1-4)glucano- y amilopectina -cadenas cortas de (α 1-4)glucano unidas entre si por enlaces (α 1-6) formando ramificaciones-. El grado de ramificación de la amilopectina y la organización espacial de dichas ramificaciones dentro del gránulo de almidón son esenciales a la hora de determinar la estructura del gránulo y las características físico químicas del almidón.

Las enzimas desramificadoras de almidón (DBEs) -tipos pullulanasa e isoamilasa- han sido consideradas clasicamente como enzimas catabólicas implicadas en la degradación del almidón. Sin embargo, el análisis de mutantes deficientes en DBEs de cereales (*sugary 1*) y *Clamydomonas* (*STA 7*) ha sugerido que la actividad desramificadora, principalmente la tipo isoamilasa, podría estar implicada en la determinación de la estructura de la amilopectina durante la biosíntesis del almidón.

La patata es un modelo excelente en donde estudiar el papel de los DBEs en la síntesis de almidón. Es facilmente transformable y la biosíntesis de almidón en el tubérculo ha sido extensamente estudiada. Por otra parte, sabemos que mediante la alteracion de la actividad de otros enzimas implicados en la síntesis de almidón es posible producir tubérculos con almidón modificado de potencial importancia comercial.

Hemos construido una genoteca de cDNA de tubérculo de patata, y usando como sonda un EST de *Arabidopsis* homologa al gen *sugary 1* de maiz, hemos identificado tres clones de cDNA que codifican para DBEs de patata. La sequencia de aminoacidos predicha para estos clones es homologa a DBEs de tipo isoamilasa de diferentes origenes. La posible implicación de estos DBEs en la biosíntesis de almidón en tubérculo de patata sera discutida.

REGULACION CIRCADIANA DE LA BIOSINTESIS DEL ALMIDON

Mérida, A., Tenorio, G., y Romero, J.M.

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

El almidón es la forma de reserva carbonada más importante en vegetales. La acumulación de almidón a largo plazo tiene lugar en órganos de reserva como tubérculos, embriones o raíces, mientras que en tejidos fotosintéticos se acumula almidón de forma transitoria. Existen varias isoformas de cada uno de los enzimas implicados en el proceso: ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGPP), almidón sintasa (SS) y enzima ramificante (SBE). La principal característica del almidón transitorio es que se sintetiza durante el día y se degrada durante la noche para cubrir los requerimientos de carbono de la planta durante el periodo de oscuridad. Se ha propuesto la existencia de una regulación circadiana de la acumulación de almidón en hojas. Sin embargo, se conoce poco sobre la actividad de los enzimas biosintéticos o sobre los niveles de expresión de los genes implicados durante el ciclo día/noche, y por tanto, sobre el punto donde se ejercería el control circadiano de la biosíntesis de almidón. Resultados de nuestro grupo han demostrado que la expresión de algunos genes de la ruta de biosíntesis de almidón en *Antirrhinum majus* y *Arabidopsis thaliana* está controlada por el reloj circadiano. Asimismo, hemos estudiado el patrón de expresión de la GBSSI de *Antirrhinum majus* durante el desarrollo floral. El gen *GBSSI* muestra un patrón de expresión muy específico que sugiere un papel clave del proceso de síntesis de almidón durante el desarrollo floral. Así, durante el desarrollo del fruto y el posterior relleno de la semilla, sería necesaria una acumulación local de almidón en el carpelo para garantizar un aporte adecuado de carbono al óvulo y a la semilla.

Trabajo subvencionado por la DGES (PB95-1267) y Junta de Andalucía (CVI-129).

BIOSINTESIS DE ISOPRENOIDES: EFECTO DE LA SOBREEXPRESION DE LA ENZIMA FARNESILDIFOSFATO SINTASA EN PLANTAS TRANSGENICAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Masferrer, A., Arró, M., Boronat, A., y Ferrer, A.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Campus de Pedralbes. Universitat de Barcelona. Avda. Diagonal 643, 08028-Barcelona.

La enzima farnesildifosfato sintasa (FPS) cataliza la condensación secuencial de dos moléculas de isopentenildifosfato (IPP) con una molécula de dimetilalildifosfato y una del intermediario geranildifosfato, para producir farnesildifosfato (FPP). El FPP es el origen de numerosas ramificaciones que conducen a la síntesis de una gran variedad de derivados isoprenoides (fitoesteroles, ubiquinona, fitohormonas, proteínas preniladas) esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Para evaluar el papel regulador de la enzima FPS en la biosíntesis de isoprenoides, se han generado *Arabidopsis* transgénicas que sobreexpresan la isoenzima FPS1S de *Arabidopsis thaliana*. El análisis de plantas transgénicas con niveles de actividad FPS hasta 7 veces superiores a los de las plantas no transformadas muestra que el aumento de actividad FPS se traduce en un ligero incremento (1.5 veces) del nivel de esteroles totales respecto al de las plantas control, y en la aparición de lesiones necróticas en las hojas. Simultáneamente, se induce la expresión del gen marcador de senescencia SAG12. La adición de mevalonato al medio de cultivo revierte los procesos anteriores. La comparación de estos efectos con los causados por la sobreexpresión de las enzimas mevalonato quinasa y HMG-CoA reductasa sugiere que las lesiones asociadas a la sobreexpresión de FPS1S pueden ser consecuencia de un estado de senescencia precoz, causado por un déficit de citoquininas, o bien de una situación de estrés oxidativo, producido por un déficit de transportadores electrónicos mitocondriales, o bien de una combinación de ambas situaciones. En cualquier caso, el origen de estos fenómenos radicaría en una reducción de la disponibilidad de IPP causada por la sobreexpresión de FPS1S.

RELACIÓN DE LA VÍA DE SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES INDEPENDIENTE DE MEVALONATO (VÍA DE ROHMER) CON LA CAROTENOGÉNESIS DURANTE LA MADURACIÓN DEL FRUTO DE TOMATE

Lois, L.M., Rodríguez-Concepción, M., Campos, N., y Boronat, A.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1, 08028 Barcelona.

Los isoprenoides, compuestos con una gran diversidad estructural y funcional, se originan a partir de un único precursor estructural, el isopentenil pirofosfato (IPP). En bacterias y plantas la síntesis de IPP tiene lugar a través de la vía del mevalonato y de la recién descubierta vía de Rohmer. En las plantas se considera que la síntesis de IPP citosólica tiene lugar a través de la vía del mevalonato y la plastídica a través de la vía de Rohmer. Para estudiar la implicación de la vía de Rohmer en la síntesis de isoprenoides de origen plastídico se ha tomado como modelo de estudio el fruto de tomate. Se ha clonado un cDNA de tomate que codifica para la 1-desoxi-D-xilulosa 5-P sintasa (DXS), enzima que cataliza la primera reacción de la vía de Rohmer. Esta enzima presenta una extensión N-terminal con características de péptido de tránsito a cloroplastos. Estudios de Northern han puesto de manifiesto que la mayor variación de los niveles del mRNA de la DXS tiene lugar durante la maduración del fruto coincidiendo con la acumulación masiva de licopeno, carotenoide responsable de la coloración roja del fruto maduro. La variación de los niveles del mRNA correspondiente a la DXS se ha comparado con la de otros genes cuya expresión también varía durante la maduración del fruto.

CONTROL DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS POR CITOQUININAS ENDOGENAS EN PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO Y MUTANTES DE Arabidopsis

Cordeiro, A., Panicot, M., Bortolotti, C., Altabella, T., Koncz, C.¹, Schmülling, T.² y Tiburcio, A.F.

Univ. de Barcelona. Unidad de Fisiología Vegetal. Facultad de Farmacia. Avd. Diagonal 643. 08028 Barcelona.

¹Max Planck Institut für Züchtungsforschung. Carl-von-Linné-Weg, 10. D-50829 Köln. Alemania.

²Universität Tübingen. Centre for Plant Molecular Biology. Allgemeine Genetik. Auf der Morgenstelle 28. 72076 Tübingen. Alemania.

Las poliaminas (PAs) son compuestos nitrogenados alifáticos de bajo peso molecular, que se encuentran ampliamente distribuidos en todos los organismos vivos. En animales, las PAs actúan como intermediarios de la acción de varios factores de crecimiento y hormonas, siendo por ello esenciales para el crecimiento y la proliferación celular. En plantas, las PAs se han relacionado con diversos aspectos del desarrollo tales como la división celular, floración, senescencia y estrés. La función concreta de las PAs todavía no se conoce ya que la mayoría de estudios realizados en este campo son de tipo correlativo. En este sentido, existen numerosos trabajos en los que se observa una correlación positiva entre los niveles de citoquininas y los de PAs y/o de las actividades de sus enzimas biosintéticos, pero no se conoce la base molecular de esta interacción. En este trabajo se ha abordado dicho problema desde una perspectiva genético-molecular. Los resultados obtenidos mediante el empleo de plantas transgénicas de tabaco y de plantas mutantes de *Arabidopsis* (*amp1*) sobreproductoras de citoquininas indican que el metabolismo de las PAs está regulado a nivel transcripcional por los niveles endógenos de citoquininas. Estos resultados, junto con los obtenidos en otros estudios realizados en nuestro laboratorio, sugieren que los cambios en los niveles endógenos de PAs no son simplemente el resultado inespecífico de la alteración del crecimiento inducido por citoquininas y/u otros reguladores, sino que las PAs son reguladores del crecimiento que interactúan directamente con las rutas de señalización de fitohormonas.

ESTUDIOS DE LA ASIMILACIÓN DE NITRATO EN LA ESTIRPE SILVESTRE Y PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Lotus japonicus*

Orea, A.(1); Pajuelo, P.(1); Pajuelo, E.(1); Romero, J.M.(2); Márquez, A.J.

(1) Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular. Facultad de Química. Apdo.553, 41080-Sevilla.

(2) Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja. Avda. Américo Vespucio s/n. 41093-Sevilla.

Se ha caracterizado la asimilación de nitrato en la leguminosa modelo *Lotus japonicus* en diferentes tejidos y condiciones de cultivo, así como en plantas transgénicas. En presencia de nitrato la actividad y proteína NR fueron elevadas en raíces, siendo inferiores en tallos y en hojas. En amonio aunque no se pudo medir actividad NR en raíces, sí se detectaron niveles considerables de proteína NR, indicando la implicación de un sistema de regulación post-transcripcional de la NR por nitrato. En el caso de la NiR su comportamiento fue similar al de la NR, con la salvedad que en amonio se detectaron niveles basales de proteína NiR que se correlacionaban con los niveles de actividad detectados. En *L. japonicus* y a diferencia de lo descrito en otras leguminosas, cuando se aumentaba la concentración de nitrato externa no se producía un desplazamiento de la asimilación de nitrato hacia las hojas. Con el objeto de examinar el posible cambio de la asimilación de nitrato de raíces a hojas en *L. japonicus*, se han analizado varias líneas de plantas transgénicas portando el gen de la NR (en sentido y antisentido) bajo el control de diferentes promotores. Por otro lado se ha comprobado que los niveles de actividad NR en raíces están fuertemente influenciados por la edad de la planta y/o condiciones de cultivo, estableciéndose una correlación entre la capacidad de asimilación de nitrato y la capacidad para el crecimiento de las raíces.

XYL-1: EL GEN DE UNA α -XILOSIDASA DE PARED CELULAR EN ARABIDOPSIS THALIANA

Sampedro, J.¹, Sieiro, C.², Revilla, G.¹, Villa, T.G.², y Zarra, I.¹

¹Depto. Biología Vegetal / Fac. de Biología / Universidad de Santiago de Compostela.

²Depto. Microbiología / Fac. de Farmacia / Universidad de Santiago de Compostela.

La α -xilosidasa es una enzima que elimina residuos de α -xilosa unidos a la glucosa del extremo no reductor de oligosacáridos de xiloglucano. Es posible que tenga un papel importante en el complejo mecanismo de control del crecimiento de la pared. A partir de hojas de repollo se ha purificado una α -xilosidasa de la que se obtuvo la secuencia de aminoácidos del fragmento N-terminal y de un fragmento interno. Se identificaron dos ESTs de Arabidopsis (G10B11T7 y H8A7T7) como fragmentos del gen de la α -xilosidasa. Se obtuvo la secuencia completa del clon más largo (H8A7). Con esta información localizamos un clon IGF-BAC (F22C21) situado en el cromosoma I que incluye la totalidad del gen de la α -xilosidasa. Proponemos XYL-1 como nombre para este gen. La secuencia de un fragmento de 4288 bases, que incluye la región codificante del gen, ha sido enviada a GENBANK (AF144078). El producto de XYL-1 tiene un posible péptido señal y durante la maduración pierde un propéptido de 96 aminoácidos. El promotor de XYL-1 incluye varias secuencias muy parecidas a elementos regulados por luz de otros genes. Separamos las ocho primeras hojas de plantas de Arabidopsis de 19 días y las repartimos en cuatro grupos, de acuerdo con su orden de aparición. Cuanto más jóvenes son las hojas, mayor es el crecimiento relativo, y mayor es también la actividad específica de la α -xilosidasa. Los niveles de mRNA de XYL-1 son también más elevados en las hojas jóvenes. Trabajamos actualmente en otros factores que modifican la expresión de XYL-1.

Estrés abiótico

IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES DE *Arabidopsis thaliana* ALTERADOS EN SU RESPUESTA AL AYUNO DE FOSFATO

Rubio, V., Martín, A.C., Solano, R., Iglesias, J., del Pozo, J.C., de la Peña, A.¹, Leyva, A., y Paz-Ares, J.

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

¹Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid.

El fósforo es uno de los nutrientes más limitantes para el crecimiento de las plantas ya que en el suelo un 80% del fosfato, la forma asimilable, suele estar inmovilizado. Las plantas han desarrollado diversas respuestas adaptativas ante esta limitación, tales como las que incrementan la disponibilidad de fosfato inorgánico, exógeno y endógeno, gracias a la inducción de diferentes RNAsas y fosfatasas y a un aumento en la eficiencia en el transporte de fosfato en las raíces. Los mecanismos moleculares que regulan estos procesos son poco conocidos. En nuestro laboratorio pretendemos realizar una disección genético-molecular de la ruta de transducción de señal involucrada en la adaptación de las plantas a la carencia de este nutriente. Con este propósito hemos aislado un ADNc, denominado *AtPSI4* (de *Arabidopsis thaliana* phosphate starvation induced) específicamente inducido en condiciones limitantes de fosfato y que muestra algunas características propias de los riborreguladores. El patrón de expresión de *AtPSI4*, observado por tinción histoquímica de plantas transgénicas portadoras de una fusión traduccional del promotor de *AtPSI4* con el gen *uidA*, se correlaciona perfectamente con las áreas de la raíz donde la concentración de fosfato es baja. Este gen delator muestra un patrón de expresión similar en otras especies, tales como patata o tabaco, lo que indica que los mecanismos reguladores están conservados. Por último, hemos identificado mutantes alterados en la expresión del gen *AtPSI4* en una población de plantas portadoras de la citada construcción mutagenizadas con EMS y estamos procediendo a la caracterización molecular y fisiológica, y a la localización cromosómica de dichas mutaciones.

LA ACTIVIDAD ADO MET SINTETASA ES ESENCIAL PARA LA LIGNOSUBERIZACION DE LOS TEJIDOS VASCULARES Y SU ADAPTACION AL ESTRÉS HIDRICO Y SALINO

Sánchez Aguayo, I. (1), Rodríguez Galán, J.M. (2), Espartero, J. (2), y Pardo, J.M. (2)

(1) Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Campus de Reina Mercedes, 41012-Sevilla.

(2) Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Avda. Reina Mercedes, 10. 41012-Sevilla.

S-adenosil-metionina (AdoMet) es el principal donador de grupos metilo en las numerosas reacciones de transmetilación que ocurren en la célula. El genoma de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) contiene al menos 4 genes SAM que codifican para AdoMet sintetasa. Los genes SAM1 y SAM3 se inducen fuertemente por estrés salino, déficit hídrico y ABA. Se ha inmunohistolocalizado la AdoMet sintetasa, encontrándose una acumulación preferente en los tejidos con lignosuberización y principalmente en los haces vasculares. En las plantas de tomate sometidas a estrés salino ocurre un marcado desarrollo del xilema, observándose un mayor número de vasos con gruesas paredes secundarias. La síntesis de lignosuberina representa un gasto considerable de AdoMet celular debido a la metilación de los monolignoles precursores. Con objeto de establecer la relación entre la síntesis de lignina y el patrón de expresión de AdoMet sintetasa, se han obtenido plantas transgénicas de tabaco que expresan constitutivamente los genes SAM1 o SAM3 de tomate, seleccionándose líneas transgénicas en las que ocurrió un fenómeno de cosupresión. Las plantas cosuprimidas presentan un aspecto achaparrado, pérdida de dominancia apical, subdesarrollo radicular, y son muy sensibles a cambios de humedad o temperatura. El análisis histológico de las plantas suprimidas mostró malformaciones en los tejidos vasculares y vasos de xilema colapsados. El bajo contenido en monómeros metilados de lignina en el xilema fue coincidente con la desaparición de la AdoMet sintetasa. Estos resultados indican que la AdoMet sintetasa es una proteína esencial en el proceso de lignosuberización que tiene lugar en los tejidos vasculares de las plantas durante su adaptación al estrés salino

ARABIDOPSIS THALIANA AtHAL3: UNA FLAVOPROTEÍNA RELACIONADA CON EL CRECIMIENTO Y EL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO

Espinosa-Ruiz, A., Cutanda, M.C., Cortina, C., Romero, C., Hernández-Acosta, P., Bellés, J. M., Culiáñez Macià, F.A.

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

Se han identificado dos genes de *Arabidopsis thaliana*, AtHAL3a y AtHAL3b, que codifican homólogos de HAL3, una proteína de levadura que regula el ciclo celular y la tolerancia al estrés salino mediante la inhibición de la proteína fosfatasa PPZ1 (1, 2, 3). La expresión de AtHAL3a en mutantes hal3- en levadura complementa parcialmente su sensibilidad a LiCl, sugiriendo una similitud funcional entre ambas proteínas. AtHAL3a y AtHAL3b se expresan constitutivamente en todos los órganos de *Arabidopsis* y se inducen en respuesta a estrés salino. AtHAL3a tiene un nivel basal de expresión superior a AtHAL3b, particularmente en semillas. La localización espacio-temporal de la expresión de AtHAL3a muestra un enriquecimiento de su ARNm en embriones y en el tejido floemático de plantas adultas. Las proteínas AtHAL3 muestran elevada conservación con un grupo de proteínas encontradas en hongos, plantas y animales, y cierta homología con una amplia familia de flavoproteínas eucariotas. La proteína recombinante AtHAL3a es amarilla debido a la presencia de un grupo cromóforo unido de forma no covalente a la proteína, identificado por HPLC como flavin mononucleótido (FMN). Plantas transgénicas de *Arabidopsis*, con ganancia y pérdida de función, muestran tasas de crecimiento alteradas y diferencias en la tolerancia a estrés hídrico y salino. Las plantas que sobreexpresan AtHAL3a muestran una mayor velocidad de crecimiento que las plantas no transformadas, y las transgénicas con expresión menor de AtHAL3a presentan el fenotipo opuesto. Las plantas que sobreexpresan AtHAL3a son también más tolerantes a estrés hídrico y salino, presentando una mejora en la germinación y desarrollo. Las plantas transgénicas desarrollan raíces y hojas verdaderas en condiciones de estrés, mientras que las plantas tipo salvaje permanecen en el estadio de cotiledones en las mismas condiciones.

Referencias :

- (1) Ferrando et al., 1995. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5470-5481.
- (2) de Nadal et al., 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7357-7362.
- (3) Clotet et al., 1999. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2408-2415.

CARACTERIZACION DE LOS MUTANTES *salobreño* DE *Arabidopsis thaliana*

Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M.R., y Micol, J.L.

División de Genética. Universidad Miguel Hernández. Campus de San Juan. 03550 Alicante.

Hemos llevado a cabo una búsqueda de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con germinación halotolerante, empleando varios fondos genéticos y diferentes procedimientos de mutagénesis, como el tratamiento con metanosulfonato de etilo, el bombardeo con neutrones rápidos y las inserciones del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*. A partir del escrutinio de 675.500 semillas derivada de mutagénesis, hemos aislado y sometido a análisis genético 17 líneas mutantes, presentando todas ellas salvo una, tasas de germinación superiores al 25% en NaCl 250 mM, concentración que inhibe completamente la germinación de las estirpes silvestres.

El modo de herencia de su fenotipo mutante es monogénico y recesivo, aunque parece influido por el fondo genético de cada estirpe. Su análisis de complementación indicó que correspondían a 10 mutaciones genuinamente distintas, probablemente hipomorfos o nulas, que fueron asignadas a 5 genes, que hemos denominado *SALOBREÑO* (*SAÑ*). Los resultados de la cartografía de los genes *SAÑ* indican que no se corresponden con ninguna de las mutaciones previamente descritas cuyo fenotipo incluye alteraciones en la sensibilidad al NaCl.

Los mutantes afectados en los genes *SAÑ1* a *SAÑ4* son tolerantes al estrés iónico que producen sobre la germinación los iones Na^+ y Cl^- , y al osmótico causado por el manitol. El mutante *sañ5* es además resistente al K^+ e insensible al ácido abscísico. Nuestros resultados genéticos y moleculares demuestran que *sañ5* es un alelo nulo del gen *ABI4*.

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL ABA EN MAÍZ

Lumbreras, V., Kizis, D., y Pagés, M.

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación y Desarrollo, CSIC, Barcelona.

El ácido abscísico (ABA) regula diferentes procesos fisiológicos y del desarrollo en plantas y juega un papel clave en mecanismos de respuesta a varios tipos de estrés. Su función está mediada por la activación de genes dianas, tal como los genes *rab* (*responsive to ABA*). Sin embargo, se conoce poco sobre cómo la señal del ABA modula la expresión de estos genes y cómo éstos a su vez inducen respuestas en la planta.

Para abordar estas preguntas estamos identificando nuevas proteínas implicadas en el proceso de señalización del ABA en maíz. Se ha llevado a cabo un *screening* de los dos híbridos en levadura para aislar factores que interactúan con el producto del gen *rab28*. Esta proteína presenta una localización nucleolar, pero su función en la respuesta a la señal del ABA es desconocida. Uno de los clones aislados corresponde a una proteína G homóloga al gen *arcA* de tabaco. La expresión de esta proteína tiene lugar en tejidos jóvenes y se reprime por varios tipos de estrés como frío y calor. Además, se ha determinado que la proteína se localiza en el citoplasma y el núcleo de la célula. También se ha aislado un clon parcial con una elevada similitud a la proteína kinasa *snf4* de levadura. La caracterización de este gen en el maíz sugiere una organización funcional notablemente distinta a la de levadura.

CHAPERONAS DE BAJO PESO MOLECULAR: PROTECCION IN VIVO FRENTE A TEMPERATURAS ALTAS Y BAJAS

Soto, A., Allona, I., Collada, C., Guevara, M.A., Casado, R., Rodríguez-Cerezo, E. (1), Aragoncillo, C., y Gomez, L.

Departamento de Biotecnología, E.T.S. Ingenieros de Montes, Universidad Politécnica de Madrid y (1)Centro Nacional de Biotecnología-CSIC. Email: lgomez@montes.upm.es

Todos los seres vivos poseen proteínas con actividad chaperona. Al sintetizarse masivamente en respuesta a temperaturas elevadas, numerosas chaperonas se han clasificado como proteínas HSP (heat-shock proteins). En plantas las principales HSP inducidas por calor pertenecen a la familia sHSP (small HSPs). Algunos miembros se acumulan normalmente durante el desarrollo, p. ej. en semillas. Recientemente hemos purificado una proteína sHSP, denominada CsHSP17.5, mayoritaria en semillas de castaño. Por poseer uno de los contenidos hídricos más altos descritos (ca. 50%), las semillas recalcitrantes de esta especie son en principio más susceptibles a determinados tipos de estrés. CsHSP17.5 presenta una localización exclusivamente citosólica y posee actividad chaperona molecular. La expresión heteróloga de esta proteína en *E. coli* nos ha permitido estudiar su posible papel protector in vivo. Ante una situación de estrés térmico, las células que acumulan CsHSP17.5 muestran tasas de supervivencia mayores que los controles. El análisis de los correspondientes lisados indica además que el efecto protector está asociado a una mayor termoestabilidad de las proteínas solubles celulares. Mediante experimentos análogos hemos comprobado que CsHSP17.5 también confiere una mayor tolerancia al estrés por bajas temperaturas, al contrario que las chaperonas mayoritarias GroEL/ES. Estos resultados demuestran una nueva función in vivo para la familia de chaperonas sHSP. La inducción de transcritos homólogos en plántulas de castaño sometidas a temperaturas extremas, pero no a estrés salino, es congruente con las conclusiones anteriores.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN GEN DE ARABIDOPSIS INDUCIBLE POR FRIO QUE CODIFICA UNA PROTEINA CON SIMILITUD A UN INTERCAMBIADOR DE H⁺/Ca²⁺

Catalá, R., y Salinas, J.

Departamento de Mejora Genética y Biotecnología, INIA, Carretera de La Coruña Km 7. 28040-Madrid.

Mediante el proceso de aclimatación, muchas especies vegetales son capaces de incrementar su tolerancia a la congelación en respuesta a temperaturas entre 0 y 10^o C. Durante este proceso se producen diferentes cambios a nivel fisiológico y bioquímico. Uno de estos cambios es el aumento transitorio en los niveles del Ca²⁺ intracelular. El Ca²⁺ actúa como segundo mensajero, activando la cadena de transducción de la señal inducida por las temperaturas bajas, a través de proteínas dependientes de Ca²⁺, responsables a su vez de la activación de genes implicados en la tolerancia a la congelación. Así pues, el aislamiento y caracterización molecular de genes que codifican proteínas que participan en la regulación de los niveles intracelulares de Ca²⁺ es de gran interés para comprender los mecanismos moleculares que controlan la respuesta de aclimatación. En el presente trabajo presentaremos el aislamiento y caracterización de un gen de Arabidopsis inducible por temperaturas bajas, denominado *RCI4A*, que codifica una proteína con similitud estructural a intercambiadores de H⁺/ Ca²⁺. Además, también se presentará el patrón de expresión de este gen a lo largo del desarrollo, en diferentes tejidos y en respuesta a diferentes estreses relacionados con el proceso de aclimatación. El estudio de la regulación de la expresión de *RCI4A* se completará con los resultados obtenidos a partir del análisis de plantas transgénicas de Arabidopsis en las cuales el gen delator *uidA* está bajo el control del promotor de *RCI4A*. Los resultados obtenidos sugieren que la proteína RCI4A puede estar relacionada con la homeostasis del Ca²⁺ intracelular durante el proceso de aclimatación a temperaturas bajas.

UNA LIPOXIGENASA DE LA RUTA DE SINTESIS DE ALDEHIDOS C-6 EN PATATA ES NECESARIA PARA LA RESISTENCIA A BACTERIAS

León, J., Sanz, C.*, Royo, J., Vancanneyt, G.§, Sánchez Serrano, J.J.

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

* Instituto de la Grasa CSIC, Avda. Padre García Tejero 4, 41012 Sevilla.

§ Plant Genetic Systems, Jozef Plateaustraat 22, B-9000 Gent , Bélgica.

El ácido jasmónico (JA) es un regulador del crecimiento vegetal que interviene en la respuesta de defensa que se inicia al producirse una herida. JA es un derivado del ácido linolénico (LNA) que, en plantas, es el ácido graso más abundante en los lípidos de membrana. Se postula que es el LNA libre el sustrato de las lipoxigenasas (LOX), que introducen oxígeno molecular dando lugar a la aparición de hidroperóxidos. Las LOX constituyen una gran familia multigénica en patata: unas LOX peroxidan el LNA en el C-9 mientras que otras lo hacen en el C-13, pero solo el 13-hidroperóxido es precursor de JA.

En nuestro laboratorio hemos caracterizado dos cDNAs diferentes de hoja (LOX-H1 y H3) que codifican enzimas con actividad 13-LOX. Para elucidar la función de LOX H1 hemos alterado su expresión en plantas transgénicas de patata. Hemos obtenido tres líneas que muestran cosupresión del transgen y del gen endógeno. Estas plantas cosuprimidas acumulan menos del 1% de proteína LOX H1 que la detectada en plantas silvestres y muestran una alteración fenotípica caracterizada por un crecimiento menor en altura, una distancia internodal mas corta, menor tamaño de las hojas, pérdida de la dominancia apical y formación de flores menos pigmentadas. LOX H1 es una proteína cloroplástica, donde se postula que se produce la síntesis de JA. Sin embargo, la deficiencia en LOX H1 no afecta a la síntesis de jasmonatos pero si a los niveles de hexenales y hexanales. Nuestros datos sugieren que la LOX H1 podría participar en procesos de defensa frente a patógenos. Hemos comprobado que las líneas cosuprimidas en LOX H1 son susceptibles a la infección por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. tomate DC 3000, lo que contrasta con la resistencia observada en plantas silvestres.

Estrés biótico

MECANISMOS MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN ENTRE BACTERIAS DEL GÉNERO *ERWINIA* Y SUS PLANTAS HOSPEDADORAS

López-Solanilla, E., Miguel, E., Poza-Carrión, C., Aguilar, I., Llama-Palacios, A., García-Olmedo, F., y Rodríguez-Palenzuela, P.

Departamento de Biotecnología, E.T.S.Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.

Dentro del género *Erwinia* se encuentran los principales agentes causales de la denominada “podredumbre blanda” en un gran número de especies vegetales, ocasionando importantes pérdidas económicas en todo el mundo. En nuestro laboratorio se estudian distintos aspectos de esta interacción: (1) La bacteria dispone de distintos factores de patogenicidad que le permiten el desarrollo de la enfermedad en su planta huésped. A través del aislamiento y caracterización de genes bacterianos inducidos en planta, se están identificando factores necesarios específicamente en la infección y que por tanto deben contribuir a la virulencia del patógeno; (2) Un patógeno capaz de prosperar produciendo enfermedad debe ser capaz de eludir o resistir las barreras de defensa de la planta. La identificación de un sistema implicado en la resistencia a péptidos antimicrobianos de plantas en *Erwinia chrysanthemi* nos ha permitido analizar su importancia relativa en la virulencia del patógeno así como corroborar el papel de los péptidos antimicrobianos en los mecanismos de defensa de la planta; (3) El choque oxidativo inducido por la infección de bacterias ha sido propuesto como una de las primeras barreras de defensa en determinadas interacciones, asignándole al H_2O_2 un papel antimicrobiano directo. En nuestro laboratorio hemos analizado la implicación de este sistema en la defensa frente a la infección de *Erwinia chrysanthemi*; (4) Caracterización de la respuesta de *Arabidopsis thaliana* a la infección de *Erwinia carotovora*; (5) Tipificación molecular de cepas de *Brenneria* (*Erwinia*) quercina, patógeno del género *Quercus*, aisladas en España.

EL ETILENO Y EL ACIDO SALICILICO COMO MEDIADORES DEL BLOQUEO POR PATOGENOS DE LA SINTESIS DE INHIBIDORES DE PROTEASAS DE RESPUESTA A HERIDA

Fayos, J., Medina, M.E., Bellés, J.M., y Conejero, V.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia (UPV)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Avda. Los naranjos s/n, 46022-Valencia.

En la IV Reunión de Biología Molecular de Plantas (Sitges, 1997) presentamos resultados que demuestran que la infección con patógenos de distinta naturaleza produce en plantas de tomate el bloqueo de la síntesis de inhibidores de proteasas de defensa contra insectos y herbívoros (herida). En esta comunicación se presentan datos que indican: i) que el mismo efecto se produce al aplicar exógenamente dosis altas de etileno o su precursor biosintético ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), tratamientos que provocan también un descenso de los niveles de ácido salicílico (SA) por debajo de los valores normales; ii) que este efecto patogénico de bloqueo disminuye de manera significativa en plantas en las que se previene la acumulación de etileno con tratamientos con un inhibidor de su biosíntesis (AVG, L- α -(2-aminoetoxivinil) glicina) o en plantas de tomate transgénicas (PTOM13) que presentan en antisentido el gen de la ACC-oxidasa (enzima que cataliza el último paso de la biosíntesis de etileno); iii) que este efecto inhibitorio se produce también en plantas NahG que tienen bloqueada la acumulación de SA. De estos resultados se pueden extraer las siguientes conclusiones: i) el bloqueo por patógenos de la respuesta a herida es un efecto biológico regulador, que parece estar mediado por los aumentos del nivel de etileno que se inducen en la respuesta de la planta frente a patógenos, siguiendo un camino independiente de SA; ii) el bloqueo producido por aplicación exógena de SA, según se ha descrito, se debería a la inhibición de la síntesis de JA. Nuestros resultados indican que este bloqueo podría deberse también a la disminución que produce el SA en los niveles basales de etileno necesarios para la síntesis de inhibidores de proteasas.

MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A PATÓGENOS MEDIADOS POR ETILENO

Solano, R.¹, Berrocal, M.² y Molina, A.²

¹Centro Nacional de Biotecnología-CSIC. Campus Cantoblanco, 28049 Madrid.

²Departamento de Biotecnología. ETSI Agrónomos. Univ. Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid

El etileno es una fitohormona implicada en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos y de desarrollo entre los que destaca la respuesta a estrés, tanto biótico como abiótico (Johnson y Ecker, 1998, Pieterse y Van Loon, 1999). Durante esta década ha avanzado mucho nuestro conocimiento sobre su ruta de señalización (Solano y Ecker, 1998). Sin embargo, se desconoce todavía, en gran medida, como esta ruta de señalización se traduce en la activación de las distintas respuestas a la hormona. Con el fin de analizar el papel del etileno en la respuesta a estrés biótico, hemos estudiado la susceptibilidad de mutantes de *Arabidopsis* afectados en la señalización de etileno a la infección por *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporium*. Los mutantes insensibles a etileno son más susceptibles que plantas silvestres al ataque por estos hongos, lo cual demuestra el papel fundamental que el etileno desempeña en la señalización de la respuesta a patógenos. Dentro de los elementos que componen la ruta de señalización y respuesta a etileno, *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* (*ERF1*) es un factor transcripcional con un dominio de unión a DNA de tipo AP2 (Solano *et al.*, 1998). La infección de plantas de *Arabidopsis* por *Botrytis cinerea* induce la expresión de *ERF1*, y este a su vez, activa la expresión de altos niveles de genes de defensa (ej: *PDF1.2*, *b-CHI*), y confiere resistencia frente a *Botrytis cinerea*. Estos resultados ponen de manifiesto el papel central que *ERF1* ocupa en la regulación de la respuesta a patógenos mediada por etileno.

- Johnson, P.R. y Ecker, J.R. (1998). Annu. Rev. Genet. 32, 227-254.
- Pieterse, C.M.J., y Van Loon, L.C. (1999). Trends in Plant Science, 4, 52-58.
- Solano, R. y Ecker, J. R. (1998). Curr. Op. Plant Biol. 1, 393-398.
- Solano, R., et al. (1998). Genes and Development, 12, 3703-3714.

PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARROZ QUE EXPRESAN UN INHIBIDOR DE PROTEASAS DE MAÍZ (gen *mpi*) SON RESISTENTES FRENTE AL INSECTO LEPIDÓPTERO *Chilo suppressalis*

Vila, L.¹, Murillo, I.¹, Marfá, V.², Meynard, D.³, Messeguer, J.², Guiderdoni, E.³, y San Segundo, B.¹

¹Departamento de Genética Molecular, Instituto de Biología de Barcelona, CID, CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona.

²Departamento de Genética Vegetal, IRTA Centro de Cabriels. Ctra. de Cabriels s/n. 08348 Cabriels, Barcelona.

³CIRAD-AMIS BP5035, 34032 Montpellier, France.

Las plantas, en respuesta al ataque por insectos activan la expresión de genes que codifican para inhibidores de proteasas. Estos inhibidores de proteasas son capaces de inhibir actividades proteolíticas presentes en el tracto digestivo del insecto provocando así un retardo en su crecimiento y finalmente su muerte. Se sabe, sin embargo, que los insectos pueden superar el efecto protector del transgen mediante la expresión de otras proteinasas que no son susceptibles de inhibición. Mediante la expresión simultánea de inhibidores de proteinasas puede conseguirse una protección más duradera en la planta transgénica. En esta línea, resulta de interés la utilización de inhibidores con especificidad por diferentes tipos de proteinasas, así como la expresión de inhibidores de proteasas en combinación con otros genes insecticidas (p.e. gen para la toxina de *Bacillus thuringiensis*). En nuestro laboratorio estamos interesados en la obtención de plantas transgénicas de arroz resistentes al insecto lepidóptero *Chilo suppressalis*, insecto que representa una plaga importante para los cultivos de arroz de la región mediterránea. Para ello se ha expresado un gen que codifica para un inhibidor de proteinasas de maíz (gen *mpi*) en plantas de arroz de la variedad Senia (japonica), variedad que se cultiva en la región del Delta del Ebro. El inhibidor MPI es un inhibidor bifuncional, capaz de inhibir actividades proteolíticas digestivas de insectos del tipo elastasa y quimotripsina. Los resultados obtenidos nos indican que las plantas de arroz que expresan el gen *mpi* muestran resistencia frente a *Chilo suppressalis*. El promotor del gen *mpi* es asimismo funcional en plantas de arroz y presenta inducibilidad por herida. Simultáneamente, se está desarrollando una metodología para la transformación de arroz mediada por *Agrobacterium* adecuada para la comercialización de plantas transgénicas.

ANÁLISIS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS CARACTERÍSTICAS DE UNA EXPLOSIÓN OXIDATIVA EN LA SIMBIOSIS *Sinorhizobium meliloti*-ALFALFA

Soto, M.J.¹, Bueno, P.², Sanjuan, J.¹, Donaire, J.P.², y Olivares, J.¹

¹Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos;

²Departamento de Bioquímica Vegetal, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda, 1; 18008 Granada.

La asociación que se establece entre *Rhizobium* y las leguminosas comienza con un intercambio de señales entre la bacteria y la planta. Durante ese proceso, y puesto que se trata de una asociación mutualista, o bien la planta debe reconocer a la bacteria como no patógena o bien la bacteria tiene que eludir la respuesta defensiva. La observación de una acumulación de ácido salicílico (SA) en las raíces de plantas de alfalfa inoculadas con un mutante *nodC* de *S. meliloti* (no productor de factor Nod), constituye una prueba de la existencia de una respuesta defensiva en una interacción incompatible (Martínez-Abarca *et al.* (1998) MPMI 11: 153-155). Esta acumulación no se observa inoculando con la cepa silvestre, lo que sugiere que los factores Nod desempeñan un importante papel en bloquear la respuesta defensiva mediada por SA. En respuestas de hipersensibilidad (HR) y de resistencia sistémica adquirida (SAR) se relaciona la producción de SA con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El análisis de actividades enzimáticas características de una explosión oxidativa ha revelado que los factores Nod determinan un incremento en actividad catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR). Además el incremento observado en actividad lipooxigenasa (LOX) en respuesta a la inoculación con una cepa silvestre, sugiere la implicación de una nueva molécula señal en el establecimiento de una interacción compatible. Actualmente estamos investigando si estos cambios en actividad se correlacionan con cambios en el patrón de expresión génica.

UNA NUEVA RUTA DE SINTESIS DE OXILIPINAS INVOLUCRADA EN LA RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL

Sanz, A. (1), Ponce de León, I. (1), Hamberg, M. (2), y Castresana, C. (1).

(1) Departamento de Genética Molecular de Plantas. Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, España.

(2) Departamento de Bioquímica Médica y Biofísica. Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia.

La generación de compuestos de naturaleza lipídica en la planta en respuesta a una infección microbiana contribuye, directa o indirectamente, a limitar el desarrollo del patógeno. La síntesis de estos compuestos, denominados genéricamente como oxilipinas, se inicia, mediante la acción de lipoxigenasas, a partir de los ácidos grasos liberados de la membrana celular.

El análisis de los cambios en los niveles de RNA mensajeros producidos durante la reacción de defensa de la planta, nos ha permitido identificar una nueva clase de enzimas vegetales que catalizan la oxigenación de ácidos grasos. La identificación estructural de los compuestos sintetizados por la acción de estas enzimas ha permitido determinar que estas proteínas, a las que inicialmente designamos como PIOX (por pathogen induced oxxygenase) actúan como α -dioxigenasas catalizando la conversión del ácido linolénico, y otros ácidos grasos, en su derivado 2(R)-hidroperóxido. Este producto se modifica posteriormente dando lugar a la aparición de tres tipos de compuestos: un derivado aldehídico C_n-1, un α -hidroxi-ácido C_n, y un ácido graso C_n-1.

La reacción enzimática caracterizada permite renombrar a la proteína identificada como α -DOX, o α -dioxigenasa, y examinar la función de los productos sintetizados en la respuesta de la planta frente a la infección.

La participación de la proteína α -DOX en la respuesta de defensa vegetal se postula en base al patrón de activación del gen α -*dox*, así como al nivel de acumulación de proteína en el tejido infectado. Ambos procesos ocurren de forma más rápida en interacciones planta-patógeno de tipo incompatible, es decir cuando la planta se manifiesta resistente a la infección.

GENES DE PECTIN METIL-ESTERASA EN *Medicago truncatula*: DOS MECANISMOS DE EVOLUCIÓN MOLECULAR DISTINTOS EXPLICAN EL RECLUTAMIENTO DE ACTIVIDAD PME EN LA SIMBIOSIS CON *Sinorhizobium meliloti*

Pérez-Hormaeche, J., Kondorosi, A.*, Ratet, P.* y Palomares, A.J.

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

*Institute des Sciences Vegetales. CNRS. Gif-sur-Yvette. Francia.

La demetilesterificación de la pectina, catalizada en plantas superiores por isoenzimas distintas de pectin metil-esterasa (PME), determina la susceptibilidad de la misma a la degradación enzimática por poligalacturonasas y pectato liasas. Además, estas enzimas son parcialmente responsables del dinamismo de la pared celular modulando la actividad de hidrolasas dependientes de pH y modificando los componentes que interaccionan en ella. En las etapas tempranas de la interacción *Rhizobium*-leguminosa el intercambio de señales entre los dos simbioses dispara la inducción en la planta de un programa genético específico. Para analizar el papel de las PMEs durante el establecimiento de la simbiosis entre *Sinorhizobium meliloti* y *Medicago truncatula*, hemos abordado el estudio de las distintas isoenzimas presentes en la planta y hemos analizado la expresión de varios genes de PME durante el desarrollo del nódulo. Basándonos en el patrón de expresión y en la homología compartida por las distintas secuencias caracterizadas hemos clasificado los genes de PME en dos grupos. El primer grupo comprende tres genes: *MtPEF1* y *MtPEF2*, que forman una pequeña familia génica de PMEs expresadas en la flor, y *MtPER*, que se expresa transitoriamente sólo durante las etapas tempranas de la interacción con *Sinorhizobium*. Los datos de expresión, secuencia y localización sugieren un origen común para estos genes de PME. El segundo grupo está compuesto por cinco genes de PME que presentan un patrón de expresión más amplio en la planta, pero una cinética característica para cada uno durante la nodulación. Las diferencias encontradas en los dos grupos indican que dos mecanismos evolutivos distintos han permitido el reclutamiento de actividad PME durante la simbiosis.

Fitopatógenos

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA DEL HONGO *Spilocaea oleagina*, AGENTE QUE CAUSA LA ENFERMEDAD DEL REPILO EN EL OLIVO

Gonzalez, R.¹; Trapero, A.²; Valpuesta, V.¹ y Botella, M.A.¹

¹Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Universidad de Málaga.

²Departamento de Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba.

La producción media anual del olivar en el mundo es de 10 millones de toneladas de aceitunas, siendo España el principal productor. Entre los pocos datos que existen en España sobre la pérdidas de cosechas, se recoge que un 12% se debe a enfermedades, siendo la más importante, la causada por el hongo *Spilocaea oleagina*, agente causal del repilo. Los datos actuales sobre el grado de resistencia de las distintas variedades del olivo al repilo son confusos, y en algunas ocasiones contradictorios. Esto podría explicarse por la presencia de variabilidad genética en el hongo lo que podría significar una capacidad de infección diferente entre distintos aislados del mismo. Actualmente no existe ninguna información sobre la existencia de variación o especialización en las distintas poblaciones de repilo, lo que sería muy importante para el diseño y aplicación de medidas de resistencia a la infección en el olivo. Nuestro objetivo es estudiar el polimorfismo de *Spilocaea oleagina*, como primer paso en el conocimiento de las distintas interacciones entre el hospedador y el patógeno. Para ello estamos empleando dos aproximaciones diferentes: (1) El uso de AFLP (amplified fragment length polymorphism) y (2) la comparación de secuencias hipervariables del rDNA ribosómico 28S.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE COMPLEJOS DE REPLICACION DEL POTYVIRUS PLUM POX VIRUS (PPV)

Escribano, V., Ribera, E., García, J.A., y Rodríguez-Cerezo, E.

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, España.

La mayoría de los virus de plantas tienen un genoma RNA que se replica en la célula huésped por medio de un complejo de replicación (replicasa) en el que intervienen proteínas virales y proteínas del huésped. Los genes del huésped que forman parte de estas replicasas virales no se conocen en la mayoría de los casos, como es el de los potyvirus, los virus RNA más numerosos en plantas. La replicación de potyvirus ocurre en el citoplasma asociada a membranas celulares, aunque el origen de las mismas se desconoce. Para purificar complejos de replicación hemos fraccionado en gradientes de glicerol extractos totales de membranas de *Nicotiana clelandii* infectada con el potyvirus plum pox virus (PPV) para su fraccionamiento en gradientes de glicerol. Se detectó actividad replicasa (medida por la producción de dsRNA in vitro) en tres de las fracciones. Estas fracciones se utilizaron para estudiar la disposición espacial del complejo de replicación en experimentos de inmunolocalización y microscopía electrónica. La proteína de la cápsida de PPV (CP) se detectó en todas las fracciones, mientras que las proteínas CI (RNA helicasa) y N1b (RNA polimerasa dependiente de RNA) se detectaron en las fracciones con actividad de replicación. Estos experimentos se están completando con anticuerpos para otras proteínas virales y para marcadores de ciertos tipos de membranas celulares, como la proteína BIP. Los experimentos de microscopía electrónica revelaron la presencia de estructuras específicas de las fracciones con actividad de replicación. Estas estructuras consistían en complejos baciliformes asociados a vesículas membranosas. Los complejos aislados sufren cambios morfológicos apreciables al añadirles los componentes de la reacción de replicación. Los experimentos actuales se centran en la inmunolocalización de proteínas virales en el complejo observado y en la identificación del origen subcelular de las vesículas membranosas. Esta es la primera vez que se describe la morfología del complejo de replicación de un virus de plantas.

SITIOS DE INICIACION DE LA SINTESIS DE LOS RNAs DE AMBAS POLARIDADES EN UN VIROIDE CON RIBOZIMAS DE CABEZA DE MARTILLO

Navarro, J.A., y Flores, R.

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

Los viroides son patógenos de plantas constituidos por un pequeño RNA circular de simple cadena cuya replicación procede por un mecanismo de círculo rodante con solo intermediarios de RNA. Una cuestión pendiente es si el inicio de la replicación viroidal ocurre en posiciones específicas definidas por promotores, o al azar, una alternativa posible considerando que la naturaleza circular del molde permite su transcripción completa independientemente de por donde ésta comience. Los RNAs viroidales lineales que contienen el inicio de la replicación, y en general todo transcrito primario, poseen en su extremo 5' un grupo trifosfato susceptible de ser marcado *in vitro* con [alfa³²P]-GTP y guanidiltransferasa. La combinación de esta reacción con un ensayo de protección con ribonucleasas, ha permitido identificar el sitio de inicio de la síntesis de los RNAs del viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd), la especie tipo de la familia de viroides con ribozimas de cabeza de martillo. En cada polaridad este sitio coincide con sólo uno de los varios extremos 5' caracterizados en experimentos de extensión de cebador empleando RNAs lineales del ASBVd purificados de plantas infectadas. Dichos sitios se encuentran en regiones ricas en A+U situadas en el bucle terminal derecho de la molécula viroidal. Las secuencias alrededor de los mismos son similares en los RNAs viroidales de ambas polaridades, por lo que es probable que sean reconocidas por el factor(es) específico que recluta la RNA polimerasa, y asimismo presentan similitudes con los promotores reconocidos por la RNA polimerasa cloroplástica de tipo NEP (de "nuclear encoded polymerase"), que es la enzima que parece estar implicada en la replicación del ASBVd.

CORRELACIÓN ENTRE DOMINIOS SECUENCIALES DE LA MOLÉCULA VIROIDAL 'CEVd' Y SU FUNCIONALIDAD

Bordas, M., Lisón, M.P., y Conejero, V.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Camino de Vera, s/n 46022
Valencia

Los viroides son los patógenos de menor complejidad y contenido informacional de estructura conocida. Son pequeñas moléculas de RNA circular desnudo. Son infectivos, patogénicos y capaces de activar un mecanismo general de respuesta de la planta huésped, sin intervención de ninguna proteína. El objetivo que se persigue en esta investigación es establecer una correlación entre la estructura del viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) y sus propiedades biológicas. Para ello, la estrategia que hemos seguido ha consistido en la sobreexpresión en plantas transgénicas de tomate de diferentes fragmentos de cDNA de la molécula viroidal bajo el control transcripcional de promotores constitutivos. La sobreexpresión de estas secuencias viroidales podría, además, conferir resistencia a viroides. En una primera etapa de este trabajo, se han diseñado y obtenido una serie de construcciones génicas portadoras de regiones estructurales de cDNA correspondientes a distintos dominios de la molécula del CEVd posiblemente relacionados con sus propiedades funcionales. Las secuencias génicas derivadas del viroide se insertaron en el plásmido pBI121 en ambas orientaciones bajo el control transcripcional del promotor doble 35S2X de CaMV. Este sistema binario se ha utilizado para la transformación genética de plantas del cultivar de tomate 'Rutgers'. Se ha comprobado la integración de los transgenes en el genoma de las plantas transformadas y se ha determinado el número de copias en cada transformante independiente. En estas plantas se detectaron niveles variables de transcrito de origen viroidal. En estos momentos se está realizando el estudio del comportamiento de la descendencia de estas plantas frente a la infección con el CEVd.

Otras comunicaciones

PAPEL DE *BARE-1* EN LA EVOLUCIÓN DEL GENOMA EN EL GÉNERO *HORDEUM*

Vicient, C.M., Suoniemi, A., Ananthawat-Jonsson, K., Tanskanen, J., Beharav, A., Nevo, E., y Schulman, A.H.

Inst. Biotechnology, Univ. Helsinki, PO Box 56, 00014 Helsinki, Finland.

Los retrotransposones son elementos genéticos móviles compuestos por una región codificante flanqueada por dos repeticiones directas o LTR (Long Terminal Repeat) y su transposición se produce por medio de un RNA intermediario. Este proceso de replicación puede producir incrementos repentinos en el número de copias. Es por ello que decidimos estudiar la influencia del retrotransposón de cebada *BARE-1* en el tamaño del genoma en el género *Hordeum* (Vicient *et al*, Plant Cell 11(9), en prensa). Hemos determinado el número de copias de la región interna y del LTR en diferentes especies. Como media, *BARE-1* tiene 13.700 copias (2.9 % del genoma) y el número de copias tiende a ser mayor cuando el genoma lo es. El número de copias del LTR es mucho mayor que el de la región interna. Si todas las copias de *BARE-1* fueran completas se esperaría una relación región interna:LTR de 1:2 pero los datos muestran que es mucho mayor. El exceso de LTR es tanto mayor cuanto menor es el porcentaje de genoma ocupado por *BARE-1*. Esto puede explicarse por la recombinación entre dos LTR de un mismo o diferentes elementos que produciría una reducción en el número de elementos activos y en el tamaño del genoma. El estudio de algunos BAC de cebada confirma esta hipótesis.

MAPADO DE ALTA RESOLUCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES DEL MELÓN. INICIO DE UN PROYECTO GENOMA

Garcia-Mas, J.¹, van Leeuwen, H.², Morales, M.¹, Arús, P.¹, Puigdomènech, P.², Monfort, A.

1 Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria, Carretera de Cabrils, s/n. 08348-CABRILS, Barcelona.

2 Institut de Biología Molecular de Barcelona, CID, CSIC. Jordi Girona 18-26, 08034-BARCELONA.

El melón es un importante cultivo hortícola en España del cual existen numerosas variedades. "Piel de Sapo" es el cultivar más utilizado en España y además es susceptible a muchas enfermedades. Una de las enfermedades más importantes en el cultivo de invierno es el virus del cribado MNSV. La línea de melón coreano PI161375 posee el alelo recesivo *nsv* que le confiere resistencia al ataque del virus. Dicha variedad también posee el gen *Vat* que impide la colonización por el áfido *Aphis gossypii* e impide así la transmisión de múltiples virus. A partir del cruzamiento entre las dos líneas de melón PI161375 y "Piel de Sapo" se ha generado una población de 32 líneas doble haploides (LDH) de las cuales hemos verificado la resistencia y estamos utilizando para saturar de marcadores las regiones próximas a los genes de resistencia *nsv* y *Vat*. Disponemos actualmente de un grupo de 3 marcadores AFLP que se distribuyen en un intervalo de 6 cM alrededor del gen *nsv*. El genoma del melón es relativamente pequeño (454 Mb), similar al genoma del arroz. La preparación de una genoteca de BACs a partir de núcleos extraídos de hojas jóvenes nos permitirá ordenar un conjunto de BACs, para localizar y obtener la secuencia de diferentes genes de interés. A su vez la búsqueda de homólogos a genes de resistencia a enfermedades mediante PCR con cebadores degenerados diseñados a partir de regiones conservadas nos ha permitido amplificar cuatro familias de secuencias. Estos homólogos a genes de resistencia (RGH) han sido localizados en el mapa de melón y se estudia su utilidad como marcadores para resistencias conocidas.

ANÁLISIS DE VARIACIÓN EN PLANTAS REGENERADAS DE *Arabidopsis thaliana* MEDIANTE AFLPs

Polanco de la Puente, C., y Ruiz Sánchez, M.L.

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

El cultivo de tejidos en plantas es una técnica ampliamente utilizada para obtener gran número de individuos a partir de una única planta. La naturaleza clónica de las plantas así obtenidas debería asegurar la absoluta identidad genética de las mismas. Sin embargo, es un hecho ampliamente descrito que el cultivo *in vitro* induce inestabilidad genética que se manifiesta en la aparición de mutaciones en las plantas regeneradas. En *Arabidopsis thaliana*, aunque se sabe que presenta este tipo de variabilidad, denominada variación somaclonal, no se ha realizado un análisis detallado para determinar la frecuencia de este fenómeno. Esta especie posee uno de los genomas más pequeños y más ampliamente estudiados dentro de las plantas superiores, lo que la hace idónea para estudios a nivel molecular.

La técnica de AFLPs es una nueva y potente herramienta para la detección de polimorfismos y alteraciones en el DNA que puede ser de gran ayuda en la estimación de la variación somaclonal. Para ello en primer lugar se ha estudiado la consistencia de los marcadores AFLPs en el material de estudio realizando, por un lado distintas reacciones a partir de un mismo DNA genómico, y por otro distintas reacciones a partir de aislamientos independientes de DNA de un mismo individuo. Se han observado variaciones en la detección de un 1.95% de los 718 marcadores AFLPs que fueron obtenidos mediante el empleo de doce combinaciones de primers (tres primers para *EcoRI* y cuatro para *MseI*). Una vez cuantificada la posible variación debida a la propia técnica empleada, se ha estimado la variación molecular presente en plantas regeneradas obtenidas a partir de raíces de *A. thaliana* (ecotipo Landsberg-erecta) que se habrá originado durante el proceso de cultivo *in vitro*.

MEJORA DE CÍTRICOS MEDIANTE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Peña, L., Cervera, M., Ghorbel, R., Domínguez, A., Fagoaga, C., Juárez, J., Pina, J.A., y Navarro, L.

Dpto. Protección Vegetal y Biotecnología. Apartado Oficial. 46113-Moncada. Valencia.

Los cítricos son los frutales de mayor importancia económica en el mundo (FAO, 1998). Su mejora genética mediante métodos convencionales se encuentra muy limitada debido a sus características genéticas y reproductivas. Tienen un sistema de reproducción complejo, con muchos casos de esterilidad y de inter y autoincompatibilidad; elevada heterocigosis; se desconoce el modo de herencia de la mayor parte de caracteres agronómicos de interés; y la mayoría de especies de cítricos presentan un prolongado periodo juvenil que puede variar entre 5 y 8 años o incluso mantenerse más de 15 años. En este contexto, la transformación genética ofrece enormes posibilidades para la mejora de los cítricos. Hemos desarrollado procedimientos eficaces de transformación de varios genotipos de interés al identificar una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* super-transformante, al caracterizar el tipo de células vegetales que resultan aptas para la transformación y utilizar medios de cultivo que favorecen la aptitud celular, al utilizar marcadores que permiten identificar y realizar un seguimiento de los sucesos transgénicos, etc. Gracias a las eficacias de transformación conseguidas, se ha podido por primera vez transformar material adulto de una leñosa, obteniéndose flores y frutos transgénicos al poco más de un año de realizada la infección con *Agrobacterium*. Además se ha introducido en distintos genotipos de cítricos genes de CTV para tratar de hacer frente a la tristeza, un gen precursor de una PR para tratar de conseguir mayor tolerancia a *Phytophthora*, genes de *Arabidopsis* implicados en el desarrollo de meristemas florales para tratar de acortar el periodo juvenil, genes implicados en el metabolismo de giberelinas de cítricos para tratar de modular el tamaño de las plantas, etc.

POSTERS

Regulación de la expresión génica

REGULACION DEL GEN γZ : RELEVANCIA DE LAS SECUENCIAS PROLAMIN-BOX Y GZM

Marzabal, P., Torrent, M., Vicente-Carbajosa, J.*, Schmidt, R.J., y Ludevid, D.**

Instituto de Biología Molecular de Barcelona. CSIC. Girona Salgado 18-26. 08034 Barcelona.

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

**Department of Biology, University of California-San Diego, La Jolla, CA 92093-01126, USA.

La expresión del gen γZ , como la del conjunto de genes que forman parte de la familia multigénica de α -zeínas, está ligada al desarrollo de la semilla de maíz alcanzando un máximo de expresión a los 15 DAP. Un análisis funcional de delecciones seriadas del promotor γZ , delecciones internas y experimentos de footprinting "in vivo", han permitido identificar los elementos en *cis* putativamente responsables de la activación del promotor γZ : elementos tipo prolamin-box (Pb1,3) y un elemento tipo GCN4 (GZM). Con el objetivo de determinar el peso específico de cada uno de estos elementos, se ha estudiado el efecto que tienen diferentes combinaciones de mutaciones puntuales sobre estos elementos en *cis* en la expresión del promotor. Los resultados obtenidos ponen en evidencia la importancia del bifactorial box compuesto por un tandem Pb3-GZM, así como la del prolamin-box más proximal (Pb1) en la expresión de γZ a 15 DAP. A partir de estos resultados, se ha construido un promotor γZ -quimérico que contiene repeticiones en tandem directo del bifactorial box. Los ensayos funcionales mediante biolística, indican que el promotor quimérico es por lo menos cinco veces más activo que el promotor γZ (wt). Mediante EMSA y "footprinting *in vivo*" se observó en endospermos de maíz de 15 DAP, la presencia de complejos proteicos que interactuaban específicamente con los citados elementos Pb3 y GZM. Se ha identificado recientemente un factor de transcripción con un dedo de zinc, específico de endospermo, que pertenece a una nueva familia de factores tipo. Los experimentos de EMSA y el análisis funcional de la co-expresión de PBF/ γZ y PBF/ αZ nos indican que este factor se une a los elementos Pb activando selectivamente el gen γZ y no αZ .

CARACTERIZACION DE TRES VARIANTES DE UNA NUEVA SUBCLASE DE bHLH ORIGINADAS MEDIANTE SPLICING ALTERNATIVO EN XILEMA DE PINO

Allona, I.¹, Lu, J.², Quinn, M.², y Whetten, R.W.²

¹Departamento de Biotecnología, E.T.S.I. de Montes, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid 28040.

²Forest Biotechnology Group, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695.

Las proteínas de tipo bHLH (basic Helix-Loop-Helix) son una clase de proteínas reguladoras importante en animales, levaduras y plantas. Hemos aislado, de una genoteca de cDNA de xilema inmaduro de *Pinus taeda*, una serie de clones que codifican un subgrupo nuevo de proteínas bHLH. Se han aislado y caracterizado tres cDNAs de este tipo. Estos difieren solo en la presencia o ausencia de fragmentos pequeños en la secuencia codificante. Utilizando una sonda común a los tres cDNAs, se detecta un único gen mediante análisis de Southern blot. Este hecho, junto con otros resultados, sugiere que los diferentes cDNAs representan productos de un proceso de splicing alternativo de ese gen. Las proteínas codificadas por estos cDNAs, expresadas en bacterias, se unen a la caja "E" o secuencia consenso de unión de las proteínas de tipo bHLH. Así mismo, hemos comprobado, mediante Western blot, que las tres variantes se expresan in vivo. Por último, experimentos de RT-PCR detectan variación en el nivel de los tres productos de splicing en distintos tejidos, lo que indicaría que el splicing diferencial se encuentra regulado.

CLONAJE DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS E INACTIVACIÓN DE LAS GIBERELINAS EN ADELFA. ESTUDIO DE SU POLIADENILACIÓN.

Úbeda, S., García-Martínez, J.L., y López-Díaz, I.

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

Las giberelinas (GAs) controlan el desarrollo y la elongación del tallo en adelfa (*Nerium oleander*) al igual que en la mayoría de especies vegetales. Para entender la regulación de la síntesis de GAs en adelfa y, con ello manipular sus niveles modificando la altura de las plantas, hemos clonado varios genes de GA 20-oxidasas, que codifican enzimas implicados en la biosíntesis de GAs, y varios genes de GA 2-oxidasas, implicados en la inactivación de GAs activas. Ambos tipos de enzimas están codificados por familias génicas.

Basándonos en regiones de secuencias conservadas para cada familia génica en distintas especies, y por técnicas de PCR y RACE-PCR obtuvimos dos clones diferentes de cDNA (NoGA20ox-1 y NoGA20ox-2) con secuencias homólogas a genes de GA 20-oxidasas. Estos genes son inducibles por inhibidores de la síntesis de GAs, al igual que ocurre en otras especies. Con el mismo procedimiento obtuvimos tres clones diferentes (NoGA2ox-1, NoGA2ox-2 y NoGA2ox-3) con secuencias homólogas a genes de GA 2-oxidasas que se expresan preferentemente en hojas pequeñas (gen NoGA2ox-1 y NoGA2ox-2) y en brotes (gen NoGA2ox-3). Todos ellos son inducibles con aplicaciones exógenas de GA3.

Los extremos 3' de los genes clonados presentaban distintos sitios de poliadenilación. En el gen NoGA20ox-1 encontramos cinco sitios de poliadenilación separados 0, 14, 55, 80 y 120 nucleótidos respecto al primer sitio. En el gen NoGA20ox-2 encontramos tres sitios de poliadenilación a 0, 24 y 100 nt. respecto al primero, y para el gen NoGA2ox-3 cuatros sitios, con una distancia de 0, 15, 28 y 108 nt. respecto al primero. Actualmente estamos estudiando si los factores que regulan la transcripción (inhibidores de la síntesis de GAs y GA3) afectan al sitio de poliadenilación.

REGULACION DE LA EXPRESION DE UN GEN DE *Arabidopsis thaliana* QUE CODIFICA LA ASNASA 2

Casado Díaz, A., Botella, M.A., y Muñoz Blanco, J.

Dpto de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. De Ciencias. Univ de Córdoba.
Avda de San Alberto Magno s/n. 14071 CORDOBA.

La asparragina es un metabolito de transporte de nitrógeno en muchas especies de plantas. Su biosíntesis y degradación está regulada por la acción de dos enzimas claves, la asparragina sintetasa (ASN) y la asparraginasa (Asnasa). Previamente, utilizando un ADNc correspondiente a la Asnasa 1 de *A. thaliana*, se detectó, mediante experimentos de Southern-blot a baja estrictencia, la existencia de otro posible gen que codifica una Asparraginasa en esta planta. Por comparación de secuencias y análisis informático de las mismas y la utilización de oligos deducidos de esta comparación, hemos conseguido clonar por PCR un fragmento cuya secuencia presenta un 65,5 de similaridad y un 59.8 % de identidad con la Asn1 de *A. thaliana*, también presenta un alto grado de similaridad (66%) y de identidad (58.9%) con el gen que codifica las asparraginasa de *Lupinus*. Utilizando la técnica de RT-PCR cuantitativa fluorescente en combinación con el programa informático GenScan, hemos procedido a estudiar las características de expresión del gen que codifica la Asnasa 2 de *A. thaliana*. Tanto en presencia como en ausencia de sacarosa, se detectó un incremento en la expresión del gen de 2.5 veces cuando plántulas de 14 d. se mantuvieron en oscuridad durante 72 h, esta inducción en la expresión del gen se revierte por la iluminación de la plantas durante 6 h. Por otra parte los niveles de expresión fueron siempre inferiores en presencia de sacarosa. Estos resultados sugieren una co-regulación, en *A. thaliana*, entre la Anasa 2 y la ASN 1 y entre Asnasa 1 y la ASN2 para asegurar el abastecimiento de nitrógeno de manera continuada a los tejidos en desarrollo de la planta.

PROMOTORES DE GEMINIVIRUS Y SU REGULACIÓN

Muñoz-Martín, A.¹, Herreros, E.¹, Collin, S.¹, Fernández-Lobato, M.², y Fenoll, C.^{1,3}

¹Dept de Biología, ²Dept. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid y ³Fac. CC Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha (Toledo).

Los Geminivirus son unos pequeños virus vegetales de partícula isométrica geminada. Dependiendo del tipo de Geminivirus, pueden tener una molécula o dos de DNA monocatenario de 2,5 a 3 Kb. Su material genético está organizado de manera que se transcribe bidireccionalmente a partir de una zona intergénica en la cual se encuentran elementos de regulación de la replicación y transcripción virales. El pequeño tamaño de su genoma les obliga a usar la maquinaria celular para realizar sus funciones, lo que les hace ideales como modelo de estudio de replicación y transcripción en vegetales.

Los virus del estriado del maíz (MSV) y del enanismo del trigo (WDV) pertenecen al subgrupo I y poseen un único componente genómico. La unidad transcrita en el sentido del virión codifica dos proteínas: V1, implicada en el movimiento del virus durante la infección, y la proteína de la cápside, V2. En el sentido complementario se codifican otras dos proteínas: C1C2 (Rep), implicada en la replicación, y C1 (RepA), para la que se ha propuesto un papel regulador de la transcripción. Tanto Rep como RepA poseen un motivo de interacción con la proteína celular de retinoblastoma (RB), una proteína celular homóloga a la identificada en animales como supresora tumoral, y son capaces de interactuar con ella. En Rep, dicho motivo de interacción con RB es esencial para su función en la replicación viral, mientras que el posible papel de la interacción de RepA con RB no está establecido.

Utilizando la técnica de bombardeo con microproyectiles en plantas, y mediante el análisis de fusiones de diferentes regiones promotoras al gen testigo *GUS*, hemos estudiado la regulación de la transcripción en el sentido del virión y el papel que RepA pueda jugar en la misma.

ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN *LEMMI9*: IDENTIFICACION DE SECUENCIAS IMPLICADAS EN LA ACTIVACIÓN GENICA POR NEMÁTODOS

Sanz-Alfárez, S. (1), Aristizábal, F. (1), González, V. (2), Boronat, A. (2), y Fenoll, C. (1,3).

(1) Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biología. Cantoblanco, E-28049 Madrid.

(2) Universidad de Barcelona. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 08028 Barcelona.

(3) Universidad de Castilla-La Mancha. Fac. CC Medio Ambiente. E-45071 Toledo.

Los nematodos del género *Meloidogyne* son endoparásitos obligados de raíces, en las que inducen unas agallas características constituídas por tejido radicular hipertrófico que rodea a un grupo de células gigantes de las que el nematodo se alimenta durante su vida en la planta. Las células gigantes se diferencian a partir del parenquima vascular, y presentan numerosas modificaciones morfológicas y fisiológicas. La expresión génica en las raíces cambia durante el desarrollo de las agallas, habiéndose descrito diversos genes inducidos y otros silenciados como consecuencia de la interacción planta-nematodo (Sijmons y col., 1994). El gen *LEMMI9* de tomate codifica una proteína del tipo LEA, y se induce en las células gigantes de agallas formadas por *Meloidogyne incognita* en tomate (van der Eycken y col., 1996). Nuestro laboratorio ha estudiado el promotor, cuyo análisis in vitro mediante geles de retardo ha permitido delimitar una región, NEM1, próxima al comienzo de la transcripción, que interacciona de modo específico con proteínas nucleares de agallas (Escobar y col., 1999). Si NEM1 es importante para la expresión de *LEMMI9*, la identificación de las proteínas que interaccionan con este elemento podría arrojar luz sobre los mecanismos de inducción génica dependientes de nematodos en las células gigantes. Con esta finalidad estamos trabajando actualmente con el sistema de un híbrido de levadura, con objeto de aislar clones que codifiquen proteínas de tomate que interaccionen físicamente con el elemento NEM1.

También hemos iniciado el análisis funcional del promotor del gen *LEMMI9*, para lo cual se han introducido en *Arabidopsis* diversas deleciones del mismo fusionadas a *GUS*, así como un promotor quimérico obtenido fusionando el elemento NEM1 a un promotor mínimo. Se ha realizado un análisis histoquímico de la expresión de *GUS* en la F2 de las plantas transgénicas obtenidas, tanto en plantas sin infectar como en plantas infectadas con *Meloidogyne spp.*, cuyos resultados discutiremos.

Referencias:

Escobar y col. (1999) MPMI 12(9), 440.

Sijmons y col. (1994) Ann. Rev. Phyt.32, 235.

Van der Eycken y col. (1996) Plant J. 9(1), 45.

ESTRUCTURA, ORGANIZACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN FACTOR 5 DEL INICIO DE LA TRADUCCIÓN EN EUCARIOTAS, eIF-5, EN *Zea mays*

López Ribera, I., y Puigdomènech, P.

Departament de Genètica Molecular. Institut de Biologia Molecular de Barcelona. CID-CSIC. Jordi Girona, 18. 08034 Barcelona.

Se ha aislado un clon de cDNA de una genoteca de cDNA de plántula de maíz (*Zea mays* L.) de 8 días de desarrollo. Los 1975 pares de bases del cDNA codifican una proteína de 451 aminoácidos, cuyo peso molecular es de 49,04 Kda.

La secuencia de aminoácidos inferida presenta similitud con proteínas eIF-5 de diferentes organismos. Destaca lo altamente conservada que se encuentra la región N-terminal, en la cual hemos localizado la presencia de una región que contiene las características propias de un dominio dedo de Zn.

Se ha aislado también un clon genómico, que corresponde al gen *eIF-5* de maíz, a partir de una genoteca genómica. Se han secuenciado 7 kilo bases de la región genómica y se ha observado la existencia de numerosos elementos repetitivos en las regiones intergénicas y de un largo intrón de 1300 pares de bases en la región 5' no codificante. De los estudios de expresión realizados, por transferencia de RNA a membrana y por hibridación *in situ*, se deduce que la acumulación de RNA mensajero de este gen está ligada a procesos de división celular, detectándose la mayor expresión en regiones meristemáticas

Del conocimiento de la función de la proteína eIF-5, en la fase de iniciación de la síntesis de proteínas, se deduce su posible interacción con la subunidad ribosómica 40S. Los estudios de interacción *in vitro*, realizados entre la proteína eIF-5 y polímeros de DNA de cadena sencilla y de poliU, demostraron la dependencia del ion Zn en la unión de la proteína a los polímeros.

Se propone que, el dominio dedo de Zn y las regiones conservadas del extremo N-terminal, tienen un papel importante en la interacción de la proteína con la subunidad ribosómica 40S.

A NOVEL RNA-BINDING PROTEIN PUTATIVELY INVOLVED IN THE POST-TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF A CYTOSOLIC ASCORBATE PEROXIDASE GENE

Carrasco, J.L., Gadea, J., Conejero, V., and Vera, P.

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

Hydrogen peroxide is produced as a by-product of cell metabolism and also under a variety of stress conditions. Ascorbate peroxidases are enzymes unique to plants that participate in the detoxification of intracellular hydrogen peroxide. APX20 is a tomato gene that encodes a cytosolic ascorbate peroxidase. The gene contains a leader intron which separates a first non-coding exon from the second exon, where the ATG codon is located. Analysis of transgenic tobacco plants harbouring promoter-GUS fusions revealed that expression in leaves is induced by wounding at the post-transcriptional level. This regulatory mechanism should involve the 5' exon, since it is the only sequence derived from the APX20 gene that is present in the GUS transcript. We performed RNA gel retardation assays to test whether protein factors present in leaf crude extracts were able to bind sequence elements within the 5' exon of the APX20 gene. Incubation of the probe with a tobacco leaf protein extract resulted in formation of a retarded complex. The binding was shown to be sequence-specific by competition analysis. With the aim of cloning protein factors responsible for the interaction, we used the yeast three-hybrid system. The screening of a GAL4AD-cDNA expression library from tobacco leaves resulted in the isolation of 5 clones showing sequence-specific activation of reporter gene expression. Sequence analysis revealed that all were identical, with no significant homologies to sequences in the databases. In search of a full-length clone we have isolated two different but highly similar sequences. We are now characterizing in more detail the isolated clones, and trying to confirm the involvement of the encoded protein in the binding observed *in vitro*.

REGULACION POR LA LUZ DE LA EXPRESION DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS DEL METABOLISMO DE GIBERELINAS EN PLANTULAS ETIOLADAS DE GUISANTE

Gil, J., Alvarez, I., y García-Martínez, J.L.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia.

La luz blanca (LB) inhibió el alargamiento del tallo de plántulas etioladas de guisante, y dicha inhibición fue revertida parcialmente mediante la aplicación de giberelina A_1 (GA_1), la GA activa en el crecimiento del tallo. El contenido de GA_1 en el tallo se redujo a un 25% tras 2 h de irradiación con LB, y a niveles trazas tras 4 h de irradiación. El efecto de LB sobre el contenido de GA_1 se revirtió cuando las plantas se cultivaron de nuevo en oscuridad tras 6 h de LB. El efecto de LB sobre la expresión de genes que codifican para GA 20-oxidasa y GA 3 β -hidroxilasa, enzimas que catalizan los últimos pasos metabólicos de la síntesis de GA_1 mostró, contrariamente a lo esperado, que los niveles de transcritos de ambos genes aumentaron en plántulas irradiadas con LB. Este aumento no ocurrió al tratar las plántulas con GA_1 antes de irradiar con LB, probablemente como resultado de regulación "feed-back" negativa. El efecto de LB sobre los transcritos de GA 20-oxidasa se localizó principalmente en el ápice ("hook"), mientras que el efecto sobre los transcritos de GA 3 β -hidroxilasa se localizó en los tejidos subapicales. La irradiación con luz roja (R) y roja lejana (FR) también aumentó el contenido de transcritos de GA 20-oxidasa, pero no el de GA 3 β -hidroxilasa, lo que sugiere que en la regulación de dichos genes por LB están implicados diferentes fotoreceptores. El aumento del contenido de GA_8 tras la irradiación con LB plantea la posibilidad de que la regulación del contenido de GA_1 por la luz esté mediada a través de la inactivación de GA_1 a GA_8 . Con objeto de confirmar esta hipótesis se ha clonado un gen de guisante que codifica para una GA 2 β -hidroxilasa (que cataliza la inactivación de GA_1) y se está analizando el efecto de LB sobre las niveles de transcritos de este gen.

LA FAMILIA DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES DOF DE CEBADA: AISLAMIENTO DE GENES Y CARACTERIZACION DE SUS PATRONES DE EXPRESION

Isabel, I., Mena, M., y Carbonero, P.

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

Las proteínas DOF son una familia de factores transcripcionales exclusivos de plantas que se caracterizan por tener un dominio de 50 residuos altamente conservado, denominado DOF (DNA-binding with one finger) por incluir un motivo $CX_2CX_{21}CX_2C$ con capacidad para estructurarse como un unico dedo de zinc. El dominio DOF es un dominio multifuncional involucrado tanto en el reconocimiento y unión a secuencias específicas de DNA como en interacciones proteína-proteína. Esta familia génica está ampliamente representada tanto en mono como en dicotiledóneas y por sus características se supone implicada en la regulación transcripcional de procesos específicos y de universal relevancia en plantas. Hasta ahora, sin embargo, se han atribuído funciones concretas sólo para un número muy reducido de sus miembros. Entre ellos se encuentra el factor DOF de cebada BPBF (Barley Prolamin-box Binding Factor), recientemente descrito por nuestro grupo e implicado en la regulación transcripcional de los genes de proteínas de reserva del tipo prolaminas durante el desarrollo del endospermo de la cebada. Con la intención de contribuir a una mejor comprensión de la diversidad de funciones que desempeña esta clase de factores transcripcionales, hemos iniciado la caracterización global de la familia de genes DOF de cebada. Por homología con la region DOF de BPBF en experimentos de "Southern blot" hemos detectado la presencia de doce miembros de esta familia. Para su aislamiento se ha realizado el escrutinio de una genoteca genómica de cebada. Aquí presentamos la caracterización molecular de un grupo de ellos así como el estudio de sus patrones de expresión.

ELEMENTOS EN *CIS* REQUERIDOS PARA LA EXPRESIÓN ESPECÍFICA EN SEMILLAS DE UN GEN *Shsp*

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

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (C.S.I.C.), Apartado 1052, 41080 Sevilla.

Mediante genes quiméricos, con el promotor y secuencias 5'-flanqueantes del gen *Ha hsp 17.6 G1*, hemos reproducido, en plantas transgénicas de tabaco, la expresión específica de semillas mostrada por dicho gen en girasol: una característica única entre los genes sHSP (*small Heat Shock Protein*) de plantas. Los genes quiméricos no respondieron al calor pero se expresaron, en ausencia de estrés exógeno, durante la fase de desecación del desarrollo embrionario zigótico. La destrucción mediante mutagénesis dirigida del único HSE (*Heat Shock Element*), distal e imperfecto, de *Ha hsp17.6 G1* afectó substancialmente tanto a la unión de HSF (*Heat Shock Factor*) *in vitro*, como a la expresión transgénica en semillas. El análisis por delección de las secuencias 5'-flanqueantes del promotor puso de manifiesto la existencia de otros elementos reguladores en *cis*, con efectos tanto positivos como negativos sobre la expresión de los transgenes, que sin embargo mantuvieron su especificidad embrionaria. Estos resultados indican diferencias en el mecanismo de activación de promotores sHSP en semillas; en comparación con la respuesta al choque térmico, que también implica HSF. Sugerimos que los HSF, y otros factores en *trans* distintos específicos de semillas, cooperan en la regulación de *Ha hsp17.6 G1* durante la desecación embrionaria.

CARACTERISTICAS MOLECULARES Y DE EXPRESION DE UN GEN DE FRESA (*Fragaria x ananassa* cv Chandler) QUE CODIFICA UNA ENDO-POLIGALACTURONASA

Redondo-Nevaldo, J., Yubero, E., Caballero, J.L., y Muñoz Blanco, J.

Dpto de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. de Ciencias. Universidad de Córdoba. Avda de San Alberto Magno s/n.14071 CORDOBA.

Una de las características de la maduración del fruto de fresa es el reblandecimiento del mismo con la maduración debido, entre otros factores, a la degradación de la lamela media constituida fundamentalmente por pectinas. Se ha propuesto, que la degradación de las pectinas está motivada por la acción sinérgica de enzimas pectolíticas. En el caso de la fresa, se ha descartado una relación entre la actividad poligalacturonasa y la maduración del fruto de fresa. En esta comunicación se presenta la clonación, mediante la técnica de DDRT-PCR de un fragmento de ADNc cuya secuencia presenta homología muy significativa con genes que codifican endo-poligalacturonasas de plantas. Se ha procedido a estudiar la regulación espacio-temporal del gen correspondiente, observándose: 1) La expresión del gen es específica de fruto; 2) Sólo se detectó expresión del gen en los estadios de maduración del fruto); 3) La expresión del gen, como en el caso de los genes relacionados con la maduración del fruto de fresa, está regulada negativamente por las auxinas sintetizadas en los aquenios de los frutos; 4) La expresión del gen disminuyó significativamente en frutos de fresa mantenidos en atmósfera controlada (22% de CO₂; 25°C). Estos resultados sugieren una estrecha relación entre la expresión del gen que codifica la poligalacturonasa y el proceso de reblandecimiento del fruto que acompaña al proceso de maduración del mismo. También se presenta las características estructurales (promotor y zona codificante) del gen que codifica la endo-poligalacturonasa de fresa.

ESTUDIO DE LOS PATRONES DE EXPRESION DE LOS GENES FPS1 Y FPS2 DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Cunillera, N., Manzano, D., Boronat, A., y Ferrer, A.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Campus de Pedralbes. Universitat de Barcelona. Avda. Diagonal 643, 08028-Barcelona.

La enzima farnesildifosfato sintasa (FPS) cataliza la síntesis de farnesildifosfato, que es el origen de numerosas ramificaciones que conducen a la síntesis de una gran variedad de derivados isoprenoides esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. *Arabidopsis thaliana* contiene dos genes (FPS1 y FPS2) que codifican la enzima FPS. El análisis de *Arabidopsis* transgénicas portadoras de construcciones que contienen las regiones 5'-flanqueantes de los genes FPS1 y FPS2 fusionadas traduccionalmente con el gen marcador GUS ha permitido establecer de forma detallada el patrón de expresión espacial y temporal de ambos genes. El gen FPS1 presenta un patrón de expresión generalizado a lo largo de todo el desarrollo de la planta. Por el contrario, el gen FPS2 presenta un patrón de expresión especializado, restringido a órganos y estadios concretos del desarrollo de la planta, siendo de destacar una intensa expresión en anteras y granos de polen. Estos patrones de expresión sugieren que la isoforma FPS1 participa en la síntesis de isoprenoides que desempeñan funciones generales de carácter básico (ej. fitoesteroles), mientras que la isoforma FPS2 estaría involucrada en la síntesis de isoprenoides con funciones más especializadas. Mediante experimentos de expresión transitoria en protoplastos y estable en *Arabidopsis* transgénicas, se ha demostrado que la región 5'-flanqueante del gen FPS2 comprendida entre las posiciones -111 y +65 contiene todos los elementos necesarios para dirigir la expresión cuantitativa y cualitativa del gen. Experimentos preliminares han permitido identificar secuencias en cis presuntamente implicadas en el control de la expresión cuantitativa del gen FPS2.

Desarrollo

GIBERELINAS Y FOTOPERIODO EN EL PROCESO DE TUBERIZACIÓN

Rodríguez, M., y Prat, S.

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

Las giberelinas (GAs) regulan el crecimiento y desarrollo de plantas, donde afectan a procesos como: expansión de la hoja, elongación del tallo, floración, desarrollo del fruto y movilización de moléculas de reserva desde las semillas. En patata, la aplicación exógena de GAs promueve la elongación del estolón e inhibe la formación del tubérculo. Los niveles endógenos de GAs son mucho menores en las plantas inducidas a tuberizar que en las no inducidas, y la aplicación de inhibidores de la síntesis de GAs favorece la tuberización en plantas no inducidas.

El fotoperíodo es un factor ambiental que controla también procesos de desarrollo similares: floración, desarrollo de los cloroplastos, elongación del tallo, fototropismo y formación de órganos de reserva. En la variedad fotoperiódica *andigena* de patata, los fotoperíodos de días largos (LD) incrementan los niveles de GAs e inhiben la tuberización, mientras que fotoperíodos cortos (SD) inducen la formación del tubérculo. Plantas transgénicas portadoras de una construcción antisentido para el gen fitocromo phy B, mostraron ser insensibles a las condiciones de fotoperíodo, lo que permitió demostrar que fitocromo B (PHY B) es responsable del control fotoperiódico de la tuberización. Estos antecedentes ponen de manifiesto la existencia de una posible interacción entre las vías de transducción de la señal fotoperiódica y las GAs.

En *Arabidopsis*, se han descrito los mutantes *gai* (por GA insensitive) que se caracterizan por ser plantas enanas pero que contienen altos niveles de GAs, lo cual es indicativo de una alteración en la ruta de transducción de estas hormonas. El gen GAI de *Arabidopsis* ha sido recientemente aislado lo que ha permitido demostrar que en los mutantes *gai* el gen presenta una delección en la región N-terminal codificante. Asimismo, se han aislado los genes homólogos a GAI de trigo, arroz (Rht 1B, Rht 1D) y maíz (D8); mutaciones en estos alelos corresponden a delecciones en la misma región de la proteína, determinan insensibilidad a GAs y generan fenotipo enano.

Para estudiar la interacción entre la señal de las GAs y de fitocromo, se han transformado plantas de patata de la variedad *andigena* y plantas transgénicas para la construcción antisentido *35S::phyB*, con el gen heterólogo *gai*. Se analizará el fenotipo de elongación del tallo, contenido en clorofilas y tuberización de estas plantas con el fin de determinar si la mutación *gai* es dominante sobre *phyB* o viceversa. Se presentarán resultados preliminares de estos estudios, junto con el aislamiento y caracterización del gen homólogo GAI en patata.

PHOR16 DE PATATA: IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO GRUPO DE PROTEÍNAS VEGETALES CON HOMOLOGÍA A ARMADILLO DE DROSOPHILA, CON UNA FUNCIÓN EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL DE GIBERELINAS

Amador, V., Monte, E., y Prat, S.

Dpto. de Genética Molecular Instituto de Biología Molecular de Barcelona-C.S.I.C. Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona.

Mediante la técnica de differential display y cribaje de una librería de cDNA, construida a partir de RNA de hojas de plantas de patata *S. demissum* inducidas para la tuberización (crecidas en días cortos), se aisló un clon llamado PHOR16 que corresponde a un gen que en análisis Northern muestra unos niveles de mRNA más elevados en hojas de plantas inducidas para la tuberización que en las plantas no inducidas. Los niveles de acumulación del transcrito PHOR16 en hoja dependen fuertemente de la presencia/ausencia de luz y, durante la inducción de tuberización, aumentan cuando los tubérculos comienzan a ser ya aparentes. Los niveles de transcrito disminuyen, por otra parte, cuando las plantas son tratadas con ancimidol (inhibidor del paso de entkaureno a entkaurenoico en la ruta de síntesis de GAs) y también están muy reducidos en los mutantes enanos *ga1* de *S. andigena*, con un bloqueo en el paso de 13-hidroxilación de GA12 a GA53. Plantas transgénicas portadoras de una construcción antisentido del cDNA PHOR16 muestran en días largos (LD) un fenotipo enano característico de mutantes deficientes en GAs. Éste fenotipo puede ser recuperado por aplicación de GA3 y lo más interesante, se recupera cuando las plantas son trasladadas a SD. Las líneas antisentido a-PHOR16 por otra parte, al ser transferidas a SD (condiciones inductoras) tuberizan antes que las plantas y forman un número mayor de tubérculos. Todos estos resultados indican un posible papel de la proteína PHOR16 como un regulador de la vía de síntesis ó bien como modulador de la sensibilidad de los diferentes tejidos a GAs. El análisis de secuencia del clon de cDNA muestra una elevada similitud con un grupo ESTs de *Arabidopsis*, para los cuales no se ha descrito aún su función, pero que se caracterizan por presentar dos dominios muy conservados: un dominio con homología con la proteína COP1 de *Arabidopsis thaliana*, la cual actúa como represor de la fotomorfogénesis en la oscuridad, y un dominio ARMADILLO, que presenta el consenso descrito para el dominio "armadillo repeat" presente en gen de polaridad *b-catenin/armadillo* de *Drosophila*, el cual consiste en 12 copias de 42 aminoácidos con estructura tridimensional helix-superhelix, altamente conservada. El dominio "armadillo repeat" es el responsable de la interacción de la proteína *b-catenin/armadillo* con *DE-cadherinas* y con la familia de factores de transcripción TCFs, y es esencial para la función de la proteína armadillo en la transducción de señal de *Wingless/Wnt* la cual es esencial para la correcta segmentación abdominal y torácica de *Drosophila*. En ensayos de expresión transiente en células BY2 de tabaco, en los cuales se transformó las células con una fusión de la proteína PHOR16 y el gen GFP (green fluorescent protein) se observó una localización nuclear y citoplasmática, de la proteína. El porcentaje de células que presentan una localización nuclear de la proteína pasa a ser del 90% cuando las células BY2

bombardeadas són crecidas en medio que contiene GA3 y citoplasmática, en un 90%, cuando estas son crecidas en medio que contiene ancimidol, demostrando así que GA3 regularía la localización subcelular de esta proteína. Se ha estudiado la localización subcelular de delecciones de la proteína que consistían en el dominio COP1 o el dominio ARMADILLO fusionados al gen GFP. Así, se pudo observar que la fusión ARMADILLO/GFP muestra una localización exclusivamente nuclear de la proteína, siendo por tanto el dominio COP1 el responsable de la migración citoplasma/núcleo regulada por GAs . Se presentarán los resultados obtenidos de estudios "two hybrid" en los que una cepa de levadura que expresaba el gen PHOR16 fusionado al dominio de unión a DNA de GAL4, se transformó una librería de cDNA de hojas de *S. demissum* fusionada al dominio activador de GAL4.. El objetivo de este experimento es el aislamiento y caracterización de proteínas que interaccionen con PHOR16 y por tanto, implicadas en la ruta de transducción de la señal de GAs.

EL GEN MADS-BOX *FRUITFULL* DETERMINA LA IDENTIDAD DE LAS VALVAS EN LOS CARPELOS DE *Arabidopsis*

Ferrándiz, C., Sato, S., Liljegren, S.J., and Yanofsky, M.F.

Department of Biology University of California at San Diego La Jolla, CA 92093-0116 USA

El gen *FRUITFULL* (*FUL*) es necesario para el desarrollo del fruto en *Arabidopsis*. Las mutaciones en *ful* afectan a todos los tejidos del pericarpo: las valvas detienen su diferenciación y no se expanden y frecuentemente se desgarran antes de que las semillas completen su maduración; el estilo se alarga anormalmente y las células del replum, o región intervalvar, crecen adoptando una disposición en zig-zag (Gu et al, 1998, *Development* 125:1509-1517). Por el contrario, la expresión constitutiva del gen *FUL* bajo el control del promotor del CaMV (35S::*FUL*) confiere un fenotipo en el que todos los tejidos del pericarpo se diferencian como valvas. Como consecuencia, los frutos 35S::*FUL* carecen de la zona de dehiscencia, una región que normalmente se diferencia entre el replum y las valvas para facilitar la apertura del fruto y la dispersión de las semillas, y por lo tanto son completamente indehiscentes.

Este fenotipo es similar al observado en los dobles mutantes *shatterproof1 shatterproof2* (*shp1 shp2*), lo cual sugiere la posibilidad de que *FUL* y *SHP1/SHP2* interactúen a nivel molecular. En esta comunicación presentaremos resultados que indican que *FUL* es un represor formal de la transcripción de *SHP1/SHP2*. Esta represión podría ser directa, como sugieren ensayos de unión de *FUL* a secuencias del promotor de *SHP2 in vitro*. Como complemento a los experimentos moleculares, hemos generado plantas en las que *FUL* se comporta como un activador constitutivo de la transcripción (*FUL:VP16*), y, como resultado de diferentes mutagénesis, se han identificado *loci* adicionales que también podrían estar involucrados en estos procesos. En esta comunicación presentaremos estos y otros resultados, y propondremos un modelo de acción de *FUL* en el desarrollo del fruto.

GA 3 β -HIDROXILASA DE PATATA

Bou, J.¹, García-Martínez, J.L.², y Prat, S.¹

¹Departamento de Genética Molecular, CID-CSIC Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona.

²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas Universidad Politécnica de Valencia-CSIC Camino de Vera 14, 46022 Valencia.

Las hormonas giberelinas (GA) son ácidos diterpenoides que, entre otras funciones, juegan un papel importante en procesos de desarrollo, como la floración o la tuberización. La biosíntesis de GA sigue, en patata, la ruta de la 13-hidroxiclaurina, posterior oxidación y eliminación de C-20 y 3 β -hidroxilación, por medio de dioxigenasas solubles dependientes de 2-oxoglutarato. La 2 β -hidroxilación es posterior y rinde GA inactivas. Con el fin de determinar el papel de la 3 β -hidroxilación de GA en el proceso de tuberización se ha abordado el clonaje y caracterización de los correspondientes genes de patata. La amplificación por PCR mediante oligos degenerados de cDNA obtenido de hoja permitió aislar *StGA3b2*, con identidad del 55% con la 3 β -hidroxilasa de *Arabidopsis* y un 67% con la de guisante. *StGA3b2* se expresa mayoritariamente en nudos y ápices inducidos para la tuberización, en internudos, en estolones no inducidos, y en menores niveles en ápices no inducidos y en hoja. A partir del análisis de Southern genómico se puede inferir que hay otro gen relacionado. *StGA3b1* se obtuvo por PCR mediante oligos específicos complementarios a la 3 β -hidroxilasa de tomate, clonada recientemente. Se ha medido la actividad 3 β -hidroxilasa de las proteínas recombinantes *StGA3b1* y *StGA3b2* y se ha observado que ambas catalizan la 3 β -hidroxilación de GA₂₀ y de GA₉. Se presentarán los resultados obtenidos del análisis de plantas transgénicas de patata, antisentido y de sobreexpresión de *StGA3b2*, las cuales se están analizando a nivel de contenido en GA, elongación del tallo y respuesta de tuberización.

IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA MORFOGÉNESIS DEL FRUTO EN *ARABIDOPSIS THALIANA*. CARACTERIZACIÓN GENÉTICO-MOLECULAR DE MUTANTES SEÑALIZADOS MEDIANTE INSERCIONES DE T-DNA

Martínez-Laborda, A., Ripoll, J.J., y Vera, A.

División de Genética. Universidad Miguel Hernández. Campus de San Juan. 03550 Alicante.

El fruto es un órgano muy especializado que se desarrolla a partir del pistilo tras el proceso de fecundación, contribuyendo a la protección de las semillas y a su diseminación. A pesar de su importancia tanto básica como aplicada, el desarrollo de este órgano ha recibido poca atención a excepción del periodo de maduración. Debido a la relativa simplicidad de su arquitectura en familias como las crucíferas o las leguminosas, supone un sistema potencialmente de gran interés para el estudio de procesos básicos de morfogénesis en plantas. Con la intención de contribuir a tal fin, proponemos una estrategia basada en el estudio de mutantes de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, con alteraciones en el desarrollo y la morfología del fruto, obtenidos mediante diversas estrategias de mutagénesis. Ello permitirá estudios morfológicos y moleculares sobre la sucesión de acontecimientos que tienen lugar desde las primeras etapas de la formación del fruto. En dicho contexto, hemos iniciado el escrutinio de diversas colecciones de mutantes por inserción de T-DNA. Así, tras verificar el patrón de herencia y comenzar su caracterización fenotípica, determinamos la presencia de una inserción ligada al fenotipo de uno de tales mutantes. La clonación molecular del gen correspondiente se encuentra en curso actualmente. Paralelamente, se está llevando a cabo un estudio genético sobre el fenómeno de la partenogénesis mediante la obtención de mutantes de EMS a partir de un fondo de plantas con esterilidad masculina condicional.

IDENTIFICACION DE GENES IMPLICADOS EN LA EMBRIOGENESIS DEL MAIZ

Bastida, M., Jahrmann, T., Stiefel, V., y Puigdomènech, P.

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, C/Jordi Girona, nº 18, 08034-Barcelona.

La embriogénesis es un proceso de desarrollo complejo que juega un papel central en el ciclo de vida de las plantas superiores. A pesar de que el conocimiento sobre la embriogénesis en animales ha avanzado bastante, sólo recientemente han empezado a ser definidos los mecanismos que regulan estos procesos en plantas. El objetivo de nuestro grupo es identificar genes que pudieran estar involucrados en el desarrollo del embrión de maíz. Para ello se han seguido dos aproximaciones; la caracterización de genes con una expresión específica durante el desarrollo, y el análisis a nivel molecular de mutantes de embriogénesis obtenidos por transposon tagging. Hemos analizado dos mutantes que bloquean el desarrollo del embrión de maíz. Éstos pertenecen a la familia de mutantes *dek* (*defective kernel*), es decir, está alterado tanto el desarrollo del embrión como el del endospermo. Los mutantes estudiados han sido denominados *long-cell* y *lachirma*. El primero se caracteriza por una proliferación anormal de los tejidos a partir de la fase coleoptilar, mientras que en el segundo mutante el desarrollo se bloquea en el estado de transición sin llegar a establecerse la simetría bilateral.

Gracias a la inserción del elemento *Ac* se han podido clonar dos genes ligados, respectivamente, a cada una de las mutaciones. El gen *dekA* codifica para una proteína que no presenta homologías en los bancos de datos. El gen correspondiente a la mutación *lachirma* lo hemos denominado *tm20* porque codifica para una proteína que contiene 20 dominios con características de dominio transmembrana. Estos dominios están agrupados en 5 grupos, de cuatro dominios cada uno. En la región central de la proteína se halla un dominio hidrofílico. Dado que esta proteína no presenta ninguna homología en los bancos de datos, se podría tratar de una nueva familia de proteínas transmembrana. Debido al fenotipo observado en los mutantes y a resultados obtenidos en otros laboratorios, la proteína TM20 podría funcionar como un receptor o un transportador de la hormona auxina.

RELACION DE DOS GENES DE FRESA (*Fragaria x anannassa* cv Chandler) CON LOS PROCESOS DE LIGNIFICACION QUE OCURREN EN EL FRUTO A LO LARGO DE SU CRECIMIENTO Y MADURACION

Blanco Portales, R., Medina-Escobar, N., Moyano, E., Caballero, J.L., y Muñoz Blanco, J.

Dpto de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. de Ciencias. Universidad de Córdoba. Avda de San Alberto Magno s/n.14071 CORDOBA.

Durante el proceso de maduración del fruto de fresa se produce un proceso de lignificación de las esclereidas que constituyen el grueso pericarpo del achenio. En nuestro grupo hemos clonado dos ADNc que se corresponden con un gen que codifica una cinnamil alcohol dehidrogenasa (CAD) y a un gen que codifica una proteína híbrida rica en prolina (HyPRP). Mientras que se conoce que la CAD es una enzima que cataliza las síntesis de monolignoles compuestos precursores de la biosíntesis de lignina, poco se conoce acerca de la función fisiológica que desempeñan las HyPRP de plantas. En la presente comunicación se ha procedido a inmunolocalizar la proteína CAD tanto en tejidos de frutos de fresa como en tejidos vegetativos de la planta, observándose que la proteína se localiza en los tejidos pre-xilemáticos así como en las esclereidas de los achenios. Por otra parte, mediante la utilización de tinción histoquímica con fluoroglucinol se detectó la presencia de lignina tanto en las células xilemáticas como en las esclereidas de los achenios. Así mismo, mediante hibridación "in situ" se ha observado la presencia de transcrito correspondiente a la HyPRP, tanto en células xilemáticas del tejido vascular del fruto como en la capa de esclereidas del achenio. La coincidencia en el modelo espacial de localización de la proteína correspondiente a la CAD de fresa con el modelo de expresión espacial del gen que codifica la HyPRP de fresa sugiere la relación de ambos genes en procesos comunes relacionados con lignificación.

ANÁLISIS GENÉTICO DEL DESARROLLO FLORAL EN *Pisum sativum*

Navarro, C., Ferrándiz, C., Madueño, F., y Beltrán, J.P.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (C.S.I.C.- U.P.V.).
Departamento de Biología del Desarrollo. Campus de la Universidad Politécnica de Valencia, Av. De los Naranjos s/n., 46022 Valencia.

El análisis genético y molecular de los procesos de iniciación y morfogénesis floral en *Antirrhinum majus* y *Arabidopsis thaliana* ha conducido al establecimiento del modelo ABC de organogénesis floral y a la identificación de algunos genes de la familia MADS como responsables de estos procesos. Las flores de guisante (*Pisum sativum*) presentan una ontogenia drásticamente distinta de la de los sistemas citados anteriormente; la principal diferencia consiste en la existencia de primordios comunes, que posteriormente diferencian los primordios de pétalos y estambres, poniendo de manifiesto la existencia de un sistema genético de regulación más complejo. En nuestro grupo hemos estudiado en profundidad la ontogenia de distintos mutantes homeóticos de guisante con el fin de analizar la implicación de las funciones A, B y C en la correcta diferenciación de los primordios comunes, así como las posibles interacciones entre ellas mediante la obtención de dobles mutantes. Así mismo, hemos aislado ocho miembros de la familia MADS de guisante (*PM1* a *PM8*), cuatro de ellos pueden ser considerados ortólogos de genes de identidad de órganos de clase A, B y C, por homología de secuencia y patrón de expresión. Se hayan en proceso los análisis para comprobar si existe alguna correlación entre dichos genes y los mutantes homeóticos estudiados. *PM7* y *PM8* presentan homología de secuencia con genes de clase C; la expresión ectópica de estos genes en *Arabidopsis thaliana* corrobora su posible función en la especificación de estambres y carpelo.

EL PROMOTOR *END1* DE GUISANTE DIRIGE LA EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE GENES FORÁNEOS HACIA LAS ANTERAS

Gómez, M.D., Cañas, L.A., y Beltrán, J.P.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (C.S.I.C.- U.P.V.).
Departamento de Biología del Desarrollo. Campus de la Universidad Politécnica de Valencia, Av. de los Naranjos s/n., 46022 Valencia.

Utilizando un método inmunosubstractivo hemos obtenido un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente una proteína de 26 kDa (*END1*) que está sólo presente en dos tejidos de la antera (conectivo y endotecio). Hemos purificado la proteína que reconoce mediante cromatografía de afinidad y microsecuenciado su extremo N-terminal (20 aas). La secuencia obtenida mostró una elevada homología con otra proteína (*ALB2*) descrita previamente en cotiledones de guisante y cuya función es desconocida. La utilización del cDNA de *alb2* como sonda en el escrutinio de una genoteca de flores de guisante, nos permitió el aislamiento de un clon con la secuencia codificante completa (908 pb), la cual presenta un 72% de homología con la de *alb2*. Los ensayos de Northern mostraron la especificidad de su expresión, ya que se restringía a extractos de anteras, no detectándose en otros órganos florales, cotiledones y tejidos vegetativos. Por otra parte, los ensayos de hibridación *in situ* corroboraron la especificidad de la expresión del gen *end1* en los tejidos de la antera del guisante durante los diferentes estadios de su desarrollo. Hemos caracterizado la región promotora del gen *end1* para evaluar su potencial como herramienta biotecnológica en el proceso de dirigir la expresión específica de genes foráneos hacia las anteras (p.e. producción de plantas androestériles). Con este fin, hemos utilizado dos construcciones diferentes que portaban el gen *uidA* (GUS-intrón) bajo el control de la secuencia completa del promotor (2731 pb) o de una versión truncada del mismo (1526 pb), tanto en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* como de *Nicotiana tabacum*. Las diferentes líneas transgénicas mostraron expresión específica del gen GUS en los tejidos conectivo y endotecio de ambos tipos de anteras y tanto la versión completa del promotor como la truncada fueron igual de funcionales. La presencia en esta región promotora (la más próxima al gen *end1*) de un motivo consenso relacionado con la unión de AGAMOUS, una proteína de la familia de factores transcripcionales MADS box que está involucrada en la identidad de dos de los órganos florales (estambres y carpelos) durante el desarrollo floral, hacen que este promotor sea también una interesante herramienta para posteriores estudios encaminados a dilucidar la interacción de genes MADS con otros genes a los que posiblemente activen.

DESARROLLO DE RAICES LATERALES EN *Arabidopsis*: NITRATO Y AUXINA

Lorenzo, H., Zhang, H., y Forde, B.

IACR- Rothamsted, Biochemistry and Physiology Dept. Harpenden, Herts, AL5 2JQ. UK.

Estudios relativos al desarrollo de raíces laterales (RL) en *Arabidopsis* han mostrado que la ramificación de la raíz primaria esta sujeta a modulación por la concentración localizada de nutrientes. El gen *ANR1* recientemente aislados codifica un factor transcripcional inducible por nitrato específicamente en raíces y potencialmente envuelto en la vía de traducción de señales externas en respuestas fisiológicas. El análisis de la sensibilidad al nitrato de plantas transgénicas *ANR1*-anti-sentido en distintas condiciones dio como resultado un modelo de actuación del nitrato como señal en el que parece existir un solapamiento entre el nitrato y la auxina. Usando líneas antisentido y mutantes "resistentes a auxina" (*axr4-2*, *axr2-1-1* y *aux1-7*) se han estudiado los genes envueltos en la asimilación de nitrato (transportador de nitrato, nitrato reductasa y nitrito reductasa) para averiguar el efecto de las mutaciones en la ruta metabólica del nitrato y la sensibilidad al mismo. Paralelamente se realizaron estudios fisiológicos para el estudio del efecto auxina/nitrato usando el inhibidor del transportador de auxina NPA y usando plantulas con tallo estirpado y aplicaciones externas de auxina (NAA). Los resultados acerca de la inducibilidad por nitrato de los genes analizados en las líneas antisentido y en los mutantes resistentes a auxina son discutidos. Los análisis fisiológicos mostraron que la auxina es necesaria para la activación del meristemo primario de las RL pero no afectan a la elongación de las mismas. Los estudios con plantulas con tallo extirpado corroboraron este resultado. Se discute la implicación de los resultados con el modelo de actuación del nitrato sugerido previamente.

IMPLICACIÓN DE PECTATO LIASAS DE FRESA EN EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL FRUTO

Benitez-Burraco, A., Redondo-Nevalado, J., Muñoz Blanco, J., y Caballero, J.L.*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Instituto Andaluz de Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba. 14001-Córdoba.
*E-mail: bb1carej@seneca.uco.es

En el reblandecimiento del fruto de fresa durante la maduración están implicados genes que codifican enzimas hidrolíticas de pared. Nuestro grupo a aislado genes de pectinmetilesterasas, celulasas, pectato liasas y endopoligalacturonasas cuyo patrón de expresión se ajusta al papel que estos genes y sus productos pueden jugar en el proceso de maduración de este fruto. Tres genes diferentes de pectato liasas han sido identificados (pelA, pelB y pelC). La expresión de los mismos es específica de fruto y aumenta significativamente a partir del estadio de maduración blanco-2, justo cuando los aquenios comienzan a lignificarse y dejan de sintetizar las auxinas. La retirada de aquenios del fruto en estadios más tempranos conducen a la expresión de estos genes, que puede ser revertida por tratamiento del fruto desaquenizado con NAA, indicando un control hormonal de los mismos por los aquenios. El análisis de los clones genómicos muestra una organización génica muy semejante, con al menos 5 intrones en idénticas posiciones. Las regiones promotoras están siendo actualmente analizadas. Se han obtenido plantas de fresa transformadas con el gen pelC en antisentido y los primeros resultados muestran un aumento significativo en la dureza del fruto. Igualmente se ha observado el patrón de expresión de estos genes en tratamientos que retrasan el reblandecimiento del fruto, como son las bajas temperaturas y CO₂. Los resultados corroboran su posible función en el proceso de maduración y han permitido diseñar experimentos de "antisense" utilizando varios de estos genes de forma sinérgica. Financiado por la CICYT, proyecto ALI97-0836-CO-03 y Grupo Junta de Andalucía CVI115.

MUERTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE EL DESARROLLO Y LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE TRIGO

Domínguez, F.¹, González, M.C.¹, Serrato, A.J.¹, Sánchez, R.¹, Moreno, J.², y Cejudo, F.J.¹

¹Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Avda Américo Vespucio s/n, 41092-Sevilla.

²Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

El proceso de muerte celular programada (PCD) consiste en la degeneración ordenada de las estructuras celulares, incluyendo la ruptura internucleosomal del DNA nuclear. En plantas, el proceso de PCD forma parte de la respuesta a estímulos tanto bióticos como abióticos. También es un proceso normal del desarrollo, como ocurre en el caso de la diferenciación del tejido vascular. Nosotros hemos estudiado los procesos de PCD en semillas de trigo. El análisis de degradación de DNA pone de manifiesto la existencia de PCD en tejidos maternos de la semilla en fases tempranas de su desarrollo (5-15 dpa). Durante el proceso postgerminativo, se detecta fragmentación de DNA en embrión y en las células de aleurona, en las que está activada por ácido giberélico (GA). La técnica de TUNEL detecta extremos 3'-OH de DNA fragmentado y, por tanto, permite identificar in situ núcleos sometidos a PCD. Con esta técnica se observa que las células que sufren PCD durante el desarrollo de la semilla son las del tejido nucelar. Tras la germinación, la PCD es un proceso tardío en células embrionarias y afecta a células epiteliales y parenquimatosas del escutelo, además del tejido vascular. En la capa de aleurona, la PCD se extiende hacia la parte distal del grano conforme avanza el proceso germinativo, un patrón típico de procesos controlados por GA. El análisis ultraestructural de células apoptóticas al microscopio electrónico ha permitido establecer algunas características de la PCD en células vegetales: fuerte heterocromatinización, inactividad nucleolar, núcleos de forma irregular y desorganización de la envuelta nuclear, separación de la membrana plasmática de la pared celular, intensa vacuolarización y citoplasma irregular.

CARACTERIZACION DE UN RECEPTOR QUINASA ATIPICO EXPRESADO EN TEJIDOS MERISTEMATICOS DEL MAIZ

Llompart, B., Río, A., Puigdomènech, P., y Casacuberta, J.M.

Departament de Genètica Molecular. Institut de Biologia Molecular de Barcelona (CSIC). Jordi Girona 18. 08034 Barcelona.

Nuestro grupo está interesado en el estudio de genes implicados en el control de la embriogénesis del maíz. En esta comunicación presentaremos la caracterización de la proteína codificada por un gen, al que hemos llamado PRPK1 (por Putative Receptor Protein Kinase 1), expresado fuertemente durante las etapas iniciales de la embriogénesis en maíz.

La proteína PRPK1 presenta similitudes con posibles receptores quinasa de plantas (proteínas RLK por Receptor-Like Kinases). La región C-terminal de PRPK1 presenta los 11 subdominios conservados propios de las Ser/Thr-quinasas y su región N-terminal presenta 5 repeticiones imperfectas de un motivo rico en leucinas (LRR), siendo similar a los supuestos dominios receptor de distintas RLKs de plantas. Estas dos regiones están separadas por una corta secuencia que podría corresponder a un dominio transmembrana. Sin embargo, el dominio quinasa de PRPK1 (KD-PRPK1) es atípico puesto que no presenta algunos de los aminoácidos considerados invariantes entre las proteínas quinasa. Por otra parte, los experimentos de fosforilación *in vitro* realizados con KD-PRPK1 expresada en *E. coli* fueron negativos, sugiriendo que, probablemente, PRPK1 no es capaz de fosforilar *in vivo*. PRPK1 no es la única proteína vegetal con estas características, puesto que existen otras proteínas previamente descritas, como la proteína TMKL1 de *Arabidopsis thaliana*, así como diversas secuencias EST o genómicas presentes en los bancos de datos, que también presentan sustituciones en los mismos aminoácidos "invariantes". Por otro lado, en sistemas animales se han descrito receptores quinasa que, a pesar de poseer un dominio quinasa no funcional, participan en cadenas de transducción de señal mediante la formación de heterodímeros con quinasa funcionales. Es por ello que hemos empezado un proyecto para buscar proteínas que pudieran interactuar con PRPK1, mediante el "screening" de una librería de doble híbrido de cDNA de embrión de maíz.

El uso de anticuerpos obtenidos contra KD-PRPK1 nos ha permitido confirmar que PRPK1 es una proteína transmembrana que se acumula durante la embriogénesis. En la planta adulta PRPK1 sólo se detecta en tejidos meristemáticos. Resultados preliminares parecen indicar que PRPK1 se acumula en el meristemo apical, incluyendo la capa L1, pero se encuentra ausente de la zona central del mismo, con un patrón que sería complementario del patrón de expresión del gen CLAVATA1 de *Arabidopsis thaliana*.

CONTROL DE LA EXPRESION DEL GEN *MIXTA* DE *ANTIRRHINUM MAJUS*

Pérez-Rodríguez, M.J., y Martin, C.R.

Department of Genetics. John Innes Centre. Colney Lane. Norwich. Reino Unido.

El gen *Mixta* de *Antirrhinum majus* codifica un factor de transcripción del tipo MYB responsable de la formación de células cónicas especializadas en la epidermis del pétalo. La expresión ectópica de *Mixta* en plantas de tabaco ha demostrado que puede inducir la formación de células cónicas y tricomas en otros tejidos epidérmicos. Esto establece una relación entre el desarrollo de células cónicas y tricomas y plantea la cuestión de cómo, en *Antirrhinum*, *Mixta* está exclusivamente implicado en la producción de las primeras. La respuesta a la pregunta anterior reside en el estricto control de la expresión de *Mixta*, que la restringe a la capa más superficial de los tejidos del pétalo y a un estadio muy tardío de su desarrollo. El gen homeótico *Deficiens*, que codifica una proteína del tipo MADS necesaria para el desarrollo del pétalo en la flor de *Antirrhinum*, parece funcionar como un activador de la expresión de *Mixta*. Mediante Ensayos de Movilidad Electroforética (EMSA), se ha podido observar que DEFICIENS, junto con las proteínas GLOBOSA y SQUAMOSA, tiene la capacidad de unirse *in vitro* al promotor de *Mixta*.

ANÁLISIS CLONAL DE LA EXPANSIÓN DE LA EPIDERMIS FOLIAR DE ARABIDOPSIS

Serna, L., Torres, J., y Fenoll, C.

Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha.
Campus Tecnológico de la Fábrica de Armas, 45071-Toledo.

La estructura básica presente en la epidermis foliar de *Arabidopsis* es el complejo estomatal anisocítico, una estructura multicelular constituida por un estoma y tres células subsidiarias. Considerando que esta estructura puede surgir a través de diversos patrones de desarrollo, hemos realizado un análisis clonal utilizando una línea portadora de la construcción 35SGUS::Ac, caracterizada por la excisión frecuente del transposón durante el desarrollo del complejo estomatal. Asumiendo que el complejo anisocítico es monoclonal, las conclusiones de este análisis son las siguientes: 1) El desarrollo del complejo estomatal culmina con la formación del estoma; 2) El plano de división que sufre el precursor estomatal inmediato es paralelo al de la división inmediatamente anterior; 3) Las divisiones sucesivas a partir del precursor estomatal ocurren siguiendo un patrón espiral; espirales positivas y negativas alternan durante la expansión foliar; 4) Las células subsidiarias copian el programa de desarrollo estomatal de las células protodérmicas. Nuestros datos apoyan el modelo del desarrollo del complejo anisocítico propuesto previamente (1, 2, 3, 4) y nos permiten además proponer un modelo de expansión de la epidermis foliar.

1. Larkin, J. C., Marks, M. D., Nadeau, J., and Sack, F. (1997). Epidermal cell fate and patterning in leaves. *Plant Cell* 9, 1109-1120.
2. Paliwal, G. S. (1967). Ontogeny of stomata in some Cruciferae. *Can. J. Bot.* 45, 495-500.
3. Pant, D. D. and Kidwai, P. F. (1967). Development of stomata in some Cruciferae. *Ann. Bot.* 123, 513-521.
4. Serna, L. and Fenoll, C. (1999). Stomatal development and patterning in *Arabidopsis* leaves. *Physiologia Plantarum*, en prensa.

UN DOMINIO PEPTIDICO RICO EN CISTEINAS ES RESPONSABLE DEL ANCLAJE DE LAS PROTEINAS TLRP A LA PARED CELULAR

Domingo, C., Sauri, A., y Vera, P.

IBMCP. Universidad Politécnica de Valencia-CSIC. Camino de Vera s/n. Valencia 46022 cdomingo@ibmcp.upv.es

La pared celular de las plantas es un compartimento que controla el crecimiento y la forma de la célula, permite la comunicación entre las células y participa en la protección frente al ataque patogénico. Entre sus componentes se encuentran proteínas estructurales, que además de participar en la arquitectura de la pared están implicadas en procesos dinámicos del desarrollo.

NtTLRP es una proteína de tabaco recientemente descrita y representa a una clase nueva de proteínas de pared asociadas a paredes secundarias. Estas proteínas tienen en común un dominio C-terminal rico en cisteínas y tirosinas. NtTLRP está ya presente en plántulas, donde la formación del xilema está en su fase temprana, y su deposición en el protoxilema sigue el patrón en espiral típico de la lignina, sugiriendo una coordinación de la regulación de la expresión del gen de NtTLRP con el proceso de lignificación característico de la diferenciación de los elementos traqueales.

NtTLRP y sus homólogos presentan homología de secuencia tanto en el péptido N-terminal, característico de las proteínas secretadas a la matriz celular, así como en la zona C-terminal. En esta última región aparece un dominio estructural muy conservado con una disposición específica de residuos de cisteína (CD, "cystein-domain"). Este dominio CD posee también residuos de tirosina intercalados junto con aminoácidos de carácter básico.

Para demostrar que este dominio posee la capacidad de anclaje a la pared se construyeron plantas transgénicas que producían de forma constitutiva una proteína quimera (PR1-CD) consistente en la fusión traduccional del dominio CD a la zona C-terminal de la proteína PR-1, la cual por sí sola es extracelular y soluble. Por medio de anticuerpos que reconocen PR-1 se pudo comprobar que la proteína PR1-CD permanece insolubilizada en las paredes celulares de las plantas transgénicas demostrando, así, que la presencia del dominio CD es suficiente para anclar una proteína a la pared celular.

EXPRESION DE GENES DE EXPANSINA Y ACTINA Y CAPACIDAD DE ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO EN *PINUS* sp. Y *ARABIDOPSIS THALIANA*

Garrido, G., Martín, M., Sabater, B., y Díaz-Sala, C.

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

La modificación dirigida de muchas características de interés forestal, particularmente relacionadas con el crecimiento y desarrollo de árboles, propiedades de la madera, o adaptaciones a plagas, patógenos y estreses ambientales, requiere un conocimiento de los genes involucrados. La pérdida de potencial de enraizamiento adventicio en etapas maduras del desarrollo es muy común en coníferas y limita la clonación y conservación de árboles élite, así como la mejora de la eficiencia de las plantaciones de este tipo de especies. Mediante el estudio de perfiles de RT-PCR (“differential display”) de estaquillas de alta (juveniles) y baja (adultas) capacidad de enraizamiento, se ha establecido recientemente una correlación entre la expresión de genes de actina y expansina y el potencial de enraizamiento (Hutchison et al., 1999; *Plant Physiology* 120:827-831). Debido a la dificultad de regeneración y a los largos tiempos de generación de coníferas, la determinación de la funcionalidad de estos genes en el potencial de enraizamiento requiere un estudio integrado en sistemas modelo. Se han encontrado numerosos paralelismos en el programa de desarrollo que lleva a la pérdida de potencial de enraizamiento en tejidos específicos de diferentes especies de pino y *Arabidopsis thaliana*. En ambos la pérdida de capacidad de enraizamiento responde más a un envejecimiento programado del tejido que a un efecto de la madurez de la planta. Resultados obtenidos en este sistema demuestran que los mecanismos de adhesión que favorecen la interacción entre citoesqueleto y pared celular juegan un papel importante en la regulación espacial de la morfogénesis celular que lleva a la pérdida de potencial de enraizamiento.

ANALISIS GENETICO Y MOLECULAR DE MUTANTES DE *Arabidopsis thaliana* CON ALTERACIONES EN LA MORFOLOGIA DE LA HOJA

Robles, P., Candela, H., Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., Piqueras, P., Vera, A., Martínez-Laborda, A., y Micol, J.L.

División de Genética, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 Alicante.

Estamos siguiendo tres aproximaciones experimentales distintas en un intento de disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Hemos estudiado en una colección de 188 ecotipos la variabilidad natural de varios elementos de la arquitectura foliar, concluyendo que está controlada por poligenes. Además, hemos analizado fenotípicamente y genéticamente 115 mutantes aislados por autores anteriores, estableciendo que corresponden a 47 grupos de complementación. Por último, hemos realizado una búsqueda de mutantes inducidos mediante tratamiento con metanosulfonato de etilo o bombardeo con neutrones rápidos, cuyo análisis genético ha indicado que corresponden a 94 y 8 genes, respectivamente. Utilizando un método de cartografía genética de alto rendimiento, basado en la amplificación simultánea de 21 microsatélites polimórficos, hemos determinado la posición de 91 de estos genes.

Los mutantes *incurvata* (*icu*) se caracterizan por la curvatura del margen de sus hojas hacia el haz y constituyen una clase fenotípica muy representada entre las variantes que hemos analizado. Hemos estudiado las interacciones entre varias mutaciones que causan fenotipos *lcu*, comprobando la existencia de sinergia entre *curly leaf* (*clf*) e *icu2*, así como entre *icu4* y *hasty* (*hst*). Hemos establecido que en las hojas de los individuos *icu2* se desreprimen ectópicamente varios genes de identidad de órgano floral, tal como ocurre en las plantas *clf*. Estos resultados sugieren que las funciones de *CLF* e *ICU2* están relacionadas y convierten a este último en candidato a pertenecer al grupo Polycomb de genes reguladores.

EL GEN *HEMIVENATA* PARTICIPA EN LA FORMACION DEL PATRON VASCULAR DE LAS HOJAS DE *Arabidopsis thaliana*

Candela, H., Martínez-Laborda, A., y Micol, J.L.

División de Genética, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 Alicante.

Para iniciar un análisis causal de la formación del patrón de venación foliar, hemos caracterizado su desarrollo en las hojas vegetativas de *Arabidopsis thaliana*. Como descriptores de su complejidad, hemos definido tres parámetros que han sido cuantificados a lo largo de la expansión foliar: los cocientes entre (a) la longitud o (b) el número de bifurcaciones de la red vascular y el área del limbo, que disminuyen en paralelo a medida que la hoja crece, y (c) el número de hidatodos, que se incrementa progresivamente en las sucesivas hojas de la roseta, así como a lo largo de la expansión de cada una de ellas.

Hemos estudiado 266 ecotipos, encontrando uno, Ei-5, cuyas hojas y cotiledones muestran un patrón de venación extremadamente sencillo, al que hemos denominado Hemivenata (Hve), un rasgo que se transmite de modo monogénico y recesivo. Hemos establecido que el gen *HVE* está ubicado en el cromosoma 2, a menos de 0,2 cM del marcador nga1145. Con el objetivo de identificar *HVE*, estamos secuenciando algunos genes candidatos y obteniendo plantas transgénicas a fin de complementar el alelo mutante *hve*. Para caracterizar su función, estamos estudiando las interacciones entre *hve* y algunas mutaciones en otros loci implicados en el desarrollo vascular y/o la percepción o el transporte de la auxina, como *LOP1*, *MP*, *PIN1*, *AXR1*, *AXR2* y *AXR4*.

ANÁLISIS GENÉTICO Y MOLECULAR DE LOS MUTANTES *ultracurvata* DE *Arabidopsis thaliana*

Pérez-Pérez, J.M., Ponce, M.R., y Micol, J.L.

División de Genética, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 Alicante.

Con la intención de contribuir al análisis causal de la ontogenia foliar, hemos realizado una búsqueda de mutantes con alteraciones en el tamaño y la forma de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. El fenotipo más extremo que hemos encontrado es el de los mutantes *ultracurvata* (*ucu*), cuyas hojas vegetativas y caulinares están enrolladas en espiral hacia el envés y a lo largo del nervio central, a diferencia de las silvestres, que son órganos planos. Hemos identificado cinco estirpes *ucu*, cuyo análisis genético indica que pertenecen a dos grupos de complementación: *UCU1*, con dos alelos semidominantes y uno recesivo, y *UCU2*, con dos alelos recesivos. Hemos establecido que estos genes se encuentran en los cromosomas 4 y 3, respectivamente.

Todos los mutantes *ucu* son enanos y su roseta es muy compacta. Mientras que las plantas *ucu1* muestran una respuesta fotomorfogénica constitutiva, algunos órganos de los individuos *ucu2* manifiestan rotación helicoidal a lo largo del eje longitudinal, especialmente en la raíz y los pistilos.

Para el estudio de interacciones genéticas, hemos cruzado los mutantes *ucu1* y *ucu2*, entre sí y con individuos *axr2*, *det2* y *dim1*, que manifiestan enanismo y alteraciones en la percepción o la síntesis de fitohormonas. Se observó aditividad de los fenotipos en todos los dobles mutantes, excepto en las combinaciones de *ucu1* con *axr2*. Mientras que los diheterocigotos que incluyen un alelo semidominante de *ucu1* son letales, los portadores del alelo recesivo *ucu1-3* muestran un fenotipo sinérgico. Presentaremos estos y otros resultados del análisis genético y fisiológico de los mutantes *ucu*, así como de la clonación posicional de *UCU1*.

PATRÓN TISULAR DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO DE PINO

Suárez, M.F.; Claros, M.G.; Cánovas, F.M.

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. 29071 Málaga.

Se ha analizado la distribución espacial de la expresión de los genes que codifican las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (Fd-GOGAT), durante la germinación de la semilla y en plántulas de pino. Los mRNA de la apoproteína del complejo antena LHCP se ha empleado como control de expresión en tejido fotosintético. Se ha utilizado un método no isotópico e indirecto de hibridación *in situ* para detectar moléculas de mRNA sobre secciones de pino incluidas en parafina. La expresión del gen de Fd-GOGAT coincide con la del gen de LHCP: los transcritos se detectan en los cotiledones, donde se acumulan durante el desarrollo del cloroplasto que tiene lugar durante la germinación de las semillas. Los transcritos de las dos isoformas citosólicas de GS (GS1a y GS1b) se identifican ya en el embrión, aunque con niveles y distribución tisular marcadamente diferentes: los niveles de mRNA de GS1b son elevados y se distribuyen a lo largo de toda la estructura del embrión, detectándose niveles basales de GS1a únicamente en los cotiledones. Durante el desarrollo sucede una acumulación preferencial de los mRNA de GS1b en los haces vasculares, mientras que los de GS1a aparecen localizados en células del parénquima clorofílico. Este patrón diferencial de expresión se hace más patente cuanto más se avanza en la etapa de desarrollo. Nuestros resultados indican que la expresión del gen GS1a está relacionada con la expresión de Fd-GOGAT y la de los genes involucrados en la fotosíntesis.

CARACTERIZACION DE PSCP: UNA SERIN-CARBOXIPEPTIDASA INDUCIDA DURANTE EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE GUISANTE

Cercos, M., Urbez, C., y Carbonell, J.

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

Los ovarios no polinizados de guisante finalizan su desarrollo durante los primeros días después de la antesis; a continuación se inicia un proceso senescente que finaliza con su muerte y abscisión. Este proceso senescente es evitado cuando se induce la fructificación tras la polinización o tratamiento con giberelinas. Así pues, este sistema experimental permite el estudio comparativo de dos procesos fisiológicos alternativos: el desarrollo y la senescencia. El objetivo del presente trabajo ha sido el aislamiento y caracterización de genes inducidos durante la fructificación de los ovarios de guisante; para ello, aplicando la técnica de Differential Display, se compararon las poblaciones de mRNA de ovarios en distintas fases del desarrollo o la senescencia y se aislaron los que estaban asociados al proceso del desarrollo. Se aislaron seis productos de PCR diferenciales. Uno de ellos, PSCP, corresponde al gen de una serin-carboxipeptidasa de la familia de la Carboxipeptidasa C. Este gen es reprimido durante la senescencia e inducido durante la fructificación y otros procesos del desarrollo de la planta. El análisis de su expresión por northern e hibridación in situ ha demostrado que PSCP se expresa mayoritariamente en los tejidos que se encuentran en desarrollo (como semillas en formación, meristemos y tejidos jóvenes), lo que sugiere la implicación de esta proteasa en procesos de crecimiento.

LA HIPOMETILACION RETRASA LA FLORACION EN PRIMULA

Gisbert, E.¹, Fraga, M.¹, Arrollo, R.², Sánchez Serrano, J.J.², Martínez-Zapater, J.M.², y Borja, M.¹

¹Fundación PROMIVA, Boadilla del Monte, 28660-Madrid.

²CNB-CSIC, Cantoblanco, 28040-Madrid.

La Prímula (*Primula vulgaris* Huds. or *P. acaulis*) o Primavera es una planta ornamental que se cultiva como planta de temporada. Es una especie diploide ($2n=22$) de la familia de las Primulaceae. Las variedades comerciales necesitan vernalizarse durante cuatro semanas a partir de la segunda semana post emergencia, para florecer. Sería muy rentable económicamente poder sustituir la vernalización por tratamientos químicos en la producción comercial de Prímula.

En el caso de *Arabidopsis thaliana*, tratamientos con el agente demetilante 5-azacitidina inducen la floración temprana en las plantas no vernalizadas de los ecotipos sensibles a metilación. Para saber si se producía un efecto análogo en Prímula se realizó un tratamiento con 0,1 mM de 5-azacitidina. En las plantas tratadas se observó un efecto contrario al descrito para *Arabidopsis*, ya que no sólo no se aceleró la floración, sino que se observó un retraso o incluso la ausencia de floración. Este efecto correlacionaba con la aparición de un mayor número de hojas en la roseta. Cuando el DNA de prímula se digiere con enzimas de restricción sensibles a metilación se observa que el retraso de floración en estas plantas correlaciona con la ausencia de metilación. Por tanto es posible que el control de la vernalización en prímula sea diferente de *Arabidopsis*.

El tratamiento con 5-azacitidina no es útil para la inducción de floración temprana en la producción comercial de prímula.

EL DESARROLLO ESTOMATAL COMO PARTE DEL PROGRAMA FOTOMORFOGÉNICO

Torres Contreras, J. (1), y Fenoll, C. (1,2)

(1) Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla - La Mancha. Campus Tecnológico de la Fábrica de Armas, 45071 Toledo.

(2) Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco, 28049 Madrid.

La luz dispara el programa fotomorfogénico de desarrollo (1), del cual la expansión cotiledonar y foliar es una parte fundamental. Durante este proceso de expansión, la hoja aumenta su superficie mediante una combinación de procesos de división y crecimiento celular. En la epidermis, estos procesos están ligados al desarrollo estomatal, ya que una buena parte de las células epidérmicas son estomas o células subsidiarias de los estomas (2,3). En la oscuridad, el programa fotomorfogénico está reprimido, de modo que la hoja no se expande y los estomas no completan su desarrollo (1). Por lo tanto, el desarrollo estomatal puede considerarse como parte del programa fotomorfogénico. La fotomorfogénesis puede dividirse en varias fases: (a) percepción de la luz a través de múltiples fotoreceptores; (b) convergencia de las señales procedentes de estos en un procesador central; y (c) distribución de la señal procedente del procesador central hacia múltiples vías de respuestas específicas. En *Arabidopsis* se han aislado muchos mutantes con fenotipos fotomorfogénicos, y la posición en la ruta de algunos de ellos está establecida, por lo que es posible estudiar las relaciones entre los genes situados en esta vía y el desarrollo estomatal. Hemos analizado el fenotipo estomatal de mutantes alterados en las tres fases de la ruta de percepción y respuesta a la luz. Los mutantes afectados en la primera fase (el grupo *hy*) presentan respuestas reducidas a la luz, y fenotipos estomatales muy leves. Por el contrario, las mutaciones en el procesador central (genes *COP/DET/FUS* pleiotrópicos), que provocan fenotipos de fotomorfogénesis constitutiva muy acusados, producen también alteraciones estomatales extremas, con presencia de estomas en la oscuridad, y a menudo en contacto directo formando grandes grupos. Finalmente, los mutantes con fotomorfogénesis constitutiva leve, alterados en puntos posteriores de la ruta (grupo *cop/det/fus* de respuestas específicas) también desarrollan estomas en la oscuridad, pero su distribución es normal o casi normal y no presentan las agrupaciones de estomas características de los mutantes pleiotrópicos. Este análisis nos permite concluir que: (a) la vía de desarrollo fotomorfogénico está implicada en la formación de estomas. (b) las señales que, procedentes de los múltiples fotoreceptores, convergen más tarde en la vía, son redundantes para la formación de estomas y su correcto espaciamiento. (c) el procesador central controla tanto la formación de estomas como el correcto desarrollo estomatal que permite la adquisición de un patrón de distribución de estomas adecuado. (d) algunos de los genes que actúan tras la divergencia de la señal procedente del procesador están situados en vías que contribuyen a la formación de estomas, pero no al control de su patrón de distribución.

- (1) T-W. McNellis and X-W. Deng. (1995). *Plant Cell* 7, 1749-1761.
- (2) L. Serna and C. Fenoll. *Phis. Plantarum* (en prensa).
- (3) L. Serna, J. Torres y C. Fenoll. (1999). V Reunión de Biología Molecular de Plantas. Alicante.

IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA FAMILIA GÉNICA POSIBLEMENTE IMPLICADA EN EL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE *Arabidopsis*

Franco-Zorrilla, J.M.¹, Cubas, P.^{1,2}, Jarillo, J.A.^{1,2}, Fernández-Calvín, B.², Salinas, J.², Martínez-Zapater, J.M.^{1,2}.

1. Departamento de Genética Molecular de Plantas. Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC. Campus de Cantoblanco. Carretera de Colmenar, km 15. 28049, Madrid.

2. Departamento de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, CIT-INIA. Carretera de la Coruña, km 7. 28040, Madrid.

El desarrollo reproductivo es uno de los procesos más importantes en el desarrollo de las plantas. Con el objeto de identificar nuevos genes que pudieran estar implicados en este proceso y que no fueran accesibles al análisis genético, realizamos una hibridación sustractiva de cDNAs de meristemos reproductivos de coliflor. De esta manera, pudimos identificar un gen, *BoREM1*, que se expresaba de forma específica en estos meristemos (Franco-Zorrilla y col., PMB, **39**: 427-436, 1999), así como el gen correspondiente de *Arabidopsis*, denominado *AtREM1*. Las proteínas deducidas a partir de la secuencia de estos genes presentan características propias de reguladores transcripcionales, como son la presencia de un dominio fuertemente ácido, varias posibles señales de localización nuclear, una cremallera de leucinas y dos dominios semiconservados que recuerdan al dominio de unión a DNA de la familia ARF de factores de transcripción. De manera similar a la expresión de *BoREM1* en meristemos de coliflor, *AtREM1* se expresa en los meristemos de inflorescencia y meristemos florales, así como en los primordios de estambres y carpelos. La inserción de un T-DNA en la región codificante de *AtREM1* no provoca ninguna alteración fenotípica en plantas homocigóticas para la inserción, lo que podría deberse a redundancia génica. De acuerdo con esta hipótesis, la secuenciación rutinaria del genoma de *Arabidopsis* ha permitido identificar al menos 15 genes con las mismas características de *AtREM1* organizados en grupos de genes repetidos en tándem. En el laboratorio estamos analizando la función de esta nueva familia de proteínas en el desarrollo de la planta, mediante el estudio de su localización subcelular y el efecto de su sobreexpresión en plantas transgénicas.

CAP 28, UN cDNA DE *Cicer arietinum* IMPLICADO EN EL PROCESO DE CRECIMIENTO

Romo, S., Dopico, B., y Labrador, E.

Dpto. Fisiología Vegetal. Fac. Biología. Universidad de Salamanca. Pza. Doctores de la Reina s/n. 37007-Salamanca.

El aislamiento y la caracterización de genes cuya expresión se modifica durante el crecimiento, puede ayudarnos a entender este proceso fundamental para el desarrollo de la planta. El estudio de estos genes permitirá esclarecer algunos aspectos todavía desconocidos en la regulación génica del crecimiento. Mediante un screening diferencial utilizando mRNA de epicotilos en crecimiento activo, y de epicotilos cuyo crecimiento está inhibido por PEG, hemos aislado un cDNA (Cap28, nº acceso AJ225026), cuya expresión disminuye cuando el crecimiento es inhibido. Codifica para una proteína de 169 aa que presenta homología con otras proteínas vegetales de función desconocida. Esta proteína posee características muy peculiares: punto isoeléctrico extremadamente bajo (3,69) y perfil marcadamente hidrofílico. Esto se debe a la elevada frecuencia de aa cargados negativamente, en concreto ácido glutámico, que se localiza en parejas a lo largo de la secuencia. El clon Cap28 presenta mayor expresión en tejidos jóvenes como semillas inmaduras, entrenudo apical, vainas jóvenes y gancho plumular y epicotilos. En relación con el crecimiento, la expresión disminuye a medida que aumenta la edad de los epicotilos. Asimismo, disminuyen cuando las plántulas se someten a condiciones de estrés (PEG, NaCl y altas temperaturas) que inhiben el crecimiento, y se reestablecen, en parte, cuando las condiciones vuelven a ser normales. Además, su expresión se induce por sustancias que inducen el crecimiento, como las auxinas y los brasinólidos. Estos resultados nos permiten relacionar esta proteína con el metabolismo activo al comienzo de procesos que implican elongación y/o división celular.

CARACTERIZACIÓN DE *esd1*, UN MUTANTE DE FLORACIÓN TEMPRANA DE *Arabidopsis thaliana*

Gómez-Mena, C.¹, Martín-Trillo, M.M.¹, Ruiz-García, L.¹, Salinas, J.², y Martínez-Zapater, J.M.¹

¹Dept. Genética Molecular de Plantas. Centro Nacional de Biotecnología. Ctra. de Colmenar Viejo Km. 15,5; Cantoblanco, 28049 Madrid.

²Dept. Mejora Genética y Biotecnología. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Carretera de la Coruña Km. 7, 28040 Madrid.

La regulación del tiempo de floración es un factor primordial para que la transición floral se lleve a cabo en el momento más adecuado del ciclo vital de la planta y bajo las condiciones ambientales más favorables. La transición de un patrón de desarrollo vegetativo a un patrón reproductivo está controlado tanto por factores ambientales como por factores endógenos. Durante el desarrollo vegetativo se pueden distinguir cambios graduales en la forma y disposición de las hojas así como en la distribución de sus tricomas. Estos cambios permiten distinguir una fase juvenil y una fase adulta en el desarrollo vegetativo. En especies herbáceas esta maduración vegetativa se ha relacionado con la adquisición de competencia del meristemo apical para responder al estímulo floral. Los mutantes de floración temprana *esd1* (*early in short days 1*) identifican un nuevo locus implicado en la represión de la floración en fotoperiodos no inductivos. Este locus se ha localizado en el cromosoma 3 mediante la utilización de marcadores moleculares tipo SSLPs y CAPS. El fenotipo de floración temprana de los mutante es consecuencia de una rápida transición a lo largo de las diferentes fases de desarrollo lo cual parece correlacionarse con una temprana adquisición de competencia meristemática. Evidencias fisiológicas y genéticas indican que *ESD1* participa en la ruta de regulación de la floración dependiente de fitocromo B. Por una parte, los mutantes mostraron pérdida de sensibilidad a la luz roja y por otra la combinación de mutaciones en *esd1* con mutantes deficiente para el fitocromo B ocasiona un fenotipo de floración muy extremo. Además, los mutantes presentan alteraciones en el patrón de desarrollo floral, mostrando un mayor número de pétalos y estambres. El análisis de la expresión de genes homeóticos responsables de la identidad de los órganos florales indica la existencia de alteraciones en los niveles de expresión de algunos de estos genes en los meristemas de los mutantes. En base a los resultados obtenidos se discute el papel del gen *ESD1* en el control del tiempo de floración.

EXPRESIÓN DE DOS PROTEÍN FOSFATASAS DEL TIPO 2C (FsPP2C1 Y FsPP2C2) REGULADAS POR ÁCIDO ABCSÍSCO EN SEMILLAS DURMIENTES DE HAYA

Lorenzo, O., Calvo, A.P., Nicolás, G., Rodríguez, D., y Nicolás, C.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca. Plaza de los Doctores de la Reina s/n. 37007 Salamanca.

En los procesos de transducción de señales en plantas juega un importante papel la familia PP2C de serina/treonina proteín fosfatasas.

En un intento de identificar proteín fosfatasas relacionadas con la dormición, reguladas por ácido abscísico y posiblemente implicadas en la transducción de señales debidas a esta hormona, usamos una aproximación diferencial por RT-PCR a partir de mRNA extraído de semillas tratadas con ácido abscísico (que mantiene a las semillas en dormición) frente a semillas tratadas con ácido giberélico o ethephon (ambas hormonas producen una rápida salida de la dormición en semillas de haya), mediante la utilización de oligonucleótidos degenerados correspondientes a los dominios conservados II (DGHGGS) y VIII (LASDGLWD) presentes en las PP2Cs.

Se han aislado varios clones de cDNA que presentan una alta homología con distintas proteín fosfatasas del tipo 2C. Dos de ellos con el tamaño esperado (550 pb aprox.), se utilizaron como sondas en el "screening" de una genoteca de semillas de haya tratadas con ABA. Se obtuvieron dos clones completos: FsPP2C1 y FsPP2C2. El clon FsPP2C1 presenta una homología del 50% con la zona catalítica de las fosfatasas tipo 2C, denominadas ABI1 y ABI2. El clon FsPP2C2 tiene una homología del 80% con distintas PP2Cs. El análisis por Northern blot de sus transcritos muestra una clara inducción por ácido abscísico. La expresión de ambos clones como proteínas de fusión permitirá confirmar si presentan actividad proteín fosfatasa 2C.

UNA PROTEÍNA NUCLEAR DE GUISANTE COMPARTE CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES CON LAS VICILINAS Y CON LAS LEA

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

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia. 46100 Burjassot, Valencia.

Durante la embriogénesis del guisante se expresan un gran número de proteínas. La mayoría son proteínas de reserva; vicilinas y leguminas. Al final de la embriogénesis predominan las proteínas LEA (late embryogenesis abundant) con carácter hidrofílico que parecen ejercer un papel protector cuando la semilla pierde agua y entra en el periodo durmiente. La expresión de las proteínas de reserva es específica de tejido y sus mensajeros no se acumulan en los órganos del embrión; cotiledones y eje embrionario durante el periodo durmiente. En los últimos años se ha resuelto por cristalografía de rayos X la estructura de dos vicilinas (faseolina y cannavalina) lo que ha permitido la formación de un modelo tridimensional canónico. De acuerdo con el modelo varias proteínas con estructura común y funciones variables se han incluido dentro de una superfamilia: vicilinas, leguminas, germinas, esferulinas y SBP (sucrose binding protein). Se cree que estas proteínas han evolucionado a partir de una proteína ancestral común que estaba implicada en la homeostasis del agua.

La extracción de proteínas de núcleos o cromatina de ejes embrionarios de guisante permite la obtención de histonas y algunas otras proteínas que no se encuentran en la planta adulta, una de estas proteínas con Mr en PAGE-SDS de 16.000 (p16) es el objeto del presente estudio. El análisis del cDNA para la proteína p16 muestra un ORF que codifica para una proteína de mayor tamaño (p54). Dentro del ORF, p16 es codificada por el 1/3 C-terminal y a los 2/3 N-terminales se le ha llamado p38. La proteína p54 muestra un 60% de identidad con la SBP de soja y ambas presentan características estructurales comunes con otras vicilinas: péptido señal hidrofóbico N-terminal, varios motivos CXXXC y una elevada conservación de residuos importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional (trimeros 7S).

El mRNA de p54, al contrario que el de otras vicilinas y SBP se acumula en el eje y cotiledones de la semilla durmiente y al igual que ocurre con las proteínas LEA durante la germinación y desarrollo de la plantula puede inducirse por factores que implican una disminución del potencial de agua: ABA, desecación, estrés osmótico y herida.

El fraccionamiento celular indica que p16 se encuentra además de en la fracción nuclear, en la mitocondrial y en la microsomal pero no en la fracción soluble. La presencia del péptido señal sugiere que la síntesis de la proteína tiene lugar sobre ribosomas asociados al retículo endoplásmico, no obstante 25 residuos más allá de la secuencia señal existe una posible señal de localización nuclear del tipo bipartita que podría justificar la presencia de esta proteína en el núcleo. Experimentos in vitro indican que p16 interacciona de forma no específica tanto con DNA desnudo como con nucleosomas u oligonucleosomas. Además cuando núcleos son obtenidos en presencia de iodoacetamida y en ausencia de agentes reductores, p16 se entrecruza con H3 a través de un puente disulfuro.

La proteína p38, correspondiente a los 2/3 N-terminales de p54 ha podido ser detectada mediante anticuerpos obtenidos frente a un péptido sintético de 13 aminoácidos unido a BSA y se ha podido observar durante la embriogénesis y la germinación que p16 y p38 evolucionan conjuntamente.

En resumen, los resultados obtenidos parecen indicar que una fracción de la proteína p54 (procesada o sin procesar) va al núcleo, que su estructura es similar al de las vicilinas, pero su expresión y la regulación de la misma se parece más al de las proteínas tipo LEA y por lo tanto su función podría estar relacionada con el papel protector frente a la pérdida de agua que ocurre en el embrión al final de su desarrollo.

CLONACION DE GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A GIBERELINAS

Urbez, C., Cercos, M., y Carbonell, J.

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

La síntesis y el metabolismo de giberelinas (GAs) ha sido estudiada de manera exhaustiva, lo cual ha llevado a un profundo conocimiento de las rutas de biosíntesis y catabolismo. Mucho menos se sabe de su percepción y de su mecanismo de acción. Las aproximaciones actuales se basan en estudios genéticos y moleculares de los mutantes de respuesta a giberelinas, y van encaminados a conocer la identidad de los genes involucrados en la cadena de transducción de señal. El objetivo de nuestro trabajo es el aislamiento y caracterización de genes regulados por GAs en la planta de guisante, y que pudieran estar implicados en la cadena de transducción de señal. Utilizando la técnica de Differential Display, se han comparado poblaciones de mRNA de ovarios de guisante tratados con GAs y no tratados y recogidos a distintos tiempos. Se ha aislado un producto diferencial (DDG310) que muestra homología con una proteína de la familia "rho", proteínas pequeñas que unen GTP, relacionadas con las de la superfamilia "ras-related". Mediante "Northern blot" se ha comprobado que 45 minutos después del tratamiento de los ovarios con GA se produce un descenso en la expresión de DDG310. Este descenso coincide con el momento en que se activa el crecimiento del ovario, lo que sugiere que esta proteína podría estar implicada en la cadena de transducción de señal de GAs o en el control del crecimiento. Se ha aislado su homólogo en *Arabidopsis thaliana* y se han generado plantas transgénicas en las que este gen está silenciado o sobreexpresado. En la actualidad se está llevando a cabo la caracterización de las plantas transgénicas.

LA SOBREENPRESION DE UNA GA 20-OXIDASA ATIPICA DE CALABAZA (*Cm20ox1*) CONFIERE, CONTRARIAMENTE A LO ESPERADO, UN FENOTIPO ALARGADO EN TABACO

Gisbert, C.¹, García-Martínez, J.L.¹, Hedden, P.², Phillips, A.L.², Croker, S.J.², y López-Díaz, I.¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia.

²Long Ashton Research Station, Bristol, Inglaterra.

La giberelina (GA) 20-oxidasa de calabaza codificada por el gen *Cm20ox1* es un enzima que cataliza, mayoritariamente, la síntesis de GAs sin actividad biológica (GA₁₇ y GA₂₅). Por tanto, cabe esperar que la sobreexpresión de dicho gen en plantas produzca una desviación de la ruta de biosíntesis hacia GAs inactivas y como consecuencia una reducción de la altura. Sin embargo, la expresión en tabaco de *Cm20ox1* bajo el control del promotor 35S ha permitido obtener 11 plantas transgénicas con fenotipo alargado (hasta 60% más altas que las control) y aislar líneas homocigóticas con dicho fenotipo, detectable incluso en plántulas (hipocotilo alargado) germinadas en placas Petri. La curva dosis-respuesta a GA₃ muestra que la respuesta a GAs de las plantas transgénicas no está saturada. Sin embargo, la longitud de los hipocotilos de plantas homocigóticas y de plantas heterocigotas (obtenidas por cruzamiento de una línea homocigótica con una línea silvestre) son iguales, indicando que no existe un efecto de dosis génica sobre el fenotipo. La adición de paclobutrazol (un inhibidor de la síntesis de GAs) al medio de cultivo redujo la altura de las plantas control y transgénicas, y la inhibición se revertió mediante GA₃, apoyando la hipótesis de que el fenotipo observado se debe a un mayor contenido de GAs activas. Por el contrario, la aplicación de LAB 198 999 (inhibidor de las dioxigenasas que catalizan los últimos pasos metabólicos de la biosíntesis de GAs) inhibió la altura de las plantas transgénicas pero aumentó, a ciertas concentraciones, la altura de las plantas control. Se discutirán estos resultados en función de los niveles de GAs endógenas y las posibles diferentes proporciones de enzimas de síntesis e inactivación en plantas control y transgénicas.

CLONACIÓN DE UN C-DNA CON POSIBLE FUNCIÓN RECEPTOR QUINASA EN CONÍFERAS

Avila, C., y Cánovas, F.M.

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga, 29071 Málaga.

Durante la última década se ha avanzado en gran medida en la regeneración de coníferas in vitro. Sin embargo, antes de que las técnicas de cultivo de coníferas por embriogénesis somática puedan utilizarse de forma práctica es necesario tener un conocimiento mayor de la regulación del proceso de diferenciación y desarrollo, lo que puede ser utilizado para mejorar la propagación vegetativa de este tipo de material. Para intentar caracterizar genes implicados en el desarrollo de coníferas hemos clonado en una primera aproximación una secuencia homóloga a los receptores quinasa de plantas. La proteína de pino silvestre que contiene los 11 subdominios característicos propios de las Ser/Thr quinasa en su región carboxilo terminal, mientras que en su región N-terminal presenta 23 repeticiones completas y una incompleta de un motivo rico en leucinas similar a los encontrados en otros receptores quinasa descritos en plantas. El gen se expresa en las etapas embrionarias del desarrollo en plántulas de pino y se está estudiando en la actualidad su nivel de expresión en las plántulas dependiente del desarrollo. Se está analizando el dominio quinasa y se ha iniciado la expresión en *E. coli* para caracterizarlo y obtener anticuerpos que nos permitan determinar su localización subcelular.

REDUCCION DE LA ALTURA DE PLANTAS DE TABACO MEDIANTE RNA ANTISENTIDO Y COSUPRESION CON UN GEN DE UNA GA 20-OXIDASA DE NARANJO

Gisbert, C., Vidal, A., García-Martínez, J.L., y López-Díaz, I.

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

Las GA 20-oxidasas son dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato que catalizan varios pasos sucesivos de oxidación dentro de la ruta biosintética de giberelinas (GAs) y cuyos productos finales son precursores de GAs activas. La sobreexpresión de genes de 20-oxidasa en plantas transgénicas es capaz de aumentar los niveles de GAs y consiguientemente la altura de las plantas en *Arabidopsis* (1) y tabaco (2). El gen *CcGA20ox1*, que codifica una GA 20-oxidasa de naranjo, presenta gran homología con los dos genes de GA 20-oxidasa clonados en tabaco (hasta un 77% de identidad). Por ello, en el presente trabajo, hemos investigado la posibilidad de reducir la altura de plantas de tabaco, inhibiendo la síntesis de giberelinas: a) por expresión en antisentido y b) por cosupresión con el gen heterólogo de naranjo *CcGA20ox1*. Se han obtenido siete plantas que expresan este gen en antisentido bajo el control del promotor 35S y que muestran reducida su altura en distinto grado. En algunas de ellas se observó una reducción del nivel de RNAm correspondiente a la más homóloga de las GA 20-oxidasas de tabaco. En este momento se están caracterizando las líneas puras obtenidas. También se han obtenido plantas de altura reducida en una línea transgénica que sobreexpresaba el gen *CcGA20ox1* en orientación sentido. La reducción de la altura apareció paulatinamente en sucesivas generaciones a causa de un silenciamiento progresivo del transgen, puesto de manifiesto por análisis Northern y Western.

(1) Coles J.P. et al (1999) *Plant J.* 17, 547-556.

(2) Vidal A. et al (1999), en preparación

COORDINACION GENETICA Y MOLECULAR DE LOS PROGRAMAS QUE DETERMINAN LA ARQUITECTURA FLORAL

Egea-Cortines, M.

Área de Genética, Dept. de Ingeniería de la Producción Agraria, Universidad Politécnica de Cartagena, ETSIA. 30203 Cartagena. marcos.egea@etsia.upct.es

Durante el desarrollo de las flores de *Antirrhinum*, existen varios procesos de desarrollo que incluyen la formación de una flor con asimetría dorsoventral, posicionamiento de los órganos florales en verticilos, establecimiento de los bordes de identidad entre verticilos y entre órganos y terminación del meristemo. El análisis de interacciones génicas entre los genes que controlan la identidad de los meristemos florales (*Squamosa*), y los organos responsables de la identidad de los órganos del segundo y tercer verticilo (*Deficiens* y *Globosa*), demuestran que existe una interacción compleja que indica que ambos genes controlan también los bordes de identidad de los órganos florales, así como la posición de los órganos formados (EMBO J. 18:5370-79). Esta interacción se debe a una disrupción del programa de control de formación de verticilos y de bordes de identidad controlado por el gen *Fimbriata*. Estudios preliminares muestran que dobles mutantes de alelos débiles de *def* y *fim* tienen un efecto radical en la arquitectura floral, incluyendo efectos en la identidad de los órganos en una forma dorsal-ventral con fenotipos más fuertes de pérdida de función en la zona ventral de la flor. Todo hace indicar que los distintos programas de desarrollo anteriormente descritos, tienen un sistema de coordinación muy poco entendido por el momento. En algunos casos, esta coordinación puede ocurrir por interacciones moleculares directas de componentes de programas distintos.

Metabolismo

EXPRESIÓN DE *xPPAR α* EN PLANTAS DE *NICOTIANA TABACUM*: EFECTO SOBRE EL METABOLISMO OXIDATIVO Y DE ÁCIDOS GRASOS

Nila, A.G.¹, Sandalio, L.M., López, M.G.¹, Gómez, M., Gómez-Lim, M.¹, y del Río, L.A.

Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.

¹Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, GTO, México.

Los peroxisomas son orgánulos celulares con un metabolismo esencialmente oxidativo que participan en diferentes procesos metabólicos como la β -oxidación de ácidos grasos. En este trabajo se transformaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con el gen del *xPPAR α* (*peroxisome proliferator activated receptor*) que en tejidos animales está implicado en la proliferación de peroxisomas y en el incremento de la β -oxidación peroxisomal. Las plantas se transformaron via *Agrobacterium tumefaciens* en el vector PPAR/pKYLX80 el cual contenía el gen del *xPPAR α* bajo el control del promotor constitutivo 35S, así como el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina. Las plantas transformadas se seleccionaron por su resistencia a kanamicina (100 mg/l) y por transferencia de Northern y Southern usando como sonda el ADNc del *xPPAR α* . La expresión de *xPPAR α* produjo cambios en la morfología de las hojas y tallos en plantas de tabaco, junto con alteraciones a nivel ultraestructural caracterizadas por un aumento de la población peroxisomal. En plantas transformadas no se observaron cambios importantes en el contenido de ácidos grasos de las hojas, a excepción de los C16:2 que se reducían significativamente en las plantas transgénicas, mientras que los C18:1 aumentaban ligeramente. Por el contrario, la actividad acil-CoA oxidasa, utilizada como marcador de la β -oxidación de ácidos grasos, aumentaba 4 veces. La expresión de *xPPAR α* produjo además un aumento de los niveles de peroxidación lipídica y una reducción de las actividades catalasa y superóxido dismutasa. Estos resultados muestran que el *xPPAR α* produce en vegetales efectos similares a los descritos en células animales, lo que sugiere la existencia de una proteína equivalente en tejidos vegetales.

BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN PLANTAS: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ACETOACETIL-CoA TIOLASA DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Ahumada, I., Campos, N., y Boronat, A.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad de Barcelona, Martí i Franqués 1, 08028-Barcelona.

La enzima acetoacetil-CoA tiolasa (AACT) cataliza la formación de acetoacetil-CoA a partir de dos moléculas de acetil-CoA. En eucariotas la reacción catalizada por la AACT representa el primer paso de la síntesis de isoprenoides a través de vía del mevalonato. Se ha aislado y caracterizado un clon de cDNA de *Arabidopsis thaliana* que codifica para la AACT. El clon de cDNA contiene un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 403 aminoácidos y una masa molecular aproximada de 41,4 kDa. La AACT de *Arabidopsis* presenta una identidad del 81.3% con la AACT de rábano identificada previamente. Los extremos 5' y 3' del mRNA de la AACT se identificaron mediante análisis de RACE. Análisis mediante Southern blot indicaron la presencia de al menos dos genes para la AACT. Estudios mediante Northern blot indican que el mRNA de la AACT se detecta de forma generalizada en todos los tejidos analizados, si bien con niveles variables. Los transcritos detectados en los distintos tejidos varían en longitud debido probablemente al uso de sitios alternativos de poliadenilación. El gen correspondiente a la AACT (AAT1) ha sido aislado utilizando el cDNA previamente clonado como sonda. El gen AAT1 contiene 12 exones y 11 intrones. El patrón de expresión espacial y temporal del gen AAT1 se está estudiando en plantas transgénicas que contienen delecciones de la región promotora fusionadas con el gen GUS. El análisis detallado del promotor del gen AAT1 se ha abordado mediante estudios de expresión transitoria en protoplastos. Recientemente se ha identificado un segundo gen que codifica para la AACT (AAT2) y su correspondiente cDNA, los cuales están actualmente en fase de caracterización.

LOCALIZACION SUBCELULAR Y POSIBLE FUNCION FISIOLÓGICA DE UNA METALOTIONEÍNA DE FRESA (*Fragaria x ananassa* cv Chandler)

Moyano, E., López-Raéz, J., Blanco Portales, R., Muñoz, E., Caballero, J.L., y Muñoz Blanco, J.

Dpto de Bioquímica y Biología Molecular.Fc. de Ciencias.Univ de Córdoba. Avda de San Alberto Magno s/n.14071 CORDOBA.

De acuerdo a la estructura de sus dominios ricos en cisteína, existen tres tipos de metalotioneínas en plantas; las metalotioneínas de clase I, las de clase II y las de clase III, denominadas fitoquelatinas. SE ha propuesto que estas proteínas intervienen en el metabolismo o detoxificación de metales, debido a su capacidad de unir metales y a su inducción por iones metálicos pesados. Además se han sugerido otras funciones posibles como el control intracelular del potencial redox, el metabolismo del azufre y la detoxificación de especies reactivas de oxígeno. También se las ha implicado en procesos de desarrollo. En nuestro grupo se ha procedido a clonar un ADNc correspondiente a un gen que codifica una metalotioneína de clase II de fresa. Mediante hibridación "in situ" se ha localizado su expresión celular, observándose que se expresa en tejido vascular y en células de parénquima. Utilizando cultivos celulares se ha observado que la expresión del gen se reprime por condiciones de estrés oxidativo y no se induce por iones metálicos. También la cotransfección del ADNc conjuntamente con un plásmido indicador (promotor HIV-LTR-luciferasa) sugirió una relación directa o indirecta con una disminución de la activación del promotor por el factor de transcripción NF-κB.(un factor de transcripción activado por redox). Los resultados sugieren una relación de esta metalotioneína con la activación/inactivación de proteínas reguladas por redox.

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN Y HOMOGLUTATIÓN EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Clemente, M.R., y Becana, M.*

Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apartado 202, 50080 Zaragoza.

El tripéptido GSH (γ Glu-Cys-Gly) es el tiol más abundante en microorganismos, plantas y animales. En plantas, el GSH es un antioxidante muy versátil que, además de otras funciones vitales como el almacenamiento y transporte de azufre, puede eliminar directamente las especies reactivas de oxígeno y participar en el ciclo ascorbato-GSH. Este ciclo elimina el H_2O_2 y protege la fotosíntesis en cloroplastos y la fijación de N_2 en los nódulos de las leguminosas. Estas plantas son particularmente interesantes para estudiar el metabolismo de tioles porque los nódulos contienen elevadas concentraciones de GSH y, en algunos casos, de hGSH (γ Glu-Cys-Ala), un tripéptido homólogo. La síntesis de GSH tiene lugar en dos etapas dependientes de ATP, catalizadas por la γ -glutamilcisteinil sintetasa (γ ECS) y la glutatión sintetasa (GSHS). En la síntesis de hGSH parece intervenir una homoglutatión sintetasa (hGSHS) específica en vez de la GSHS. En este trabajo hemos determinado el contenido de tioles y las actividades γ ECS, GSHS y hGSHS de nódulos. Asimismo, hemos iniciado el estudio molecular de dichas enzimas.

Optimizando técnicas de HPLC con detección por fluorescencia que permiten la cuantificación de tioles y enzimas en muestras de menos de 25 mg de nódulos, hemos observado que el GSH es el tiol más abundante en nódulos de crecimiento indeterminado (guisante, alfalfa), mientras que el hGSH predomina en los nódulos de crecimiento determinado (soja, judía). La correlación entre contenido de tioles y actividades tiol sintetetas mayoritarias en nódulos de ocho leguminosas indica que la distribución de GSH y hGSH está determinada por sintetetas específicas. Utilizando genotecas de cDNA de nódulos, hemos aislado secuencias completas que codifican la γ ECS de guisante y judía, así como secuencias parciales que codifican la GSHS de guisante y la hGSHS de judía. El análisis de las secuencias teóricas de las correspondientes proteínas (péptido señal, N-terminal, homologías con secuencias de otras plantas superiores) y los estudios de fraccionamiento subcelular (citosol, plastidios, mitocondrias, peroxisomas) indican que los cDNAs codifican γ ECS localizadas en plastidios, si bien existe también actividad γ ECS en el citosol nodular. Asimismo, los resultados muestran que la GSHS y hGSHS están presentes en el citosol de los nódulos.

Agradecimientos - Este trabajo ha sido financiado por los proyectos 2FD97-1101 y PB95-0522 de la DGESIC (MEC). J.F.M. es investigador contratado del MEC. I.I-O. es becario postdoctoral de la Unión Europea. M.A.M., M.C.R. y M.R.C. son becarios predoctorales del Gobierno Vasco y MEC.

Referencias - Alscher RG (1989) *Physiol. Plant.* **77**: 457-464, Dalton et al. (1986) *PNAS* **83**: 3811-3815, Frendo et al. (1999) *Plant J.* **17**: 216-219, Matamoros et

al. (1999) *Plant Physiol.* **121**: 97-112, Matamoros et al. (1999) *Plant Physiol.* *In press*, May and Leaver (1994) *PNAS* **91**: 10059-10063, Noctor and Foyer (1998) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 249-279

STUDY OF MAIZE LIGNIN BIOSYNTHETIC PATHWAY

Ruelland, E., Rigau, J., and Puigdomènech, P.

Departament de genètica molecular. Institut de biologia molecular de Barcelona. CSIC. Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona.

Lignins are phenolic polymers of the secondary cell walls of vascular plants. They are situated in supporting and conducting tissues, such as phloem, xylem or sclerenchym, where they provide mechanical strength and impermeability. Lignins result from the polymerization of hydroxycinnamyl alcohols: p-coumaryl, coniferyl and sinapyl. Of the many enzymes of the biosynthetic pathway of these monomers (monolignols), we are interested in the Caffeoyl-O-Methyl-transferase (COMT) and the cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD). Indeed, it was recently demonstrated that natural maize mutants with lower lignin content were mutated on these enzymes :the brown midrib 1 (bm1) mutant is mutated on the CAD gene, and the bm3 mutant is mutated on the COMT gene. Many studies are dedicated to better understand the lignin biosynthetic pathway. Still, many questions remain unanswered :1- What type of cells do synthesize monolignols. Do only lignifying cells produce the monomers (cell autonomy concept)? Or do neighbouring cells produce monolignols that are to be transported to the lignifying cells (cell cooperation)? 2- What is the subcellular level of the synthesis of the phenylpropanoid units? Till now, it was admitted that these units were synthesized in cytoplasm, but new evidences suggest that this synthesis could be associated with membrane structures of Golgi bodies or of the RE.

Using antibodies raised against sugarcane COMT and CAD, Western blot and immunolocalisation experiments were performed with maize tissues to answer these questions.

FLS2: UN RECEPTOR-QUINASA INVOLUCRADO EN EL RECONOCIMIENTO DE LA FLAGELINA EN ARABIDOPSIS

Gomez Gomez, L., y Boller, T.

Friedrich Miescher-Institut. P.O. Box 2543 CH-4002 Basilea, Suiza.

Las flagelinas, componentes principales del flagelo bacteriano, son muy variables en peso molecular y en secuencia, sin embargo todas las flagelinas contienen un dominio altamente conservado de 20 aminoácidos que es prácticamente idéntico en todas las eubacterias, incluyendo *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Escherichia*. Las células vegetales específicamente reconocen las flagelinas a través de este dominio. El tratamiento de plántulas de *Arabidopsis* con péptidos sintéticos correspondientes a este dominio (flg22) induce deposición de calosa, inducción de genes de defensa (PR) e inhibición del crecimiento. Con el objeto de determinar los componentes involucrados en el reconocimiento de la flagelina en *Arabidopsis*, plantas de *Arabidopsis* mutagenizadas con EMS fueron tratadas con el péptido flg22, aislando mutantes cuyo crecimiento no está afectado por el péptido flg22. Los mutantes aislados constituyen tres grupos de complementación distintos. Uno de ellos ha sido estudiado en más profundidad. Este locus se localiza en el cromosoma cinco de *Arabidopsis* y mediante paseo cromosómico el gen ha sido identificado y clonado. Este gen codifica para un receptor-quinasa, por lo que representa un candidato directo para ser el receptor de la flagelina en *Arabidopsis*.

MODELO DE EXPRESION DE UN GEN DE FRESA (*Fragaria x anannassa* cv Chandler) QUE CODIFICA UNA PIRUVATO DESCARBOXILASA ESPECIFICA DE FRUTO

Moyano, E., López-Raéz, J.A., Caballero, J.L., y Muñoz Blanco, J.
Dpto de Bioquímica y Biología Molecular.Fac. de Ciencias.Univ.Córdoba.

La piruvato descarboxilasa cataliza la conversión de piruvato a acetaldehído el cual es posteriormente transformado a etanol por acción de la alcohol deshidrogenasa. En plantas se ha relacionado a la actividad piruvato descarboxilasa con procesos de supervivencia en condiciones de anoxia. En frutos se ha propuesto que esta fermentación etanólica podría estar relacionada con la formación de compuestos volátiles componentes del aroma del fruto (ésteres de etilo). Mediante la técnica de DDRT-PCR se ha aislado un fragmento de ADNc correspondiente a un gen que codifica una piruvato descarboxilasa. Se ha estudiado el modelo de expresión espacio-temporal del mismo obteniéndose los siguientes resultados: 1) La expresión del gen es específica de fruto; 2) Se detecta transcritos en todos los estadios de elongación y maduración del fruto, aunque la expresión del gen se dispara en los estadios de maduración del mismo; 3) La expresión del gen se induce por la retirada de los aquenios de frutos inmaduros; 4) El almacenamiento de frutos en atmósfera de CO₂ motivo un aumento de los niveles de transcritos en los mismos. También se ha procedido a clonar y caracterizar estructuralmente el gen que codifica la piruvato descarboxilasa específica de fruto. Los resultados sugieren que esta enzima está relacionada con mecanismos bioquímicos envueltos en la producción de aromas que se producen durante la maduración del fruto de fresa.

CARACTERIZACIÓN DE 'PINALATE', UN MUTANTE DE NARANJA CON FRUTOS DE COLORACIÓN ALTERADA. AISLAMIENTO DE cDNAs Y EXPRESIÓN DE GENES DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN CÍTRICOS

Marcos, J.F., Alférez, F., Mallent, D., Lafuente, T., y Zacarías, L.
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia.

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides con importantes funciones en las plantas, entre las que se encuentran la coloración de flores y frutos. Este trabajo se enmarca en la caracterización genético-molecular de la ruta de biosíntesis de carotenoides y de su regulación en frutos cítricos. Se ha caracterizado un nuevo mutante de naranja denominado 'Pinalate', surgido espontáneamente de la variedad comercial 'Navelate', y que presenta frutos de coloración amarilla y desverdización lenta. La comparación del contenido en carotenoides del flavedo del fruto durante la maduración demostró que en 'Pinalate' se acumulan altas concentraciones de los carotenos iniciales de la ruta de biosíntesis, fitoeno (46,2% del total de carotenoides), fitoflueno (16,2%) y ζ -caroteno (25%), que no se detectan en la variedad parental. Paralelamente, 'Pinalate' tiene una marcada reducción en la fracción de carotenoides correspondiente a xantofilas (10-15% frente a 85%). Una característica adicional relevante de estos frutos es su bajo contenido en ácido abscísico. Estos datos sugirieron que 'Pinalate' tiene afectada la actividad ζ -caroteno desaturasa (ZDS). Se han aislado y caracterizado las secuencias de cDNA correspondientes a los genes fitoeno desaturasa (*pds*) y ζ -caroteno desaturasa (*zds*) de cítricos. Las proteínas codificadas presentan una identidad de secuencia muy alta con las encontradas en otros vegetales (en torno al 80%). El estudio de expresión génica durante la maduración demostró que los mRNAs correspondientes tienen una acumulación máxima en el momento de cambio de color del fruto y que dicha acumulación es al menos diez veces superior en *zds* que en *pds*. Los frutos del mutante no presentan una acumulación alterada en ninguno de estos dos mRNAs con respecto a 'Navelate'. Se discutirán las posibles alternativas que expliquen el anormal contenido en carotenoides de 'Pinalate'.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PEPC DE SEMILLAS DE *AMARANTHUS EDULIS* SILVESTRE Y DEL MUTANTE LaC₄ 2.16

Alvarez, R., García-Mauriño, S., Vidal, J.*, y Echevarría, C.

Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes nº6, 41012 Sevilla, e-mail rosario@cica.es; fax 4615780

*Intitut de Biotechnologie des Plantes, Université Paris-sud, Centre d'Orsay, Francia.

En este trabajo hemos estudiado la PEPC de las semillas producidas por *Amaranthus edulis* del tipo silvestre y del tipo mutante LaC₄ 2.16. Las plantas mutantes son deficientes en la PEPC C₄ fotosintética (1). Las semillas del mutante LaC₄ 2.16 nos fueron cedidas por el Prof. P.J. Lea de la Universidad de Lancaster, UK.

Los resultados obtenidos muestran que tanto la PEPC de las semillas de *Amaranthus edulis*, del tipo silvestre como las del mutante LaC₄ 2.16, está compuesta por dos polipéptidos, de 100 y de 105 kDa respectivamente (2,3).

La utilización de anticuerpos específicos anti-N y C-terminal de la PEPC de hojas de sorgo, mostraron que ambos polipéptidos están completos y no son productos de degradación. En ambos tipos de semillas se observó un aumento de la actividad PEPC de 2-3 veces durante la germinación, manteniéndose constante la cantidad de proteína total. El uso de anticuerpos anti-sitio de fosforilación (APS-IgGs) en ensayos de fosforilación *in vitro* con [³²P] ATP, identificaron en ambos tipos de semillas, una PEPC-quinasa dependiente de Ca²⁺ que fosforila la Ser fisiológica (4).

Sin embargo, las semillas producidas por el mutante pesan menos, tienen menos cantidad de proteína soluble, y sólo germinan un 2% frente a un 90% de germinación de las semillas producidas por la planta silvestre.

REFERENCIAS

- (1) Lea PJ, Dever L, Hausler RE, Lacuesta M, Onek L, Leegood RC (1994). *Plant Sci* 12-14.
- (2) Osuna L, González MC, Cejudo FJ, Vidal J, Echevarría C (1996). *Plant Physiol* 111: 551-558.
- (3) Osuna L, Pierre JN, González MC, Alvarez R, Cejudo FJ, Echevarría C, Vidal J (1999). *Plant Physiol* 119: 511-520.
- (4) Chollet R, Vidal J, O'Leary MH (1996). *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 47: 273-298.

LOCALIZACION DE ENZIMAS BIOSINTETICAS DE POLIAMINAS EN TABACO

Bortolotti, C., Cordeiro, A., Alcazar, R., Borrell, A., Tiburcio, A.F., y Altabella, T.

Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 643. 08028-Barcelona.

La falta de datos sobre la localización subcelular de las poliaminas (PAs) y las enzimas implicadas en su metabolismo, sigue siendo uno de los obstáculos para entender las funciones que desempeñan las PAs en las plantas. Utilizando técnicas de fraccionamiento celular y medida de actividad enzimática, o métodos autorradiográficos, basados en la unión entre la enzima e inhibidores específicos marcados radioactivamente, se ha localizado la actividad de algunas enzimas de la biosíntesis de PAs en diferentes compartimentos celulares. Sin embargo, debido a las limitaciones de las técnicas utilizadas, los datos obtenidos deben interpretarse con cierta cautela. Una información más clara y fiable podría obtenerse utilizando métodos inmunológicos. Actualmente, se han clonado la mayoría de los genes que codifican enzimas biosintéticas de PAs, por lo que es posible obtener anticuerpos específicos frente a estas enzimas y utilizarlos en estudios de localización. En nuestro trabajo, hemos sobreexpresado los cDNAs de ADC (arginina descarboxilasa) y SPDsyn (espermidina sintasa) de tabaco en bacterias, y las proteínas producidas, una vez purificadas, se han utilizado para obtener los correspondientes anticuerpos. Tras comprobar su especificidad, los Ac se utilizan para localizar las enzimas a nivel tisular y subcelular, mediante técnicas de fraccionamiento celular e inmunocitoquímicas. La información obtenida en estos estudios puede ser de utilidad para comprender las funciones fisiológicas de las PAs en las plantas y para explicar los fenotipos observados en plantas transgénicas y mutantes, utilizadas en diversos estudios sobre funciones y mecanismos de acción de las PAs.

UNA NUEVA ISOFORMA DE LA Cu/Zn SUPEROXIDO DISMUTASA CLOROPLASTICA EN EL ECOTIPO Cvi DE *Arabidopsis thaliana*

Abarca, D., Roldán, M., Sabater, B., y Martín, M.

Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá, 28871 Madrid.

Las superóxido dismutasas (SODs) son enzimas que catalizan la dismutación de radical superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Esta reacción es la primera defensa celular frente a la acumulación de especies activas de oxígeno (EAOs). En plantas, la principal fuente de EAOs es el cloroplasto, donde la producción de radical superóxido está asociada a la actividad de la cadena de transporte electrónico fotosintético. En el presente trabajo se ha realizado un estudio comparativo del patrón isoenzimático de SOD en los ecotipos Ler y Cvi de *Arabidopsis thaliana*. Ensayos de actividad en gel han permitido identificar una Cu/Zn-SOD cloroplástica característica de Cvi. Con objeto de determinar si se trata de un nuevo isoenzima, se ha analizado el patrón de SODs en híbridos resultantes de cruzamientos entre Ler y Cvi, así como en plantas individuales de la generación F2. Estos ensayos han puesto de manifiesto que la actividad detectada corresponde a una isoforma de la Cu/Zn-SOD cloroplástica de *A.thaliana* que es específica del ecotipo Cvi. Para estudiar las diferencias entre las isoformas detectadas en Ler y Cvi, se ha determinado la secuencia nucleotídica del gen correspondiente en ambos ecotipos (Abarca et al., PGR99-089, Plant Physiol. 120: 933, 1999). Se ha comprobado así que las secuencias de las dos proteínas difieren en cuatro aminoácidos, de los que sólo dos se encuentran en la forma madura de la proteína. Las dos posiciones afectadas no corresponden a residuos conservados, pero mapean en regiones importantes para la actividad del enzima (Rosen et al., Nature 362: 59-62, 1993).

REGULACION ESPACIAL Y TEMPORAL DE TRES GENES DIFERENTES DE LA OLEATO DESATURASA MICROSOMAL (*FAD2*) DE GIRASOL NORMAL Y ALTO OLEICO

Martínez-Rivas, J.M.*, y Heinz, E.

Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg, Ohnhorststr. 18, 22609-Hamburg (Alemania).

El ácido linoleico es el ácido graso mayoritario (30-65%) en la semilla de la variedad normal de girasol (*Helianthus annuus* L.), mientras que en el mutante alto oleico predomina el ácido oleico (80-90%). El carácter alto oleico sólo se manifiesta en la semilla en desarrollo y se debe a una mutación dominante que afecta a la oleato desaturasa microsomal (*FAD2*), enzima responsable de la desaturación del ácido oleico a linoleico. Hemos estudiado a nivel molecular la regulación de la expresión de dicha enzima en ambas variedades de girasol. Se han obtenido mediante técnicas de PCR tres clones completos de cDNA diferentes, a partir de cDNA transcrito de mRNA aislado de semillas de girasol de la variedad normal. Las secuencias de dichos clones (*FAD2-1*, *FAD2-2* y *FAD2-3*) presentaban una alta homología entre ellas, y comparadas con la de otros genes *FAD2* de plantas. Se ha realizado análisis de Northern para medir los niveles de transcrito de los tres genes, utilizando sondas específicas correspondientes a cada uno de ellos. En la variedad normal, el gen *FAD2-1* se expresaba fuerte y exclusivamente en semillas, mostrando un máximo a los 25 días después de floración, mientras que los genes *FAD2-2* y *FAD2-3* se expresaban débil y uniformemente en todos los tejidos estudiados. Sin embargo, la expresión del gen *FAD2-1* en semillas del mutante alto oleico estaba drásticamente reducida. El análisis de Southern genómico confirmó que se trataba de genes no alélicos y reveló que el genoma de girasol sólo contiene una copia de cada uno de ellos, excepto en el caso del gen *FAD2-1* que se encuentra duplicado en el mutante alto oleico. Por último, la expresión funcional en *S. cerevisiae* de los cDNAs descritos confirmó que todos ellos codificaban para la oleato desaturasa microsomal.

*Dirección actual: Instituto de la Grasa, CSIC, Av. Padre García Tejero 4, 41012-Sevilla.

CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA 3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL-CoA SINTASA DE *Arabidopsis thaliana*

Diez, E., y Boronat, A.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona.

El 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) es un importante intermediario de la vía de síntesis de isoprenoides ya que actúa como precursor del mevalonato en la reacción catalizada por la enzima HMG-CoA reductasa. Dicho compuesto es sintetizado mediante la acción de la enzima HMG-CoA sintasa (HMGS). Recientemente se clonó un cDNA de *A.thaliana* que codifica por una proteína de 461 aminoácidos que presenta una alta similitud con las sintasas de mamífero (41-43%). La actividad de la enzima fue comprobada mediante complementación de mutantes de levadura auxotróficos para esteroides y medición de la actividad de la enzima sobreexpresada. A partir de este cDNA y con el objetivo de caracterizar la HMGS de *Arabidopsis* hemos aislado y secuenciado un clon genómico de *A.thaliana* que contiene dicho gen (*HMS1*). Los análisis mediante Southern y Northern blot han revelado la presencia de un solo gen, que se expresa mayoritariamente en tejidos no fotosintéticos. El estudio del patrón de expresión espacial y temporal del gen *HMS1* realizado mediante experimentos de tinción histoquímica en plantas transgénicas *HMS1::GUS* revela que el gen se expresa ya en los primeros estadios de desarrollo de la plántula, principalmente en la zona de separación tallo-raíz. En la planta adulta se detectan altos niveles de expresión en las flores, especialmente en las anteras y el estigma.

PROPIEDADES DE LA DESOXIXILULOSA-5-FOSFATO REDUCTOISOMERASA, EL ENZIMA QUE CATALIZA LA PRIMERA ETAPA ESPECÍFICA DE LA VÍA DE SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN CLOROPLASTOS

Besumbes, O., Querol, J., Boronat, A., e Imperial, S.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Química. Universidad de Barcelona. Martí Franquès,1. 08028-Barcelona. email: imperial@sun.bq.ub.es

El isopentenil difosfato (IPP) es el precursor universal de los compuestos isoprenoides. En las células vegetales se han descrito dos rutas biosintéticas para la formación de este precursor que presentan diferente localización subcelular. En el citoplasma el acetil-CoA es transformado por la vía del mevalonato en IPP que dará lugar a isoprenoides citoplasmáticos como los esteroides y los poliprenoides. En los plastos, isoprenoides como el beta caroteno, el isopreno o la cadena de fitilo de la clorofila derivan de IPP que se sintetiza por una vía independiente de mevalonato denominada, vía de Rohmer. De esta vía, descrita recientemente, únicamente se conocen las dos primeras reacciones: en la primera de ellas se forma 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) a partir de D-gliceraldehído-3-fosfato y piruvato; en la segunda, mediante la reducción y reordenación del esqueleto carbonado de la DXP se forma 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). La formación de MEP, catalizada por la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR), es la primera etapa específica para la síntesis de IPP. La vía de Rohmer tiene un gran interés biotecnológico para el diseño de herbicidas y antibióticos ya que su presencia está restringida a eubacterias, algas y plantas. En esta comunicación se resume la información disponible actualmente sobre las propiedades estructurales y funcionales de la DXR de plantas y se compara con la obtenida para el enzima de microorganismos, en especial de E. coli.

ANÁLISIS MEDIANTE LA TÉCNICA DEL DOBLE-HÍBRIDO DE INTERACCIONES ENTRE LAS ENZIMAS QUE CATALIZAN LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA VÍA DE BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Leivar, P., González, V., Ahumada, I., Diez, E., Campos, N., y Boronat, A.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, 08028-Barcelona.

Las plantas sintetizan una gran variedad de compuestos isoprenoides que presentan una elevada diversidad de estructuras y funciones. Aún así, todos los compuestos isoprenoides derivan de una sola molécula precursora: el isopentenil pirofosfato (IPP). La organización y regulación de la vía de biosíntesis de isoprenoides es compleja y todavía no está bien caracterizada. Uno de los aspectos más intrigantes que ha surgido de la caracterización de la vía a nivel molecular, ha sido la presencia de familias multigénicas en muchos de los genes que codifican para las enzimas de la vía. En base a la observación de que ciertas isoformas participan en la biosíntesis exclusiva de determinados grupos de isoprenoides, se ha propuesto un modelo de organización de la vía en canales metabólicos o metabolones. A pesar de ser un modelo muy atractivo, todavía se carece de evidencias experimentales directas. También se ha propuesto que los metabolones se formarían en torno a la HMG-CoA reductasa, enzima considerada como la etapa limitante de flujo en la biosíntesis de isoprenoides tales como los esteroides. Con el objetivo de investigar las posibles interacciones moleculares entre las enzimas que catalizan las primeras etapas de la vía del mevalonato en *Arabidopsis thaliana*, se ha realizado un estudio de las mismas mediante la técnica del doble-híbrido en levadura.

CLONACION Y EXPRESION DE ENZIMAS DE *Digitalis purpurea*: HOMOLOGIA CON ALDOSA REDUCTASAS

Gavidia, I.^{1,2}, Pérez-Bermúdez, P.² y Seitz, H.U.¹

¹ZMBP, Univ. Tuebingen, Auf der Morgenstelle 1, 72076 Tuebingen, Alemania.

²Biología Vegetal, Univ. Valencia, Av. V. A. Estellés s/n, 46100 Burjasot.

Los cardenólidos son esteroides vegetales, con una genina C₂₃ y una cadena de azúcares de longitud variable, utilizados en el tratamiento de insuficiencias cardíacas. La fuente principal de cardenólidos son las hojas de diferentes especies del género *Digitalis*. La ruta biosintética propuesta incluye colesterol, pregnenolona, progesterona y distintos pregnanos, y conduce a la formación de digitoxigenina como precursor de los diferentes cardenólidos. Característica fundamental de todos ellos es su configuración 5 β , estereoisomería que surge en la reducción de progesterona a 5 β -pregnano-3,20-diona. En este estudio se ha construido una librería de cDNA de *D. purpurea* que ha sido rastreada empleando como sonda un clon de 5 β -reductasa de origen animal. Se han aislado dos cDNA, denominados AR62 y AR34, de 948 bp que codifican péptidos de 315 aminoácidos con un 98.4% de identidad entre sí. Las secuencias peptídicas deducidas muestran una elevada homología estructural con enzimas de la familia de las aldo-ceto reductasas, las cuales están involucradas no sólo en la regulación osmótica sino también en el metabolismo esteroideo en mamíferos. Así, se ha propuesto que algunos enzimas considerados dehidrogenasas esteroideas específicas son aldo-ceto reductasas con actividad sobre un amplio grupo de sustratos. Los cDNAs de AR62 y AR34 se expresaron en *E. coli* y se determinó la actividad enzimática de las proteínas purificadas sobre diferentes sustratos. Estos enzimas usan NADH como cofactor y aceptan no sólo los sustratos típicos de las aldosa reductasas sino también varios esteroides con diferente especificidad. Esta es la primera referencia sobre enzimas vegetales de la familia aldo-ceto reductasa con actividad sobre esteroides.

PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-HYDROXY KINASE IN THE LEGUME-*Rhizobium* INTERFACE

Hernández, L.E.¹, Escobar, C.¹, Drøbak B.K.², Bisseling, T.³, Brewin, N.J.²

¹Unidad de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid;

²The John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney Lane, NORWICH NR4 7UH, Reino Unido.

³Wageningen Agricultural University, Dreijenlaan H-6073 Wageningen, Paises Bajos. e-mail: luise.hernandez@uam.es

Relatively recently, a novel family of phosphoinositides has been characterized in several eukaryotes. These lipids all possess a phosphomonoester group in the D-3 position of the inositol ring (1). It has been proposed that these lipids may act as intracellular mediators in signalling events and substantial evidence suggest that they are involved in processes such as the control of cell mobility, signalling via the Ras pathway, apoptosis, vesicle trafficking and secretion (2). Several enzymes responsible for 3-phosphorylation of phosphoinositides have been identified; the first phosphoinositide 3-kinase to be purified and characterized was the mammalian p85-p110 dimeric enzyme which associates with activated tyrosine kinase receptors (3). The yeast protein, Vps34p has been identified as another phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. In contrast to the mammalian p85-p110 enzyme, Vps34p only phosphorylates PtdIns in the D-3 position but it is incapable of D-3 phosphorylating PtdIns(4)*P* and PtdIns(4,5)*P*₂ (4). Recent evidence indicate that PtdIns(3)*P* binds to several classes of proteins containing a Zn²⁺-type finger, known a FYVE finger domain. Mutations in this proteins, such as in the yeast VPS21, reveals a vesicle missorting phenotype highlighting the key role of PtdIns(3)*P* in vesicle trafficking (5).

It is now clear that several classes of PtdIns 3-kinases are present in a wide variety of eukaryotic organisms. However, in lower eukaryotes such as the slime mould, *Dictyostelium discoideum* (6), the alga *Chlamydomonas reinhardtii* (7) and plants (*Daucus carota*, 8) only Vps34p-related PtdIns 3-kinases have so far been identified. Two cDNAs with high homology to VPS34 have been cloned from the plants *Arabidopsis thaliana* (*AtVPS34*, 9) and *Glycine max* (*pSPI3K*, 10). These cDNA sequences have significant homology to the cDNAs encoding for both bovine PtdIns 3-kinase and yeast PtdIns 4-kinase. The importance of PtdIns 3-kinase activity for normal cell development in plants has been demonstrated using transgenic *A. thaliana* plants expressing antisense *AtVPS34*. The growth of *AtVPS34* antisense transgenic plants was found to be severely impaired (9). Furthermore, in young soybean nodules at a developmental stage characterised by high rate of cell proliferation, it was observed an accumulation of transcripts of the *pSPI3K-1* gene encoding a PtdIns 3-kinase (10). In this stage of the symbiotic process, there is particular need for a high level of vesicle production and membrane biogenesis (11).

An Expressed Sequence Tag (EST) cDNA library of *Medicago truncatula* root hairs treated with Nod factor is available (prepared by Prof. S.R. Long and co-workers, Stanford, USA; <http://bio-srl8.stanford.edu>). From this database, we have identified and sequenced one EST (accession number: 00356) with a high

homology (90%) to the protein product encoded by the *pSPI3K-1* gene which is overexpressed in young soybean nodules (10). By using a specific PCR-probe amplified from the less conserved region at the 3'-end, we determined in a southern blot analysis that at least two homolog genes might be also present in *Medicago truncatula*. To study the role of PtdIns 3-kinase during the establishment of the *Rhizobium*-legume symbiosis we have analysed the expression of the gene encoding for this putative PtdIns 3-kinase by northern blot. Using the same 3'-end specific probe we observed higher levels of transcripts accumulation in stems and nodules of four week old *Medicago truncatula* plants infected with *Rhizobium meliloti*).

Acknowledgements. L.E.H. and N.J.B. gratefully acknowledge financial support from the EU HCM Programme: Signals in Symbiosis (CHRX-CR94-0699). Work in the B.K.D. laboratory was supported by the B.B.S.R.C. Intracellular Signalling Initiative. We are grateful to Prof. S.K. Long (Stanford, USA) for the donation of the 00356 EST clone.

REFERENCES

1. Kapeller, R., & Cantley, L.C. (1994) *BioEssays* **16**, 565-576.
2. Carpenter, C.L., & Cantley, L.C. (1996) *Current Opinion Cell Biol.* **8**, 153-158.
3. Carpenter, C.L., Duckworth, B.C., Auger, K.R., Cohen, B., Schaffhausen, B.S., & Cantley, L.C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19704-19708.
4. Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., & Emr, S.D. (1993) *Science* **260**, 88-91.
5. Kutateladze, T.G., Ogburn, K.D., Watson, W.T., de Beer, T., Emr, S.D., Burd, C.G. & Overduin, M..(1999) *Mol. Cell* **3**, 805-811.
6. Zhou, K., Takegawa, K., Emr, S.D., & Firtel, R.A. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5645-5656.
7. Munnik, T., Irvine, R.F., & Musgrave, A. (1994) *Biochem. J.* **298**, 269-286.
8. Dove, S.K., Lloyd, C.W., & Drøbak, B.K. (1994) *Biochemical J.* **303**, 347-350.
9. Welters, P., Takegawa, K., Emr, S.D., & Chrispeels, M.J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11398-11402.
10. Hong, Z., & Verma, D.P.S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **91**, 9617-9621.
11. Brewin, N.J. (1991) *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**, 191-226.

CLONAJE DE SUSTRATOS PROTEICOS DE P69A, UNA PROTEASA DEL TIPO SUBTILISINA DE PLANTAS DE TOMATE

Jordá, L., Sotolongo, M., Conejero, V., y Vera, P.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (I.B.M.C.P). Universidad Politécnica de Valencia-C.S.I.C. 46022-Valencia, Spain.

Las proteasas del tipo subtilisina forman un grupo de enzimas altamente conservadas evolutivamente. Recientemente se han descrito muchas proteasas pertenecientes a este grupo en plantas, pero muy poco se conoce acerca de su función biológica. En plantas de tomate este tipo de proteasas, que se encuentran representadas por la familia llamada P69, se localizan en la matriz extracelular (ECM), donde presumiblemente realizan su función. Para poder averiguar cual es dicha función, es indispensable identificar y caracterizar los sustratos reconocidos y procesados por este tipo de proteasas. En esta presentación describimos una aproximación funcional para aislar directamente proteínas reconocidas por las proteasas P69. El método consiste en la identificación de clones individuales de cDNA que codifican proteínas que tras transcripción y traducción *in vitro*, son procesadas específicamente por uno de los miembros del clan de las proteasas P69. Se presentará por tanto la caracterización preliminar de algunos de estos sustratos proteicos.

PRENILACIÓN Y REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA CALMODULINA DE PETUNIA CaM53

Rodríguez-Concepción, M.^{1,2}, y Gruissem, W.¹

¹Department of Plant and Microbial Biology, 211 Koshland Hall, University of California at Berkeley, USA.

²Dirección actual: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Martí i Franqués 1, 08028 Barcelona.

La prenilación o modificación post-traducciona l de proteínas con grupos prenil procedentes de la ruta de isoprenoides es un mecanismo mediante el cual algunas proteínas reguladoras del crecimiento y el desarrollo consiguen interactuar con membranas celulares y con otras proteínas. Una de estas proteínas recientemente identificadas en plantas es CaM53, una calmodulina de petunia con una extensión C-terminal formada por un dominio básico rico en arginina y lisina y un motivo conservado de prenilación. Esta región adicional al dominio de unión de calcio contiene información para su localización subcelular. Cuando la proteína es prenilada se transporta hasta la membrana plasmática. Sin embargo en ausencia de prenilación CaM53 se acumula en el núcleo. La localización diferencial de CaM53 tiene importantes consecuencias fisiológicas. Así, el fenotipo de plantas que sobre-expresan CaM53 difiere del de las plantas que expresan una versión mutada de la proteína que no puede ser prenilada. Las calmodulinas transducen las señales de calcio mediante la interacción con otras proteínas y la consiguiente activación de cascadas moleculares, por lo que la acumulación de CaM53 en la membrana plasmática o en el núcleo puede resultar en la activación de dianas y cascadas de transducción de señal diferentes. El estado de prenilación de CaM53 y por tanto su localización subcelular puede modularse bien alterando específicamente la ruta de isoprenoides o bien modificando los niveles de asimilados en las células. Estos resultados sugieren que la prenilación de CaM53 es un mecanismo mediante el cual la célula vegetal integra la información procedente del estado metabólico y de los estímulos transducidos a través de calcio.

CLONACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA COPALILDIFOSFATO SINTASAS DEL HÍBRIDO CITRANGE CARRIZO. ANÁLISIS DE LOS PARENTALES

Alapont, C.P.^{1,2}, Vidal, A.M.^{1,2}, Talón, M.¹ y García-Martínez, J.L.²

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Montcada, Valencia.

²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Univ. Politécnica de Valencia, Valencia.

La biosíntesis de giberelinas (GAs) está catalizada por tres tipos de enzimas: a) ciclasas (copalildifosfato sintasa (CDS) y *ent*-kaureno sintasa), que intervienen en la síntesis de *ent*-kaureno; b) citocromos P450, que dan lugar a GA₁₂ a partir de *ent*-kaureno; y c) dioxigenasas, que catalizan la síntesis de las diversas GAs a partir de GA₁₂. Se cree que CDS un enzima clave en la regulación de la ruta de biosíntesis de GAs. Citrange Carrizo es un híbrido de *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* ampliamente utilizado como portainjertos de cítricos. Se han aislado en citrange Carrizo dos clones de PCR cuya secuencia sugiere que corresponden a genes que codifican para CDSs (*CcCDS1* y *CcCDS2*). Con la técnica RACE se ha aislado un clon completo de cDNA (gen *CcCDS1*), que codifica para una proteína de unos 866 aminoácidos, que se está caracterizando mediante la actividad enzimática de los productos de expresión en *E. coli*. Dada la poca abundancia de transcritos de las CDSs se está utilizando la técnica QRT-PCR para cuantificar los niveles de dichos transcritos en tejidos de citrange Carrizo, y para conocer el efecto de la aplicación de GAs e inhibidores de la síntesis de GAs sobre los niveles de expresión de *CcCDS1*. Para conocer qué parental ha aportado el gen *CcCDS1* al híbrido se ha amplificado cDNA de *C. sinensis* y *P. trifoliata* con oligonucleótidos específicos de *CcCDS1*. Estos oligonucleótidos amplificaron ambos cDNAs, y su secuenciación permitirá conocer cuál es el parental de *CcCDS1*, y clonar un nuevo gen que codifique para una CDS procedente del otro parental. Esta técnica ha permitido conocer también que el clon que codifica para una GA 20-oxidasa aislado previamente de citrange Carrizo (*Cc20ox1*) procede de *Poncirus trifoliata*.

S-ADENILMETIONINA DESCARBOXILASA DE GUISANTE: UN GEN IMPLICADO EN PROCESOS DE DESARROLLO Y RESPUESTA A ESTRES AMBIENTAL

Carrasco, P., y Marco, F.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València. Dr. Moliner 50, Burjassot, E-46100, València.

Un cDNA que codifica para la S-adenosil-L-metionina descarboxilasa (SAMdC, EC 4.1.1.50) ha sido aislado a partir de una genoteca de expresión obtenida de callos de guisante. Este cDNA es capaz de complementar el mutante de levadura Y342, deficiente en SAMdC. La presencia de una única copia del gen de la SAMdC se determinó por análisis Southern. La expresión de la SAMdC en plantas de guisante resultó ser diferente en tejidos vegetativos y reproductivos. Sin embargo, los niveles más altos del mRNA de la SAMdC se encontraron en tejidos indiferenciados o con tasas de división celular altas. Los niveles de expresión de la SAMdC aumentaron también durante la senescencia de ovarios de guisante. Así mismo, el análisis Northern mostró un incremento de la transcripción del gen de la SAMdC durante la fructificación. Una inducción de los niveles de mRNA se detectó al inicio del desarrollo del fruto. En ovarios senescentes, la expresión de la SAMdC también aumentó, probablemente asociado al incremento en los niveles de espermina detectados durante la senescencia del ovario. El tratamiento de los ovarios con AVG, produjo un retraso de la senescencia de ovario e inhibió la acumulación del mRNA de la SAMdC. Por último, los niveles de transcritos de la SAMdC aumentaron como consecuencia del tratamiento con ozono. El efecto del ozono fue específico para el gen de la SAMdC, no afectando a otros transcritos implicados en la biosíntesis de poliaminas.

HOMOLOGOS DE FACTORES DE LA HOMEOTASIS DEL COBRE EN *Arabidopsis thaliana*

Mira, H.¹, Sancenón, V.¹, Martínez-García, F.², y Peñarrubia, L.¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.

²Departament de Fisiología Animal. Universitat de València. Spain.

La homeostasis del cobre está ligada a la ruta de transducción del etileno, al ser necesaria la presencia del metal para la percepción de la hormona. En plantas, como en otros organismos, la red homeostática del cobre parece estar conservada con la descrita en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En nuestro laboratorio, estamos estudiando dos de los componentes de dicha red. COPT1 es un transportador de la membrana plasmática y CCH es una metalocarabina citosólica de cobre que, siguiendo el modelo de la levadura, se encargaría de llevar el cobre al transportador de la membrana en un compartimento de la ruta de secreción, donde se incorporaría a las proteínas que lo requieran.

Se ha aislado COPT1 a partir de una genoteca de cDNA de *Arabidopsis* por complementación funcional de mutantes de levadura deficientes en los correspondientes transportadores de alta afinidad de cobre de la membrana plasmática (ctr1 y ctr3). La expresión de COPT1 está regulada por cobre en hojas, mientras que en raíces la expresión es muy baja y no se observa regulación por dicho metal. Además, se ha obtenido un fragmento genómico que contiene a COPT1 y que presenta, tanto en la región 5' como en la 3', varias secuencias similares a las responsables de la regulación por cobre (CuREs) descritas en levadura y que son dianas del factor de transcripción MAC1 en dicho organismo.

Por otra parte, CCH posee una extensión en el extremo carboxilo de aproximadamente 50 aminoácidos que está ausente en el resto de los homólogos descritos. No se ha encontrado similitud entre dicha extensión y ninguna otra secuencia descrita en los bancos de datos. Se ha demostrado que los homólogos de soja y arroz presentan también extensiones C-terminales con un tamaño similar, aunque sin homología a nivel de secuencia. No obstante todas las extensiones descritas en plantas superiores podrían originar estructuras secundarias similares. En cuanto a la función de esta extensión, se ha demostrado que su presencia no es necesaria en levadura para llevar a cabo la complementación funcional del correspondiente mutante. Tras la expresión en *Escherichia coli* y la obtención de anticuerpos, se ha procedido a la inmunolocalización de la proteína en diferentes tejidos y fases del desarrollo. El drástico aumento de la proteína durante la senescencia y su localización en los tubos cribosos del floema indica una nueva función de este tipo de carabinas en plantas. Nuestros resultados sugieren que CCH podría estar implicada en el transporte intercelular de cobre, probablemente contribuyendo a la redistribución de este elemento en las fases reproductivas, reciclandolo desde los órganos senescentes a los de alta demanda de nutrientes, como flores y frutos.

TRANSFORMACION DE TOMATES CON UN GEN QUE AUMENTA LOS NIVELES DE ACIDO INDOL-3-ACÉTICO, BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR DE LA POLIGALACTURONASA

Rambla, J.L., y Chamarro, J.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, Valencia, Spain.

El gen *iaaM* de *Agrobacterium tumefaciens* codifica un enzima que cataliza la síntesis de indolacetamida a partir de triptófano, que, a su vez se convierte en ácido indol-3-acético por acción de las hidrolasas endógenas del tomate. La transformación del tomate con dicho gen bajo el control del promotor de la poligalacturonasa del fruto. Este promotor tiene la peculiaridad de estimular la expresión del gen al iniciarse la maduración y la producción autocatalítica de etileno. El IAA es un inhibidor de la maduración de los frutos y, al mismo tiempo estimula la producción de etileno que a su vez estimula la maduración. Para estudiar este efecto aparentemente contradictorio hemos transformado tomates de la variedad *Ailsa Craig* con *Agrobacterium* mediante un sistema de vectores binarios. Se obtuvieron al menos 36 plantas que se desarrollaron en medio selectivo. Las plantas de la generación Ro presentaban en general, dominancia apical epinastia, aborto de numerosos ramilletes florales y senescencia precoz de las hojas basales que, en algunos casos se extendía rápidamente a las hojas adultas superiores. La inserción del gen en las plantas transformadas se comprobó mediante análisis Southern. El análisis mediante citometría de flujo puso de manifiesto un 2% de plantas tetraploides mientras el resto eran diploides. Se analizó el comportamiento de la R1 de cuatro líneas que presentaban fenotipos de interés. En esta serie se atenuó el problema de marchitamiento de las hojas y aborto floral. El análisis Northern puso de manifiesto la expresión del gen y su especificidad. Los análisis de los niveles de ácido indolacético libre y conjugado por espectrometría de masas se encuentran en periodo de ejecución.

CARACTERISTICAS DE EXPRESION ESPACIAL DEL PROMOTOR DE LA ASPARRAGINASA-1 DE *Arabidopsis thaliana*

Casado Díaz, A., Botella, M.A., y Muñoz Blanco, J.

Dpto de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. de Ciencias. Universidad de Córdoba. Avda de San Alberto Magno s/n. 14071 CORDOBA.

La asparraginasasa (Asnasa) es una enzima clave en el metabolismo nitrogenado de plantas superiores. La asparragina conjuntamente con la glutamina, juega un papel importante en las plantas como molécula transportadora de nitrógeno desde las zonas de asimilación hacia las de consumo. En estas, la Asnasa hidroliza la asparragina a aspartato y amonio, este último es asimilado por el ciclo GS-GOGAT, incorporándose al metabolismo de la planta. Nosotros hemos clonado y caracterizado un gen correspondiente a una Asnasa de *Arabidopsis thaliana*. Con el objetivo de conocer la regulación espacial de su promotor hemos procedido a transformar plantas de *A. thaliana* con una construcción quimérica constituida por 1600 pb del promotor fusionado a un gen indicador (GUS). El análisis de las plantas transgénicas indica una fuerte activación del promotor en cotiledones e hipocótilo de plantas de tres días, no detectándose expresión del gen indicador en raíz. Con el crecimiento de la planta la expresión del gen indicador se fué restringiendo a las zonas meristemáticas de la planta, hojas en desarrollo y las estípulas. En plantas adultas, la actividad GUS se detectó en tejidos en desarrollo de tallos, flores (principalmente anteras), frutos y semillas. Se han obtenido anticuerpos policlonales contra la Asnasa-1. Utilizando estos anticuerpos se ha procedido a inmunolocalizar la proteína, encontrándose que la proteína está localizada en tejido vascular. Estos resultados parecen indicar que la función fisiológica de la asparraginasasa-1 está relacionada con el aporte de nitrógeno a tejidos en desarrollo.

RESPUESTA DE *ARABIDOPSIS THALIANA* AL ANTISENSE DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA CLOROPLASTÍDICA DE GUISANTE

Sahrawy, M.¹, Avila, C.², Chueca, C.¹, Ortega, C.², Cánovas, F.² y López Gorgé, J.¹

1) Departamento de Bioquímica Vegetal, Estación Experimental del Zaidin, CSIC, Profesor Albareda, 1. 18008 Granada.

2) Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga.

Una de las alternativas fundamentales del metabolismo hidrocarbonado en plantas es la síntesis de almidón cloroplastídico a partir del azúcar recién sintetizado, o el paso de éste al citosol para la síntesis de sacarosa, como forma de exportación hidrocarbonada a otras partes de la planta. La dirección preferencial a una u otra vía viene condicionada por las necesidades ambientales (luz, temperatura, etc.) y nutricionales (aporte de otros nutrientes), y está dirigida básicamente por sistemas enzimáticos reguladores situados en nudos claves del metabolismo. Uno de éstos es la FBPasa cloroplastídica, pues el producto de su acción enzimática es el punto de partida de la síntesis de almidón, mientras que los precursores inmediatos de su sustrato constituyen la forma de exportación de azúcares al citosol para la síntesis de sacarosa.

Mediante la técnica de mRNA antisense frente a la FBPasa cloroplastídica de guisante y via *Agrobacterium* se han preparado plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Por selección con kanamicina se han obtenido once transformantes diferentes. Algunos de ellos muestran un fenotipo diferente al de la planta salvaje. Aunque todos tienen el cDNA de la FBPasa cloroplastídica de guisante no presentan la misma actividad enzimática FBPasa. Actualmente se están realizando estudios de la capacidad de expresión del mensajero, de la proteína enzimática, y del nivel de actividad de la misma. Igualmente se analizará la glutamina sintetasa y la nitrato reductasa pertenecientes al metabolismo del nitrógeno proceso paralelo al metabolismo del carbono.

Estrés abiótico

IDENTIFICATION OF A SMALL HEAT SHOCK PROTEIN (Cp shsp1) AND ANALYSIS OF THE HEAT SHOCK RESPONSE IN *Craterostigma plantagineum*

Schiliro, E., Bartels, D., and Salamini, F.

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung. Plant Breeding Department Carl-von-Linné Weg 10 D-50829 Köln, Germany.

All organisms possess a set of stress-responsive genes that code for proteins with protective functions against elevated temperatures. A very abundant group of plant heat-induced proteins are the small heat shock proteins (sHSPs), a large family of polypeptides smaller than 30 kDa, expressed during both thermal stress and specific developmental stages in seeds and flowers. All plant sHSP genes are nuclear encoded and are divided in different classes according to their subcellular localization: cytosol, chloroplast or endoplasmic reticulum. Recently a fifth class of mitochondrial-localized proteins has been reported. Previously the expression of small heat shock proteins was observed in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Scrophulariaceae) in response to dehydration. *C. plantagineum* is a resurrection plant able to tolerate severe desiccation. In order to study the role of dehydration-related sHSPs a cDNA clone was isolated from *C. plantagineum* and the deduced amino acid sequence showed high homology to a Pea mitochondrial heat shock 22 kDa protein. It was used to screen a genomic library, in order to identify putative heat shock responsive promoter elements. The organization of the genomic sequence upstream of the start codon shows elements characteristic of many plant HS promoters already studied. 1100 bps of the promoter from this region were used in gel retardation and competition assays to demonstrate the DNA-binding activity of an HS transcription factor gene isolated from *C. plantagineum*. The expression of the Cp shsp transcript was analyzed by Northern blots using RNA from fresh, dehydrated and heat stressed leaves and roots. We observed a strong induction in dehydrated and heat stressed roots, whereas both in fresh and in dehydrated leaves the expression was rather low, increasing just in the heat shocked tissues.

EXPRESION DEL GEN DE LEVADURA TPS1 (TREHALOSA-6-FOSFATO-SINTETASA) EN PLANTAS DE TOMATE

Cortina, C., Romero, C., Espinosa-Ruiz, A., Cutanda, M.C., Hernández-Acosta, P., Bellés, J.M., Culiáñez-Macià, F.A.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (U.P.V-C.S.I.C) Avenida de los Naranjos, s/n 46022 Valencia

El disacárido trehalosa es un azúcar no reductor (1-a-D-glucopiranosil-1-a-D-glucopiranosido) que se encuentra presente en diferentes organismos como algas, bacterias, insectos, invertebrados y levaduras . En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la acumulación de trehalosa se ha relacionado con la termotolerancia (1) y el estrés hídrico (2). La trehalosa no se acumula en la mayoría de especies vegetales superiores, donde la sacarosa podría actuar como análogo funcional, tan sólo en las llamadas plantas de resurrección tolerantes a la desecación, como *Myrothamnus flabellifolius* y *Sporobolus stapfianus*, se han encontrado cantidades apreciables. Sin embargo, el reciente hallazgo en *Arabidopsis thaliana* de los genes homólogos de TPS1 (trehalosa-6-fosfato-sintetasa) y TPS2 (trehalosa-6-fosfato-fosfatasa) de *Saccharomyces cerevisiae* (3,4) ha demostrado la presencia potencial de la ruta de síntesis de trehalosa en plantas vasculares. Trabajos anteriores han mostrado que la introducción en plantas de tabaco de genes implicados en la ruta de biosíntesis de trehalosa en microorganismos, TPS1 de levadura (5,6) y OtsA/OtsB de *E.Coli* (7), mejoran la tolerancia al estrés hídrico. Con el fin de mejorar la tolerancia a estrés hídrico en especies de interés agronómico, plantas de tomate de la variedad comercial UC82B fueron transformadas con el gen de levadura TPS1. Las plantas F0 que expresan el gen TPS1 presentan alteraciones pleiotrópicas similares a las apreciadas en tabaco (5,7). Líneas F2 homocigotas están siendo seleccionadas para estudiar su posible mejora en la tolerancia a la sequía.

Referencias:

(1) De Virgilio et al (1994) *Eur J Biochem* 212, 315-323 (2) McKenzie et al. (1988) *J Gen Microbiol* 134, 1661-1666 (3) Blázquez et al (1998) *The Plant Journal* 13(5), 685-689 (4) Vogel et al (1998) *The Plant Journal* 13, 673-683 (5) Romero et al (1996) *Planta* 201, 293-297 (6) Holmström et al (1996) *Nature* 379, 683-684 (7) Pilon-Smits et al (1998) *Plant Physiol* 107, 125-130

EXPRESIÓN DEL GEN DOGR2 (2-DEOXYGLUCOSA-6-FOSFATO FOSFATASA) DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN EL MUTANTE TPS1 (TREHALOSA-6-FOSFATO SINTETASA) DE LEVADURA Y EN TABACO TRANSGÉNICO : PAPEL DE LOS METABOLITOS EN LA SEÑALIZACIÓN POR GLUCOSA Y TOLERANCIA A LA CARENCIA DE FÓSFORO

Cutanda, M.C., Romero, C., Espinosa-Ruiz, A., Cortina, C., Hernández-Acosta, P., Bellés, J.M., Culiáñez-Macià, F.A.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (U.P.V.-C.S.I.C.) Avenida de los Naranjos, s/n 46022 Valencia.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que, tanto en levadura como en plantas, el metabolismo de carbohidratos no sólo proporciona energía a las células sino que también afecta a la regulación de la expresión génica (1). En levadura, gracias a los trabajos con el mutante *tps1*, se ha podido establecer la intervención de la trehalosa-6-fosfato sintetasa en la regulación del flujo de glucosa en la glicolisis, afectando así a la expresión de genes implicados en distintas rutas metabólicas (respiración, estrés osmótico, etc) (2). Asimismo, la síntesis de trehalosa en plantas de tabaco transgénicas también produce alteraciones en el metabolismo de carbohidratos (3). Han sido propuestos varios modelos para explicar como ocurre exactamente dicha regulación. Uno de ellos sugiere que la biosíntesis de trehalosa regula el flujo de glucosa actuando como un sistema tampón sobre hexosas-fosfato y liberando P_i , requerido como sustrato de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (2). Para comprobar esta hipótesis hemos transformado el mutante *tps1* de levadura y plantas de tabaco con el gen *DOGR2* (4), cuyo producto génico produce la defosforilación de hexosas-fosfato. Los resultados muestran que la expresión de este gen, tanto en el mutante de levadura como en plantas impide la represión catabólica producida por la 2-deoxyglucosa (un análogo de la glucosa no metabolizable). Además, un descenso en la concentración de hexosas-fosfato junto al aumento de ATP y P_i revierte el fenotipo de falta de crecimiento en glucosa del mutante *tps1*, lo que indica que al menos una de las funciones de la síntesis de trehalosa es regular los niveles de metabolitos, para evitar una represión excesiva que conduce a la falta de crecimiento en fuentes de carbono rápidamente metabolizables. Actualmente, se realizan estudios en las plantas transgénicas para determinar posibles alteraciones de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos y la fotosíntesis. Asimismo, resultados preliminares indican que las plantas transgénicas toleran mejor la carencia de fósforo.

Referencias (1)Gancedo J.M.(1998) *Microb. and Mol. Biol. Reviews*.p334-361. (2)Thevelein and Hohmann.(1995)*TIBS* 20:3-10. (3)Romero et al.(1997) *Planta*. 201:293-297. (4)Randez-Gil et al.(1995) *Yeast*.vol. 11:1233-1240.

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE ARABIDOPSIS THALIANA AFECTADOS EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE PROLINA

Hernández-Acosta, P., Cutanda, M.C., Aguado, C., Espinosa-Ruiz, A., Romero, C., Cortina, C., Bellés, J.M., Culiáñez-Macià, F.A.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (U.P.V.-C.S.I.C.) Avenida de los Naranjos, s/n 46022 Valencia.

La prolina se acumula en plantas y otros organismos como respuesta al estrés osmótico y salino. Se ha sugerido que este aminoácido puede actuar no sólo como osmolito sino también como reserva de energía y poder reductor, fuente de nitrógeno y protector frente a radicales hidroxilo (1). En consecuencia, durante estos últimos años se han publicado numerosos trabajos en los que se proponía la acumulación constitutiva de prolina en plantas como estrategia para aumentar su tolerancia al estrés osmótico y salino (2,3). Sin embargo, la falta de correlación entre los niveles de prolina y la tolerancia a sal en ciertas especies de plantas (4), o en mutantes de *Arabidopsis Thaliana* como *sos1* (5) o *pst1* (6), sugieren que la acumulación de prolina puede ser una mera consecuencia del estrés. En un esfuerzo por entender la homeostasis de prolina en plantas hemos desarrollado una estrategia para la obtención de mutantes de *Arabidopsis Thaliana* (ecotipo Col.) en la ruta de biosíntesis de este aminoácido. En una primera etapa, se han seleccionado cien posibles mutantes de una colección de semillas M2 mutagenizadas con EMS, por su tolerancia a trans-4-hydroxy-L-prolina. Tres mutantes que acumulan prolina en esas condiciones han sido sometidos a diferentes ensayos de estrés hídrico y salino in vitro. Los resultados muestran que estos mutantes no acumulan prolina en condiciones normales aunque sí lo hacen en hidroxiprolina y en condiciones de estrés osmótico y salino. Sin embargo, hemos observado que los mutantes son más sensibles al estrés, probablemente debido a una regulación distinta en la acumulación de prolina. Actualmente, se está realizando la caracterización genética y bioquímica de estos mutantes para identificar los genes mutados y su función en el proceso de síntesis y degradación de prolina en condiciones de estrés hídrico y salino.

Referencias: (1) Verma et al., (1992). AVRDC Symposium. Tainan. Taiwan. (2) Kishor et al., (1995). *Plant Physiol.* 108:1387-1394. (3) Zhang et al., (1995). *J. Biol. Chem.* 270 :20491-20496. (4) Moftah et al., (1987). *Plant Physiol.* 83 :238-240. (5) Jiping Liu et al., (1997). *Plant Physiol.* 114 :890-903. (6) Tsugane K. et al., (1999). *Plant Cell.* 11(7) :1195-206.

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO EN TOMATE

Borsani, O.¹, Laguna, L.¹, Cuartero, J.², Valpuesta, V.¹, y Botella, M.A.¹

¹Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Universidad de Málaga.

²Estación Experimental La Mayora. CSIC. Málaga.

El factor limitante en el uso de la biotecnología para mejorar estrés salino en plantas es la falta de información acerca de los genes que producen tolerancia a la salinidad. Una forma de identificar genes implicados en la tolerancia a la salinidad es utilizar una aproximación genética. En nuestro laboratorio se han identificado genes que son esenciales para la tolerancia al NaCl a través de identificar y caracterizar mutantes hipersensibles a este estrés, usando como modelo la planta de tomate. Para la identificación de mutantes de tomate, las plantas se crecieron en medio MS sin NaCl, y posteriormente se transfirieron a medio MS suplementado con 125 mM de NaCl. Se seleccionaron aquellas plantas que disminuyeron su crecimiento con respecto al control. Se analizaron 1300 familias de tomate cv. *Moneymaker* mutagenizadas con EMS, y se aislaron 22 familias hipersensibles a NaCl, las cuales se clasificaron en tres grupos atendiendo a su respuesta al NaCl y a los iones potasio. El primer grupo, que es el más numeroso, está compuesto por mutantes cuya raíz detiene su crecimiento con NaCl y también con bajas concentraciones de potasio. Esto indica que la toma de alta afinidad de potasio es un proceso clave para la tolerancia de las plantas de tomate a NaCl, como previamente se ha demostrado en *Arabidopsis*. En el segundo grupo, que está compuesto por tres familias, el crecimiento de la raíz se detiene en presencia del NaCl pero tienen capacidad de crecer con bajas concentraciones de potasio. Esto sugiere que, además de la toma de alta afinidad de potasio, están implicados otros procesos en la tolerancia del tomate al NaCl. Finalmente, en el tercer grupo, que está compuesto por una única familia, la raíz no se afecta después de la exposición al NaCl, pero si la parte aérea que muestra una clorosis que se intensifica con el tiempo de exposición al NaCl y que provoca finalmente la muerte de la planta. Esto indica que también ciertos procesos regulados genéticamente en la parte aérea de la planta son muy importantes para la tolerancia de la planta a la sal.

Qs_HSP17 Y OTRAS smHSPs CLASE I DE ALCORNOQUE

Figueras, M., Jofré, A., Pla, M., Puigderrajols, P., Verdaguer, D., Mir, G., Huguet, G., y Molinas, M.

Laboratori del Suro. Departament de Biologia. Universitat de Girona. Girona, Spain.

El felema del alcornoque, o corcho, se caracteriza por permitir de forma excepcional el crecimiento y división de células suberificadas. Estas células consiguen sobrevivir durante cierto tiempo a pesar del estrés oxidativo endógeno al que se ven sometidas. Qs_Hsp17 de alcornoque es una smHsp de clase I aislada del felema de *Quercus suber*. Ensayos de hibridación "in situ" y inmunolocalización han demostrado que el gen *Qs_hsp17* es activo y se traduce en células que sufren un estrés oxidativo por la síntesis de polímeros aromáticos (suberificación y lignificación). La presencia de Qs_Hsp17 en estas células apunta a una función protectora del estrés oxidativo.

Mediante RT-PCR de extractos de células del felema, se identificaron tres nuevas smHSPs de clase I además de Qs_Hsp17; confirmándose el carácter multigénico de las smHSP clase I de alcornoque.

Se realizaron electroforesis bidimensionales y Western-blots con el anticuerpo policlonal de Qs_Hsp17 a partir de extractos proteicos de tejidos con estrés oxidativo endógeno (xilema y felema) y de plántulas sometidas a estrés térmico y oxidativo. Estos extractos muestran un patrón bidimensional común en lo referente a las isoformas de 16 y 30 KD, patrón que coincide con el observado en la proteína recombinante. Estos resultados sugieren que los distintos "spots" de 16 y 30 KD corresponden a isoformas de Qs_Hsp17 debidas a modificaciones post-traduccionales.

LAS BAJAS TEMPERATURAS DISMINUYEN LOS NIVELES DE cLTP, UN mRNA QUE CODIFICA UNA "PROTEINA TRANSPORTADORA DE LIPIDOS", EN FRUTOS CITRICOS SENSIBLES AL FRIO

Sanchez-Ballesta, M.T.¹, Lafuente, M.T.¹, Zacarías, L.¹, y Granell, A.²

1. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC) Apdo Correos 73, Burjassot, 46100 Valencia.

2. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV) Camino de Vera s/n, 46022 Valencia

La exposición prolongada a bajas temperaturas ocasiona en determinadas variedades de frutos cítricos alteraciones fisiológicas importantes, denominadas daños por frío. Estas alteraciones se manifiestan como picados, manchas y necrosis en la piel del fruto y son la causa de su pérdida de calidad. Con el objetivo de entender los cambios fisiológicos que tiene lugar en los frutos cítricos durante la conservación a bajas temperaturas estudiamos los patrones de expresión génica. Para ello, se realizó un escrutinio diferencial de una genoteca de cDNA de frutos de la mandarina 'Fortune', una variedad muy sensible a desarrollar daños por frío, almacenados durante 21 días a 2°C. Entre los diferentes cDNAs aislados que correspondían a mRNAs cuyos niveles se modificaban significativamente por las bajas temperaturas, el cDNA 7ba era el único que disminuía por el frío. Dicho cDNA codifica para una proteína de 115 aminoácidos y presenta un elevado porcentaje de identidad con proteínas transportadoras de lípidos (LTP) identificadas en otras plantas. Hemos comprobado que los niveles de expresión del mRNA LTP disminuyen drásticamente en los frutos de mandarina y de naranja expuestos a 2°C cuando se trata de variedades sensibles a desarrollar daños por frío. Sin embargo, una variedad de mandarina tolerante a mostrar dichas alteraciones contenía unos niveles iniciales del mRNA que fueron superiores a los de la variedad sensible y que aún experimentaron un aumento, transitorio, en respuesta al frío. Estos resultados, unido al hecho de que las LTPs se inducen como respuesta a las bajas temperaturas en plantas adaptadas a climas fríos, sugieren que la disminución en la expresión de cLTP estaría relacionada con la susceptibilidad de algunos frutos cítricos a este tipo de estrés.

FUNCION DE LAS FOSFATASAS 2Ac EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES EN RESPUESTA A HERIDA Y ACIDO JASMONICO EN *Arabidopsis thaliana*

Pernas, M., Rojo, E., y Sánchez Serrano, J.J.

Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Campus de Cantoblanco UAM. Madrid.

La fosforilación reversible de proteínas es uno de los mecanismos más importantes en el control de la actividad celular. En plantas procesos como la respuesta a hormonas, y las reacciones frente a patógenos y distintos estreses ambientales, vienen regulados por el estado de fosforilación de las proteínas que constituyen el soporte molecular de las cadenas de transducción de señales. El nivel de fosforilación de las proteínas diana depende del balance entre las actividades proteína kinasa y proteína fosfatasa. Los resultados obtenidos en nuestro grupo sugieren que una serín/treonina proteína fosfatasa de tipo 2A (PP2A) regula la activación, inducida por herida, de la expresión de los genes que responden al ácido jasmónico. En animales, PP2A es un heterodímero que consta de una subunidad catalítica (PP2Ac) y una subunidad reguladora A de 65 kDa, o de un heterotrímero al que se añade una subunidad reguladora B de peso molecular variable. Se han identificado en plantas homólogos de todas las subunidades. Así, en *Arabidopsis thaliana* se han aislado cuatro genes que codifican subunidades catalíticas. Para dilucidar el papel de las PP2Ac en el sistema de transducción de las señales de herida, hemos generado plantas transgénicas de *A.thaliana* que sobreexpresan, individualmente, dos subunidades catalíticas PP2A-1 y PP2A-2. Se han obtenido líneas transgénicas que tienen incrementados los niveles de mRNA y proteína de cada una de las subunidades catalíticas. Se ha analizado la respuesta de estas líneas al tratamiento con ácido jasmónico y a la herida.

IDENTIFICACIÓN DE UN ANTIPORTADOR Na^+/H^+ DE ARABIDOPSIS

Quintero, F.J.¹, Blatt, M.R.², y Pardo, J.M.¹

¹Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, PO Box 1052, Sevilla - 41089.

²Laboratory of Plant Physiology and Biophysics, University of London, Wye College, Wye, Kent TN25 5AH, Reino Unido.

La acumulación de Na^+ en la vacuola es un mecanismo esencial para la tolerancia al estrés salino, ya que disminuye la concentración citosólica de Na^+ y contribuye al ajuste osmótico necesario para la expansión y turgencia celular. Estudios fisiológicos sugieren que este transporte de Na^+ es llevado a cabo por un antiportador Na^+/H^+ . En este trabajo se describe un gen de Arabidopsis thaliana, denominado AtNHX1, que codifica para una proteína de aprox. 60 kDa que presenta una homología significativa con los antiportadores Na^+/H^+ de la familia NHE de animales. Cuando este gen es expresado en levadura es capaz de suprimir la sensibilidad a Li^+ y Na^+ de un mutante Dnhx1, que carece del antiportador Na^+/H^+ implicado en la acumulación de Na^+ en la vacuola, pero es incapaz de complementar un mutante Dnha1, carente del antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática. La tolerancia conferida por la expresión de AtNHX1 se correlacionó con un mayor contenido interno del catión y su acumulación en un compartimento intracelular que era energéticamente dependiente de la H^+ -ATPasa vacuolar. La inmunolocalización de la proteína AtNHX1 en levadura confirmó su presencia en fracciones correspondientes a membranas vacuolares. El análisis de la expresión de AtNHX1 en Arabidopsis demostró que los niveles de mRNA se inducen por ABA y estrés salino en hojas, pero no en raíces. Los resultados sugieren que AtNHX1 está implicado en la compartimentalización de Na^+ en la vacuola en plantas, y podría jugar un papel muy importante en la tolerancia a salinidad.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *rci1a* DURANTE EL DESARROLLO DE ARABIDOPSIS Y EN RESPUESTA A DIFERENTES FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS

Fernández-Calvín, B., Leyva, A., Martínez-Zapater, J.M., y Salinas, J.

Departamento de Mejora Genética y Biotecnología; INIA; Carretera de la Coruña, Km7, 28040 Madrid

RCI1A es un gen de *Arabidopsis* cuya expresión está regulada por temperaturas bajas y codifica la proteína RCI14A que pertenece a la familia de las 14-3-3. Esta familia comprende una serie de proteínas de 30 Kd, que han sido relacionadas con la regulación de procesos de fosforilación/desfosforilación dependientes de Ca^{2+} y están ampliamente distribuidas entre todos los seres vivos. En este trabajo se presenta el análisis de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen una construcción en la que un fragmento del promotor de *RCI1A* se ha fusionado transcripcionalmente con la secuencia codificante del gen de la β -glucuronidasa (GUS). Los resultados obtenidos han demostrado que dicho fragmento contiene toda la información necesaria para responder a las temperaturas bajas y conferir un patrón de expresión al gen *uidA* semejante al observado previamente para el gen *RCI1A* durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Por otro lado, el estudio de la actividad GUS durante el proceso de germinación de la semilla, así como en diferentes órganos de la planta ha revelado que la expresión de *RCI1A* está regulada temporal y espacialmente durante el desarrollo de *Arabidopsis*, lo que sugiere que *RCI1A* tiene otras implicaciones además de estar relacionado con el proceso de aclimatación. En este sentido, el análisis de las líneas transgénicas ha permitido poner de manifiesto que la expresión del gen *RCI1A* además de estar regulada por las temperaturas bajas lo está por diferentes factores de carácter abiótico y biótico. Mediante tinción histoquímica se ha detectado un incremento de la actividad GUS en diferentes órganos sometidos a herida. Por otro lado, la inoculación de bacterias (*Pseudomonas syringae* pv. *tomate*) en hojas de roseta así como el tratamiento exógeno con ácido jasmónico, ACC y ácido salicílico en plántulas crecidas en medio líquido producen la acumulación de los mensajeros correspondientes al gen *uidA* y al gen *RCI1A*.

REGULACIÓN TRADUCIONAL Y ESPECIFICIDAD DE TEJIDO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS sHSP EN RESPUESTA AL CALOR

Almoquera, C., Rojas, A., Coca, M.A., y Jordano, J.

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (C.S.I.C.), Apartado 1052, 41080 Sevilla.

La respuesta al calor (*heat shock*) está muy conservada entre los organismos eucarióticos y consta tanto de una activación transcripcional de genes específicos, como de su regulación post-transcripcional. Mientras que la activación transcripcional ocurre generalmente de una forma autónoma en cada célula, la regulación post-transcripcional contribuye a conferir especificidad de tejido en algunos casos. En plantas tan sólo se han descrito indicios de esto último: como la acumulación de sHSPs (*small Heat Shock Proteins*) en tejidos vasculares del tallo (Almoquera *et al.*, 1993); o una aparente falta de respuesta al calor de genes quiméricos sHSP::GUS en germínulas (Coca *et al.*, 1996). Hemos construido plantas transgénicas de tabaco con nuevos genes quiméricos GUS que difieren en la región codificante y el 5'UTR del gen sHSP *Ha 17.7 G4*. Mediante análisis combinado de mRNA y actividad GUS, demostramos la existencia de un control negativo de naturaleza traducional que implica secuencias codificantes y del 5'UTR. La región codificante impide la expresión de actividad GUS en germínulas y el 5'UTR la restringe al *cambium* en el tallo. Este control es específico de tejidos vegetativos ya que las deleciones produjeron un aumento de la actividad GUS de los genes quiméricos en germínulas, tallo y hojas, pero no en semillas. Estudios de localización de mRNA y proteínas tanto en girasol (el sistema homólogo) como en tabaco demuestran la conservación del control traducional que produce la especificidad de tejido de sHSPs en el tallo.

UN GEN DE ARABIDOPSIS, INDUCIBLE POR FRIO, CODIFICA UNA PROTEINA CON SIMILITUD A MONOXIGENASAS

López-Cobollo, R.M., Catalá, R., y Salinas, J.

Departamento de Mejora Genética y Biotecnología, INIA, Carretera de la Coruña Km 7, 28040-Madrid.

Arabidopsis es capaz de aumentar su tolerancia a la congelación en respuesta a temperaturas entre 0° y 10°C. Este proceso, conocido como aclimatación a las temperaturas bajas, conlleva diversos cambios fisiológicos y bioquímicos que parecen estar regulados por las temperaturas bajas a través de cambios en la expresión génica. Con objeto de comprender los mecanismos moleculares que controlan este proceso, hemos identificado genes cuya expresión está regulada en respuesta a las temperaturas bajas. Uno de estos genes, denominado *RC15A*, codifica una proteína que presenta similitud con proteínas del tipo monoxigenasas. El estudio de la organización genómica de *RC15A* reveló que pertenece a una familia multigénica. Los patrones de expresión de *RC15A* indicaron que se induce en todos los tejidos en respuesta a las temperaturas bajas. Con el propósito de caracterizar con más detalle los patrones de expresión de *RC15A*, se obtuvieron plantas transgénicas de Arabidopsis conteniendo un fragmento de 770 pb correspondientes al promotor del gen, fusionado transcripcionalmente al gen que codifica la β -glucuronidasa. El análisis de estas plantas transgénicas permitió precisar aún más los patrones de expresión de *RC15A* y confirmó que el fragmento de 770 pb contiene toda la información necesaria para conferir respuesta a la inducción por frío. En base a los resultados obtenidos, se discutirá el papel que la proteína codificada por *RC15A* puede jugar en el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

EXPRESIÓN Y TRADUCCIÓN *in vitro* DE UN GEN DE FRESÓN QUE CODIFICA UNA QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO

Llop-Tous, I., Domínguez-Puigjaner, E., Palomer, X., y Vendrell, M.
CSIC, Instituto de Biología Molecular, Barcelona

A partir de una librería de cDNA de fresón maduro se aisló un clon de cDNA, denominado MAX17, que presenta alta homología con proteínas quinasa dependientes de calcio (CDPKs). Las proteínas quinasa intervienen en la fosforilación de proteínas, controlando diversos procesos metabólicos mediante la activación/desactivación de enzimas. Varios estudios muestran que la fosforilación de proteínas en plantas está modulada en respuesta a distintos estímulos externos y a estrés ambiental. La actividad de las CDPKs está regulada directamente por Ca^{2+} , es independiente de la calmodulina y variablemente dependiente de fosfolípidos.

El producto de la traducción *in vitro* del transcrito MAX17 se analizó mediante electroforesis de una y dos dimensiones. Los geles bidimensionales revelaron varias isoformas de diferente punto isoeléctrico. Además el tratamiento con fosfatasa alcalina de la proteína traducida *in vitro* resultó en la aparición de nuevas isoformas con puntos isoeléctricos más básicos, sugiriendo que la proteína presenta varios puntos de fosforilación.

Se evaluaron los niveles de expresión del transcrito MAX17 en distintos tejidos de la planta del fresón, así como también su evolución durante la maduración del fruto, observando que su expresión aumenta a lo largo de la maduración del fresón. También se analizó el efecto de los tratamientos aplicados durante la conservación post-cosecha del fresón (bajas temperaturas y atmósferas ricas en CO_2) sobre la acumulación del transcrito en el fruto maduro.

Estrés biótico

CISTATINAS Y MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS: NUEVAS ACTIVIDADES ACARICIDAS Y ANTIFUNGICAS Y PATRONES DE EXPRESION DE UN INHIBIDOR DE *Castanea sativa*

Pernas, M.^a, Sánchez-Monge, R.^a, López-Solanilla, E.^a, Sanchez-Ramos, I.^b, Lombardero, M.^c, Castañera, P.^b, Rodríguez-Palenzuela, P.^a, y Salcedo, G.^a

^aUnidad de Bioquímica, Departamento de Biotecnología, E.T.S.Ingenieros Agrónomos, Madrid.

^bUnidad de Entomología, Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C, Madrid.

^cALK- Abelló, Madrid.

Las cistatinas de plantas (inhibidores de cisteín proteasas) han sido implicadas en la defensa frente al ataque de distintas plagas y patógenos. Esta propuesta esta basada en su capacidad de inhibir proteasas exógenas de distintos insectos y nematodos y a su inducción por herida y ácido jasmónico. El efecto de una cistatina de *C.sativa* (CsC), recientemente caracterizada en el laboratorio (Pernas *et al.*, Plant Mol. Biol 1998;38:1235-42), sobre distintos tipos de organismos fitófagos, ha permitido describir dos nuevas actividades de estos inhibidores: i) acaricida, inhibiendo *in vitro* la principal enzima digestiva de *Dermatophagoides farinae*, así como el desarrollo *in vivo* de este ácaro. ii) fungicida, afectando a proteasas de *Botrytis cinerea*, así como al crecimiento de este y otros hongos fitopatógenos (*C.graminicola* y *S.nodorum*). Además, la expresión del mensajero de CsC se induce en plántulas de castaña por infección con *B.cinerea*.

Los patrones de expresión de CsC durante la maduración (descenso en los niveles de ARNm) y la germinación (aumento de su ARNm) de la semilla de castaña, opuestos a los de las cistatinas de cereales, sugieren un papel de este inhibidor en defensa, y no en el control de proteasas endógenas como se había propuesto en dichas especies. El mensajero de CsC también se induce , principalmente en raíz y hojas, por herida y ácido jasmónico. Además de un papel en defensa, basado en los datos anteriores, la inducción del ARNm de CsC por calor, frio y alta sal, sugieren su posible implicación en la respuesta al estrés abiotico.

AISLAMIENTO, CLONAJE Y ANALISIS DE ANALOGOS A GENES DE RESISTENCIA (RGA) DE *Aegilops ventricosa* Y *Aegilops triuncialis* USANDO PRIMERS CONSERVADOS

López Braña, I.¹, Montes, M.J.¹, Delibes, A.¹, Martín Sánchez, J.A.², Romero, M.D.

¹Dpto. Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, U.P.M., 28040 Madrid.

²Centre R + D de Lleida, UdL-IRTA, Alcalde Rovira Roure 177, E-25006, Lleida.

³Centro de Ciencias Medioambientales-C.S.I.C., Serrano 115, 28006 Madrid.

A partir de los cruzamientos [(*T.turgidum* x *Ae.ventricosa*) x *T.aestivum*] y [(*T.turgidum* x *Ae.triuncialis*) x *T.aestivum*] se han obtenido diversas líneas de trigo hexaploide portadoras de genes de resistencia (al nemátodo del quiste de los cereales, al mosquito del trigo, al oidio, al mal de pie. etc.), algunas de las cuales se han conseguido ligar a determinados marcadores bioquímicos y moleculares. Para tratar de encontrar marcadores ligados a aquellos genes no localizados, se han diseñado oligonucleótidos a partir de los motivos de secuencia conservados entre los genes de resistencia de plantas descritos hasta la fecha. Estos oligonucleótidos se han usado como primers para PCRs utilizando los DNAs de las accesiones de *Ae. ventricosa* y *Ae.triuncialis*, anteriormente descritas, como molde. Los productos obtenidos se han clonado usando un kit de clonaje TA. A partir del análisis de las secuencias de 113 de estos clones se han seleccionado 8 clones que revelaron motivos de secuencia conservados en genes de resistencia en plantas (dominios de unión a nucleótidos, de kinasas, etc.). Se describen las secuencias de estos Análogos a Genes de Resistencia (RGA), sus relaciones con otros RGAs y su posible uso para tratar de diferenciar las distintas líneas resistentes a los patógenos descritos mediante el diseño de oligonucleótidos a partir de las zonas variables de estas secuencias que den lugar a productos de amplificación específicos de cada tipo de RGA.

ACUMULACIÓN ESPACIO-TEMPORAL COORDINADA DE PROTEÍNAS ANTIFÚNGICAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA DE CASTAÑO

García-Casado, G., Collada, C., Allona, I., Soto, A., Casado, R., Rodríguez-Cerezo, E. (1), Gomez, L., y Aragoncillo, C.

Departamento de Biotecnología, E.T.S. Ingenieros de Montes, Universidad Politécnica de Madrid y (1) Centro Nacional de Biotecnología-CSIC. Email: arag@montes.upm.es

Las semillas maduras del castaño común acumulan niveles inusualmente elevados de ciertas proteínas antifúngicas, lo que se ha relacionado con su alto contenido de almidón y agua. En esta comunicación se presenta la purificación de CsTL1, una proteína de tipo taumatina que se acumula abundantemente en los cotiledones del castaño. Su secuenciación parcial, así como la caracterización de un clon cDNA completo, indican que CsTL1 se sintetiza como una preproteína con un péptido señal de 22 residuos. La proteína madura (23 kD) posee 16 cisteínas, presuntamente implicadas en la formación de puentes disulfuro, así como un elevado punto isoeléctrico (ca. 9). A diferencia de otras proteínas PR (pathogenesis-related) de naturaleza básica, CsTL1 aparece localizada en la matriz extracelular, como indican los experimentos de inmunomicroscopía electrónica llevados a cabo en cotiledones de castaño. CsTL1 inhibe *in vitro* el crecimiento de los hongos *Trichoderma viride* y *Fusarium oxysporum*, y muestra efectos sinérgicos con Ch1, la quitinasa mayoritaria de la semilla de castaño. Los genes codificantes para ambas proteínas siguen patrones de expresión muy similares durante la maduración y germinación de la semilla, y lo mismo ocurre con sus homólogos vegetativos en plántulas de castaño sometidas a distintos tipos de estrés. Las posibles implicaciones de estos resultados se discuten desde una perspectiva funcional.

UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS RESISTENTES A GEMINIVIRUS

Franco, M., Flores, A., Morilla, G., y Bejarano, E.R.

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. 29071-Málaga.

El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) es un geminivirus transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. Este virus es capaz de infectar varias especies de Solanáceas (*Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana* etc.). El virus ha producido graves pérdidas en cosechas de tomate de numerosos países tanto de Europa, Asia, África y América.

Hemos desarrollado una nueva estrategia para la obtención de plantas resistentes a TYLCV combinando la expresión de RNA-antisentido para el gen *Rep* del virus y la formación de partículas interfentes que expresan el RNA-antisentido mencionado. La producción de las partículas tiene lugar a partir de construcciones insertadas en el genoma de la planta, en respuesta a la infección por el virus.

Se presentarán los resultados obtenidos con plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con las dos especies de TYLCV presentes en la Península Ibérica.

CARACTERIZACION DE UNA PROTEINA CELULAR QUE INTERACCIONA CON LA REPLICASA DEL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE (TYLCV)

Donoso, I., Garriga, A.C., Antúnez, C., y Bejarano, E.R.

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.

Los geminivirus son virus de planta con un genoma de DNA circular de cadena sencilla, que contiene entre 6-8 genes. El gen *Rep* es el único gen viral esencial para su replicación. Este gen codifica una proteína multifuncional que se une específicamente al origen de replicación viral.

La presencia de esta proteína en células vegetales induce la aparición de proteínas específicas de fase S. Esta inducción se asemeja a la que ocurre en algunos virus animales (adenovirus, poliomavirus, etc.). Como en estos virus, la desregulación del ciclo celular podría implicar interacciones de la proteína *Rep* con proteínas celulares implicadas en control del ciclo.

Utilizando la técnica de Two Hybrid System, hemos aislado una proteína que interacciona con pRep. El gen que codifica para esta proteína está conservada en todos los eucariontes. Se presentarán los datos obtenidos del análisis funcional de este gen en levaduras, incluidos experimentos de complementación con el homólogo de *A. thaliana*.

PAPEL DEL PERÓXIDO DE NITRÓGENO EN INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO

Alamillo, J.M., y García-Olmedo, F.

Departamento de Biotecnología. E.T.S. Ingenieros Agrónomos. U.P.M. Ciudad Universitaria. 28040-Madrid.

Las plantas se defienden del ataque de los patógenos activando diversos mecanismos de defensa. Entre las primeras respuestas se encuentra la producción masiva de especies reactivas de oxígeno (ROIs), que juegan un papel central en la defensa induciendo la llamada respuesta hipersensible (HR). En animales el óxido nítrico (NO) colabora con los ROIs en condiciones patológicas que conllevan inflamación y muerte celular programada (PCD). Recientemente se ha visto que esta cooperación también se da en plantas, donde tanto el NO como los ROIs pueden inducir la expresión de genes de defensa y activar la muerte de las células afectadas. En esta comunicación se presentan resultados que demuestran que el peróxido de nitrógeno (ONOO⁻) que se genera a partir de ROIs y NO juega un papel importante en la interacción entre *Arabidopsis* y bacterias del género *Pseudomonas*. Para ello hemos utilizado urato, que es un producto natural capaz de eliminar la toxicidad que se deriva del ONOO⁻. Nuestros resultados sugieren que, dependiendo de la concentración a la que se produzca, el ONOO⁻ puede ser el causante de una gran parte de la muerte celular que se produce durante la respuesta hipersensible (HR), o bien atenuar la defensa de las células atacadas, cuando la interacción es de tipo compatible. Al contrario que en las interacciones con *Pseudomonas*, el urato no produce ningún efecto con bacterias del género *Xanthomonas*, probablemente porque estas bacterias son capaces de detoxificar el ONOO⁻ por si mismas.

EL ÁCIDO GENTÍSICO COMO SEÑAL ADICIONAL AL ÁCIDO SALICÍLICO PARA LA ACTIVACIÓN DE DEFENSAS EN PLANTAS DE TOMATE

Bellés, J.M.¹, Garro, R.¹, Fayos, J.¹, Navarro, P.¹, Primo, J.², y Conejero, V.¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas.

²Instituto de Tecnología Química. Universidad Politécnica de Valencia. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

El viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) y el virus del mosaico del tomate (ToMV), (ambos patógenos producen una infección sistémica, no necrotizante en hojas de tomate, *Lycopersicon esculentum* cv. Rutgers), inducen una gran acumulación de un compuesto fenólico que nosotros hemos identificado como el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico). Dicha identificación se ha llevado a cabo mediante la purificación por HPLC del compuesto, seguida de su análisis por resonancia magnética nuclear. Los niveles de ácido gentísico, tanto libre como conjugado, aumentan hasta más de 150 veces en las hojas de tomate que muestran los síntomas de la enfermedad. En contraste con estos resultados, la infección de hojas de tomate con una bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) que produce una reacción hipersensible productora de manchas necróticas, no induce ningún incremento en las cantidades de ácido gentísico en las hojas de tomate. El tratamiento exógeno de las hojas de tomate con ácido benzoico o ácido salicílico induce también la acumulación de ácido gentísico, y experimentos utilizando ácido salicílico marcado radioactivamente demuestran que éste es el precursor inmediato del ácido gentísico. El ácido gentísico induce en hojas de tomate las proteínas PR, P23, P32 y P34, que también son producidas por el CEVd, pero no por el ácido salicílico que, sin embargo, es capaz de inducir otras PRs. Se concluye que el ácido gentísico es una molécula señal, adicional al ácido salicílico, para la inducción de genes de defensa en plantas de tomate.

PROTECCIÓN FRENTE AL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) MEDIANTE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CÍTRICOS CON DIFERENTES VERSIONES DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE CÁPSIDA

Domínguez, A., Pina, J.A., Guerri, J., Navarro, L., Moreno, P., y Peña, L.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apdo. Oficial 46113. Moncada. Valencia.

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) causa una de las enfermedades más importantes de este cultivo. Hasta el momento, no se han desarrollado formas estables de protección. En los últimos 10 años, una de las estrategias más prometedoras de protección frente a virosis ha sido la transformación genética de plantas con secuencias virales. El gen más utilizado ha sido el que codifica la proteína de la cápsida (CP) viral, que ha conferido protección eficaz en numerosos sistemas planta-virus. Hemos transformado lima Mexicana (*Citrus aurantifolia* Swing.), una especie muy sensible a CTV, con diferentes versiones del gen que codifica la CP de CTV: (1) codificante de CP; (2) no codificante de CP, con codón de parada después del codón de iniciación. Para preparar las construcciones, se han amplificado mediante PCR y caracterizado las secuencias derivadas del gen *CP* de la cepa virulenta T305. Dichas regiones codificantes, reguladas por el promotor 35S del CaMV y el terminador *nos* del gen de la nopalina sintetasa, se han clonado en el plásmido binario pBI121 o en pBIN19, entre los módulos de expresión marcadores *nos-pro/nptIII/nos-ter* y *35S-pro/uidA/nos-ter*. Dichos plásmidos se han introducido en la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, con la que se ha transformado entrenudos de lima Mexicana. Se han regenerado plantas enteras cuyo carácter transgénico se ha confirmado mediante análisis Southern. La expresión de transgenes *CP* se ha analizado por medio de Northern, y Western y ELISA. Se han obtenido más de 20 líneas transgénicas con cada construcción. Se han llevado a cabo experimentos de inoculación del virus en las plantas transgénicas. Se presentarán los resultados de estos experimentos y se discutirán las posibilidades de utilización práctica de estas plantas para el control de la tristeza.

INDUCCIÓN POR NEMATODOS DE GENES VEGETALES RELACIONADOS CON EMBRIOGÉNESIS Y ESTRÉS HÍDRICO

Escobar, C.², Herreros, E.¹, Robertson, L.¹, Estévez, R.¹, Aubareda, A.¹ y Fenoll, C.²

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid.

²Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha. Campus Tecnológico de la Fábrica de Armas, 45071 Toledo.

Los nematodos endoparásitos de plantas provocan pérdidas mundiales en agricultura que superan los 100 billones de dólares anuales. Los más importantes económicamente son los nematodos sedentarios, como *Meloidogyne incognita* y *Heterodera schachtii*, que pasan la mayor parte de su ciclo vital en las raíces de las plantas a las que parasitan. En ellas, inducen a partir de las células de la raíz estructuras muy especializadas, los sitios de alimentación (NFS), de los que dependen para su desarrollo. Estudios previos han demostrado que los nematodos inducen cambios en la expresión génica en los NFS y en otras células de la raíz próximas a éstos, aunque las vías de señalización y los mecanismos implicados en el desarrollo del NFS siguen sin conocerse con claridad. Se ha observado que los promotores de algunos genes inducidos específicamente por nematodos son también inducibles durante la embriogénesis y/o bajo otras situaciones de estrés de la planta (*ABI3*, *TobRB7*, *TSW12*, *TAS14*, *sHSP17.7* y *LEMMI9*). Nuestro grupo ha estudiado con mayor profundidad el promotor de *LEMMI9*, inducible por *Meloidogyne spp.* y está actualmente estudiando *sHSP17.7* and *ABI3*. Nuestra hipótesis es que, durante la infección, el nemátodo desencadena cascadas de señalización relacionadas con la embriogénesis y/o las respuestas a cambios hídricos, que convergen en la inducción coordinada de estos genes. Para comprobarla estamos analizando los promotores, con el fin de identificar los elementos de secuencia responsables de la respuesta.

El gen *sHSP17.7* de girasol codifica una proteína de choque térmico de bajo peso molecular. Estamos analizando plantas de tabaco transgénicas que contienen fusiones a *GUS* de este promotor, tras su infección con nematodos. Tras el análisis de varias deleciones se ha delimitado una región suficiente para la respuesta a nemátodos en la zona promotora proximal (-83pb.), lo que sugiere que alguno de los elementos de choque térmico (HSE) o elementos de respuesta a *ABI3* situados en esta región podrían estar implicados en la inducibilidad del promotor por nematodos. Para analizar el papel de los diferentes elementos se están estudiando varias líneas transgénicas con mutaciones en diferentes posiciones, generadas por el grupo de J.Jordano.

El gen *ABI3* de *Arabidopsis* está involucrado en el proceso de maduración y germinación de semillas. Recientemente se ha propuesto su participación en la quiescencia de otros tejidos pero el papel que pudiera jugar en el desarrollo de los NFS se desconoce. Actualmente estamos analizando plantas de *Arabidopsis* transgénicas portadoras de fusiones del promotor de *ABI3* al gen testigo *GUS* para determinar su inducibilidad por nematodos.

IDENTIFICACIÓN DE UN HEXAPÉPTIDO ACTIVO FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS CAUSANTES DE PODREDUMBRES DE FRUTOS DURANTE LA POSTCOSECHA

López-García, B.^{1,2}, González-Candelas, L.¹, Pérez-Payá, E.², y Marcos, J.F.¹

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia.

²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València.

Los hongos filamentosos causan importantes enfermedades y pérdidas durante el cultivo y posterior procesamiento de vegetales, incluyendo las podredumbres de frutas y hortalizas durante el periodo de post-cosecha. Actualmente la infección causada por hongos fitopatógenos se controla en muchos casos mediante el uso de fungicidas químicos, aunque existen inconvenientes evidentes asociados a su utilización. Por tanto, es necesario identificar nuevos compuestos y estrategias que puedan sustituir a dichos fungicidas. Nuestros laboratorios están interesados en la utilización de la metodología de la química combinatorial para identificar nuevos compuestos antifúngicos, tomando como sistema modelo de trabajo las podredumbres de la post-cosecha. Hemos identificado un hexapéptido sintético de D-aminoácidos que posee actividad antifúngica frente a cepas de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Botrytis cinerea*. El péptido inhibe el crecimiento *in vitro* de estos patógenos con concentraciones mínimas inhibitorias de 60-80 μM e IC_{50} de 30-40 μM , dependiendo del hongo, pero no afecta a otros hongos filamentosos y microorganismos (incluyendo bacterias y levaduras), demostrando una marcada especificidad. Nuestros resultados indican que la actividad del péptido es específica de secuencia debido a que hexapéptidos de secuencia relacionada, incluyendo uno con un único cambio de aminoácido, no presentan actividad. El hexapéptido inhibe principalmente la germinación de esporas, aunque también se observa un efecto sobre el crecimiento posterior del micelio. La actividad *in vitro* del péptido es dependiente de la fuerza iónica del medio, sugiriendo que su efecto es debido a una interacción electrostática con la pared celular del hongo. Experimentos preliminares de inoculación controlada indican que el péptido retarda las enfermedades de podredumbre de frutos.

FUNCIONALIDAD DE UNA α -FUCOSIDASA DE GUISANTE: ¿ PROTEÍNA DE DEFENSA FRENTE A PATÓGENOS ?

Tarragó, T., Codina, A., Torrent, M., y Ludevid, M.D.

Instituto de Biología Molecular de Barcelona. CSIC. Girona Salgado 18-26. 08034 Barcelona.

La α -L-fucosidasa de guisante hidroliza residuos α -1,2-fucosil terminales de oligosacáridos derivados de xiloglucanos de la pared celular. El gen *fuc* fue aislado y caracterizado por Augur i col. y hasta el momento es el único gen de α -L-fucosidasa que se ha clonado en plantas. Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que *fuc1* codifica para una α -L-fucosidasa vacuolar (20kD) que se sintetiza como pre-proteína. La señal de direccionalidad a vacuola está contenida en el propéptido C-terminal formado por nueve aminoácidos.

La función de la α -L-fucosidasa de guisante es desconocida. Se ha trabajado en base a dos hipótesis de funcionalidad: a) Crecimiento/Elongación y b) Patogénesis.

a) Se han analizado los patrones de expresión de *fuc1* y proteína en plantas de guisante tratadas GA3, con un inhibidor de la síntesis de giberelinas (paclobutrazol) y también sobre los mutantes enanos (nana y lele) deficientes en giberelinas y sus correspondientes líneas isogénicas. Los resultados obtenidos indican que las giberelinas no inducen, al contrario, antagonizan la expresión del gen *fuc1*, modificando negativamente tanto la acumulación de transcrito como de proteína.

b) En base a una homología funcional, descrita en otros enzimas hidrolíticos (β -glucanasas y quitinasas) de defensa de la planta frente a la invasión por patógenos, se ha explorado esta hipótesis mediante dos aproximaciones experimentales. En ensayos "in vitro" se ha estudiado el efecto de fucosidasa recombinante frente a diferentes hongos. Los resultados indican que a concentraciones muy bajas (nM) del enzima, se detecta un fuerte efecto inhibitor del crecimiento de los hongos, y que la inhibición es dosis-dependiente. En ensayos "in vivo" se han infectado hojas de plantas de guisante con patógenos fúngicos y con elicitores preparados a partir de los mismos hongos. La expresión del gen *fuc1* se induce entre las 6 y 8h después de la infección o del tratamiento con elicitores. Se presenta además en esta comunicación la exploración de las rutas de transducción de señal mediante tratamientos con etileno, ácido salicílico y jasmonato .

SNAKINS: UNA NUEVA FAMILIA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS

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

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biotecnología-UPM, E. T. S. Ingenieros Agrónomos. Avda. Complutense s/n 28040-Madrid.

Las plantas no poseen un sistema inmunológico comparable al de los animales superiores, sin embargo son capaces de defenderse de la mayoría de los patógenos potenciales mediante una serie de barreras de defensa que pueden ser clasificadas en constitutivas o preexistentes, e inducibles.

Se han caracterizado varias familias de péptidos vegetales ricos en cisteína, que tienen propiedades antibióticas frente a fitopatógenos, y que forman parte de las barreras de defensa constitutivas e inducibles de las plantas (García-Olmedo et al., 1998). Entre estas familias de péptidos se encuentran las tioninas (García-Olmedo et al., 1992), las LTPs (García-Olmedo et al., 1995), las defensinas (Segura et al., 1998; Broekaert et al., 1995) y las recientemente caracterizadas snakins (Segura et al., 1999). Los dos primeros miembros de esta nueva familia de péptidos antimicrobianos, denominados StSN1 y StSN2, han sido aislados de tubérculo de patata (*Solanum tuberosum*). Ambos péptidos, que en base a su secuencia de aminoácidos representan dos subfamilias estructurales de las snakins, son activos a concentraciones inferiores a 20 μ M frente a bacterias Gram positivas y hongos patógenos de plantas.

El cDNA que codifica la StSN1 ha sido clonado y utilizado para estudiar el patrón de expresión del gen *StSN1* en patata (Segura et al., 1999). El patrón de expresión del gen *StSN1* durante el desarrollo y en respuestas a tratamientos abióticos e infección por patógenos sugiere que *StSN1* es un componente de las barreras de defensa constitutivas de patata (Segura et al., 1999).

El cDNA que codifica la StSN2 ha sido también clonado recientemente mediante PCR usando oligonucleótidos degenerados, deducidos a partir de su secuencia N-terminal. Este cDNA codifica una preproteína que contiene un péptido señal, seguido de un péptido ácido de 15 aminoácidos y la proteína madura StSN2. StSN2 tiene 66 aminoácidos, incluidas las 12 cisteínas conservadas en todas las snakins, un peso molecular de 7.027 Da, y un punto isoelectrico de 9,16. El patrón de expresión durante el desarrollo del gen *StSN2* es similar al del *StSN1* en tubérculo, tallos y flores, pero difiere en hojas, donde *StSN2* se expresa y *StSN1* no, y en capullos florales donde se expresa *StSN1*, pero no *StSN2*.

La expresión del gen *StSN2* es inducible por herida y tratamiento con ácido abscísico, una hormona implicada en la activación de la respuesta frente a herida en patata, pero no responde al tratamiento con ácido jasmónico. La infección de tubérculos de patata con *Botrytis cinerea* causa una inducción transitoria del gen *StSN2*, mientras que la inoculación con la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* produce una rápida represión de la expresión del gen. El patrón de expresión del gen *StSN2* durante el desarrollo y en respuesta a tratamientos abióticos e infección por patógenos sugiere que *StSN2* podría ser un componente de los mecanismos de defensa constitutivo e inducibles de patata. Entre los datos que apoyan el papel de defensa de las

snakins se puede destacar que mutantes de bacterias fitopatógenas sensibles a estos péptidos, son menos virulentos en la planta (López-Solanilla et al., 1998).

En *Arabidopsis thaliana* existen varios genes homólogos que codifican miembros de las diferentes subfamilias de las snakins. Un mutante de inserción de T-DNA en uno de estos genes ha sido aislado en nuestro laboratorio. Se presentarán los últimos resultados del estudio y caracterización de este mutante, y del patrón de expresión de las snakins de *A. thaliana* en respuesta a la infección por patógenos.

Referencias

- Broekaert, W. et al. (1995). *Plant. Physiol.* 108:1353-1358.
- García-Olmedo et al., (1998). *Biopolymers-Peptide Sci.*, 47: 479-494.
- García-Olmedo, F. et al.(1992). *Genes involved in Plant Defense*. Boller and Meins eds. *Plant Gene Research Series*. Springer-Verlag. pp:283-302.
- García-Olmedo, F. et al.(1995). *Trends Microbiol.* 3:72-74.
- López-Solanilla, E. et al.(1998). *Plant Cell*, 10: 1903-1914.
- Segura, A. et al.(1998). *FEBS Lett.* 435: 159-162.
- Segura, A. et al.(1999). *Mol Plant Microbe Interact.* 12: 16-23.

LA EXPRESIÓN DE UN GEN INDUCIDO POR PATÓGENOS PUEDE SER MIMIFICADA POR UNA INSENSIBILIDAD A AUXINAS

Mayda, E., Marqués, M.C., Conejero, V., y Vera, P.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Camino de Vera s/n, 46022-Valencia, España.

Las plantas superiores han desarrollado un sinnúmero de mecanismos de defensa frente al ataque de patógenos. Algunos de estos mecanismos se encuentran presentes permanentemente en la planta; sin embargo, otros se activan de forma específica tras la percepción de un insulto patogénico dando lugar a la activación de un gran número de genes relacionados con la patogénesis, desde los que codifican PRs hasta fitoalexinas o peroxidasas, que en última instancia van a contribuir a la reducción de la expansión del patógeno por la planta. Uno de estos genes, que codifica una peroxidasa aniónica de tomate, llamado CEVI-1, tiene un patrón de expresión característico, pues se induce durante el curso de infecciones virales y subvirales compatibles, pero al contrario de lo que ocurre con otros genes relacionados con la defensa, no se encuentra inducido en interacciones incompatibles ni por moléculas señalizadoras tal como el ácido salicílico, etileno o metil jasmonato. Asimismo, su expresión tampoco es inducida por heridas realizadas en las hojas, sin embargo, sí que se induce en tejido foliar separado de la planta o puesto en flotación. Plantas de tomate, *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana* transformadas con el promotor de CEVI-1 fusionado a GUS mostraron el mismo patrón de expresión característico de CEVI-1. Se han aislado mutantes de *A. thaliana*, denominados *dth*, que expresan constitutivamente este gen. La existencia de varios elementos *cis* de respuesta a auxinas (AuxRE) en el promotor de CEVI-1, y el hecho de que alguno de estos mutantes *dth* presenten defectos en la percepción de auxinas parece indicar que durante las infecciones sistémicas con virus, la homeostasis de auxinas es uno de los componentes que participa en la regulación de las respuestas defensivas.

UTILIZACIÓN DEL GEN njjs46 DE FRESA (*Fragaria x ananassa* c.v. Chandler) QUE CODIFICA UNA PROTEINA DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS (LTP) EN MECANISMOS DE DEFENSA DEL FRUTO A PATÓGENOS

Yubero-Serrano, E.M., Moyano, E., Muñoz Blanco, J., y Caballero, J.L.*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Instituto Andaluz de Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba. 14001-Córdoba.
*E-mail: bb1carej@seneca.uco.es

La fresa representa en España ingresos próximos a los 50.000 millones de pesetas/año. Entre el 5-25% de la producción se pierde debido al reblandecimiento del fruto y a las infecciones producidas por patógenos. Hemos aislado dos cDNAs de fresa (njjs26 y njjs46) que codifican LTPs, descritas como proteínas implicadas en procesos de defensa frente a patógenos en otras plantas. El cDNA njjs46 se ha utilizado como sonda para estudiar el patrón de expresión del gen y su expresión espacial en el fruto mediante hibridación "in situ". Los resultados demuestran expresión de este gen en células epidérmicas de receptáculo del fruto y aquenios, así como en el interior de éstos, en la capa de células indiferenciadas que rodea al endospermo y embrión. A partir de estos resultados se ha diseñado una estrategia biotecnológica de defensa de la fresa frente a patógenos. En este sentido el cDNA de este gen se ha utilizado como sonda para clonar el gen completo a partir de una genoteca genómica de fresa. Actualmente se están realizando experimentos de expresión temporal mediante biobalística para determinar las secuencias cis reguladoras. En paralelo se están realizando construcciones con el promotor del gen njjs46 para la expresión dirigida de genes homólogos o heterólogos de *Trichoderma* implicados en mecanismos de defensa a determinados patógenos de la fresa. Estas construcciones se utilizarán en la obtención de plantas transgénicas de fresa que se espera estén mejoradas en su resistencia a patógenos. Financiado por la CICYT, proyecto ALI97-0836-CO-03 y Grupo Junta de Andalucía CVI115 y FEDER 1FD97-0843-CO5-03.

SOBREEXPRESION DE LA PROTEINA CENTRINA EN PLANTAS TRANSGÉNICAS LIMITA LA MUERTE CELULAR CARACTERISTICA DE UNA REACCIÓN HIPERSENSIBLE

Piqueras, R.¹, García-Luque, I.², Serra, M.T.², Castresana, C.¹

¹Centro Nacional de Biotecnología, CSIC; Campus de Cantoblanco, Madrid 28049.

²Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC; Velazquez 144, Madrid 28006.

Como parte del proceso adaptativo frente al ataque patogénico, las plantas han desarrollado una amplia variedad de respuestas de defensa, entre las que cabe destacar la reacción hipersensible desarrollada en las interacciones incompatibles. Mediante la técnica del "differential display" identificamos un DNA de *Arabidopsis thaliana*, designado *ap33A*, cuya expresión se inducía tras la infección con la bacteria incompatible *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (147). La secuencia de DNA completo codifica para una proteína con elevada homología con proteínas centrinas de distintos organismos. La expresión del gen *ap33A* se induce en respuesta a la infección con bacterias tanto incompatibles como compatibles, siendo más rápida la inducción en el primer tipo de interacción. Además, la expresión del gen *ap33A* se induce en respuesta al tratamiento con ácido salicílico, y con compuestos inductores de la síntesis de especies de oxígeno activo. El papel de la proteína AP33A en la respuesta de defensa vegetal se investigó en plantas transgénicas de tabaco y *Arabidopsis* en las que la expresión del cDNA *ap33A* está dirigida por las secuencias reguladoras del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. El análisis de la respuesta de las plantas transgénicas obtenidas, frente a la infección por bacterias, virus y hongos, compatibles e incompatibles con los ecotipos y variedades usados, así como en respuesta al tratamiento con un compuesto inductor de la síntesis de especies de oxígeno activo, reveló que el número de células necrosadas tras los tratamientos citados, era significativamente menor en las plantas transgénicas que en las plantas control sin transformar. Las plantas de tabaco resultaron, además, protegidas frente a la infección por el virus CMV, compatible con la variedad de tabaco usada.

ISOLATION OF DISEASE RESISTANCE GENE ANALOGS IN PEPPER

Egea-Gilabert, C.¹, Dickinson, M.J.², Candela, M.³, and Candela, M.E.¹

¹Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, SPAIN.

²School of Biological Sciences, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD, U.K. ³Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid. SPAIN.

Plant resistance to particular pathogens involves specific recognition events (Baker et al., 1997). These resistance reactions are race-specific and triggered by corresponding (R) genes in the host and avirulence (*Avr*) genes in the pathogen. Resistance mechanisms operate in both major classes of flowering plants, dicots and monocots. To date, the isolation of resistance genes has required the difficult and complex procedures of map-based cloning and/or transposon tagging. Polymerase chain reaction (PCR) is one method that may allow a more efficient means of isolating further resistance genes. In recent studies, PCR primers based on short stretch of amino acids conserved among NBS-LRR (putative nucleotide binding site-leucine rich repeats) resistance proteins were used to amplify resistance gene-like sequences from soybean, *Arabidopsis thaliana* and maize (Kanazin et al., 1996; Aarts et al., 1998; Collins et al., 1998).

We have used oligonucleotide primers based on conserved motifs in and around the NBS of known NBS-LRR resistance proteins to amplify sequences from pepper genomic DNA by PCR. PCR products were purified, cloned and sequenced. Five of these clones resembled part of R genes in that they contain internal signature motifs present in the others NBS-LRR class of R genes. Furthermore a BLAST search of the GenBank database with each of these sequences has revealed strong associations with several R genes, and these clones have been tentatively classified as RGAs (resistant gene analogs).

We are now developing an AFLP (amplified fragment-length polymorphism)-based strategy to characterise and map these sequences so those specific resistance genes can be isolated.

Aarts M.G.M., te Lintel Hekkert, B., Holub, E.B., Beynon, J.L., Stiekema, W.J. & Pereira, A. (1998). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 251-258.

Collins, N.C., Webb, C.A., Seah, S., Ellis, J.G., Hulbert, S.H. & Pryor, A. (1998). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 968-978.

Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. & Dinesh-Kumar, S.P. (1997). *Science* 276: 726-733.

Kanazin, V. Marek, L.F. & Shoemaker, R.C. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11746-11750.

CARACTERIZACION MOLECULAR DE UN AISLADO DEL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CITRICOS (CEVd) QUE INDUCE UNA REACCION SUAVE EN *GYNURA AURANTIACA*

Chaffai, M.¹, Hernández, C.², Flores, R.², y Durán-Vila, N.¹

¹Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apartado Oficial, 46113 Moncada, Valencia).

²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera 14, 46022 Valencia.

El estudio de las propiedades biológicas de una serie de aislados de campo del CEVd permitió identificar uno que provoca una reacción atípica en *Gynura aurantiaca* caracterizada por el marchitamiento y necrosis de las hojas apicales y por un enanismo muy suave. Dicho aislado (CEVd-129) induce también protección frente a la inoculación posterior con aislados agresivos del mismo viroide. Estudios de hibridación con impresiones de tejido de *G. aurantiaca* infectado con el aislado CEVd-129 o con otro agresivo (CEVd-s), mostraron que no existen diferencias en los perfiles de movimiento de los correspondientes RNAs aunque CEVd-129 se acumula en concentraciones inferiores a las de CEVd-s. Mediante una estrategia de RT-PCR, se sintetizaron cDNAs del aislado CEVd-129 que se ligaron al vector pUC18. Los insertos de los clones obtenidos se amplificaron por PCR y se sometieron a análisis conformacional del DNA monocatenario (SSCP), lo que permitió realizar una primera estimación de la variabilidad e identificar aquellos clones con las secuencias más frecuentes. Una comparación de la secuencias de clones del aislado CEVd-129 con la secuencia de referencia CEVd-JA, derivada de un aislado agresivo en tomate, mostró la existencia de cambios nucleotídicos en los dominios P y V (cadenas inferior y superior) y en el dominio C (cadena inferior). Los cambios identificados como característicos de CEVd-129 son similares a los descritos anteriormente en aislados que incitan una reacción suave en tomate. Clones infecciosos de distintas variantes de secuencia del aislado CEVd-129 indujeron síntomas suaves en *G. aurantiaca* y en tomate, indicando que la modulación de la virulencia del CEVd en ambos huéspedes está determinada por los mismos motivos de secuencia.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE ADNc CORRESPONDIENTES A ARNmS INDUCIDOS DE MANERA DIFERENCIAL EN LA INTERACCION *Spilocaea oleagina*-olivo

Benítez Alonso, Y., Caballero, J.L., y Muñoz Blanco, J.

Spilocaea oleagina es un hongo biotrófo específico de *Olea europea* (olivo y acebuche) causante de la enfermedad conocida como "repilo" del olivo y que se caracteriza por una defoliación severa del mismo. Con el objetivo de contribuir a esclarecer los mecanismos moleculares involucrados en la interacción planta-patógeno, hemos procedido a aplicar la técnica de DDRT-PCR en la interacción entre *S. oleagina* y olivo. Para ello, se compararon las poblaciones de ARNm de hojas jóvenes no inoculadas con el patógeno frente a los ARNm de hojas jóvenes inoculadas y que presentaban síntomas de la enfermedad (aproximadamente 3 semanas post-inoculación). Se utilizaron combinaciones de cebadores anclados y arbitrarios que garantizaban la cobertura de un 50% de la población de ARNm. Mediante el análisis informático de las secuencias de los fragmentos aislados se han podido identificar los genes correspondientes (genes homólogos a: BPF-1; ligno estilbeno sintasa, protein disulfuro isomerasa, chalcona isomerasa, tubulina, calnexinas, etc) . Los análisis de expresión para alguno de ellos indican una expresión diferencial clara. Se discute la implicación de estos genes en los cambios moleculares que se producen en la interacción entre *S. oleagina* y olivo.

CARACTERIZACION DE PLANTAS MUTANTES ALTERADAS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL

Moreno, J.I., Martín, R., y Castresana, C.

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

Con objeto de identificar nuevos elementos reguladores implicados en la activación de la respuesta de defensa vegetal, hemos procedido a identificar plantas mutantes de *A. thaliana* alteradas en la ruta de señalización que controla la inducción de los genes de defensa. Una parte de las plantas mutantes identificadas desarrollan, en ausencia de patógenos, lesiones que imitan a las producidas en una infección natural, y presentan activación de distintos genes de defensa, por lo que se denominaron *dge*, del inglés *defence gene expressers*. Los análisis genéticos de las diversas líneas examinadas revelaron la naturaleza recesiva de las mutaciones y el carácter no alélico de todas ellas.

El mutante *dge2* presenta lesiones de tipo HR que progresan desde su iniciación en forma de clorosis. Estas plantas muestran activación de genes cuya expresión está mediada por moléculas señalizadoras tales como SA (PR-1 y PR-2), JA (LOX2) y etileno (ATHCHIB). Esta mutación ha sido mapeada en el cromosoma 3, en la región comprendida entre los marcadores AP3 y Cds4.

Las plantas de la línea *dge4* se caracterizan por presentar pequeños puntos necróticos de crecimiento limitado. A diferencia de lo que ocurre en una interacción planta-patógeno, en la que la activación del gen PR-2 se asocia a la presencia de síntomas de infección, en el mutante *dge4* la expresión de este gen se encuentra inactivada, incluso después del tratamiento con ácido salicílico. La mutación *dge4* mapea en el cromosoma 2 delimitada por los marcadores nga 1145 y nga 1126.

La localización cromosómica de las mutaciones *dge2* y *dge4* es distinta de la determinada para otros mutantes con características similares previamente descritos.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *MsPG3*, EL PRIMER GEN CON ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA IMPLICADO EN LA INTERACCIÓN *RHIZOBIUM*-LEGUMINOSA

Pérez-Hormaeche, J., Coronado, C., Muñoz, J.A., Rodríguez-Llorente, I.D., Dary, M., Caviedes, M.A., y Palomares, A.J.

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

La poligalacturonasa (PG) es una de las principales enzimas asociadas a la degradación de la pared celular en plantas. Nuestra hipótesis de trabajo sostiene que la PG y otras enzimas pectinolíticas de la planta poseen un papel fundamental en las etapas tempranas de la interacción *Rhizobium*-leguminosas. Mediante RT-PCR hemos identificado la expresión en el género *Medicago* de dos clases diferentes de genes de PG, representadas por secuencias parciales de cDNA amplificadas a partir de plantas de *M. truncatula* y *M. sativa*. La primera clase se corresponde con una pequeña familia génica de PGs que se expresan durante el desarrollo y la germinación del polen. La otra clase de PG identificada se corresponde con el gen *MsPG3*, un gen de copia única de *Medicago* que se expresa en raíces de alfalfa en presencia de la bacteria. Mediante RT-PCR hemos demostrado la inducción de su expresión en raíces de alfalfa tras la inoculación con *Sinorhizobium meliloti*. La temprana inducción de *MsPG3* en la simbiosis también se detectó mediante experimentos de hibridación in situ en los que se analizó el patrón espacial de expresión asociado al desarrollo del nódulo. La ausencia de transcritos de *MsPG3* en otros órganos de *Medicago* relaciona estrechamente su función con la simbiosis. Los resultados obtenidos sugieren la implicación de *MsPG3* en los primeros estadios de la nodulación, durante la formación del meristemo y en el proceso de infección. La PG podría facilitar la entrada de la bacteria a través de la pared celular del pelo radical, participando también en la formación del cordón de infección y en la liberación de las bacterias en las células del nódulo.

PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN DE POLIGALACTURONASA *MsPG3* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Medicago truncatula*

Rodríguez-Llorente, I.D., Dary, M., Ratet, P.*, Trinh, T.H.*, Kondorosi, A.*, Caviedes, M.A. y Palomares, A.J.

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

*Institut des Sciences Vegetales. CNRS. Gif-sur Yvette. Francia.

Recientemente hemos aislado y caracterizado el gen *MsPG3* que se expresa en raíces y nódulos de alfalfa. Se han obtenido nódulos transgénicos de *Vicia hirsuta* que contienen el promotor de *MsPG3* fusionado al gen de la β -glucuronidasa. El análisis de estos transgénicos heterólogos ha demostrado que *MsPG3* se expresa en primordios nodulares y en la zona de invasión del tejido nodular. Para analizar el patrón de expresión de *MsPG3* en el sistema homólogo de *Medicago truncatula*, se han transformado mediante un nuevo protocolo, plantas con un fragmento de 2.7kb de *MsPG3* que contiene el promotor fusionado al gen *gus*. Este protocolo permite la obtención de plantas transgénicas en un periodo de tres meses y con una elevada eficacia de regeneración. Para hacer un análisis de delección de la región promotora se han utilizado cinco fragmentos de *MsPG3* que contienen 600, 413, 306, 205 y 92 pares de bases fusionadas al gen *gus* y también se han utilizado para transformar *M. truncatula*. Se han regenerado 35 plantas transgénicas de *M. truncatula* que contiene el promotor completo y de 10 a 15 plantas con cada una de las delecciones mencionadas. Se ha analizado la expresión de T0 y T1 de estas plantas en cuanto a la expresión de *gus*. En orden a bloquear la expresión de *MsPG3* endógeno se han transformado plantas de *M. truncatula* con otras dos construcciones. Un fragmento de 800 pb de cDNA de *MsPG3* se clonó en sentido y antisentido bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en un vector binario. Estas plantas pueden ayudar a entender el papel que juega este gen en el proceso simbiótico.

LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA MSPG3 MEDIANTE EXPRESIÓN TRANSITORIA Y OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Medicago truncatula*

Rodriguez-Llorente, I.D., Pérez-Hormaeche, J., Dary, M., Kondorosi, A.*, Ratet, P.*, Caviedes, M.A., y Palomares, A.J.

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

*Institut des Sciences Vegetales. CNRS. Gif-sur Yvette. Francia.

Se ha postulado que las poligalacturonasas (PGs), enzimas pectinolíticas fundamentales en diversos procesos de degradación de la pared celular en plantas, podrían participar activamente en las primeras etapas de la interacción *Rhizobium*-leguminosa. Nuestro grupo ha aislado y caracterizado un gen de *Medicago sativa*, *MsPG3*, que codifica una PG inducible en raíces inoculadas con *Rhizobium*. La inducción temprana del gen y la localización espacial de su ARNm sugieren un papel específico de la PG en la invasión bacteriana de los tejidos simbióticos y en la formación del primordio nodular. Con objeto de determinar la localización celular y subcelular de la proteína MSPG3, se han construido fusiones traduccionales de distintos fragmentos del gen *MsPG3* a la *gfp* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La presencia de un péptido señal en todas las poligalacturonasas vegetales descritas parece indicar un mecanismo común de síntesis, en el retículo endoplasmático, y de transporte extracelular. La presencia o ausencia del péptido señal en estas fusiones puede ser de utilidad para demostrar la funcionalidad del mismo *in vivo*. Asimismo, se ha estudiado el posible papel regulador de secuencias comprendidas en el primer intrón de *MsPG3* y en la región 3' no codificante del gen, incluyendo dichas secuencias en fusiones traduccionales y transcripcionales a los genes informadores *gfp* y *gus*. Todas estas construcciones y los correspondientes controles se utilizaron tanto en experimentos de expresión transitoria por bombardeo de diferentes sistemas vegetales como en la obtención de plantas transgénicas de *Medicago truncatula*.

ALTERACIONES EN LA CAPACIDAD NODULANTE Y FIJADORA DE N₂ EN ISOLINEAS MUTAGENIZADAS DE *Lupinus* sp. Y *Cicer arietinum*

Chamber Pérez, M.A., Liró Hernández, L., y Carrión Rodríguez, A.

Consejería de Agricultura y Pesca. Dirección General de Investigaciones Agrarias. C.I.F.A. "Las Torres", Dpto. Fijación de Nitrógeno. Apdo. Oficial, Alcalá del Río, 41200, Sevilla.

Mediante mutagenización química (EMS y NaN₃) y rayos γ se han logrado obtener isolíneas alteradas en sus potenciales simbióticos, tanto en cuanto a la producción de masa nodular como en la eficiencia fijadora del N₂ atmosférico. Tras el tratamiento y selección sobre un total superior a las 10,000 plantas, poseemos en la actualidad líneas en generaciones M₄ a M₆ de los siguientes tipos de mutantes: No-nodulantes, ineficientes, hipernodulantes, supereficientes y nitrato-resistentes.

Las líneas no-nodulantes presentan gran interés para trabajos tales como evaluación de las tasas de fijación simbiótica mediante técnicas isotópicas, en lugar de utilizar como controles cereales u otras especies no-fijadoras, según se ha venido haciendo hasta ahora; de este tipo hemos conseguido hasta la fecha 4 mutantes de altramuces y 1 de garbanzos. Dentro de esta categoría de mutantes hemos de incluir aquellas formadoras de pseudonódulos y/o nódulos escasos y pequeños; muy útiles en estudios relacionados con los procesos de reconocimiento *Rhizobium*-leguminosa, infección y desarrollo nodular; se han obtenido 3 mutantes de altramuz y 4 en garbanzos.

Las mutantes ineficientes se caracterizan por alteraciones en algún paso del proceso de fijación, que reduce la productividad de la leguminosa, sin que por ello se haya visto modificada su masa nodular; poseemos 11 isolíneas de *Lupinus* y 8 de *Cicer*.

Las plantas hipernodulantes tienen la facultad de desarrollar una abundante nodulación, significativamente superior a las de sus respectivos patrones, pues, parece haberse alterado el proceso de autoregulación natural, sin que ello se traduzca necesariamente en unos mayores rendimientos de materia seca, salvo en casos excepcionales (Altramuz = 4 y garbanzo = 6). Por otro lado, las supereficientes originan altos rendimientos con masas nodulares similares a las de los cultivares de procedencia (Altramuz = 5 y garbanzo = 7).

Finalmente, las resistentes a nitratos se muestran insensibles a dosis elevadas de éstos en el medio de crecimiento (más de 5mM N), pudiendo, por tanto, nodular y fijar N₂ en cantidades equivalentes a las originadas en ausencia de nitratos (Altramuz = 5 y garbanzo = 3).

Desde un punto de vista ecológico y agronómico, pensamos que los grupos de isolíneas mutagenizadas, que más valor pueden tener para su futura comercialización son las supereficientes y las nitrato-resistentes, porque cada uno de ellos viene a resolver una problemática que tienen planteadas las leguminosas tradicionalmente, tales son sus bajas producciones frente a otras especies anuales, y su sensibilidad a los nitratos que contaminan los terrenos y acuíferos en la actualidad.

Fitopatógenos

COMPLEMENTACIÓN DEL MOVIMIENTO VIRAL EN EL TOBAMOVIRUS DEL MOSAICO DE LA COLZA (ORMV)

Mansilla Mansilla, C., Sánchez Sánchez, F., Aguilar Pastor, I., y Ponz Ascaso, F.

INIA. Autopista A-6, Km 7. Madrid.

Los tobamovirus son virus vegetales de genoma RNA (+) cuyo genoma posee capacidad codificante para al menos cuatro proteínas diferentes en los huéspedes adecuados. Una de estas proteínas es la proteína MP, o del movimiento viral, que se sintetiza en la célula infectada a partir de un mRNA subgenómico. El tamaño molecular de esta proteína varía ligeramente entre los distintos tobamovirus estudiados, estando en torno a 30kD. La MP de tobamovirus mejor caracterizada es la del virus del mosaico del tabaco (TMV). En éste y otros tobamovirus la MP se requiere para completar la infección local (hoja inoculada) y la infección sistémica, lo que indica la importancia de esta proteína en el establecimiento de la infección en una planta huésped. Nosotros estamos caracterizando la funcionalidad de la MP del virus del mosaico de la colza (ORMV), un tobamovirus que infecta plantas crucíferas, entre ellas la planta modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*. En esta comunicación se presentarán los resultados relativos a la complementación en trans del movimiento de un ORMV defectivo para esta función en dos huéspedes distintos y se discutirán las posibles implicaciones de las diferentes situaciones obtenidas en los distintos sistemas estudiados.

VARIABILIDAD NATURAL EN LA INTERACCION *Arabidopsis-erwinia*

Aguilar, I., Alamillo, J.M., García-Olmedo, F., y Rodríguez-Palenzuela, P.

Departamento de Biotecnología. E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid

Las plantas se defienden del ataque de los patógenos mediante una serie de mecanismos integrados en una compleja red de defensa. Las distintas rutas se activan de forma diferencial según la naturaleza del patógeno. Estas rutas pueden ser dependientes de ácido salicílico (SA) o SA-independientes, estando otros compuestos como ácido jasmónico o etileno implicados. Las bacterias pectolíticas del género *Erwinia* constituyen un grupo importante de patógenos vegetales que causan podredumbres blandas en numerosas especies cultivadas. Puesto que las características patogénicas de estas bacterias parecen ser muy diferentes a las de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* es posible que las plantas utilicen otros mecanismos de defensa diferentes a los descritos. En plantas de tabaco infectadas con *Erwinia carotovora* se ha demostrado que la activación de mecanismos de defensa es independiente de ácido salicílico, pudiendo producirse por rutas alternativas en las que el jasmónico y el etileno estarían implicados. Con el fin de estudiar la respuesta de la planta a la infección por *Erwinia carotovora*, estamos utilizando distintos ecotipos de *Arabidopsis thaliana*. Para analizar diferencias en el sitio de infección hemos transformado la bacteria con un plásmido que contiene la proteína verde fluorescente (pEGFP), lo que permite seguir la infección in planta. A nivel molecular hemos analizado la expresión de distintos genes implicados en reacciones de defensa (GST, PAL, PR-1, defensinas y tioninas). Las diferencias encontradas entre los distintos ecotipos sugieren la activación de distintas rutas de defensa. Este sistema nos permitirá conocer los aspectos genéticos y moleculares responsables de la interacción entre erwinias pectolíticas y la planta.

IDENTIFICACIÓN DE GENES BACTERIANOS DE *Erwinia chrysanthemi* QUE SE EXPRESAN ESPECIFICAMENTE EN PLANTA

Aguilar, I., Poza-Carrión, C., García-Olmedo, F., y Rodríguez-Palenzuela, P.

Departamento de Biotecnología. E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.

En la planta y durante el proceso de infección, las bacterias fitopatógenas están expuestas a condiciones ambientales que varían constantemente. La habilidad de las fitobacterias para adaptarse rápidamente a estas condiciones es crucial para su supervivencia en el huésped. Los sistemas *in vitro*, por tanto, no siempre permiten una reconstrucción exacta de lo que ocurre en la interacción bacteria-huésped, demostrándose que los procesos de infección son regulados y estimulados por factores del huésped *in vivo*. Recientemente se han desarrollado un gran número de técnicas en genética bacteriana que permiten la identificación y posterior análisis también *in vivo* de factores implicados en patogénesis. *Erwinia chrysanthemi* pertenece al grupo de bacterias pectolíticas causantes de podredumbres blandas y responsables de importantes pérdidas económicas. Con el fin de analizar factores bacterianos inducidos *in vivo* estamos empleando un método basado en la mutagénesis al azar del genoma de *erwinia* con un minitransposón que a su vez contiene un gen delator GUS sin promotor. De 5000 posibles mutantes analizados hemos obtenido 30 mutantes "inducidos" en discos de endivia. Estos mutantes están siendo caracterizados mediante secuenciación parcial y análisis de fenotipo. Con esta aproximación se pretende identificar nuevos componentes que contribuyan a la virulencia de *erwinias* pectolíticas, analizar *in vivo* el modelo de expresión espacio-temporal y estudiar la regulación en planta de los nuevos factores de patogenicidad.

TIPIFICACION MOLECULAR DE CEPAS DE *Brenneria (Erwinia) quercina* AISLADAS EN DIVERSAS MASAS FORESTALES DE *Quercus* DE LA PENINSULA IBERICA

Poza-Carrión, C.¹, Aguilar, I.¹, López, M.M.², González, R.², García-Olmedo, F.¹ y Rodríguez-Palenzuela, P.¹

¹ Departamento de Biotecnología-UPM, ETS Ingenieros Agrónomos, E-28040 Madrid.

² Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias IVIA, 46113 Valencia.

A partir de los años 80, se han observado en España daños en bosques de encina, alcornoques y otras especies del género *Quercus* con variada sintomatología, que se agrupó bajo la denominación de seca de las quercíneas. En muchos casos se observa la aparición de chancros sangrantes y exudaciones en bellotas y yemas que afectan al desarrollo de los árboles. Este problema se ha detectado en diversas masas forestales de *Quercus* en Aragón, Castilla-La Mancha, Castilla-León, Extremadura, Madrid y C. Valenciana, lo que ha permitido construir una colección de aislados bacterianos procedentes tanto de chancros como de exudados de *Quercus ilex* y *Quercus pyrenaica*. La mayoría de los aislados, que fueron previamente identificados mediante técnicas convencionales y serología han sido caracterizados positivamente como *Brenneria (Erwinia) quercina* utilizando el sistema BIOLOG, para la identificación de bacterias. La caracterización bioquímica y serológica no ha permitido observar más que un aislado distinto de los demás estudiados.

Con el fin de conocer la diversidad genética que presentaban nuestros aislados, tanto intra como inter específica, se empleó un método más sensible, basado en la existencia de secuencias repetidas en el genoma bacteriano del tipo ERIC, BOX y REP. Mediante el empleo de cebadores específicos de dichas regiones, se amplifican fragmentos de ADN con tamaños muy dispares. Se obtiene de esta forma un perfil genético que nos permitirá contestar a diversas preguntas de interés epidemiológico, tales como: ¿cuánta diversidad genética se observa en los aislados españoles?, ¿se observa correlación entre distancia genética y geográfica?, o ¿se observa especificidad de huésped?. También permitirá desarrollar métodos moleculares de diagnóstico de esta especie en material vegetal, para utilizarlos en estudios epidemiológicos de la enfermedad que produce esta bacteria.

COMPLEJOS ENTRE UN VIROIDE Y PROTEINA(S) DE LA PLANTA HUESPED FORMADOS POR IRRADIACION CON LUZ ULTRAVIOLETA

Darós, J.A., y Flores, R.

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

Los viroides son un grupo de patógenos de plantas constituidos por un pequeño RNA circular con un elevado contenido en estructura secundaria. La molécula de RNA no codifica ninguna proteína por lo que para completar su ciclo biológico, los viroides necesitan interactuar con factores del huésped. Mediante estudios de irradiación con luz ultravioleta (UV) y análisis por hibridación Northern se ha puesto de manifiesto una interacción directa entre el viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd) y una proteína(s) de la planta. Hojas de plantas de aguacate infectadas por el ASBVd se irradiaron con dosis crecientes de luz UV. A continuación, extractos foliares se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y los RNAs viroidales se analizaron por hibridación Northern. En los extractos de hojas irradiadas se observó la aparición de una nueva banda, retrasada con respecto a la posición que ocupa el monómero circular del ASBVd, cuya concentración aumentó con la dosis de luz UV en un cierto intervalo. La banda desapareció cuando los extractos, previamente al análisis por hibridación Northern, se fraccionaron con fenol, lo que sugiere que se trata de un aducto RNA-proteína. Otro indicio en este sentido es que la incubación con proteinasa K degradó el aducto sin afectar al resto de RNAs viroidales. Estos resultados muestran que el análisis del entrecruzamiento entre RNAs y proteínas promovido por la acción de luz UV es una aproximación adecuada para identificar proteínas del huésped que interactúan con los RNAs viroidales.

DETECCIÓN DE *Erwinia amylovora*, AGENTE CAUSANTE DEL FUEGO BACTERIANO, MEDIANTE NESTED-PCR EN UN TUBO

Llop, P.¹; Bonaterra, A.²; López, M.¹

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apdo Oficial. 46113 Moncada, (Valencia), Spain.

²Instituto de Tecnología Agroalimentària. Lab. de Producción Vegetal. Universitat de Girona. Av. Lluís Santaló, s/n 17071 Girona, Spain.

Erwinia amylovora, bacteria responsable del fuego bacteriano de las rosáceas, es un patógeno de cuarentena en la UE. Se ha puesto a punto un método de detección de esta bacteria en material vegetal basado en una nested PCR en un solo tubo, para obtener la máxima sensibilidad sin el riesgo de contaminaciones potenciales debidas a los amplicones. Se han empleado como iniciadores externos los diseñados a partir del plásmido PEa29 para una nested PCR estándar (en dos tubos) y se ha diseñado una pareja interna. La separación de las dos reacciones de PCR se consiguió con diferentes temperaturas de unión de los iniciadores. Con cultivos puros de *E. amylovora* el método de nested en un tubo alcanzó una sensibilidad similar a la de la nested PCR en dos tubos. La especificidad y sensibilidad fueron mejores que las de las PCR convencionales. La presencia de sustancias inhibitoras en material vegetal, muy comunes en los huéspedes de esta bacteria, se eliminó con este sistema al utilizar volúmenes de muestra de 1 µl. Con 131 muestras de material infectado, este método alcanzó mayor eficiencia en la detección que ningún otro sistema de PCR: PCR estándar 42,7% de muestras positivas, nested PCR en dos tubos 57,2%, nested en un solo tubo 70,2%. Cuando se analizaron comparativamente muestras asintomáticas procedentes de áreas infectadas, también este nuevo método fue el mejor, comparándolo con los protocolos de PCR citados anteriormente (26,4%, 30,9% y 55,8% positivos de 68 muestras analizadas, respectivamente). Se propone este método para su uso rutinario en prospecciones de cuarentena y para la detección de poblaciones endofitas y epifitas de *E. amylovora* en estudios epidemiológicos, debido a su alta sensibilidad, especificidad, rapidez y simplicidad.

Otras comunicaciones

MEJORA MOLECULAR EN MELÓN: EL CASO DE LA RESISTENCIA GENÉTICA A MNSV

Noguera, J., Capel, J., y Lozano, R.

Dpto. de Biología Aplicada (Lab. de Genética y Mejora), Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería, 04120 Almería.

Una estrategia basada en el análisis masal de poblaciones segregantes (*Bulk Segregant Analysis*) nos ha permitido identificar y mapear cuatro marcadores moleculares ligados al gen *nsv*, el cual confiere resistencia al virus del moteado necrótico del melón (MNSV). Para el marcador *cri1*, tan sólo se ha detectado un individuo recombinante, lo que revela una corta distancia genética entre ambos loci (0,9 cM). A partir de estos resultados se han diseñado nuevos "bulks" al objeto de reducir la región cromosómica cercana al gen *nsv* y localizar nuevos marcadores más estrechamente ligados que *cri1*, empleando en este caso marcadores altamente polimórficos como son los AFLP. El análisis con más de 60 combinaciones de cebadores ha llevado a la identificación de 6 nuevos marcadores ligados al locus *nsv*, uno de ellos de naturaleza codominante. Las distancias genéticas establecidas por el momento son iguales o menores a la ya conocida, y en algunos casos, la ausencia de individuos recombinantes en la población de mapeo hace pensar en distancias de ligamiento muy cercanas al gen de interés, e incluso en la posibilidad de marcadores intragénicos. Además, el hecho de disponer de marcadores a ambos lados del gen de interés permite, por una parte, una mayor eficacia en los programas de retrocruzamiento destinados a introgresar *nsv* en líneas parentales de híbridos, y por otra, ofrece nuevas posibilidades para clonar dicho gen en base a la información posicional.

IDENTIFICACIÓN DE VARIEDADES DEL GÉNERO *Prunus* MEDIANTE MARCADORES AFLP

Balaguer, B., Aznar, R.*, y Lorences, E.P.**

Comercial Técnica y Viveros, S.A. (COTEVISA), L'Alcudia (Valencia).

*Dpto. Microbiología, Fac. CC. Biológicas, Univ. de Valencia.

**Dpto. Biología Vegetal, Fac. CC. Biológicas, Univ. de Valencia.

La diferenciación de 27 variedades frutícolas del género *Prunus* pertenecientes a 3 especies (*P. persica*, *P. salicina* y *P. domestica*) ha sido abordada mediante la técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic). Dicha técnica consiste en: i) la doble restricción de los DNAs, en este caso con los enzimas *EcoRI* y *MseI*, ii) ligación a adaptadores de DNA de secuencia conocida, iii) amplificación con cebadores dirigidos a los adaptadores, iv) separación y detección de los fragmentos amplificados mediante secuenciador capilar. Los cromatogramas correspondientes a las variedades estudiadas se registraron y analizaron mediante el programa de análisis de imagen GelCompar, creándose un banco de datos para estas variedades. De las 16 combinaciones de cebadores ensayadas se seleccionaron 3 que permitieron la diferenciación de 25 de las 27 variedades ensayadas. El análisis de agrupamiento sobre los resultados de los 3 cebadores con el método de asociación UPGMA sobre las matrices de similitud calculadas con el coeficiente de Dice mostró 3 grupos formados al 83% de similitud, correspondientes a las 3 especies analizadas, siendo *P. persica* la especie que presenta mayor similitud genética entre variedades. Los resultados obtenidos indican que la técnica AFLP posibilita la diferenciación de variedades del género *Prunus*, y la creación de un banco de datos con los patrones AFLP permite realizar el control de origen de las variedades analizadas e identificar nuevas variedades.

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD INTRAVARIETAL EN LA VARIEDAD DE VID "ALBILLO" BASADO EN EL EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES AFLP

Cabezas, J.A.^{1,2}; Cervera, M.T.^{1,2}; Rodríguez, I.³; Cabello, F.³; Martínez-Zapater, J.M.^{1,2}

¹Departamento de Genética Molecular de Plantas. Centro Nacional de Biotecnología, CSIC. Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid.

²Departamento de Mejora Genética y Biotecnología, SGIT, INIA. Ctra. de la Coruña Km 7,5. 28049 Madrid.

³Sección de Viticultura y Enología, Finca El Encín, IMIA, Alcalá de Henares (Madrid).

El Albillo es una de las variedades de vid más antiguas de España, con un uso bivalente, para consumo en fresco y para vinificación. Existen descripciones de la variedad Albillo desde el siglo XIV. Sin embargo, el conocimiento sobre su origen y variabilidad genética es pobre, y lo complica el hecho de que con la denominación Albillo se designa, en distintas regiones, a diferentes variedades. El objetivo de este trabajo es analizar muestras pertenecientes a la variedad Albillo y sinonimias descritas históricamente. Para ello se estudió mediante la técnica AFLP el ADN de 28 entradas de material vegetal del Banco de Germoplasma de "El Encín", perteneciente al Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA). Mediante la utilización de dos combinaciones de cebadores se analizaron un total de 199 bandas, 110 de las cuales (el 55 %) resultaron ser polimórficas. El examen detallado de los agrupamientos obtenidos, basados en la similitud genética entre accesiones, permitió la identificación de tres variedades bajo la misma denominación: (i) "Albillo de León", que agrupa algunas entradas de Albillo procedentes de Salamanca, Malvasía del Bierzo, Temprano y Temprano blanco; (ii) "Albillo de Ribera de Duero", que agrupa entradas de Albillo procedentes de Valladolid con Blanco del País, Turruntés, y Albillo Mayor; (iii) "Albillo de Madrid", que coincide morfológicamente con las descripciones ampelográficas más antiguas, y que agrupa entradas de Albillo procedentes de León, Avila, Zaragoza, Madrid y Segovia, con Albillo de Toro, Temprano de Camporreal, Temprano de Mora y Nieves Temprano. Asimismo, este análisis permitió la identificación de homonimias adicionales y falsas sinonimias.

UTILIZACIÓN DE LOS CEBADORES F13 Y F17 EN LA DETECCIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Díaz-Perales, A., Linacero, R., y Vázquez, A.M.

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid.

A partir de dos secuencias hipervariables detectadas en cultivos in vitro de centeno, se han diseñado dos oligonucleótidos, F13 y F17, de 20 y 19 pares de bases respectivamente, que en el presente trabajo se han utilizado por separado en reacciones de LP-RAPDs. Se ha estudiado si estos cebadores pueden ser utilizados como sondas universales para el estudio de la variabilidad genética. Para ello se ha desarrollado una metodología totalmente reproducible, pudiéndose amplificar un elevado número de bandas a partir de DNAs de distinto origen (levaduras, hongos, líquenes, plantas y animales). Posteriormente se ha analizado su capacidad para detectar variabilidad genética en distintos tipos de materiales:

1-Entre individuos de la misma población en una especie alógama, *Secale cereale* L., pudiéndose diferenciar todos los individuos de la población analizados.

2-Entre variedades de tres especies autógamas, *Triticum aestivum*, *Triticum durum* y *Hordeum vulgare*. En este caso los marcadores generados por estos cebadores han sido suficientes para diferenciar todas las variedades de la misma especie.

Por otra parte se ha estudiado si los productos de amplificación generados por estos cebadores pueden ser utilizados para realizar análisis de parentesco entre variedades de cebada relacionadas en su genealogía.

UTILIZACION DE MICROSATELITES (STMS) PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PORTAINJERTOS DE VID (*Vitis vinifera*)

De Andres, M.T.; Borrego, J.; Ibañez, J.; Jouve, N.*

I.M.I.A. Finca "El Encín" Km 38,200 N-II. Apdo de Correos 127.

*Dpto Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias. U.A.H.

La utilización de portainjertos, en zonas filoxeradas es el mejor camino para la obtención de uvas de calidad. De su gran influencia en la cepa, se deriva la importancia que los portainjertos adquieren en la explotación del viñedo, la trascendencia de su acertada elección y su correcta identificación. Los portainjertos habituales proceden de cruces entre especies próximas a la vinífera, y se propagan vegetativamente. Constituyen un grupo relativamente reducido y mundialmente extendido e, independientemente de su distribución geográfica, suelen ser clones genéticamente idénticos, e idénticos al patrón del cual se han originado. Por lo tanto, la constitución genética de los clones es clave para su caracterización, y de ahí la importancia de elegir marcadores moleculares adecuados. De entre ellos los microsátélites (STMS) son los que pueden dar mejor resultado, debido a su elevado polimorfismo, su herencia codominante, y principalmente por la posibilidad de transferencia de datos entre laboratorios.

En este trabajo se presentan los resultados de la utilización de 9 microsátélites, previamente utilizados para caracterizar variedades de *Vitis vinifera*, en una colección de portainjertos, la mayoría pertenecientes a la colección del Banco de Germoplasma de Vid de El Encín (I.M.I.A.), a los que se han añadido otros de otros Bancos europeos. El análisis se basa en la detección de fluorescencia mediante un secuenciador automático ABI prism 310, utilizando el software GENESCAN. El elevado nivel de polimorfismo permite la identificación de portainjertos, la detección de patrones idénticos tenidos por diferentes, así como la existencia de diferencias entre patrones con la misma denominación

PUNTOS CALIENTES DE INESTABILIDAD EN EL DNA DETECTADOS MEDIANTE EL ESTUDIO DE VARIACIÓN SOMACLONAL EN CENTENO

Vázquez, A.M., Alves, E., y Linacero, R.

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid.

Se han analizado mediante la técnica de RAPDs plantas regeneradas a partir de callos embriogénicos de centeno *Secale cereale*. El análisis de los patrones de RAPDs nos ha permitido detectar la existencia de variaciones entre las plantas regeneradas del mismo callo que, teniendo que presentar el mismo patrón de bandas amplificadas, muestran bandas diferenciales. De las 309 bandas analizadas 25 fueron variables. Algunas de estas bandas, 16, varían en varias plantas regeneradas a partir de distintas líneas, como se ha confirmado por hibridación, por lo que han de ser secuencias hipervariables o encontrarse en una región hipervariable del genoma. Así es posible explicar el que distintos sucesos mutacionales afecten exactamente a las mismas secuencias. Para conocer los tipos de secuencias implicados en estos cambios estas bandas hipervariables han sido clonadas y secuenciadas. Se ha analizado su número de copias en el genoma de centeno y sus secuencias han sido comparadas con las presentes en los bancos de genes, encontrándose que algunas de ellas presentan homología con elementos móviles, tanto con retrotransposones (WIS-2-1A de trigo, BARE-1 de cebada, PREM-1 de maíz), como con otro tipo de elementos móviles (WIS1 de trigo).

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE OLIVO PARA SU CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN

Claros, M.G., Bautista, R., Crespillo, R., y Cánovas, F.M.

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. claros@uma.es

El desarrollo de marcadores moleculares basados en el DNA está ayudando a la identificación y clasificación de muchas especies y variedades de plantas. Partiendo de hojas de olivos rastreados en la provincia de Málaga, hemos utilizado RAPD y AP-PCR para agrupar muestras de 56 cultivares en 22 variedades, la mayoría homogéneas salvo los cultivares denominados genéricamente "picudos". Las 22 variedades las hemos clasificado en tres grandes grupos, siendo el más interesante el que contiene las variedades autóctonas de la provincia de Málaga (verdial, picudo y nevadillo blanco). Los resultados apoyan la hipótesis del origen autóctono de la mayoría de las variedades de olivo, lo cual ha permitido dar el empuje definitivo a la denominación de orgien "Axarquía" para un tipo de aceite de la provincia. La clonación y secuenciación de los polimorfismos nos ha permitido obtener varios SCAR, que con ayuda de las enzimas de restricción, nos han proporcionado marcadores moleculares con los que ya hemos etiquetado 5 variedades. A partir del gen Ole1 de olivo hemos diseñado un EST que nos ha permitido identificar dos variedades. Estamos diseñando otros oligos a partir de otros genes para obtener nuevos marcadores EST. Este proyecto ha sido subvencionado por la Junta de Andalucía (CVI-114 y C97-082).

ENSAYO DE LAS RELACIONES GENÉTICAS ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO *Digitalis* BASADO EN MARCADORES RAPD

Nebauer, S.G.¹, del Castillo-Agudo, L.², y Segura, J.¹

¹Departamento de Biología Vegetal, ²Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Avda. V.A. Estellès s.n. 46100-Burjassot (València).

Se han utilizado los marcadores RAPD para estudiar la variación interespecífica entre seis especies del género *Digitalis*: *D. obscura*, *D. lanata*, *D. grandiflora*, *D. purpurea*, *D. thapsi*, y *D. dubia*, y el híbrido *D. excelsior* (*D. purpurea* x *D. grandiflora*). Se han obtenido un total de 91 bandas altamente reproducibles, amplificadas por los cebadores OPA10, OPB7, OPA13 y OPC5. La homología de bandas que co-emigran se corroboró por Southern-blot y análisis de secuencia. La aplicación de diversas aproximaciones estadísticas para el análisis de las bandas RAPD, incluyendo métodos de distancia y parsimonia, agrupaciones de familias y análisis molecular de la varianza (AMOVA), han mostrado que estos marcadores son taxonómicamente informativos en *Digitalis*. Las relaciones filogenéticas que se deducen del análisis están de acuerdo con las previamente establecidas mediante caracteres morfológicos. El híbrido *D. excelsior* parece mostrar una mayor afinidad con la sección *Digitalis* que con la *Grandiflorae*. Este es el primer trabajo conocido donde se aplican los marcadores RAPD al estudio de las relaciones genéticas entre especies del género *Digitalis*.

PROTEÍNAS DE DEFENSA DE PLANTAS COMO ALERGÉENOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Sánchez-Monge, R.¹, Díaz-Perales, A.¹, Blanco, C.², Collada, C.³, Lombardero, M.⁴, García-Sellús, F.J.⁵, Barber, D.⁴, Aragoncillo, C.³ y Salcedo, G.¹

¹Unidad de Bioquímica, Departamento de Biotecnología, E.T.S.Ingenieros Agrónomos, Madrid.

²Sección de Alergia, Unidad de Investigación, Hospital Nuestra Señora del Pino, Las Palmas de Gran Canaria.

³Unidad de Química y Bioquímica, Departamento de Biotecnología, E.T.S. Ingenieros de Montes, Madrid; ⁴ALK-Abelló, Madrid.

Alrededor de un 1% de la población adulta y de un 10% de la población infantil sufre algún tipo de alergia alimentaria. La relación entre proteínas de defensa y alérgenos vegetales es un área de interés creciente al haberse identificado varias de estas proteínas como componentes alérgicos de distintos alimentos de origen vegetal. Particularmente la prevalencia de las alergias a frutos está aumentando en los últimos años asociada a menudo con la alergia al latex o con distintos tipos de polinosis. La purificación de varias quitinasas de castaña, aguacate, y plátano ha permitido la identificación de las quitinasas de tipo I, que poseen un dominio heveina en el extremo N-terminal, como los alérgenos responsables del llamado síndrome latex-frutas. Las quitinasas del tipo II de castaña y aguacate que no poseen el dominio heveina, no son alérgicas ni en pruebas "in vitro" (reconocimiento de IgE de pacientes alérgicos) ni en pruebas "in vivo". Se ha expresado en la levadura *Pichia pastoris* la quitinasa I de castaña completa, así como los dominios heveina y catalítico, con objeto de confirmar la implicación del dominio heveina en dicho síndrome y determinar sus epítomos.

Por otra parte se han identificado los principales alérgenos de la alergia a frutos de la familia Rosaceae (melocotón, manzana, cerezas...), como proteínas LTP (proteínas transportadoras de lípidos), en poblaciones mediterráneas, que no tienen asociada alergia al polen de abedul. Se han purificado las LTP de manzana, melocotón, castaña y *Artemisia* y comparado su actividad alérgica tanto "in vivo" como "in vitro". Se está abordando el clonaje, expresión y mapeo de epítomos de la LTP de melocotón.

EXTRACCION DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE HOJAS DE LEGUMINOSAS LEÑOSAS

Fernández, E., Viader, S., Moysset, L., y Simón, E.

Departamento de Biología Vegetal. Unidad de Fisiología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Diagonal 625. 08028 Barcelona.

La posición de las hojas y los folíolos de *Robinia pseudoacacia* y *Albizzia lophantha* varía de forma rítmica y por transiciones luz-oscuridad. Ambos movimientos se producen por cambios de turgencia de las células motoras de los pulvínulos, órganos motores situados en la base de las hojas y los folíolos, y están controlados por un reloj endógeno y su interacción con los fotorreceptores de luz azul y el sistema fitocromo. Se pretende a) identificar los fitocromos implicados en el control del movimiento foliar y b) averiguar el patrón de expresión de los genes fitocromo y la distribución de este sistema fotorreceptor en los pulvínulos. El aislamiento de ácidos nucleicos es indispensable para clonar y secuenciar los genes fitocromo así como para averiguar su expresión en las células motoras pulvinulares. Con esta finalidad se han ensayado distintos métodos de extracción de DNA (Dellaporta y col. 1983. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21; Kochko y Hamon, 1990. Plant Mol. Biol. Rep. 8:3-7; Shagai-Marooof y col., 1984. Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 81: 8014-8018; Doyle-Doyle, 1990. Focus 12:13-15) y RNA total (Goormachtig y col., 1995. Mol.Plant-Mic.Int. 8:816-824, Chang y col. 1993. Plant Mol. Biol. Rep. 11:113-116) que difieren por el tampón de extracción, inhibidores de RNAsas y proceso de purificación. La extracción de ácidos nucleicos de estas especies ha resultado muy dificultosa por su elevado contenido en polifenoles y polisacáridos. Se presentarán los resultados obtenidos en cuanto a rendimiento, integridad y pureza.

DISEÑO DE AS-PCR PARA HMW-GLUTENINAS DE TRIGO

de Bustos Rodríguez, A., Rubio de la Moya, P., y Jouve de la Barreda, N.

Dpto. Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá. Campus Universitario. 28871 Alcalá de Henares. Madrid.

En programas de introgresión de genes de interés en especies cultivadas es importante contar con una herramienta que permita la detección rápida y segura de tales genes. En el caso concreto de las gluteninas de alto peso molecular, relacionadas con la calidad del grano, esta detección se hace utilizando el endospermo de la semilla con la técnica de SDS-PAGE, lo que supone la utilización de parte de esta, así como una limitación temporal hasta la obtención de dicha semilla. En este trabajo se presenta la aplicación de la técnica de AS-PCR (amplificación específica de alelos) para la detección de gluteninas de alto peso molecular. Así se han desarrollado primers específicos para los alelos de los genes Glu 1Ax, Glu 1Dx, Glu 1Dy, lo que ha permitido la selección de plantas portadoras de los alelos de interés eliminando las homocigóticas y heterocigóticas para los alelos contrarios. Este método permite la detección en cualquier momento del ciclo de la planta utilizándose cualquier parte de la misma. El desarrollo de esta metodología también ha permitido la caracterización molecular de alelos como ha sido el caso del Glu Ax-Nulo. Su caracterización ha permitido profundizar en el conocimiento de los motivos por los cuales no codifica para una HMW-glutenina. Así se ha visto que la secuencia de este alelo presenta un codón de paro hacia la mitad de la secuencia codificadora lo que podría explicar la no aparición tal proteína. (Proyecto AGF97-810 CICYT).

LOCALIZACION DE QTL ASOCIADOS A CALIDAD DE TUBERCULO EN PATATA: CONTENIDO EN AZUCARES REDUCTORES DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Menéndez, C.*, Ritter, E.‡, Schäfer-Praegl, R., Salamini, F., y Gebhardt, C.

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Carl von Linné weg 10, 50829 Köln, Alemania.

*Depto. de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Avda. de La Paz 105, 26004 Logroño.

‡ CIMA-Granja Modelo. Apdo 46. 01080 Arkaute, Vitoria.

La acumulación de azúcares reductores, (glucosa y fructosa) en tubérculos de patata almacenados a bajas temperaturas, es un parámetro crítico para la industria procesadora de patata. Cuando los niveles de azúcares reductores en tubérculo son altos, y en condiciones de alta temperatura (asociadas al proceso de fritura), los azúcares reductores se combinan con los grupos amino libres de los aminoácidos (reacción de Maillard) dando lugar a un producto que es inaceptable por su sabor amargo, al igual que a un pardeamiento (no enzimático). Este es uno de los problemas más importantes asociados a la producción de patatas fritas, ya que si se produce esta reacción el producto no es aceptable comercialmente.

El proceso por el que se acumulan azúcares depende de factores genéticos y ambientales y puede ocurrir por la interacción de diversas rutas metabólicas. El objetivo del presente estudio es la identificación de QTL (loci para caracteres cuantitativos) responsables del contenido en azúcares después del almacenamiento a bajas temperaturas y de los posibles genes candidatos involucrados en el proceso.

Hemos analizado dos poblaciones F1 de patata diploide (150 genotipos cada una) derivadas de cruzamientos entre parentales seleccionados por su alta heterocigosidad y diferencias en contenido en azúcar. Estas poblaciones han sido evaluadas en 3 años en el invernadero y en ensayos de campo replicados para rendimiento, contenido en almidón, número de tubérculos, y otros caracteres morfológicos y agronómicos. Además el contenido en azúcares de los tubérculos fue medido a la recolección y después del almacenamiento a 4 °C durante tres meses, mediante un método enzimático.

Se identificaron diez regiones genómicas que comprenden QTL putativos para contenido en azúcares y dos que son significativas para contenido en almidón del tubérculo. Los efectos de los QTL fueron consistentes en diferentes ambientes y ambas poblaciones para una región principal en el cromosoma 7. Aproximadamente 50 genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos se han mapeado en patata. Algunos de esos genes como la sucrosa sintasa, sucrosa-fosfato sintasa y ATP-asas son candidatos putativos para los QTL identificados en nuestras poblaciones.

PROTECCIÓN FRENTE A *Phytophthora citrophthora* EN NARANJOS TRANSGÉNICOS SUPERPRODUCTORES DE LA PROTEÍNA PR P23.

Fagoaga, C. , Arnau, J., Pina, J.A., Navarro, L., Hinarejos, C., Tuset, J.J., y Peña, J.J.

Dpto. de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial, 46113-Moncada, Valencia.

Cuando las plantas se someten a diferentes formas de estrés biótico o abiótico producen y acumulan las denominadas proteínas PR asociadas a la patogénesis (Pathogenesis-Related proteins). La proteína P23 es una PR de 23 KDa que es inducida en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill, cv. Rutgers) cuando se infectan con CEVd (Citrus Exocortis Viroid). Se ha demostrado la actividad antifúngica de esta proteína, al inhibir *in vitro* la multiplicación de ciertos hongos fitopatógenos (Rodrigo *et al.*, 1993). Varias especies del género *Phytophthora* se han descrito como los agentes causales de las más importantes enfermedades fúngicas que afectan el cultivo de los cítricos en nuestro país (Tuset *et al.*, 1984). Hemos introducido el gen precursor de la proteína P23 en plantas de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L. Osb. cv. Pineapple) e investigado las propiedades antifúngicas de dicha proteína en las plantas transgénicas para tratar de conseguir protección frente a *Phytophthora*.

El laboratorio del Dr. Conejero (IBMCP-CSIC) nos ha facilitado el plásmido binario pBI121.P23, que contiene los módulos de expresión *uidA* y *npt II* de pBI121, y entre ellos la secuencia codificante de la proteína P23 bajo el promotor 35S, la secuencia líder del RNA 4 de AMV y el terminador *nos*. Se han obtenido plantas transgénicas a partir de segmentos de entrenudo de plántulas de naranjo dulce inoculadas con *A. tumefaciens*, siguiendo el procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio (Peña *et al.*, 1995; Cervera *et al.*, 1998).

Mediante análisis Southern y Western, se ha comprobado la integración estable del transgén de interés y su expresión en las plantas de naranjo regeneradas. Discos de cultivos del hongo en agar se han inoculado en porciones de corteza y en plantas enteras, según Tuset *et al.* (1984). La actividad antifúngica de la P23 se ha cuantificado como una disminución en el crecimiento radial de la podredumbre producida por el hongo. Se han seleccionado 11 líneas transgénicas GUS positivas (2 de ellas transformadas con pBI 121). El análisis Southern ha demostrado que en 9 de ellas se había integrado de manera estable el gen de la P23. El análisis Western ha permitido detectar la P23 en 8 de las 11 líneas. Los ensayos de actividad antifúngica en trozos de corteza y en las plantas transgénicas enteras muestran que algunas líneas transgénicas presentan mayor protección frente a *Phytophthora* que las plantas control.

Índice de autores

Abarca, D.....	153	Brewin, N.J.....	159
Aguado, C.....	173	Bueno, P.....	72
Aguilar Pastor, I.....	210	Bustos, R.....	49
Aguilar, I.....	68, 211, 212, 213	Caballero, J.L.....	
Ahmad, M.....	37	29, 101, 111, 115, 144, 149, 198, 202
Ahumada, I.....	143, 157	Cabello, F.....	220
Alamillo, J.M.....	189, 211	Cabezas, J.A.....	220
Alapont, C.P.....	163	Calvo, A.P.....	31, 133
Alcazar, R.....	152	Campos, N.....	52, 143, 157
Alfárez, F.....	150	Candela, H.....	122, 123
Allona, I.....	63, 91, 186	Candela, M.....	200
Almoguera, C.....	30, 100, 180	Candela, M.E.....	200
Altabella, T.....	53, 152	Cánovas, F.....	168
Alvarez, I.....	98	Cánovas, F.M.....	125, 138, 224
Alvarez, R.....	151	Cañas, L.A.....	41, 113
Alves, E.....	223	Capel, J.....	39, 218
Amador, V.....	105	Carbonell, J.....	126, 136
Anamthawat-Jonsson, K.....	82	Carbonero, P.....	28, 99
Angosto, T.....	39	Carranco, R.....	100
Antúnez, C.....	188	Carrasco, J.L.....	97
Aragoncillo, C.....	63, 186, 226	Carrasco, P.....	164
Aristizábal, F.....	95	Carrión Rodríguez, A.....	207
Arró, M.....	51	Casacuberta, J.M.....	32, 117
Arrollo, R.....	127	Casado Díaz, A.....	93, 167
Arús, P.....	83	Casado, R.....	63, 186
Aubareda, A.....	192	Cashmore, A.R.....	37
Avila, C.....	138, 168	Castañera, P.....	184
Aznar, R.....	219	Castillo, J.....	134
Balaguer, B.....	219	Castillo-Agudo, L.....	225
Barber, D.....	226	Castresana, C.....	73, 199, 203
Bartels, D.....	170	Catalá, R.....	64, 181
Bastida, M.....	110	Caviedes, M.A.....	204, 205, 206
Bautista, R.....	224	Cazalis, R.....	48
Becana, M.....	145	Cejudo, F.J.....	116
Beguiristain, T.....	32	Cercos, M.....	126, 136
Beharav, A.....	82	Cervera, M.....	85
Bejarano, E.R.....	187, 188	Cervera, M.T.....	220
Bellés, J. M.....	60	Chaffai, M.....	201
Bellés, J.M.....	69, 171, 172, 173, 190	Chamarro, J.....	44, 166
Beltrán, J.P.....	41, 112, 113	Chamber Pérez, M.A.....	207
Benítez Alonso, Y.....	202	Chueca, A.....	48
Benítez-Burraco, A.....	115	Chueca, C.....	168
Berbel, A.....	41	Claros, M.G.....	125, 224
Berrocal, M.....	70, 195	Clemente, M.R.....	145
Besumbes, O.....	156	Coca, M.A.....	180
Bisseling, T.....	159	Codina, A.....	194
Blanco Portales, R.....	29, 111, 144	Collada, C.....	63, 186, 226
Blanco, C.....	226	Collin, S.....	94
Blatt, M.R.....	178	Conejero, V.....	69, 79, 97, 161, 190, 197
Boller, T.....	148	Cordeiro, A.....	53, 152
Bonaterro, A.....	215	Coronado, C.....	204
Bordas, M.....	79	Cortina, C.....	60, 171, 172, 173
Borja, M.....	127	Coupland, F.....	38
Boronat, A.....	51, 52, 95, 102, 143, 155, 156, 157	Crespillo, R.....	224
Borrego, J.....	222	Croker, S.J.....	137
Borrell, A.....	152	Cuartero, J.....	174
Borsani, O.....	174	Cubas Domínguez, P.....	42
Bortolotti, C.....	53, 152	Cubas, P.....	130
Botella, M.A.....	76, 93, 167, 174	Culiáñez Macià, F.A.....	60
Boter, M.....	26	Culiáñez-Macià, F.A.....	171, 172, 173
Bou, J.....	108	Cunillera, N.....	102

Cutanda, M.C.	60, 171, 172, 173	Gavidia, I.	158
Darós, J.A.	214	Gebhardt, C.	229
Dary, M.	204, 205, 206	Ghorbel, R.	85
Dávila, J.	43	Gil, J.	98
De Andres, M.T.	222	Gisbert, C.	137, 139
de Bustos Rodríguez, A.	228	Gisbert, E.	127
de la Peña, A.	58	Gomez Gomez, L.	148
del Campo, E.M.	33	Gómez, E.	43
del Pozo, J.C.	58	Gomez, L.	63, 186
del Río, L.A.	142	Gómez, M.	142
Delibes, A.	185	Gómez, M.D.	113
Díaz, I.	28	Gómez-Lim, M.	142
Díaz-Perales, A.	221, 226	Gómez-Mena, C.	132
Díaz-Sala, C.	121	González, M.C.	116
Dickinson, M.J.	200	Gonzalez, R.	76
Diez, E.	155, 157	González, R.	213
Domingo, C.	120	González, V.	95, 157
Domínguez, A.	85, 191	González-Candelas, L.	193
Domínguez, F.	116	Granell, A.	176
Domínguez-Puigjaner, E.	182	Gruissem, W.	162
Donaire, J.P.	72	Guerri, J.	191
Donoso, I.	188	Guevara, M.A.	63
Dopico, B.	131	Guideroni, E.	71
Drobak B.K.	159	Hamberg, M.	73
Durán-Vila, N.	201	Hedden, P.	137
Echevarría, C.	151	Heinz, E.	154
Egea-Cortines, M.	140	Hernández, C.	201
Egea-Gilabert, C.	200	Hernández, L.E.	159
Escobar, C.	159, 192	Hernández-Acosta, P.	60, 171, 172, 173
Escribano, V.	77	Herreros, E.	94, 192
Espartero, J.	59	Houlné, G.	44
Espinosa-Ruiz, A.	60, 171, 172, 173	Hueros, G.	43
Espunya, M.C.	36	Huguet, G.	175
Estévez, R.	192	Ibañez, J.	222
Fagoaga, C.	85	Igeño, M.I.	38
Fayos, J.	69, 190	Iglesias, J.	58
Fenoll, C.	94, 95, 119, 128, 192	Isabel, I.	99
Fernández, E.	227	Iturbe-Ormaetxe, I.	145
Fernández-Calvín, B.	130, 179	Jahrmann, T.	110
Fernández-Lobato, M.	94	Jamilena, M.	39
Ferrándiz, C.	107, 112	Jarillo, J.A.	37, 130
Ferrer, A.	51, 102	Jofré, A.	175
Figueras, M.	175	Jordá, L.	161
Flores, A.	187	Jordano, J.	30, 100, 180
Flores, R.	78, 201, 214	Jouve de la Barreda, N.	228
Forde, B.	114	Jouve, N.	222
Fraga, M.	127	Juárez, J.	85
Franco, L.	134	Kízis, D.	62
Franco, M.	187	Koncz, C.	53
Franco-Zorrilla, J.M.	130	Kondorosi, A.	74, 205, 206
Gadea, J.	97	Labrador, E.	131
García, J.A.	77	Lafuente, M.T.	176
García-Casado, G.	186	Lafuente, T.	150
García-Luque, I.	199	Laguna, L.	174
García-Martínez, J.L.	92, 98, 108, 137, 139, 163	Lara, P.	28
García-Mas, J.	83	Leivar, P.	157
García-Mauriño, S.	151	León, J.	65
García-Olmedo, F.	68, 189, 195, 211, 212, 213	Leyva, A.	58, 179
García-Sellús, F.J.	226	Liljegren, S.J.	107
Garrido, G.	121	Linacero, R.	221, 223
Garriga, A.C.	188	Liró Hernández, L.	207
Garro, R.	190	Lisón, M.P.	79
		Llama-Palacios, A.	68

Llombart, B.	117	Molina, A.	70, 195
Llop, P.	215	Molinas, M.	175
Llop-Tous, I.	182	Molinero-Rosales, N.	39
Lois, L.M.	52	Monfort, A.	83
Lombardero, M.	184, 226	Monte, E.	105
López Braña, I.	185	Montes, M.J.	185
López Gorgé, J.	48, 168	Morales, M.	83
López Raéz, J.A.	29	Moran, J.F.	145
López Ribera, I.	96	Moreno, J.	116
López, M.	215	Moreno, J.I.	203
López, M.G.	142	Moreno, M.	195
López, M.M.	213	Moreno, P.	191
López-Cobollo, R.M.	181	Moreno-Bruna, B.	44
López-Díaz, I.	92, 137, 139	Morilla, G.	187
López-García, B.	193	Moyano, E.	29, 111, 144, 149, 198
López-Raéz, J.	144	Moyssset, L.	227
López-Raéz, J.A.	149	Muñoz Blanco, J.	29, 93, 101, 111, 115, 144, 149, 167, 198, 202
López-Solanilla, E.	68, 184	Muñoz, E.	144
Lorences, E.P.	219	Muñoz, J.A.	204
Lorenzo, H.	114	Muñoz-Martín, A.	94
Lorenzo, O.	31, 133	Murillo, I.	71
Lozano, R.	39, 218	Navarro, C.	112
Lu, J.	91	Navarro, J.A.	78
Ludevid, D.	90	Navarro, L.	85, 191
Ludevid, M.D.	194	Navarro, P.	190
Lumbreras, V.	62	Nebauer, S.G.	225
Madueño, F.	41, 112	Nevo, E.	82
Mallent, D.	150	Nicolás, C.	31, 133
Mansilla Mansilla, C.	210	Nicolás, G.	31, 133
Manzano, D.	102	Nila, A.G.	142
Marco, F.	164	Noguera, J.	218
Marcos, J.F.	150, 193	Olivares, J.	72
Marfá, V.	71	Orea, A.	54
Marqués, M.C.	197	Ortega, C.	168
Márquez, A.J.	54	Pagés, M.	62
Martín Sánchez, J.A.	185	Pajuelo, E.	54
Martín, A.C.	58	Pajuelo, P.	54
Martín, C.	49	Palomares, A.J.	74, 204, 205, 206
Martin, C.R.	118	Palomer, X.	182
Martín, M.	33, 121, 153	Panicot, M.	53
Martín, R.	203	Pardo, J.M.	59, 178
Martínez, M.C.	36	Paz-Ares, J.	58
Martínez-García, F.	165	Pelaz, S.	40
Martínez-Laborda, A.	109, 122, 123	Peña, L.	85, 191
Martínez-Rivas, J.M.	154	Peñarrubia, L.	165
Martínez-Zapater, J.M.	42, 127, 130, 132, 179, 220	Pérez-Bermúdez, P.	158
Martín-Trillo, M.M.	132	Pérez-Hormacche, J.	74, 204, 206
Marzabal, P.	90	Pérez-Payá, E.	193
Masferrer, A.	51	Pérez-Pérez, J.M.	122, 124
Matamoros, M.A.	145	Pérez-Rodríguez, M.J.	118
Mayda, E.	197	Pernas, M.	177, 184
Medina, M.E.	69	Phillips, A.L.	137
Medina-Escobar, N.	111	Pina, J.A.	85, 191
Mena, M.	99	Piqueras, P.	61, 122
Menéndez, C.	229	Piqueras, R.	199
Mérida, A.	50	Pla, M.	175
Messeguer, J.	71	Polanco de la Puente, C.	84
Meynard, D.	71	Ponce de León, I.	73
Mícol, J.L.	61, 122, 123, 124	Ponce, M.R.	61, 122, 124
Miguel, E.	68	Ponz Ascaso, F.	210
Mir, G.	175	Poza-Carrión, C.	68, 212, 213
Mira, H.	165	Pozueta-Romero, J.	44

Prat, S.	26, 104, 105, 108	Sanz-Alfárez, S.	95
Primo, J.	190	Sato, S.	107
Puigderrajols, P.	175	Sauri, A.	120
Puigdomènech, P.	32, 83, 96, 110, 117, 147	Schäfer-Praegl, R.	229
Querol, J.	156	Schantz, R.	44
Quesada, V.	61	Schiliro', E.	170
Quinn, M.	91	Schmidt, R.J.	90
Quintero, F.J.	178	Schmülling, T.	53
Rambla, J.L.	166	Schulman, A.H.	82
Ratet, P.	74, 205, 206	Segura, A.	195
Redondo-Nevado, J.	101, 115	Segura, J.	225
Revilla, G.	55	Seitz, H.U.	158
Ribera, E.	77	Serna, L.	119
Rigau, J.	147	Serra, M.T.	199
Río, A.	117	Serrato, A.J.	116
Ripoll, J.J.	109	Sieiro, C.	55
Ritter, E.	229	Simón, E.	227
Robertson, L.	192	Smith, A.	49
Robles, P.	122	Solano, R.	58, 70
Robson, F.	38	Soto, A.	63, 186
Rodrigo, M.I.	134	Soto, M.J.	72
Rodríguez Galán, J.M.	59	Sotolongo, M.	161
Rodríguez, D.	31, 133	Stiefel, V.	110
Rodríguez, I.	220	Suárez López, P.	38
Rodríguez-Cerezo, E.	63, 77, 186	Suárez, M.F.	125
Rodríguez-Concepción, M.	52, 162	Suoniemi, A.	82
Rodríguez-Llorente, I.D.	204, 205, 206	Talón, M.	163
Rodríguez-Palenzuela, P.	68, 184, 211, 212, 213	Tanskanen, J.	82
Rojas, A.	30, 180	Tarragó, T.	194
Rojo, E.	177	Tenorio, G.	50
Roldán, M.	153	Tiburcio, A.F.	53, 152
Romero, C.	60, 171, 172, 173	Torrent, M.	90, 194
Romero, J.M.	50, 54	Torres Contreras, J.	128
Romero, M.D.	185	Torres, J.	119
Romo, S.	131	Trapero, A.	76
Royo, J.	43, 65	Trinh, T.H.	205
Rubio de la Moya, P.	228	Úbeda, S.	92
Rubio, M.C.	145	Urbez, C.	126, 136
Rubio, V.	58	Valpuesta, V.	76, 174
Ruelland, E.	147	van Leeuwen, H.	83
Ruiz Sánchez, M.L.	84	Vancanneyt, G.	65
Ruiz-García, L.	132	Vázquez, A.M.	221, 223
Ruíz-Rivero, O.	26	Vendrell, M.	182
Sabater, B.	33, 121, 153	Vera, A.	109, 122
Sahrawy, M.	168	Vera, P.	97, 120, 161, 197
Salamini, F.	170, 229	Verdaguer, D.	175
Salcedo, G.	184, 226	Viader, S.	227
Salinas, J.	64, 130, 179, 181	Vicente-Carbajosa, J.	28, 90
Sampedro, J.	55	Vicent, C.M.	82
San Segundo, B.	71	Vidal, A.	139
Sancenón, V.	165	Vidal, A.M.	163
Sánchez Aguayo, I.	59	Vidal, J.	151
Sánchez Sánchez, F.	210	Vila, L.	71
Sánchez Serrano, J.J.	65, 127, 177	Villa, T.G.	55
Sánchez, R.	116	Wheatley, K.	38
Sanchez-Ballesta, M.T.	176	Whetten, R.W.	91
Sánchez-Monge, R.	184, 226	Yanofsky, M.F.	40, 107
Sanchez-Ramos, I.	184	Yubero, E.	101
Sandalio, L.M.	142	Yubero-Serrano, E.M.	198
Sanjuan, J.	72	Zacarias, L.	150, 176
Sanz, A.	73	Zarra, I.	55
Sanz, C.	65	Zhang, H.	114
Sanz, Y.	43	Zurita, S.	39

