

Tesis de Posgrado

Estudio de la familia génica Asr de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Maskin, Laura

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Maskin, Laura. (2003). Estudio de la familia génica Asr de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3676_Maskin.pdf

Cita tipo Chicago:

Maskin, Laura. "Estudio de la familia génica Asr de tomate (*Lycopersicon esculentum*)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3676_Maskin.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio de la familia génica *Asr* de tomate
(*Lycopersicon esculentum*)**

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Lic. Laura Maskin

Director: Norberto Daniel Iusem

2003

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular,
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, IFIBYNE-
CONICET, FCEyN-UBA.

197670

Agradecimientos

A Norberto y a mis compañeros tomateros, Gustavo, Nicolás, Javi y Vero (por el aliento constante que todos ustedes me dieron).

A Fer Carrari (no es lo mismo si no estás, volvé!!!).

Al LFBM y su gente.

Al Conicet y a la Fundación Antorchas por el sustento económico (y a la Fundación Rubio-Maskin por estos últimos 6 meses).

A mi grupo adoptivo "Los Uchiteles", Osvaldo, Rafa, Francisco y en particular a mis amigos Silvana, Itati, Silvina, Barbi (por los almuerzos, el tecito y las cenas, las que fueron y las que vendrán).

A Fer Marengo (no encuentro palabras, ni hablar de una frase entera, para agradecerte todo lo que hiciste por mi).

A Ramiro (por las mañanas de mates, por los chismes y los mails, tu sabes).

A Alina (por hacer del intercambio científico una excusa para divertirnos).

A la gente del INTA.

A Elsa y a Nelly (porque su apoyo estuvo presente siempre, a pesar del tiempo).

A Sara (por tu paciencia infinita y tus consejos maravillosos).

A Mariana y Susana (porque siempre estuvieron dispuestas a contestar todas mis dudas).

A Marce, Sebas, Dani, Bessie y Dani y Dalia (por los ánimos que siempre me dieron).

A Lore (por ser una entendida, no sólo en Derridá, sino también en los plásmidos. Por tu eterna amistad).

A mis amiguisimas Coto y Marina.

A mi familia san nicolenia, rosarina y cordobeza.

A mi abuela Isa, a mis tíos Pachi, Hugo y Lidia, a mis hermanos, cuñadas y sobrinos.

A mi papá y a mi mamá (porque...qué hubiera hecho sin ustedes?).

A Pablo y a Martina (por cada segundo con ustedes).

INDICE

	PAG.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCION	
¿Porqué estudiar el estrés en las plantas?.....	5
El tomate, nuestra planta modelo.....	6
El fruto de tomate.....	7
El estrés en las plantas.....	8
Situaciones de estrés abióticos más comunes.....	9
<i>Estrés hídrico</i>	9
<i>Bajas temperaturas</i>	12
<i>Daño mecánico</i>	13
<i>Estrés salino</i>	14
Percepción celular del estrés.....	15
Genes que responden a estrés.....	16
¿Cómo es la regulación de estos genes?.....	17
El ácido abscísico (ABA).....	17
Vías de regulación.....	18
La familia génica <i>Asr</i> de tomate.....	20
Objetivos.....	21
MATERIALES Y METODOS	
ANALISIS ESTRUCTURAL DE LAS ASR.....	22
Programas computacionales.....	22
ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOS <i>Asr</i> DE TOMATE.....	22
(<i>L.esculentum</i>)	
Material vegetal.....	22
Colección de muestras en tejidos sin estrés.....	22
Tratamientos de estrés.....	23
Extracción de ARN.....	23
Cálculo de la concentración y corroboración de la integridad.....	24
del ARN obtenido	
Oligonucleótidos.....	24
RT-PCR.....	25
Transcripción reversa (RT).....	26
Amplificación por PCR.....	26
Northern blot.....	26
Cuantificación relativa del ARN mensajero.....	27
Producción y purificación de la proteína ASR1	
por columna de níquel.....	27
Producción de anticuerpos contra la proteína ASR1.....	28
Extracción de proteínas.....	28
Elución de proteínas a partir del gel de poliacrilamida.....	28
Cuantificación de proteínas.....	28
Western blot.....	29
Subclonado de los amplicones de <i>Asr1</i> y <i>Asr2</i>	30
Preparación de las ribosondas y transcripción <i>in vitro</i>	32
Hibridación <i>in situ</i>	32

ENSAYOS DE EXPRESION EN BACTERIAS.....	34
Subclonado de <i>Asr1</i> en plásmido bacteriano regulable por arabinosa.....	34
Chequeo de la expresión de ASR1 y viabilidad de las bacterias.....	36
Análisis del comportamiento en medio salino de bacterias que expresan ASR1.....	36
Análisis del comportamiento de bacterias que expresan ASR1 frente a la radiación UV.....	37
ENSAYOS DE EXPRESION EN LEVADURAS.....	37
Plásmido de expresión utilizado.....	37
Transformación de las levaduras.....	38
Respuesta del cultivo de levaduras a estrés salino.....	39
RESULTADOS	
ANALISIS DE LAS ASR.....	40
Características de las ASR de tomate.....	40
Búsqueda de productos génicos tipo ASR en otras especies.....	43
Comparación de secuencias y estructura de productos génicos relacionados con ASR de tomate.....	46
COMPORTAMIENTO DE LOS <i>Asr</i> DE TOMATE FRENTE AL ESTRES.....	52
Respuesta frente al estrés hídrico.....	52
Acumulación de los transcritos frente al estrés hídrico.....	52
Acumulación de las proteínas frente al estrés hídrico.....	55
Respuesta a otros tipos de estrés.....	56
Tipo celular en el que se expresan los <i>Asr</i> de tomate.....	57
COMPORTAMIENTO DE LOS <i>Asr</i> EN OTROS PROCESOS.....	60
En la maduración del fruto.....	60
En el tejido floral.....	62
¿ASR forma agregados?.....	63
ENSAYOS PRELIMINARES DE EXPRESION EN SISTEMAS HETEROLOGOS.....	64
Comportamiento de bacterias que expresan ASR1 frente al estrés.....	64
Comportamiento de levaduras que expresan ASR1 frente al estrés.....	67
DISCUSION	
Analizando la estructura de las ASR	69
Familia <i>Asr</i> de tomate (<i>L.esculentum</i>): comportamiento frente al estrés	72
Analizando bandas proteicas no esperadas.....	78
Expresión de ASR1 en sistemas heterólogos.....	79
CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFIA	84

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron los miembros de la familia génica *Asr* de tomate (*Asr1*, *Asr2* y *Asr3*).

Por métodos computacionales se compararon las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas y se realizó una búsqueda de proteínas homólogas que reveló la existencia de moléculas proteicas conservadas que se acumulan en situaciones de variados tipos de estrés y/o en fruto. La comparación de todas estas proteínas "tipo ASR", provenientes de muy distintas especies, mostró que la homología se encuentra concentrada en dos dominios particulares. Además, todas comparten características estructurales como la alta hidrofiliidad, alta carga, sitios conservados de miristoilación y dos regiones hidrofóbicas.

Por otro lado, se evaluó la expresión de cada uno de los miembros conocidos de esta familia génica en tomate (*L. esculentum*), determinándose que poseen un nivel de expresión variable en condiciones basales en los órganos analizados y que se inducen diferencialmente en respuesta al estrés hídrico, al daño, al frío y durante la maduración del fruto.

Se observó que la expresión basal de *Asr1* y *Asr2* en hoja se limita específicamente a células acompañantes del floema. En condiciones de falta de agua, la expresión en hoja y en raíz se visualiza también en las células parenquimáticas adyacentes.

Se muestran evidencias de que ASR forma agregados *in vitro* (dímeros y trímeros).

Finalmente, ensayos preliminares de expresión en sistemas heterólogos demuestran que ASR1 provoca un aumento de la viabilidad de levaduras sometidas a estrés salino.

ABSTRACT

This work reports the study of the members of the tomato *Asr* gene family (*Asr1*, *Asr2* and *Asr3*).

Using computational methods, the amino acidic sequences were compared. A search of homologous proteins revealed the presence of conserved molecules that accumulate in responses to various types of stress and/or in fruit. Comparison of all these ASR-like proteins from different plant species showed that homology is concentrated at two particular domains. Besides, all of them share structural features like high hydrophilicity, high charge, a conserved myristoylation signal and two hydrophobic zones.

In addition, the expression of each known member of the *Asr* family in tomato (*L. esculentum*) were evaluated. The results showed variable basal expression level in all the analyzed organs and differential induction in response to water stress, wounding, cold and during fruit ripening.

In leaves, *Asr1* and *Asr2* basal expression was restricted to the companion phloem cells. Under water deficit conditions, this expression was also visualized in leaf and root parenchyma adjacent cells.

Evidences that ASR form aggregates *in vitro* (dimers and trimers) are shown.

Finally, preliminar assays in heterologous expression systems showed that ASR1 causes an increment in viability of yeast subjected to salt stressed.

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en el siguiente artículo:

- Maskin L., Gudesblat G.E., Moreno J.E., Carrari F.O., Frankel N., Sambade A., Rossi M.M. y Iusem N.D. (2001). Differential expression of the members of *Asr* gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Sci.* 161, 739-746.

ABREVIATURAS

3': río abajo.

5': río arriba.

ABA: ácido abscísico (hormona vegetal).

ADN: ácido desoxiribonucleico.

APS: amonio persulfato.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal.

BCIP/NBT: nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-cloro-3-indolyl-fosfato.

BPB: azul de bromofenol.

BrEt: bromuro de etidio.

EDTA: ácido etilendinitrilo tetracético.

kDa: kilodalton.

mAmp: miliampers.

PBS: buffer salino fosfato.

rpm: revoluciones por minuto.

RT-PCR: transcripción reversa-rección en cadena de la polimerasa.

SDS: sodio dodecil sulfato.

SDS-PAGE: gel de policrilamida con SDS.

TEMED: N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina.

TBS: buffer salino tris.

V: volts.

INTRODUCCION

Si un mamífero es enfrentado a una situación de estrés (una emergencia) secreta adrenalina, la hormona que lo preparará para la movilización de grandes cantidades de energía y que le permitirá reaccionar escapando o quedándose a pelear. Pero, ¿qué hace una planta en esa situación? Ciertamente no puede escapar. Las plantas no tienen otra opción que hacer frente al estrés y lo hacen modificando su comportamiento en todos los niveles, esperando que el motivo de estrés se vaya o, intentando adaptarse a esta nueva situación.

¿Porqué estudiar el estrés en las plantas?

A medida que la población mundial crece, la agricultura debe alimentar a un mayor número de personas y simultáneamente competir con los centros urbanos en desarrollo por las tierras arables. Este incremento en la demanda ha incentivado intereses científicos y comerciales, que en los últimos tiempos han puesto energías en intentar dilucidar los mecanismos por los cuales las plantas responden al estrés y en manipular estos mecanismos para aumentar la productividad de los cultivos en ambientes cuyas condiciones son subóptimas.

Cuando las cosechas récord son comparadas con las cosechas promedio, el impacto del ambiente en la productividad resulta evidente. Si asumimos que la cosecha récord representa el crecimiento de las plantas bajo condiciones ideales, entonces las pérdidas asociadas a estrés biótico y abiótico pueden reducir la productividad promedio en un 65%-87%, dependiendo del cultivo (Tabla1).

En este contexto, la aplicación de técnicas biotecnológicas y de mejoramiento clásico podrían proporcionar las herramientas para el desarrollo de plantas con tolerancia al estrés, cuyo objetivo principal apuntaría al aumento de las tierras disponibles para ser utilizadas como fuente de alimento, y que redundaría en un beneficio económico considerable a las economías regionales.

Tabla 1: Cosecha promedio y cosecha récord de cultivos más importantes

Cultivo	Cosecha récord (kg/ha)	Cosecha promedio (kg/ha)	Promedio de pérdidas (kg/ha)		Pérdidas por factores abióticos (% de cosecha record)
			Factores bióticos	Factores abióticos	
Maíz	19300	4600	1952	12700	65.8
Trigo	14500	1880	726	11900	82.1
Soja	7390	1610	666	5120	69.3
Sorgo	20100	2830	1051	16200	80.6
Cebada	11400	2050	765	8590	75.4
Papa	94100	28300	17775	50900	54.1
Caña de azúcar	121000	42600	17100	61300	50.7

(Buchanan et al., 2000)

El objetivo general del presente trabajo es realizar un aporte al complejo estudio de la respuesta de las plantas al estrés, mediante el análisis del comportamiento de una familia de genes de tomate llamada *Asr*.

El tomate, nuestra planta modelo.

Las variedades de tomate comercial son incluidas dentro de la especie *Lycopersicon esculentum*. El lugar original de su domesticación es incierto aunque las evidencias sugieren que fue en México. Debido a su valor como cultivo, *Lycopersicon esculentum* ha sido diseminado por todo el mundo. Actualmente, el cultivo de tomate tiene una gran importancia tanto en la producción a campo como en invernáculo.

El fruto de tomate procesado para salsas es el sector de mayor crecimiento de la industria vegetal. Desde el punto de vista nutricional, el tomate contribuye ampliamente a cubrir nuestros requerimientos de vitaminas y minerales -particularmente vitamina C, provitamina A y potasio- (Bittenbender y Kelly, 1988) debido a su alto consumo per cápita. Además aporta licopeno, un

potente antioxidante asociado con la resistencia a varias formas de cáncer humano (Caperle et al., 1996).

Asimismo, la planta de tomate es un modelo comúnmente utilizado para estudios fisiológicos y moleculares debido a su diversidad de germoplasma y , principalmente, a su disponibilidad en cuanto a herramientas moleculares (TIGR Tomato Gene Index, <http://www.tigr.org/tdb/lgi>) y a su transformación eficiente. En este contexto han sido muy útiles un gran número de mutantes para investigación y mejoramiento (Giovannoni, 2001).

El fruto de tomate

A nivel productivo, la maduración del fruto es un tema muy importante ya que implica un problema durante su comercialización y almacenamiento. Es por ello que el tomate es el cultivo modelo en el estudio de la fisiología molecular de la maduración. Cuando un fruto madura, su actividad enzimática se modifica en toda la célula debido a cambios en la expresión génica. Color, aroma y textura se alteran, así como también la susceptibilidad del fruto a patógenos oportunistas.

La transición de cloroplastos a cromoplastos, proceso durante el cual se degrada la clorofila y se acumulan carotenoides, es la causa del cambio de color del fruto; el ablandamiento es consecuencia de la actividad de enzimas que degradan la pared celular disminuyendo la rigidez del fruto. También se alteran durante la maduración los niveles de azúcares, ácidos y compuestos volátiles, produciendo el aroma y sabor del fruto maduro. En frutos climatéricos, como es el caso del tomate, la banana y la manzana, la maduración se inicia por un aumento de la concentración del etileno, sintetizado a partir de S-adenosil metionina vía ACC (ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato) sintetasa y ACC oxidasa. Se ha comprobado que el etileno actúa a nivel transcripcional, induciendo y reprimiendo la expresión de genes involucrados en el proceso de maduración (Gray et al., 1994). Por ejemplo, la poligalacturonidasa (PG), proteína que degrada la pectina de la pared celular, es inducida por etileno aumentando 100 veces durante la maduración (DellaPenna et al., 1986). Smith et al., en 1990 desarrollaron tomates

transgénicos expresando el gen de la PG de forma antisentido. Tenían una consistencia levemente diferente respecto a los tomates salvajes (Grierson y Schuch, 1993), mostrando además algunas características comercialmente valiosas como consecuencia de la alteración en el metabolismo de la pectina debido a los bajos niveles de PG (Schuch et al., 1991). Estos frutos fueron más resistentes al daño mecánico, lo cual permitió su cosecha en un estado más avanzado de maduración, resultando en un fruto más sabroso y por otro lado, los extractos tenían mayor viscosidad y mayor contenido de solutos solubles (estos tomates fueron comercializados por Calgene, USA).

El estrés en las plantas

A través de todo el planeta, las plantas habitan un amplio rango de ambientes con diversas combinaciones de condiciones abióticas e interacciones bióticas. Existen plantas que crecen en ambientes con temperaturas que alcanzan los -35°C en la Antártida o en zonas que sobrepasan los 55°C , como en el Valle de la Muerte (USA), como también en lugares donde la irradiación alcanza picos máximos o en sitios donde la oscuridad es total.

Los procesos evolutivos han esculpido a las plantas con combinaciones elaboradas de rasgos morfológicos, anatómicos, fisiológicos y de comportamiento, manteniendo poblaciones exitosas en diversas condiciones ambientales. Sin embargo, existen limitantes biofísicas y bioquímicas en la estructura y función de las plantas que impiden el desarrollo de ciertos rasgos y características que una planta individual puede tener en un hábitat en particular. Debido a su naturaleza sésil, las plantas no pueden escapar de los predadores ni de las condiciones ambientales adversas. Deben tratar de prosperar en el lugar que les tocó crecer. La falta de agua, el daño mecánico y las bajas temperaturas son las situaciones adversas más frecuentes que las plantas deben afrontar y esto es lo que constituye un estrés.

Pero, ¿a qué denominamos estrés?. Se lo define como el conjunto de condiciones capaces de producir una influencia desventajosa en procesos

fisiológicos. Puede ocasionar desde cambios en el crecimiento hasta daño en células y/o tejidos y modificar la expresión de genes.

Existen múltiples tipos de estrés a los que comúnmente se los divide de manera arbitraria en tres grupos: Físicos, químicos (abióticos) y bióticos (Tabla 2). A estas señales externas deben sumarse factores internos propios de la planta, es decir, condiciones de la "historia de la planta" como por ejemplo su nivel hormonal previo al estrés, su genotipo, momento del ciclo celular por el que atraviesa, su etapa ontogénica, etc., así como también la duración e intensidad de cada tipo de estrés. Según Anthony Trewavas (Trewavas et al., 1997), la interacción de estos factores genera 10^{10} posibilidades de estreses combinados. Esto nos da una idea de lo complejo e importante que resulta el estudio del estrés y las respuestas de la planta, así como también que posible/s vías de transducción de señales las conectan.

Tabla 2: Lista parcial de las fuentes de estrés ambiental en las plantas

Abiótico		
Físico	Químico	Biótico
Sequía	Polución	Competencia
Temperatura	M. pesados	Alelopatía
Radiación	Pesticidas	Herbivoría
Inundación	Toxinas	Patógenos
Viento	PH del suelo	
C.magnético	Salinidad	

Situaciones de estrés abióticos más comunes

Estrés hídrico

La mayoría de las plantas están expuestas a distintos grados y tipos de estrés en algún momento de su desarrollo, pero sin duda la falta de agua es la fuente de estrés más común y frecuente.

En nuestro país, las áreas subhúmedas, semiáridas y áridas (tierras secas), representan el 75% de la superficie total (según datos del Informe Nacional de la Secretaría de Desarrollo Sustentable y Política Ambiental de la Nación, para la Implementación de la Convención de las Naciones Unidas de Lucha Contra la Desertificación). A nivel mundial, Naciones Unidas calcula que la sequía y la desertificación afectan a 1.200 millones de personas en todo el mundo, mientras que las pérdidas anuales ascienden a 42.000 millones de dólares. Cerca del 40% de la población mundial vive en áreas con déficit hídrico y se estima que para el 2025, cerca de dos tercios de la población mundial -alrededor de 5.500 millones de personas- vivirán en áreas con déficit de agua. Por otro lado, el mal uso del agua disponible ha incrementado las pérdidas de este recurso por irrigación no apropiada en un 60% desde 1960. Teniendo en cuenta que cerca del 70% de toda el agua dulce disponible es utilizada por la agricultura, este no es un dato menor. (Convención Internacional del Agua Dulce (ONU), La Habana 2003).

En cuanto al déficit hídrico que sufre una planta, el grado de estrés puede variar desde leves fluctuaciones en la humedad atmosférica hasta deficiencias de agua extremas y baja humedad de los ambientes áridos. Las plantas responden a la falta de agua y esa respuesta depende principalmente de la intensidad y duración del estrés. Las respuestas más tempranas al estrés hídrico están mediadas por procesos fisiológicos. Al disminuir el contenido de agua en la planta, las células pierden turgencia, en consecuencia la expansión celular se detiene y con ello disminuye el crecimiento de las hojas. Con menor área foliar la planta transpira menos, conservando el agua limitante en el suelo para su uso por períodos más largos. Se considera entonces la reducción del área foliar como la primer línea de defensa frente al estrés hídrico. El déficit de hídrico provoca además una disminución en el módulo de elasticidad de la pared celular y modifica el umbral de cedencia de manera de acompañar el cambio de volumen de la célula (Taiz y Zeiger, 1998). La pérdida de turgencia se manifiesta en el aspecto marchito de las hojas, que toma distintas formas según la especie. En los cereales, por ejemplo, la hoja se enrolla mientras que en el tomate pierden su posición erecta. Asimismo, la inhibición de la expansión foliar reduce el consumo de carbono y energía; así una gran proporción de los fotoasimilados se redistribuyen hacia sistema radicular donde se utilizarán para

el futuro crecimiento, determinando una disminución en la relación vástago/raíz. Los ápices radiculares pierden turgencia en los suelos secos y por lo tanto el crecimiento se produce preferencialmente hacia capas más profundas, donde la pérdida de agua es menor (Taiz y Zeiger, 1998). Los frutos son un destino alternativo de los fotoasimilados y en general predominan sobre las raíces (Taiz y Zeiger, 1998).

Cuando el estrés es rápido o cuando se produce luego de que el área foliar ya llegó al máximo, la planta responde cerrando sus estomas, reduciendo así la transpiración. Esta respuesta puede generarse de forma pasiva por la pérdida de turgencia en las células de la guarda producida por evaporación (relacionada con situaciones atmosféricas demandantes), o de manera activa donde el cierre estomático es determinado por el estado hídrico de toda la hoja o de las raíces y en el que intervienen procesos metabólicos. Además se sabe que el ácido abscísico interviene en el cierre de los estomas tanto como señal a larga distancia desde la raíz (sensando el contenido hídrico del suelo) hasta las hojas, así como también liberándose desde los reservorios de la hoja como resultado de la deshidratación propia del tejido foliar. A largo plazo, además, el ABA influye sobre la tasa de crecimiento de las raíces y de las hojas, aumentándola e inhibiéndola, respectivamente.

En los comienzos del estrés, el cierre estomático incrementa la eficiencia del uso del agua (más CO₂ es asimilado por unidad de agua transpirada) debido a que la transpiración se ve más inhibida que la concentración intercelular de CO₂. La deshidratación progresiva de las células del mesófilo comienza luego a afectar negativamente la fotosíntesis. Cuando la intensidad o duración del estrés aumenta, la eficiencia en el uso del agua disminuye, la inhibición en el metabolismo del mesófilo es mayor y por lo tanto disminuye la cantidad de fotosintatos exportados desde las hojas. La translocación de los productos también se ve afectada, pero solo en estadios tardíos del estrés, lo que permite a las plantas movilizar y usar reservas donde lo necesitan (por ejemplo en las semillas en crecimiento) aún en condiciones de estrés severo. En la mayoría de las especies, la habilidad de translocar carbonos es el factor clave de su resistencia a la sequía.

Las plantas pueden también responder fisiológicamente a la falta de agua mediante un ajuste osmótico, que consiste en el incremento en la

concentración de iones y solutos compatibles en la célula produciendo un descenso en el potencial osmótico y como consecuencia, la entrada de agua a la célula. De esta manera, las plantas capaces de realizar ajuste osmótico mantienen la turgencia, permiten la elongación celular y facilitan la alta conductancia estomática a niveles de bajo potencial agua. En general este mecanismo está asociado al aumento en el módulo de elasticidad (endurecimiento) de la pared celular (Taiz y Zeiger, 1998).

Además de las respuestas individuales a situaciones de estrés, las plantas han evolucionado adaptándose a la selección impuesta por los distintos ambientes. Las plantas de los desiertos, llamadas efímeras, sencillamente eluden la sequía. Poseen un ciclo de vida corto, producen poca biomasa y cuando la disponibilidad de agua es casi nula se mantienen en estado de semilla.

Hojas pequeñas, pelos foliares, reservóros de agua, aerénquima, son ejemplos de distintas estrategias cuando el agua es limitante.

Bajas temperaturas

Otra situación a la que las plantas se ven sometidas es el frío. Las bajas temperaturas son un fenómeno que aparece episódica o periódicamente en el 90% de las tierras secas del planeta. Aunque la biomasa de la zona ecuatorial posee una amplia variedad de géneros y especies, las plantas que alimentan al mundo crecen principalmente en regiones donde las bajas temperaturas son un problema ambiental.

Hay dos tipos de daños que las plantas pueden sufrir al ser expuestas a bajas temperaturas (Stushnoff et al. 1984). El primero es el daño por *enfriamiento* que ocurre aproximadamente entre los 20°C y 0°C. El daño resultante incluye, dependiendo del estado en el que se encuentre la planta, una variedad de interrupciones fisiológicas en la germinación, en el desarrollo de flores y frutos, retardo en la maduración, disminución en el peso de la planta, y por lo tanto en la productividad, lo que significa en algunos cultivos pérdidas anuales millonarias. Se sabe además que el enfriamiento modifica el metabolismo de las células; algunos de estos procesos se recuperan rápidamente y otros no. Son afectadas reacciones enzimáticas, tasa de difusión

de sustratos, propiedades de transporte de membranas, etc. (Kratsch and Wise, 2000). A menudo, el estrés por enfriamiento a temperaturas no letales es reversible. Asimismo, la mayoría de las especies poseen una habilidad denominada "aclimatación". Este mecanismo le permite a la planta reducir o eliminar el daño producido durante una exposición gradual a temperaturas decrecientes por debajo del rango crítico.

El segundo tipo de daño es el causado por congelamiento y ocurre cuando la temperatura externa cae por debajo del punto de congelación del agua. Lo que experimentan las plantas en esta situación es un congelamiento intra y/o extracelular. El congelamiento intracelular daña la estructura protoplasmática y los cristales de hielo pueden matar a la célula (Levitt, 1980). Debido al congelamiento extracelular el citoplasma de la célula se deshidrata ya que el agua celular es transferida a los cristales de hielo que se forman en los espacios intercelulares. Según la planta, la tolerancia a bajas temperatura puede diferir. Algunas variedades de plantas son tan susceptibles al daño por congelamiento que pueden morir al primer contacto con una helada (el arroz, el maíz y el tomate) (Stushnoff et al. 1984); no toleran hielo en sus tejidos y muestran rápidamente síntomas de daño que incluyen apariencia flácida con pérdida de turgencia. Algunos pastos, que poseen la capacidad de aclimatarse, pueden soportar la presencia de hielo extracelular en sus tejidos y sobrevivir a - 40°C, y casos más extremos se han visto en plantas que sobreviven sin la formación de hielo extracelular soportando temperaturas de hasta -196°C.

Daño mecánico

Una herida abierta causada por daño mecánico es un potencial sitio de infección para patógenos; ambas situaciones, por separado o combinadas, inducen respuestas locales y sistémicas, reflejadas en la acumulación de variadas sustancias como inhibidores de proteasas, oxidasas, aminopeptidasas y quitinasas (Constabel et al., 1995 Schweizer et al., 1998). El estudio en detalle de los eventos de señalización que generan una respuesta al daño a nivel sistémico y local, llevaron al descubrimiento del ácido jasmónico (JA) como señal de respuesta local (Reymond y Farmer, 1998) y a la sistemina (un oligopéptido) como señal sistémica (Pearce et al. 1991). Orozco-Cárdenas y

colaboradores (2001), observaron la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (componentes comunes en las respuestas de defensa de las plantas) en hojas de tomate dañadas y determinaron que el H_2O_2 sería el segundo mensajero en vía de señalización del JA. Esta vía es la responsable de inducir genes tempranos y tardíos que constituyen una barrera contra microorganismos oportunistas (Reymond et al 2000; Orozco-Cárdenas et al., 2001). Por otro lado, la acumulación de inhibidores de proteasas en hojas de tomate inducida por daño por la vía del JA y de la sistemina, es regulada por la acción inhibitoria del ácido salicílico (SA) y el ácido acetil salicílico (ASA) (Doares, 1995).

Estrés salino

En condiciones naturales, las plantas terrestres superiores se encuentran con tierras de alta concentraciones salina, ya sea en cercanías al mar o en estuarios, donde el agua marina y el agua fresca suelen mezclarse. En zonas lejanas a la costa, filtraciones naturales de sales provenientes de depósitos geológicos marinos pueden ser arrastradas hacia zonas adyacentes generando tierras estériles para la agricultura. Sin embargo, un problema aún mayor es la acumulación de sales como consecuencia del riego. La evaporación y transpiración remueven del suelo el agua pura como vapor y, si el agua de riego contiene altas concentraciones de sales que no tienen posibilidad de fluir, estas se acumulan alcanzando niveles que son dañinos para la mayoría de las especies. Se estima que cerca de 1/3 de las zonas irrigadas de la Tierra están afectadas por estrés salino (Taiz y Zeiger, 1998).

Solutos disueltos en la zona de la raíz de una planta generan un bajo potencial osmótico produciendo una baja en el potencial agua del suelo. Así, el balance general de agua de la planta es afectado, porque las hojas necesitan desarrollar un potencial agua aún menor para mantener el gradiente cuesta arriba de potencial agua entre el suelo y las hojas. En este caso, el efecto de la sal es el mismo que el producido por déficit hídrico. En paralelo, existe un efecto de la sal que está relacionado con la toxicidad misma del ión, al acumularse en concentraciones dañinas de Na^+ , Cl^- o SO_4^{2-} en la células. En presencia de sal, las células vegetales responden disminuyendo su potencial

osmótico y lo hacen mediante dos procesos: la acumulación de iones en la vacuola o expulsión hacia fuera de la célula y la síntesis de solutos compatibles en el citosol. Estos compuestos incluyen glicina betaina, prolina, sorbitol y sacarosa (Buchanan et al., 2000). Uno de los posibles mecanismos de toxicidad del Na^+ es el hecho de estar directamente involucrado con la interferencia en los transportadores celulares de K^+ , un macronutriente esencial (Buchanan et al., 2000).

A nivel fisiológico, las plantas minimizan el daño ocasionado por la sal excluyéndola de los meristemas, en particular del vástago y de las hojas, que son zonas en expansión y fotosintéticamente activas. El movimiento de Na^+ en las hojas es minimizado por su absorción en el flujo xilemático durante la transpiración. Algunas plantas halófitas no excluyen el Na^+ , sino que poseen una glándulas en la superficie de las hojas donde se almacena la sal en forma de cristales (Taiz y Zeiger, 1998).

Percepción celular del estrés

Las vías de transducción de señales comienzan con la percepción de dicha señal. En el caso del estrés, la multiplicidad de señales generadas por la falta de agua, el frío, el calor, la alta salinidad, el daño, etc. poseen algunos rasgos comunes, pero a su vez, cada una aporta características particulares. Hasta la fecha, no ha sido confirmada la existencia en plantas de sensores para percibir la señal inicial de un estrés, pero se especula que, basado en la multiplicidad de señales, debe existir más de uno. Dado que la falta de agua, el frío y la salinidad inducen transcientemente el flujo interno de Ca^{++} (Sanders et al., 1999; Knight, 2000), el canal responsable del tránsito de este ión es uno de los candidatos a funcionar como sensor de este tipo de estrés (Xiong 2002). Otro probable sensor son las histidinas quininas. Se ha probado que en ciertas algas y bacterias esta proteína de membrana es un termosensor que regula la expresión de genes que responden al frío (Suzuki et al., 2000; Aguilar et al., 2001).

En plantas, el frío, la falta de agua y la alta salinidad poseen la característica común de estimular la acumulación de osmolitos compatibles y

antioxidantes (Hasegawa et al., 2000). Estos compuestos, junto con el ABA (de la que se comentará en detalle más adelante), el Ca^{++} y el inositol fosfato constituyen probables mensajeros secundarios en la vía de transducción de señales de respuesta al estrés, aunque su modo de acción no ha sido del todo esclarecido (Xiong et al., 2002).

Genes que responden a estrés

Como se mencionó anteriormente, el estrés genera en las plantas respuestas a todo nivel. En este contexto, en los últimos años ha aumentado de forma geométrica descubrimiento y la caracterización de genes que responden a la falta de agua, a la alta concentración salina, al frío o al calor, etc. (Silhavy et al., 1995; Schneider et al., 1997; Padmanabhan et al., 1997; Wang et al., 1998; Vaidyanathan et al., 1999; Tomashow, 1999; Hasegawa et al., 2000; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Zhu, 2002, etc.). Actualmente se cree que son cientos de genes los involucrados en las respuestas a estreses abióticos (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1999, Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000, Zhu, 2002, Xiong y Zhu, 2001, Xiong y Zhu, 2002, Xiong et al., 2002). Los productos de estos genes no solo tienen funciones protectoras de la célula, mediante la producción de proteínas metabólicas, sino también de señales de transducción de la respuesta al estrés. Con este criterio, los productos de estos genes se han clasificado en dos grandes grupos. El primero incluye proteínas cuya probable función sea la de participar en la tolerancia al estrés: proteínas de canales de agua, involucradas en el movimiento de moléculas de agua a través de la membrana plasmática, enzimas requeridas para la biosíntesis de varios osmoprotectores (azúcares, Prolina y Betaina), proteínas que podrían directamente proteger macromoléculas y membranas (proteínas LEA, osmotina, proteínas anticongelantes, chaperonas y proteínas de unión al ARNm), proteasas para el reciclado de proteínas (thiolproteasas, Clp proteasas y ubiquitinas) y enzimas de detoxificación (glutathion-S-transferasa, epoxi-hidrolasa soluble, catalasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa). Algunas de estas proteínas, por ejemplo la enzima clave para la síntesis de prolina, fueron sobreexpresadas en

plantas transgénicas , obteniéndose un fenotipo tolerante al estrés (Kavi y Kishor ey al., 1995), indicando una función directa en la tolerancia al estrés. El segundo grupo contiene proteínas involucradas en la regulación de la señal de transducción y expresión génica, cuya probable función sea la de responder a la señal de estrés: proteínquinas, factores de transcripción y enzimas involucradas en el metabolismo de fosfoinositol (Seki et al., 2003).

¿Cómo es la regulación de estos genes?

El ácido abscísico (ABA)

El ácido abscísico fue descubierto a principio de los años '60 de forma independiente por varios grupos. Originalmente se creía que esta hormona estaba involucrada en la abscisión de frutos y en la dormición de árboles, pero el rol del ABA en estos procesos aún no está del todo claro. Se sabe, sin embargo, que el ABA es necesario para el desarrollo de las semillas, regulando procesos esenciales para la vitalidad y la germinación junto a otros factores del desarrollo que incluyen la morfogénesis del embrión (Quatrano, 1987; Leung y Giraudat, 1998; Rock, 2000), acumulación de proteínas y lípidos de reserva (Finkelstein et al., 1985) , la dormición primaria (Frey et al., 1999) y la adquisición de la tolerancia a la desecación (Kermode y Bewley, 1987).

Tal e Imber (1970) demostraron que la pérdida de agua causaba una rápida acumulación de ABA en la planta. Jones (1980) y Cowan (1982) fueron los primeros en sugerir que las plantas pueden "medir" el estatus de agua del suelo independientemente de la situación hídrica del resto de la planta. En el suelo seco, las raíces deshidratadas sintetizan ABA rápidamente y esto produce un aumento en su concentración en el flujo xilemático, viajando como información química, hasta alcanzar hojas y yemas, aún turgentes, vía apoplasto. Por esta razón generalmente se refiere a ella como la "hormona del estrés" (Zeevaart, 1999). El aumento de las concentraciones endógenas de ABA induce genes blanco, por lo tanto, la acumulación de ABA no es más que un paso en la vía de transducción de señales hasta la inducción de genes durante el déficit de agua.

Pese a los esfuerzos realizados y aunque se sabe que la regulación de estos procesos es mediada en gran parte por cambios en la síntesis *de novo* del ABA (Schwartz et al., 2003), el receptor de esta fitohormona aún no ha sido identificado. Sutton et al (2000) construyeron una "library" de ADNc de células de la guarda y dicen que contiene el ADNc que codifica para el receptor del ABA, aunque aún no lo han aislado. Recientemente, Zhang et al. (2002) identificaron y purificaron una proteína de 42 KD a partir de epidermis hoja de poroto que se une al ABA; según estos autores, esta es la primera proteína de unión a ABA que se ha logrado purificar y sugieren que tendría un potencial rol como receptor de esta hormona.

Vías de regulación

La mayoría de los genes que se inducen por estrés hídrico responden al tratamiento exógeno con ABA, pero no todos. Estudios focalizados en la expresión de estos genes en mutantes deficientes en ABA (*aba*) o insensibles a ABA (*abi*) en *Arabidopsis* revelan que efectivamente algunos de estos genes no requieren la acumulación de esta hormona para responder en situaciones de sequía o frío (Bray et al., 1997). Por lo tanto, parecen existir dos grandes vías de respuesta a situaciones de estrés: una que depende de ABA y otro independiente de esta fitohormona:

Genes que responden a estrés por la vía dependiente del ABA: bajo condiciones de estrés hídrico y salino, los niveles endógenos de ABA se incrementan (Ingram y Bartels, 1996, Bray, 1997). Existen genes que responden a la acumulación de ABA de forma directa, es decir, sin necesidad alguna de síntesis proteica (Giraudat et al., 1994, Ingram y Bartels, 1996. Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Kang et al., 2002). Tal es el caso de genes que poseen secuencias llamadas ABREs (PyACGTGGC) en sus regiones promotoras. Las secuencias G-box, son semejantes a las ABREs tanto en forma como en función, ya que participan en la respuesta a distintos tipos de estrés vía ABA. Se ha aislado cADN para proteínas de unión a las secuencias ABRE y G-box (Uno et al., 2000; Choi et al., 2000). Estas proteínas,

llamadas bZip, están caracterizadas por poseer una región básica adyacente a un motivo "cierre de leucina" y constituyen una gran familia. Recientemente, Kang et al. (2002) reportaron la expresión constitutiva de un bZip en *Arabidopsis* que generó una planta hipersensible al ABA y con mayor tolerancia a la sequía. En algunos casos, son necesarios elementos acoplantes para especificar la función de las secuencias ABRE, como se determinó para el caso de el gen HVA22 en el cual su expresión estaba regulada por un verdadero complejo proteico de respuesta a ABA (Shen y Ho, 1995). Sin embargo, es desconocida aún la manera en que el ABA promueve la unión de las bZip a los genes blanco para iniciar su transcripción. Existen otros elementos distintos a las secuencias ABRE que también intervienen en la expresión de genes de respuesta a ABA, no solo en condiciones de estrés hídrico, sino también en el proceso de disecación de las semillas. La Sph box y el motivo GTGTC regulan la expresión dependiente de ABA del gen C1 de maíz, cuyo producto es un factor de transcripción que interviene en el control de la biosíntesis de antocianinas durante el desarrollo de la semilla (Mc.Carty, 1995). Por otro lado, existen dentro de esta vía dependiente del ABA, genes que requieren de síntesis proteica para su expresión. Un ejemplo de ello es la inducción del gen rd22 de *Arabidopsis*, inducible por sequía (Abe H et al., 1997; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Este gen posee una región de 67 bp en su promotor que resulta esencial para su respuesta a ABA y que no contiene secuencias ABRE. A estos motivos conservados se les unen factores tanto bZip como otros (MYB, MYC) promoviendo y activando la expresión de este gen de manera cooperativa (Iwasaki et al., 1995; Abe et al., 1997).

Genes que responden a estrés por la vía independiente del ABA: Muchos genes son inducidos por falta de agua, sal o frío en mutantes de *Arabidopsis* deficientes en ABA (*aba*) o insensibles a ABA (*abi*), lo que sugiere que estos genes no necesitan del ABA para su expresión bajo esos tipos de estrés (Thomashow, 1994; Ingram y Bartels, 1996; Bray, 1997). Una secuencia conservada de 9 pb (TACCGACAT), llamada DRE (Samuka et al. 2002) es esencial para la regulación de ciertos genes bajo condiciones de estrés hídrico, frío y altas concentraciones salinas, pero no funcionan como las ABREs, ya que lo hacen de un modo independiente del ABA. Se conocen los factores de

transcripción que se unen a estas secuencias, entre los que se encuentran las proteínas EREBP y AP2, involucradas también en la expresión de genes de respuesta al etileno y en la morfogénesis floral, respectivamente.

La familia génica *Asr* de tomate

Los *Asr* (por ABA, "stress" y "ripening") comenzaron a ser estudiados en 1993, cuando Iusem et al. aislaron por primera vez el clon de cADN a partir de una genoteca de cADN de fruto de tomate rastreada con clones de cADN diferenciales de hojas de tomate bajo estrés hídrico vs. hojas no estresadas. Rossi y Iusem (1994) utilizaron el cADN de *Asr1* como sonda para rastrear una biblioteca genómica de tomate, aislando un nuevo clon genómico al que denominaron *Asr2*. Por otro lado, Amitai et al. (1993) de la misma manera obtuvieron otro clon genómico al que denominaron *Asr3* (# acceso al GenBank X74908). La región codificante de *Asr1* muestra 79,1% de homología con *Asr2* y 76,2% con *Asr3* a nivel nucleotídico, mientras que *Asr2* y *Asr3* comparten 86,4% de homología. Sin embargo, si se consideran las regiones promotoras, así como también las regiones 5' y 3' no codificantes la homología cae por debajo del 50%. Para determinar si estos tres clones correspondían a tres formas alélicas del mismo gen o, alternativamente, eran miembros parálogos de una familia génica, Rossi et al. (1996) diseñaron experimentos de PCR utilizando plantas endocriadas (extensivamente homocigotas). Los resultados mostraron que los clones en estudio mapeaban en tres diferentes loci. Además, los autores determinaron el ligamiento de *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* en un mapa de RFLP de tomate (Tanksley et al., 1992) en la misma posición del cromosoma 4, demostrando que pertenecen a una familia génica.

Asr1 y *Asr2* han sido los más estudiados. En 1997. Gilad et al. mediante experimentos de fraccionamiento celular localizaron a *Asr1* principalmente en el núcleo y se demostraron que posee actividad de pegado a ADN de manera dependiente del ion Zinc. Por su parte, Rossi et al. (1998), utilizando una fusión de parte de la zona 5' no codificante de *Asr2* con el gen reportero de la βglucuronidasa (GUS), transformaron plantas de papaya, tabaco, tomate y papa, determinando su funcionalidad como región promotora.

Objetivos

A partir de estos conocimientos previos, los objetivos principales de este trabajo son:

Analizar las características comunes y diferenciales en la estructura de las ASR.

Evaluar la expresión de los genes de la familia *Asr* de tomate frente al estrés.

Comenzar con la puesta a punto de ensayos que permitan determinar la capacidad protectora de ASR1 frente al estrés en sistemas de expresión heterólogos.

**MATERIALES
Y
METODOS**

ANALISIS ESTRUCTURAL DE LAS ASRs

Programas computacionales

Para la búsqueda de secuencias homólogas se utilizó la base de datos GenBank usando el programa BlastP (Altschul et al., 1997). El alineamiento múltiple de secuencias se desarrolló mediante el programa ClustalW 1.8 (Higgins et al., 1996), a través del BMC Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>). Los perfiles hidropáticos se realizaron con el programa DNA strider utilizando versión de Kyte-Doolittle con una ventana = 5. La búsqueda de sitios consenso se realizó mediante el análisis de PROSCAN a través del PROSITE.BASE (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>). La hidrofiliidad se calculó según Kyte-Doolittle (1982). La combinación multivariable de regresión lineal (SOPMA-GOR4-SIMPA) se utilizó para las predicciones de estructura secundaria de las proteínas.

ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOS *Asr* DE TOMATE (*L. esculentum*)

Material vegetal

Las plantas y los frutos utilizados para el aislamiento de ARN y proteínas son del genotipo UC82B de *Lycopersicon esculentum*. Las semillas se germinaron sobre algodón húmedo en bandejas plásticas, durante 3 días en oscuridad a 22-25°C. Las plantas se crecieron durante 1 mes en invernáculo bajo condiciones estándares (fotoperíodo 16hs luz/8 hs oscuridad a 22-25° C).

Colección de muestras en tejidos sin estrés

Para fruto se colectaron de plantas de tomate frutos de distintos estadios de maduración (estadio 1 -verde-, estadio2 -"breaker"- y estadio 3- rojo-). Para órgano floral se tomaron muestras de flores de plantas de 2 meses, a las cuales se dividió en pétalos, sépalos y el "resto", que incluye principalmente las estructuras sexuales.

Tratamientos de estrés

Se realizaron 4 tratamientos de estrés:

- 1) Estrés hídrico: muestras de hoja, tallo y raíz se obtuvieron de plantas que fueron removidas de sus macetas y a las cuales se dejó secar sobre la mesada del laboratorio durante distintos tiempos. Los mismos órganos extraídos de plantas regadas normalmente a capacidad de campo se usaron como control.
- 2) Bajas temperaturas: muestras de hoja, tallo y raíz se obtuvieron de plantas que fueron expuestas a 6-8°C durante 24 horas. Los mismos órganos extraídos de plantas crecidas a 22-25°C se usaron como control.
- 3) Daño mecánico: hojas, raíces y tallos se seccionaron en cuadraditos de 0.5x0.5x0.5 cm y se pusieron sobre papel de filtro humedecido con buffer fosfato 50 mM (pH7) durante 3 horas. Como controles, los mismos tejidos sin cortar se pusieron durante los mismos tiempos en el mismo buffer.
- 4) Infección por hongos: estas muestras fueron hojas infectadas naturalmente por oidios en el invernáculo.

En todos los casos las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente luego de los tratamientos y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

Extracción de ARN

La extracción de ARN de todos los órganos se realizó siguiendo el protocolo recomendado por Gibco para su producto Trizol a partir de 200 mg de tejido. En forma resumida, las muestras de tejido conservadas a -80° C se pulverizaron en mortero con nitrógeno líquido. Se agregó 1ml de Trizol (Gibco) por cada 100 mg de tejido y se homogeneizó. El homogenato se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 12.000 g a 2-8° C para separar los restos de tejido vegetal. Al sobrenadante se le realizó una extracción de proteínas por el agregado de 0,2 ml de cloroformo por cada 1 ml de Trizol utilizado inicialmente. Se dejó actuar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 10.000 g a 2-8° C, se recuperó la fase acuosa y se transvasó a otro tubo. Se

adicionaron 0,5 ml de isopropanol y 0,5 ml de una solución salina (0,8M citrato de sodio; 1,2 M NaCl) por cada 1 ml de Trizol. Se dejó actuar durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 15 minutos a 10.000 g a 2-8° C. El pellet se lavó con al menos 1 ml de etanol 75% y se centrifugó 5 minutos a 7500 g a 2-8° C. El pellet se dejó secar al aire, se resuspendió en agua MiliQ estéril mediante pipeteo. Para que la resuspensión fuera total se calentaron las muestras 10 minutos en un baño de 55-60° C.

Cálculo de la concentración y corroboración de la integridad del ARN obtenido

La cuantificación del ARN se realizó espectofotométricamente, por absorbancia a longitud de onda de 260nm. Por otro lado, la integridad del ARN se corroboró mediante una electroforesis en gel desnaturizante de agarosa (1%), formaldehído (37%) y Mops (1x). Las muestras se llevaron a un volumen de 50 µl con formamida (40%), formaldehído (6%), Mops (1x,) Bromuro de Etidio (1ul). Previo a la electroforesis, las muestras se desnaturizaron por calentamiento a 65° C durante 10 minutos. La composición del buffer de corrida utilizado fue: Mops (1x) y formaldehído (6%). La electroforesis se realizó bajo campana de gases durante 1 hora a 90 V.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados fueron provistos por la compañía Bio Synthesis y previamente diseñados usando el programa ClustalW (1.8) para el alineamiento múltiple de secuencias y el programa Oligo 4.0 (para Macintosh).

Para amplificar por RT-PCR las secuencias correspondientes a los mARN de cada uno de los *Asr*, se diseñaron los siguientes tres pares de oligonucleótidos específicos sobre las secuencias correspondientes (Número de acceso al GenBank: U86130 para *Asr1*, L20756 para *Asr2* y X74908 para *Asr3*) y de manera tal que los productos de amplificación fuesen de distinto tamaño para permitir su identificación por tamaño en gel:

Asr1-directo: 5' GAT AGA TTT ATT GTT TCA GAT GGA G 3'
Asr1-inverso: 5' GAC ACA ACA CTT ATA CCA AAT ATG G 3'

Asr2-directo: 5' TTA AGA GAA GCA ATA CAA TAT GGC T 3'
Asr2-inverso: 5' TCC ACC TGC CCC AAC TGC AGC AAC A 3'

Asr3-directo: 5' CAA AGC ATA AAT TGT CTA TCG ACG T 3'
Asr3-inverso: 5' TCA ACT GGA CCA CCT TCT TCC TCT C 3'

Los tamaños de los productos de amplificación esperados son: 418 pb para *Asr1*, 269 pb para *Asr2* y 140 pb para *Asr3*.

Para utilizar como control interno de expresión constitutiva se sintetizaron dos oligos que amplifican el mRNA del gen de actina de papa (*Solanum Tuberosum*, número de acceso al Gen Bank X55752) y cuya secuencia fue provista por el Instituto de Biotecnología, INTA-Castelar. Estos oligos se utilizaron por ser la papa una solanacea filogenéticamente muy cercana al tomate:

Actina-directo: 5' TGG CAT CAT ACC TTT TAC AA 3'
Actina-inverso: 5' TCC GGG CAT CTG AAC CTC TC 3'

El tamaño del producto de amplificación esperado para la actina es de 519 pb.

RT-PCR

Para cuantificar el ARNm de los genes *Asr*, se aseguró que todas las reacciones de PCR fueran llevadas a cabo en un rango lineal de amplificación, es decir, que las cantidades de producto resultaran proporcionales a las cantidades de ADNc molde inicialmente presentes en las muestras. Para ello, se probaron diferentes números (no saturantes) de ciclos (de 25 a 35) con los oligonucleótidos y las condiciones descriptas en "Amplificación por PCR". La intensidad de las bandas correspondientes a los productos de PCR se analizaron por medio del programa

NIH-Image para MacIntosh. De esta manera se determinaron los números de ciclos óptimos para cada experimento, con fines semicuantitativos. La amplificación de un fragmento del gen de actina fue usada como control y las reacciones se llevaron a cabo de la misma manera que para los *Asr*.

Transcripción Reversa (RT)

3,6 µg de ARN de cada muestra se llevaron a 5 µl de volumen final con agua MilliQ estéril y se desnaturalizaron mediante calentamiento durante 5' a 65°C. Las muestras se pusieron inmediatamente en hielo y se les adicionó 15 µl de la mezcla de reacción conteniendo : buffer para Transcriptasa reversa, 1 mM de DTT, 20 U de RNAsin, 400 µM de dNTPs, 3,3 µM de oligodT (15) y 300 U de M-MLV RT. Para que el oligodT hibride con la cola de poliA de los mARN, la reacción se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se sintetizó la primera cadena de ADNc a 35°C durante 1 hora. Finalmente se calentó a 95°C durante 5 minutos para inactivar a la transcriptasa reversa.

Amplificación por PCR

Las reacciones se llevaron a cabo en 25 µl con 1,5 mM de MgCl₂, buffer para Taq polimerasa, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Taq Polimerasa, 2 ng/µl de primer directo, 2 ng/µl de primer inverso y 2,5 µl de ADNc producto de la RT. Se utilizó termociclador Mj-Research con el siguiente programa:

94°C durante 3 minutos, X número de ciclos de: 94°C durante 1minuto, 55°C durante 1minuto y 72°C durante 1minuto, y extensión a 72°C durante 10 minutos.

Posteriormente los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa nativo al 2,5% teñido con Bromuro de Etidio.

Northern blot

Muestras de 20 µg de ARN total se separaron electroforéticamente en gel desnaturalizante y se transfirieron a membrana de nylon (Hybond-N. Amersham).

Las membranas se prehibridaron a 42°C en 50% formamida, 5X solución Denhardt, 5X SSC, 1,2% SDS y 0,5 mg/ml de DNA de esperma de salmón. Las membranas se hibridaron luego con las distintas sondas (amplicones de *Asr1*, *Asr2*, *Asr3* y Actina) marcadas con α CTP-P³² mediante el sistema de "Random priming" (Prime-a-gene de Promega). La hibridaciones se realizaron a 42°C toda la noche. Los lavados fueron realizados bajo condiciones de alta rigurosidad: a 42°C en 2X SSC/0,1% SDS durante 20 minutos, luego a 42°C en 0,5X SSC/0,1% SDS durante 20 minutos y finalmente un lavado a 65°C en 0,1X SSC/0,1% SDS durante 20 minutos. Después de los lavados, las membranas radioactivas fueron expuestas a placas autoradiográficas (Xomat, Kodak, USA) durante 2-3 días y reveladas en revelador automático.

Cuantificación relativa del ARN mensajero

Las placas autoradiografías fueron sometidas a "scanning" en un equipo PhotoDyne y las bandas fueron cuantificadas por medio del programa NHI Image para MacIntosh. Los valores de densidad obtenidos fueron graficados con el programa Excel de Microsoft.

Producción y purificación de la proteína ASR1 por columna de níquel

El plásmido pET portando el clon de ADNc de *Asr1*, utilizado para la producción de la proteína ASR1 fue construido por lusem et al., 1993. La inducción de la proteína y su purificación fue realizada por el Lic. Gustavo Gudesblat, utilizando el Kit HisTrap de Pharmacia Biotech, basado en la técnica denominada metal-chelate affinity chromatography (MCAC): proteínas recombinantes que llevan fusionadas al menos 6 residuos consecutivos de histidina, pueden purificarse usando una resina conteniendo iones níquel inmovilizados por unión covalente.

Producción de anticuerpos contra la proteína ASR1

Este procedimiento fue realizado por la Dra. Hebe Goldman, del Laboratorio de Inmunoquímica de la FCE y N-UBA. El suero anti-ASR1 fue obtenido por inoculación intramuscular de ratones con 25 µg de la proteína ASR1 purificada, obteniéndose un título de 16000.

Extracción de proteínas

0,1g de cada tejido se congelaron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en 500 µl de Buffer de extracción de proteínas (NaHPO₄ (pH7) 50 mM; β-mercaptoetanol 10 mM; Na₂EDTA 10mM, N-lauril-sarcosina 0,1%; Tritón X-100 0,1%) con ayuda de un émbolo plástico de punta cónica. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos. Luego se centrifugaron durante otros 5 minutos a 5000 rpm.y se descartó el pellet.

Elución de proteínas a partir del gel de policrilamida

Para la elución de proteínas del gel, se separó por corte con bisturí el bloque de acrilamida-bis conteniendo la zona de interés. Este bloque se incubó en buffer de electroforesis durante toda la noche y luego se colectó la solución resultante. Las proteínas se concentraron por el método de Metanol-Cloroformo-Agua (Guide to Protein Purification, Murray Deutscher, Meth.In Enz., pp78) y se resuspendieron en buffer de extracción.

Cuantificación de proteínas

Para medir la cantidad de proteínas presentes en los extractos, se utilizó el método de Bradford (1976). Se midió la absorbancia a 570 nm en lector de Elisa (Microplate Reader Benchmark de Bio-Rad) y utilizando el programa Excel 97 a partir de la curva patrón realizada con BSA, se dedujo la fórmula de la recta y de allí la cantidad en µg de la proteína incógnita.

Western blot

Se utilizó la técnica de Western blot según Sambrook et al., 1989 con algunas modificaciones. 20 µg de cada extracto proteico obtenido se incubaron en "Loading Buffer" (0,125M Tris Cl (pH 6.8); 10 mM Dithiothreitol; 1% SDS; 0,005% BPB; 5% glicerol) durante 5 minutos a 100° C y se sembraron en gel separador de poliacrilamida 16.5% (16,5% acrilamida:bisacrilamida (30:1); 0,39M Tris-HCl (pH8.8); 0,1% SDS; 0,1% APS; 2ul TEMED). Se realizó la electroforesis en Buffer Tris-Glicina (25 mM Tris; 250 mM glicina; 0,1% SDS) a 60 mA. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Hybond-C Extra. Amersham) en buffer de transferencia (39 mM Glicina; 48 mM Tris base; 0.037% SDS; 20% metanol) durante 1 hora a 100 V. Para la inmunodetección, se bloqueó la membrana con Solución de bloqueo (1x PBS; 5% leche descremada; 0,05% Tween 20) durante 2 horas en agitación. La membrana se incubó luego durante 1 hora y media a temperatura ambiente y agitación con el suero de ratón anti-ASR1 en una dilución 1/200 en Solución de hibridación (1x PBS; 0,5% leche descremada; 0,05% Tween 20). En forma paralela se incubó como control un duplicado de la membrana con suero preimmune de ratón en una dilución 1/200 en solución de hibridación. A las membranas se les realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con buffer de hibridación y luego se las incubó durante 30 minutos con suero anti-ratón conjugado con peroxidasa (origen comercial, Santa Cruz biopp) en una dilución 1/40.000 en buffer de hibridación. Las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada vez con buffer de hibridación. Para el revelado de las proteínas inmobilizadas en la nitrocelulosa se utilizó el Kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) que consiste en la oxidación del luminol catalizada por la peroxidasa, resultando en la emisión de quimioluminiscencia. Dicha quimioluminiscencia impacta en placa autoradiográfica (Xomat, Kodak, USA) por exposición durante varios minutos luego de lo cual se reveló en reveladora automática.

Subclonado de los amplicones de *Asr1* y *Asr2*

Productos de PCR de *Asr1* y *Asr2* (amplicones) se purificaron del gel de agarosa mediante columnas Wizard Minipreps de Promega. Por medio de la reacción de "fill-in" se generaron extremos romos en los amplicones para permitir su subclonado en el plásmido pBluescript SK (Stratagene). Para ello, 350 ng de cada producto de PCR, 0,5 mM dntps, 1X Buffer Klenow y 5U de enzima Klenow se calentaron a 37°C durante 30 minutos. Luego se agregó 20 mM de EDTA a cada tubo y se calentó a 75° C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Para la restricción del vector se incubaron a 37°C durante 2 horas, 2 ug de pBluescript en 1X Buffer neb#3 y 200 U de Eco RV (Gibco). Se realizó luego un paso de precipitación para eliminar las sales y se calentó a 65°, 10 minutos para inactivar la enzima. Se chequeó el corte por electroforesis en gel de agarosa y se diluyó el plásmido hasta 10 ng/μl. Para la ligación de los amplicones en el pBluescript se probaron distintas relaciones vector-inserto (1:1, 1:10, 1:50 y 1:100), utilizando 10 ng de pBluescript cortado, 1X de Buffer ligasa (Promega), 10U de Eco RV (Gibco), 20 U de Ligasa HC (Promega) y la cantidad adecuada de inserto (amplicón) cuya concentración era de (30 ng/μl). Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se calentó a 65°C durante 10 minutos para inactivar las enzimas. Con los productos de ligación se transformaron según Sambrock et al. (1989) bacterias de *E. coli* competentes (cepa DH5-α) y se crecieron en placas con LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l) + agar (1,5%) suplementado con ampicilina (100ug/ml), 20 mM IPTG y 0,6% X-Gal a 37°C durante toda la noche. Se seleccionaron al azar varias colonias blancas (y alguna azul como control) para confirmar la presencia de los insertos mediante la técnica de "colony" PCR. Para ello se "picó" la colonia con escarbadiantes, se resuspendió en 50 ul de agua y se hirvió 10 minutos a fin de lizar las bacterias. Se tomaron 5 ul para una reacción de 25 ul de PCR con cada oligonucleótido. El producto se separó mediante electroforesis en gel de agarosa. Las colonias positivas para la presencia del inserto se crecieron en LB ampicilina toda la noche a 37°C con agitación. Para identificar insertos en posición sentido ("sense") y antisentido ("antisense") de cada uno de los amplicones, se realizaron, a partir de los cultivos y según Sambrock et al. (1989),

minipreparaciones de plásmidos a los cuales se cortó con 20 U de enzima Xho (Gibco). Se chequeó en gel de agarosa la aparición de bandas diferenciales entre las dos construcciones (ver Figura 1) y una colonia "sense" y otra "antisense" de cada amplicon se creció y se congeló a -80 °C en 20% de glicerol hasta su utilización.

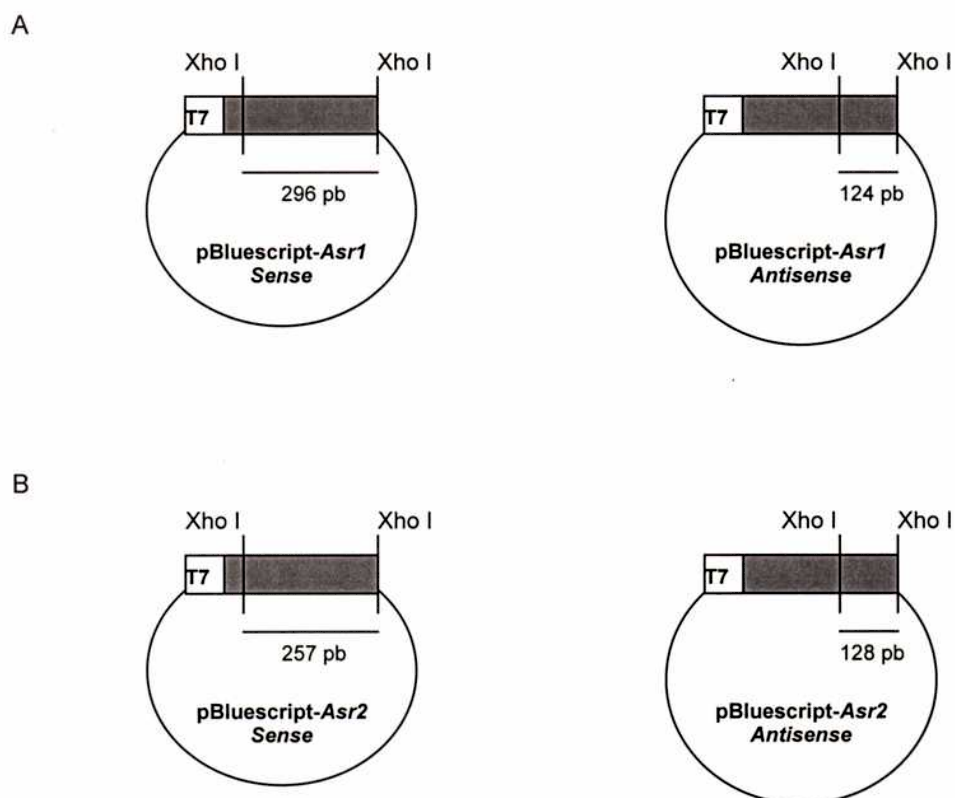


Figura 1: Subclonado en pBluescript de los productos de PCR de *Asr1* (A) y *Asr2* (B) en posición "sense" y "antisense". Los amplicones están representados como rectángulos grises. T7 representa el promotor bajo el cual se clonaron los amplicones.

Preparación de las ribosondas y transcripción *in vitro*

1 µg de plásmido ("sense" y "antisense") de cada subclonado se linealizó con 50 U de Eco RI (Gibco) durante 2 horas a 37° C. Posteriormente se trató la muestra con 0,1 mg/ml de proteinasa K, 30 minutos a 37°C. Se extrajo dos veces con 1 volumen de fenol/cloroformo (1:1) seguido de una extracción con 1 volumen de cloroformo:isoamilico (24:1). Luego se precipitó el plásmido con 0,2 volúmenes de NH₄AcO 10 My 2,5 vol de etanol absoluto. Para ayudar a la precipitación, se dejó 1 hora a -80°C y se centrifugó 15 minutos a 12.000 rpm. Posteriormente los plásmidos se lavaron dos veces con etanol al 75% y se resuspendieron en Tris 10 mM (pH 7) a una concentración final de 1 µg/ul. La marcación de las sondas se realizó por transcripción *in vitro* mediante el producto "DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)" de Roche, utilizando como molde 1 µg de plásmido linealizado, NTPs (1mM ATP, 1mM CTP, 1 mM GTP, 0.65mM UTP, 0.35 mM DIG-11UTP), buffer de transcripción del kit, 20 U de inhibidor de RNAsas y 40 U de T7 RNA polimerasa. Se incubó durante 2 horas a 37°C y se le agregaron 2 U de RQ1 Rnasa (Promega). Luego se incubó durante 15 minutos a 37 °C y se agregaron 0.02 M de EDTA para frenar la reacción de la Rnasa. La ribosondas obtenidas se precipitaron con 2.5 M de AcNH₄ y 2,5 volúmenes de Etanol 100%; se lavaron con etanol 75% y se resuspendieron en agua MilliQ estéril. Posteriormente se chequeó una alícuota en gel de agarosa 2,5% utilizando 100ng de ARN-marcado del kit como control.

Hibridación *in situ*

Muestras de hoja y raíz de plantas de 1 mes (controles y estresadas durante 24 horas por falta de agua) fueron fijadas en Fijador de Karnovsky (5% glutaraldehido, 4% paraformaldehido, 0.1M buffer fosfato pH=7.2). Los tejidos fijados se deshidrataron usando series graduales de TBA (50-100%) y finalmente se infiltraron y se embebieron en parafina ultrapura. Las muestras se cortaron con micrótopo y se prepararon según Jackson (1991). Las hibridaciones se realizaron según Chaumont et al. (1998) con modificaciones: las muestras se desparafinaron mediante dos lavados de 10 minutos con xilol y se hidrataron utilizando series

decrecientes de etanol (100%, 96%, 70%, 50%, 30%), seguido de un lavado final con agua destilada. Luego se incubaron con 0.2M de HCl durante 20 minutos y se realizaron lavados con agua destilada, 2X SSC y nuevamente agua destilada durante 5 minutos cada uno. Se incubó con solución K (1ug/ul de proteinasa K, 100mM Tris (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8)) durante 30 minutos a 37°C en un ambiente humedecido con PBS. Luego de la incubación se lavaron las muestras con PBS durante 2 minutos y se bloqueó la acción de la proteinasa con 2 mg/ml de glicina en PBS. Posteriormente se lavó dos veces con PBS y se prefijó durante 12 minutos con paraformaldehído 4%, seguido de un lavado con PBS. Luego se deshidrató mediante lavados en serie de etanol creciente (30%, 50%, 70%, 96%, 100%). Se dejó secar al aire durante 1 hora. Luego, 300 ng de ribosonda se hirvieron durante 5 minutos en 5 µl de esperma de salmón (10 mg/ml), se agregaron al buffer de hibridación (6X SSC, 50% formamida, 1,25% SDS, 5X Denhardt) y se aplicaron sobre las muestras de tejido. Las muestras se incubaron en un ambiente con formamida al 50%, durante toda la noche en estufa a 45-50°C. Al día siguiente, las muestras se lavaron dos veces con 2X SSC/0.1% SDS durante 5 minutos a temperatura ambiente y dos veces con 0.2 x SSC/ 0.1% SDS durante 10 minutos a 45°C. Luego se lavaron 5 minutos con TBS (100mM Tris-HCl (pH 7.5); 400 mM NaCl) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (0.5% leche en TBS). Se lavó durante 1 minuto con TBS y se pusieron en contacto con el anticuerpo anti-DIG de origen comercial, diluido 1/300 en 0.5% leche en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente, en ambiente humedecido con PBS. Finalmente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS. Para la detección, las muestras se lavaron 5 minutos en buffer de detección (100 mM Tris HCl (pH 9.5); 100mM NaCl; 50mM MgCl₂) y luego se les agregó 1 ml del buffer con 6.6 µl de NBT (50 mg/ml) y 3.3 µl de BCIP (50 mg/ml) (Promega). Se dejó en oscuridad aproximadamente 3-4 horas hasta aparición de color. Finalmente, se realizaron dos lavados de 2 minutos con agua destilada y se deshidrató utilizando series crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 96%, 100%) durante 3-4 minutos. Se lavó con xilol, 5 minutos para la deshidratación total, se montaron las muestras con cubreobjetos, se observó al microscopio óptico y se fotografió.

ENSAYOS DE EXPRESIÓN EN BACTERIAS

Subclonado de *Asr1* en plásmido bacteriano regulable por arabinosa

Para los ensayos de expresión en bacterias era necesario obtener la proteína ASR1 en cantidades que no fueran tóxicas para las bacterias. Se contaba con el plásmido pBAD24, portador del promotor pBAD, que posee la ventaja de ser regulable por arabinosa. Así, se obtuvo por restricción con KpnI (Gibco) y XbaI (Gibco) el fragmento codificante de *Asr1* a partir del plásmido pNM444 (cedido por N. Iusem y M. Rossi) y se lo subclonó en el plásmido pBAD24 (Guzmán et al., 1995) cortado con las mismas enzimas, mediante ligación con ligasa (Promega), obteniéndose un plásmido al que se denominó Pre-pBAD24-*Asr1*. El plásmido pBAD24 posee un codón de iniciación de la traducción (atg) en el sitio de clonado, quedando río arriba de la secuencia insertada de *Asr1* (Figura 2). Por ello se realizó un paso de restricción con EcoRI (Gibco) y KpnI (Gibco), que liberó un fragmento de 9 pb río arriba de *Asr1* (que incluyó el atg del plásmido), seguido de un tratamiento con Klenow (Promega) para "rellenar" y con la enzima ligasa para ligar. Así, se obtuvo el plásmido deseado al que denominamos pBAD24-*Asr1*, en el cual la secuencia subclonada se encuentra bajo el promotor pBAD, regulable por arabinosa. (Figura 2). Cada paso del subclonado fue chequeado por restricción en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Con el plásmido obtenido se transformaron según Sambrock et al. (1989) bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α . Todos los cultivos bacterianos fueron realizados en medio LB suplementado con ampicilina (100ug/ml), a 37°C con agitación a 200 rpm. Las extracciones de plásmido se realizaron mediante el protocolo convencional de "Miniprep" (Sambrock et al., 1989) y mediante análisis con enzimas de restricción se determinó el clon bacteriano que portaba el plásmido deseado.

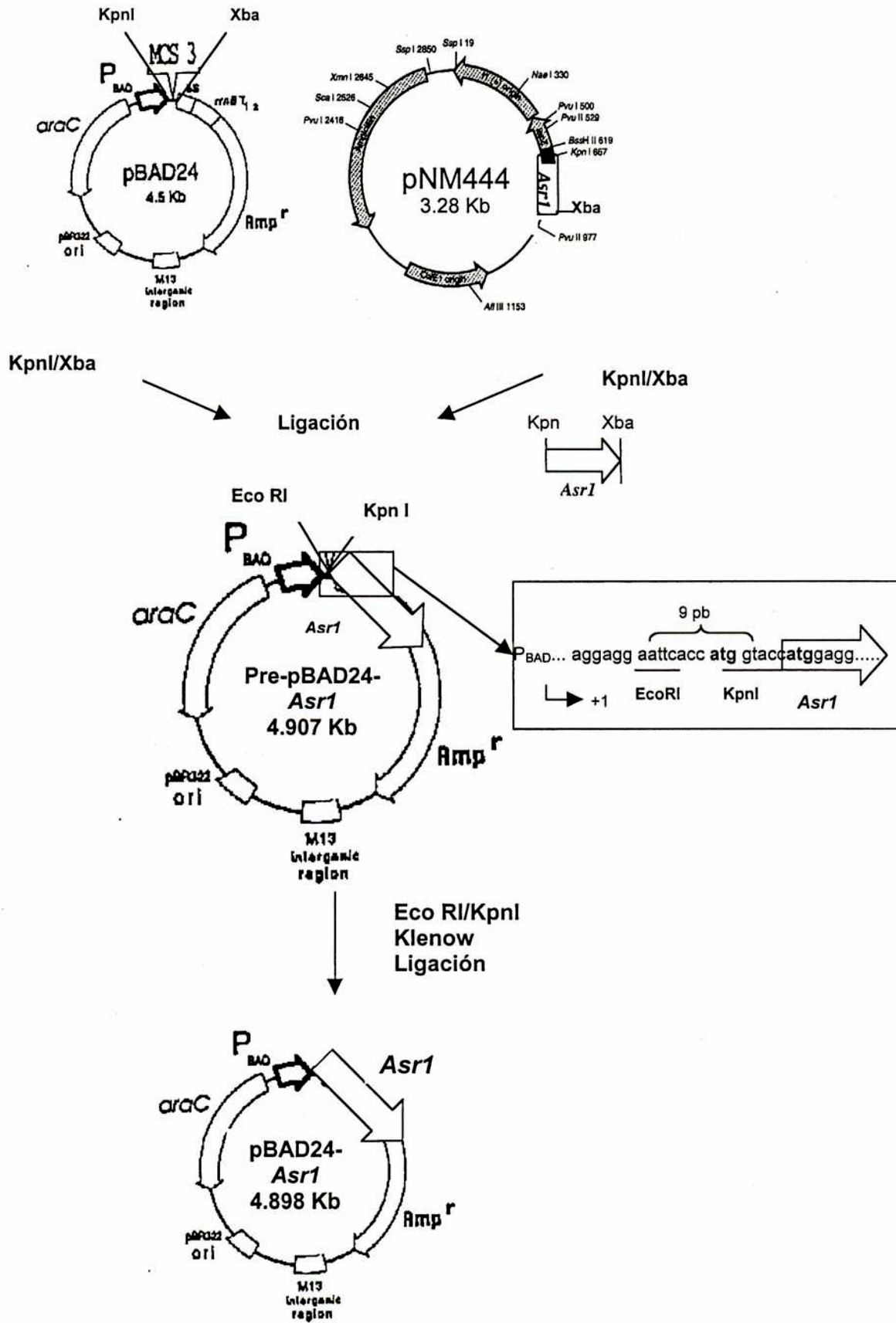


Figura 2: Estrategia de subclonado de *Asr1* en pBad24

Chequeo de la expresión de ASR1 y viabilidad de las bacterias

Un cultivo bacteriano de células portando pBAD24-*Asr1* obtenido a partir de una colonia aislada (crecida toda la noche a 37°C con agitación) se diluyó 1/20 en medio LB fresco+ampicilina y se dejó crecer hasta alcanzar una OD=0.5. Se dividió el cultivo en dos: a uno de ellos se le agregó arabinosa a una concentración final de 0,2% y al otro el mismo volumen de medio LB líquido. Se incubó durante 2 horas a 37° C con agitación, luego de lo cual se tomó una alícuota de cada cultivo y se realizó una extracción de proteínas totales hirviendo la muestra con igual volumen de Buffer de Extracción (Tris HCl 100mM (pH 6.8); βmercaptoetanol 200mM; SDS 4%; glicerol 20%; BPB 0,2%). La inducción de ASR1 se verificó mediante Western blot utilizando anticuerpo anti-ASR1 y revelando con ECL (Amersham). Posteriormente se sembraron distintas diluciones de los cultivos en placas conteniendo medio LB ampicilina + 1,5% de agar y se dejó toda la noche a 37°C. Se contaron luego las colonias obtenidas con cultivos inducidos y no inducidos.

Análisis del comportamiento en medio salino de bacterias que expresan ASR1

Un cultivo bacteriano de células portando pBAD24-*Asr1* obtenido a partir de una colonia aislada (crecida toda la noche a 37°C en agitación) se diluyó 1/20 en medio LB fresco+ampicilina y se dejó crecer hasta alcanzar una OD=0.5. Se dividió el cultivo en dos: a uno de ellos se le agregó arabinosa a una concentración final de 0,2% y al otro el mismo volumen de medio LB líquido. Se incubó durante 2 horas a 37° con agitación, luego de lo cual se sembraron distintas diluciones de los cultivos en placas conteniendo medio LB ampicilina + 0,7% agar + 0,4M de NaCl. Como controles, las mismas diluciones se plaquearon en el mismo medio pero sin NaCl. Se dejaron crecer toda la noche a 37°C y se contaron las colonias obtenidas.

Análisis del comportamiento de bacterias que expresan ASR1 frente a la luz UV

Un cultivo bacteriano de células portando pBAD24-*Asr1* obtenido a partir de una colonia aislada (crecida toda la noche a 37 °C en agitación) se diluyó 1/20 en medio LB fresco ampicilina y se dejó crecer hasta alcanzar una OD=0.5. Se dividió el cultivo en dos: a uno se le agregó arabinosa a una concentración final de 0,2% y al otro el mismo volumen de medio LB líquido. Se dejó induciendo durante 2 horas a 37°C. Luego se centrifugaron los cultivos durante 10 minutos a 3500 g y 4°C y se resuspendió el pellet obtenido en 0.1M de MgSO₄. Las soluciones bacterianas así obtenidas se dejaron en placas de Petri de vidrio y se mantuvieron en oscuridad hasta el momento de ser irradiadas. Bacterias inducidas y no inducidas con arabinosa se expusieron al UV (lámpara Phillips G15T8 15W, con pico de longitud de onda del UV-C 254nm) durante 5, 10, y 15 segundos a una distancia de 30 cm y 60 cm. Como controles, bacterias inducidas y no inducidas se mantuvieron en oscuridad, sin irradiar. Luego de realizar diluciones seriadas las bacterias, se plaquearon en medio LB ampicilina, se dejaron crecer toda la noche a 37°C y se contaron las colonias sobrevivientes obtenidas.

ENSAYOS DE EXPRESION EN LEVADURAS

Plásmido de expresión utilizado

Para los ensayos de expresión en levadura se utilizó el pYES2-*Asr1*, cedido por el Lic.Gustavo Gudesblat, quien lo obtuvo por subclonado del fragmento codificante de *Asr1*, proveniente del pNM440, en el vector pYES2 (Invitrogen) (Figura 3). Este plásmido posee un promotor inducible por galactosa y el gen URA3 que le confiere resistencia en un medio de crecimiento sin uracilo a las levaduras que lo portan.

La transformación de levaduras con este plásmido y los experimentos de respuesta a la sal fueron realizados en colaboración con las Dras. Susana Correa García y Mariana Bermúdez Moretti del Departamento de Química Biológica y del

Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular de la FCE y N-UBA, respectivamente.

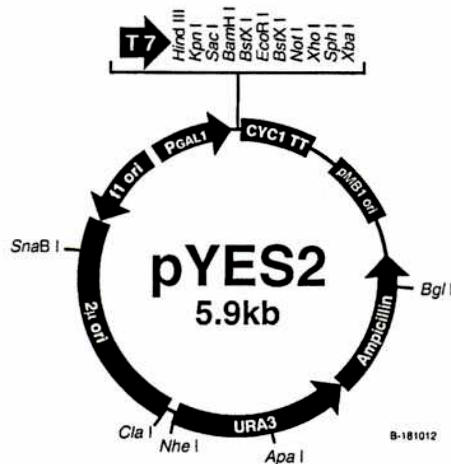


Figura 3: Plásmido de expresión en levaduras pYES2 en el cual se subclonó la secuencia codificante de *Asr1*.

Transformación de las levaduras

La cepa utilizada fue la BY4741 (*Mat a his Δ 1 leu 2 Δ 0 met 15 Δ 0 ur 3 Δ 0*). Las transformaciones se realizaron según Chen et al. (1992): de un cultivo de células crecidas en medio YPD (extracto de levadura 1% (Difco); peptona 2% (Difco); glucosa 2%; agar 2%) toda la noche a 30°C y en agitación, se tomaron varias colonias y se resuspendieron en 1 ml de agua estéril. Se centrifugó 1 minuto a 3000-4000 rpm. Se descartó el sobrendante y se resuspendieron las células en el líquido remanente. Se agregó agua hasta un volumen final de 20 μ l /transformación. Se transfirieron 20 μ l a tubo eppendorf y se agregó 1 μ g de plásmido y 100ul de buffer "One Step" (0,2 M LiAC, 40% PEG 3350, 100 mM dithiotreitol). Se aplicó vortex durante 5 segundos y se incubó 20 minutos a 42 °C. Luego se agregó 1 ml de agua, se centrifugó brevemente y se plaqueó en medio YNB (017% YNB (Difco) sin aminoácidos y sin amonio; 0,77 % DO (-ura) (Clontech); 10 mM de $SO_4(NH_4)_2$;

2% de glucosa). Las transformaciones se realizaron utilizando los plásmidos pYES2 vacío y pYES2-*Asr1* en paralelo.

Respuesta del cultivo de levaduras a estrés por NaCl.

Una colonia de cada transformante (con pYES2 vacío y con pYES2-*Asr1*) se creció en 5 ml de Medio SC (YNB sin aminoácidos y sin amonio (Difco) + 0,77 % de DO (-ura) (Clontech) + 10 mM de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) suplementado con 2% de rafinosa y 0,1% de glucosa, en agitación y a 30°C durante toda la noche. Luego se realizó una dilución 1/5 en Medio SC suplementado con 2% de rafinosa y se dejó crecer hasta OD=1 (absorbancia a 600 nm). A 1 ml de este cultivo se le realizaron dos lavados con agua estéril. A esta suspensión se la diluyó 1/10 en Medio SC suplementado con 1% galactosa (inductor del sistema). Se incubó durante 18 hs. en agitación a 30°C y posteriormente cada cultivo se diluyó 1/5 en Medio SC galactosa 1% con o sin el agregado de 0,5 M de NaCl. Finalmente, todos los cultivos se incubaron a 30°C con agitación, se sacaron alícuotas de cada uno de ellos a distintos tiempos y se les midió la absorbancia (A_{600}).

Para evaluar la presencia de ASR1, se obtuvieron extractos de proteína total por resuspensión del pellet de 1 ml de levaduras (crecidas en medio inductor) en 100 μl de "Buffer Sample" (TrisHCl 60 mM (pH 6.8); β mercaptoetanol 5%; SDS 2%; glicerol 10%; BPB 0,2%). Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95°C y se centrifugaron a 14000 xg. El sobrenadante se utilizó para determinar la presencia de ASR1 mediante la técnica de Western blot, revelando con ECL (Amersham).

RESULTADOS

ANALISIS DE LAS ASR

Características de las ASR de tomate (*L. esculentum*)

Asr1, *Asr2* y *Asr3* han sido caracterizados extensamente por Iusem et al. (1993), Rossi y Iusem (1994 y 1995) y Amitai-Zeigerson et al. (1993), respectivamente. Al comparar las secuencias proteicas, se observa la presencia de dos regiones conservadas ricas en alanina: una, en la posición 74-78 (que en ASR1 consiste en 5 residuos consecutivos de alanina), está conservada en ASR2 y ASR3 con una valina central en lugar de la alanina (Figura 4, recuadro I). Este reemplazo no afectaría la estructura terciaria de la proteína ya que tanto la alanina y la valina son aminoácidos no polares. La otra zona rica en alaninas es la que corresponde a los residuos 45-50, también presente en los tres miembros de la familia (Figura 4, recuadro II). Otro dato interesante es la existencia un potencial sitio de miristoilación en las posiciones 42-47, 44-49 y 42-47 para ASR1, ASR2 y ASR3, respectivamente (Figura 4, sombreado oscuro); además, en los residuos 110 a 112 de ASR1 existe un potencial sitio de fosforilación para proteína-quinasa C y en los residuos 35 a 38 de ASR2, un potencial sitio de fosforilación para la caseína-quinasa II (Figura 4, sombreado claro).

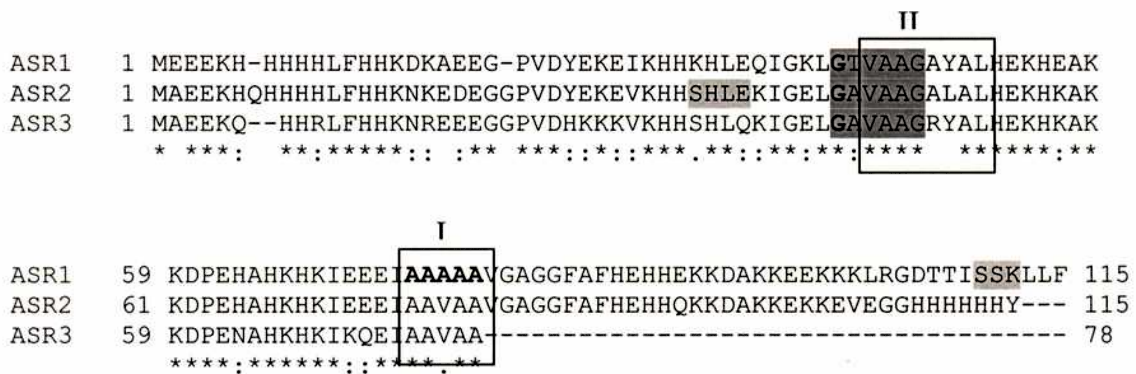


Figura 4: Alineamiento de secuencias proteicas de las ASR de tomate (*L. esculentum*)

Los asteriscos y los puntos indican aminoácidos con homología total y parcial entre las tres secuencias, respectivamente. Las zonas marcadas con recuadros corresponden a las regiones ricas en alaninas (I: residuos del 74-78; II: residuos del 45-50). El sombreado oscuro y claro indica el sitio putativo de miristoilación y fosforilación, respectivamente.

Al analizar el patrón de hidropatía mediante el algoritmo de Kyte-Doolittle, se observó que las ASR de tomate son proteínas predominantemente hidrofílicas y poseen dos zonas claramente hidrofóbicas que corresponden a las regiones ricas en alaninas previamente descritas (Figura 5).

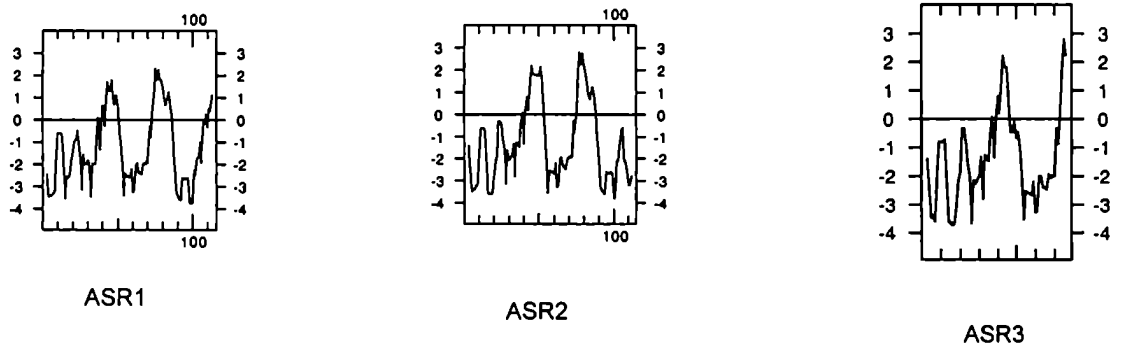


Figura 5: Patrón de hidropatía según de Kyte-Doolittle de las proteínas ASR de tomate. Valores positivos y negativos representan el grado de hidrofobicidad e hidrofílicidad, respectivamente. Los residuos aminoacídicos están representados al pie del patrón .

Utilizando la combinación multivariable de regresión lineal (SOPMA-GOR4-SIMPA) se predijo la estructura secundaria de las proteínas ASR de tomate (Figura 6). Los tres miembros de la familia mostraron una proporción de entre el 45 y 60 % de conformación alfa hélice (h) en su estructura y entre un 36 y 47% de "random coil" (c). El porcentaje restante (4-8%) estuvo compuesto por la conformación de cadena extendida (e).

A**ASR1**

```

          10          20          30          40          50          60          70
          |          |          |          |          |          |          |
MEEEKHHHHHLFHHKDKAEEGPVDYEKEIKHHKHLEQIGKLGTVAAAGAYALHEKHEAKKDPEHAHKHKIE
ccccccccceeeeeccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhccccchhhhhhhh
EEIAAAAAVGAGGFAPFHEHHEKDKAKKEKKKLRGDTTISKLLF
hhhhhhhhhhccccceccccccccchhhhhhhhhcccccecccccc

```

ASR2

```

          10          20          30          40          50          60          70
          |          |          |          |          |          |          |
MAEEKQHHLHLFHHKNKEDEGGPVDYEKEVKHSHLEKIGELGAVAAGALALHEKHKAKKDPEHAHKHK
ccccchhhheeeeeccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
IEEEIAAVALVAGGFAPFHEHHQKDKAKKEKKEVEGGHHHHHHY
hhhhhhhhhhhhccccceccccccccchhhhhhhhhcccccecccccc

```

ASR3

```

          10          20          30          40          50          60          70
          |          |          |          |          |          |          |
MAEEKQHHLRFHHKNREEEGPVDHKKKVKHSHLQKIGELGAVAAGRYALHEKHKAKKDPENAHKHKIK
ccchhhhhheeeccccccccccccchhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
QEIAAVAA
hhhhhhcc

```

B

	ASR1	ASR2	ASR3
Alpha helix (h)	45.22%	52.63%	60.26%
Extended strand (e)	7.83%	6.14%	3.85%
Random coil (c)	46.96%	41.23%	35.90%

Figura 6: Predicción de la estructura secundaria de las proteínas ASR de tomate.

A. probabilidad de formación de Alfa hélice (h), Cadena extendida (e) y "Random coil" (c) para ASR1, ASR2 y ASR3. Los números indican el nº de aminoácido. **B.** probabilidad de formación de h, e y c, expresado en porcentaje para cada ASR.

Búsqueda de productos génicos tipo ASR en otras especies

Mediante el programa BLASTP, se realizó una búsqueda de secuencias codificantes tipo ASR en el reino vegetal, utilizando ASR1 de tomate comercial (*Lycopersicon esculentum*) como referencia. El resultado revela la existencia de proteínas homólogas a ASR presentes en especies muy diversas: tomate salvaje (*L. hirsutum*, *L. peruvianum*, *L. chilense*), papa (evolutivamente cercana al tomate), uva, durazno, pomelo, lily, melón, pino, hasta en ciertas monocotiledóneas como maíz, arroz y caña de azúcar, etc. (Tabla 3). Una característica que involucra a todas estas proteínas es el hecho de responder a algún tipo de estrés abiótico (falta de agua, alta salinidad, frío), al ácido abscísico y/o expresarse durante la maduración del fruto. El tejido u órgano donde la expresión de estos genes es mayoritaria es variable, así como también la longitud en aminoácidos de la proteína. *Calystegia*, durazno, papa comercial y salvaje poseen los ortólogos de mayor tamaño (Tabla 3).

Del análisis de posibles sitios consenso, se desprende que todas las proteínas poseen al menos un sitio potencial de miristoilación con ubicación variable dentro de su secuencia. Respecto a la predicción de estructura secundaria, estas proteínas coinciden en presentar un porcentaje mayoritario de α -hélice y "random coil". En general, la conformación α -hélice es mayor a la de "random coil"; siendo la primera la estructura que abarca por lo menos el 40% de la proteína. Las excepciones a esta característica están dadas por las ASR de *Calystegia*, durazno (*P. armeniaca* y *P. persica*), StDS2 de papa comercial y DS2 de papa salvaje. Coincidentemente estas son las cuatro proteínas más largas de los homólogos a ASR (Tabla 3).

Otro rasgo común entre estas secuencias es el alto porcentaje relativo de aminoácidos cargados. Aunque el porcentaje de cada aminoácido varía según la proteína, histidina, lisina, glicina y ácido glutámico son los que se presentan en mayor proporción en todos los casos (Tabla 3).

Hasta la fecha, sólo se ha podido confirmar la pertenencia de las ASR a una familia multigénica en tomate comercial (ASR1, ASR2 y ASR3) (Rossi et al., 1996) y en pino (LP3, LP3-1, LP3-2 y LP3-3) (Padmanabhan et al., 1997).

Tabla 3: Productos génicos tipo ASR reportados. Id representa, expresado como porcentaje, el nivel de identidad de aminoácidos, que se ubican más arriba en la lista de BLASTP. α H:alfa hélice, Rco:random coil, O: otros.

Nombre del gen	Especie	Órgano o tejido de expresión	Señal ambiental o fisiológica	Id	Número de aa	Pot.sitio miristoilac. (posición)	Estructura 2da (% mayoritario)		% aa mayoritarios					#acceso al GenBank y Referencia	
							α H	RCo	O	Gly	Ala	His	Lys		Glu
Asr1	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	raíz, tallo, hoja, fruto	estrés hídrico maduración	100	115	GTVAAG (42-47)	45	47	8	7	13	15	17	15	Q08655 (1)
Ci21A	<i>Solanum tuberosum</i> (papa comercial)	Tubérculo, hojas	Frío, estrés hídrico	80	109	GTVAAG (41-46)	57	26	17	8	13	18	16	17	AAD00254.1 (2)
Calys	<i>Calystegia soldanella</i>	fruto	estrés hídrico maduración	80	248	GTVAAG (179-184)	16	77	7	13	5	7	12	17	BAB19963.1 (3)
Asr2	<i>Lycopersicon hirsutum</i> (tomate)	No hay datos	No hay datos	73	114	GAVAAG (44-49)	51	37	12	9	13	20	16	15	AAP37980 (16)
Asr2	<i>Lycopersicon chilense</i> (tomate)	No hay datos	No hay datos	72	115	GAVAAG (44-49)	53	34	13	8	13	20	15	15	AAP37979 (16)
Ci21B	<i>Solanum tuberosum</i> (papa comercial)	Tubérculo, hojas	Frío, estrés hídrico	70	108	GAVAAG (42-47)	50	33	17	9	14	17	17	16	AAD00255.1 (2)
Asr2	<i>Lycopersicon peruvianum</i> gland. (tomate)	No hay datos	No hay datos	69	111	GAVAAG (44-49)	51	34	15	8	13	18	16	15	AAP37984 (16)
Ip3	<i>Pinus Taeda</i> (pino)	Raíz, tallo	estrés hídrico	69	153	GTVAAG (79-84)	60	24	16	6	13	13	11	18	T09832 (5)
VvMSA	<i>Vitis vinifera</i> (uva)	fruto	maduración Sacarosa ABA	68	149	GVAAG (80-85)	45	38	17	6	14	14	10	14	AF281656 (4)
Asr2	<i>Lycopersicon peruvianum humifusum</i> (tomate)	No hay datos	No hay datos	66	112	GAVAAG (44-49)	51	32	17	10	13	19	15	15	AAP37981 (16)
Asr-like	<i>Prunus armeniaca</i> (durazno)	fruto	maduración	66	200	GAAAAG (131-136)	25	50	25	21	8	11	8	14	AAB97140 (6)
Asr	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (planta de hielo)	No hay datos	ABA, estrés, maduración	62	143	GAVAAG (74-79)	43	32	25	8	12	16	11	18	T12245

Ip3-1	<i>Pinus taeda</i> (pino)	Raíz y tallo	Estrés hídrico ABA	58	126	GTVAAG (57-62)	57	24	19	7	12	16	13	18	T09789 (8)
Ip3-3	<i>Pinus taeda</i> (pino)	Tallo, raíz y hoja	Estrés hídrico	58	131	GXMATG (64-69)	52	29	19	7	12	12	10	19	T10490 (8)
Asr-like	<i>Prunus persica</i> (durazno)	fruto	maduración	56	193	GAAAAG (124-129)	30	48	22	19	9	12	8	14	AAL26889 (9)
Asr3	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Hoja Raíz	Estrés hídrico	53	78	GAVAAG (42-47)	60	36	4	6	14	15	18	11	P37220 (10)
BSCSP1	<i>Zea mays</i> (maíz)	Hoja Coleoptile (ver)	No hay datos Luz limitante	50	135	GALAGG (58-63)	43	36	21	14	14	8	5	11	BAB20906 (17)
Asr2	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Hoja Raíz fruto	Estrés hídrico maduración	50	103	GAVAAG (44-49)	52	41	7	8	13	21	15	15	AAA99440 (11)
SIDS2	<i>Solanum tuberosum</i> (papa comercial)	Hoja	Estrés hídrico	46	288	GAVAAG (198-203)	26	57	17	15	6	6	12	17	CAC86102 (12)
DS2	<i>Solanum chacoense</i> (papa salvaje)	Hoja y tallo	Estrés hídrico	46	263	GAVAAG (193-198)	25	58	17	16	6	6	13	16	S53488 (13)
LLA-23	<i>Lilium longiflorum</i> (lily)	polen	disecación	44	142	GGNCSQ (45-50)	46	27	27	7	11	12	12	15	AF077629 (14)
Ip3-2	<i>Pinus taeda</i> (pino)	Tallo y hoja	Estrés hídrico	40	108	GAVATG (41-46)	49	27	24	9	12	13	15	22	T09817 (8)
Asr	<i>Pyrus pyrifolia</i> (pera)	fruto	maduración	36	74	GVGAAG (5-10)	47	27	26	10	16	14	14	20	BAA96451
Asr1	<i>Citrus máxima</i> (pomelo)	fruto	maduración	34	98	GTAGAG (27-32)	48	29	23	11	13	12	13	17	AAA82741 (15)
Asr1	<i>Cucumis melo</i> (melón)	fruto	ABA	>34	112	GAAAAG (46-51)	56	22	22	7	12	21	13	19	AAL27560
SoDip22	<i>Saccharum officinatum</i> (caña de azúcar)	hoja	Estrés hídrico	>34	142	GAIAGG (72-77)	57	21	22	10	14	13	13	19	BAB68268
OsAsr1	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	Hoja, raíz	ABA, NaCl, manitol	>34	138	GALAGG (68-73)	42	33	25	9	13	13	13	15	AF039573 (7)

(1) Iusem et al. (1993), (2) Schneider et al. (1997), (3) Hara et al. (2002), (4) Cákir et al. (2003), (5) Chang et al. (1996), (6) Mbeque-A-Mbeque et al. (1997), (7) Vaideyanathan et al. (1999), (8) Padmanabhan et al. (1997), (9) Callahan et al. (1993), (10) Amitai, H et al. (1993), (11) Rossi y Iusem (1994), (12) Doczi et al. (2002), (13) Silhavy et al. (1995), (14) Wang et al. (1998), (15) Canel et al. (1995), (16) Frankel et al. (2003), (17) Riccardi et al. (1998).

Comparación de secuencias y estructura de productos génicos relacionadas con ASR de tomate

A partir de las secuencias peptídicas tipo ASR encontradas se realizó un alineamiento múltiple de secuencias mediante el programa ClustalW (1.8) para MacIntosh. En la Figura 7 se muestra el alineamiento múltiple de secuencias peptídicas que mostraron mayor similitud con ASR1 de tomate. Se identificó dentro de estas secuencias dos regiones de homología: una hacia el N-terminal que abarca unos 20 aminoácidos y otra región mayor, de 72 aminoácidos hacia el C-terminal (resultados obtenidos conjuntamente con N.Frankel). Esta última región está altamente conservada entre todas estas proteínas. La región intermedia es variable en tamaño y composición, aún dentro de la misma especie. Los homólogos de papa salvaje, calistegia y durazno poseen las secuencias intermedias más extensas.

```

ASR1_Ly_esc_      1 --MEEKKHHHHLFHHKDKAE--
ci21A_Sol.tub_   1 ---MEEEKHHHHLFHHKDKAE--
ASR2_Ly.hir_     1 -MAEEKKHQHHHHLFHHKNKDEGG-
ASR2_Ly.per.gl_  1 -MAEEKKHQHHHHLFHHKNKDEGG-
ASR2_Ly.chil_    1 -MAEEKKHQHHHHLFHHKNRDEGG-
ASR2_Ly_esc_     1 -MAEEKKHQHHHHLFHHKNKDEGG-
ASR2_Ly.per_     1 -MAEEKKHQHHHHLFHHKNKDEGG-
ci21B_Sol.tub_  1 ---MAEEKHHHHLFHHKNKDEGG-
ASR3_Ly_esc_     1 ---MAEEKKHQHHHLFHHKNRDEGG-
Calys_C.sol_     1 ---MSEEEKHHHLFGHHKDKERQPSYGYENTYGSDDSYERKNTYGDSSYEKKNTYGGDD
LLA-23_L.long_   1 ---MAEEKHHHHLFHHNKESNPEV---VV---
ASR1_C.mel_      1 MAEEEQGHHHHHLFHHKKEG-----
StDS2_S.tub_    1 -MAEQKKHFFGGLFHHKNEDEDTPVEKTTYEETTYGESEKTRTYGEKTSYGGDDTYGEKT
DS2_S.cha_      1 -----KHHFGGLFHHKNEDEDTPVEKTTYEETTYGESEKTRTYGEKTSYGGDDTYGEKT
ASR1_C.max_     1 -----
ASR_P.arme._    1 ---MSEEEKHHHGLFHHKDEDRPIETSDYPQSGGYSDEGRTGSGY-----
ASR_P.per_      1 ---MSEEEKHHHGLFHHKDEDRPIETSDYPQSGGYSDEGRTGS-----
ASR_P.pyr_      1 -----
VvMSA_V.vin._   1 ---MSEEEKHHHHLFHHK-----DKPVDDAVPYSDNAYSDDTTYSDTS-----
ASR_M.crys_     1 --MADGEKHHHHLFHHKDEKPEAEAVVYSETTYSGDGYGTG-----
LP3_P.tae_      1 ---MSEEEKHHHHLFHHKDESENVPSEVVCAETTTAYGDEVI-----
LP3-3_P.tae_    1 -----KEDENDNPPSEVVYFETTTAYGDEVI-----
LP3-1_P.tae_    1 ---MSEEEKHHHHLFHHKDEGG-----E-----QVI-----
LP3-2_P.tae_    1 -----HHKKEG-----
SoDip22_S.off_  1 ---MAEEKHHHHLFHHKDEEQV-----
OsASR1_O.sat_   1 ---MAEEKHHHHLFHHKDE-----
BSCSP1_Z.mays_  1 ---MRRPAYGADDCGYGGRTAVY-----
consensus       1          hhhhhlfhkk ee

```

ASR1_Ly_esc_	22	-----	
ci21A_Sol.tub_	21	-----	
ASR2_Ly.hir_	24	-----	
ASR2_Ly.per.gl_	24	-----	
ASR2_Ly.chil_	24	-----	
ASR2_Ly_esc_	24	-----	
ASR2_Ly.per_	24	-----	
ci21B_Sol.tub_	22	-----	
ASR3_Ly_esc_	22	-----	
Calys_C.sol_	58	SYERKNTYGEDSYEKKNTYGGDESYERKNTYGGDESY-----EKKNTY	
LLA-23_L.long_	24	-----	
ASR1_C.mel_	21	-----	
StDS2_S.tub_	60	TTFGDDNKYGEKTSYGDDTYGEKPTS YGGDNTYGEKTSYEGGDDNKYGEKTSYEGGDDNQ	
DS2_S.cha_	55	TTFGDDNKYGEKTSYGDDTYGEKPTS YGGDNTYGEKTSYEGGDDNKYGEKTSYEGGDDNK	
ASR1_C.max_	1	-----	
ASR_P.arme._	43	-----GGGGGGYGGG	
ASR_P.per_	41	-----GYGGG	
ASR_P.pyr_	1	-----	
VvMSA_V.vin._	39	-----	
ASR_M.crys_	42	-----	
LP3_P.tae_	41	-----	
LP3-3_P.tae_	29	-----	
LP3-1_P.tae_	24	-----	
LP3-2_P.tae_	8	-----	
SoDip22_S.off_	22	-----	
OsASR1_O.sat_	18	-----	
BSCSP1_Z.mays_	22	-----	
consensus	61	-----	

ASR1_Ly_esc_	22	-----	PV
ci21A_Sol.tub_	21	-----	PV
ASR2_Ly.hir_	24	-----	PV
ASR2_Ly.per.gl_	24	-----	PV
ASR2_Ly.chil_	24	-----	PV
ASR2_Ly_esc_	24	-----	PV
ASR2_Ly.per_	24	-----	PV
ci21B_Sol.tub_	22	-----	PV
ASR3_Ly_esc_	22	-----	PV
Calys_C.sol_	101	GGDESYERKNNYGDNNESSYENKPTGYGKTSYGEDSYGGGQTDKYGSATGIEEGRTHE	
LLA-23_L.long_	24	-----SETNYI-----TDGLNSTYSTSSDVYGGNQSQANYE	
ASR1_C.mel_	21	-----EESS-----DVV	
StDS2_S.tub_	120	YGEKTSYGDSDYGEKPSYGGGDDNKYGEKTSYGNEEGGYGGGVGETTNYEENESEKTSSE	
DS2_S.cha_	115	YGEKTSYGDSDYGEKPSYGGGDDNKYGEKTSYGNEEGGYGGGVGETTNYEENESEKTSSE	
ASR1_C.max_	1	-----MAGKEEFF	
ASR_P.arme._	53	GGYGDGGGGYGDNTAYSGEGRPGSGYGGGGYGESADYSDGGRYKETAAAYGTTGTNESEI	
ASR_P.per_	46	GGYGDGGGGYGDNTAYSGEGRPGSGYGGGGYGESADYSDGGRYKETAAAYGTTGTNESEI	
ASR_P.pyr_	1	-----	
VvMSA_V.vin._	39	-----YATDGVSGYAAETTEVLADDPAP	
ASR_M.crys_	42	-----YSETTAVIAEPEK	
LP3_P.tae_	41	-----QSADVYAAGEVNDKFAEYE	
LP3-3_P.tae_	29	-----QSADVYATGNVNSD---EYE	
LP3-1_P.tae_	24	-----ESTDVYAAGNVDEY---EK	
LP3-2_P.tae_	8	-----ESADVRDEGNVKSE---EK	
SoDip22_S.off_	22	-----EQPAGGGGYGEAAEYTTTVEVVSTGEDEYD	
OsASR1_O.sat_	18	-----EPATGVDSYGEVYTTSETVTTEVVAGGQDEYE	
BSCSP1_Z.mays_	22	-----ADEYSRGGRYEGYGVQE	
consensus	121	-----	


```

ASR1_Ly.esc_      24 DYKKEIKHHKHLEQIKLGTVAAGAFALHEKHEAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAAVAGGG
ci21A_Sol.tub_   23 DYKKEIKHHKHLEQIKLGTVAAGAFALHEKHEAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAAVAGGG
ASR2_Ly.hir_     26 DYKKEVKHHSHLEKIGELGVAAGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEEIAVAAVAGGG
ASR2_Ly.per.gl_  26 DYKKEVKHHSHLEKIGELGVAAGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEEIAVAAVAGGG
ASR2_Ly.chil_   26 DYKKEVKHHSHLEKIGELGVAAGAFALHEKHAKKDLENAHKHKIEEEIAVAAVAGGG
ASR2_Ly.esc_    26 DYKKEVKHHSHLEKIGELGVAAGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEEIAVAAVAGGG
ASR2_Ly.per_    26 DYKKEVKHHSHLEKIGELGVAAGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEEIAVAAVAGGG
ci21B_Sol.tub_  24 DYKKEVKHHSHLEKIGELGVAAGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEEIAVAAVAGGG
ASR3_Ly.esc_    24 DKKKVKHHSHLEKIGELGVAAGRAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIKQETIAAVAA----
Calys_C.sol_    161 DYKKEIKHHKHLEELKGLCTVAAGAFALYEKHEAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAVAVGSGG
LLA-23_L.long_  55 DYKKEKHKIKHKHEIGELGVAAGAFALYEKHEAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAAAGAGG
ASR1_C.mel_     28 DYKKEIKHHKHLEIGELGVAAGAFALHEKHEAKKIDSEHSEHKKIEEEIAAAVAVAGAGG
StDS2_S.tub_   180 DYKKEIKHHKHLEIGELGVAAGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEGIAAAAAAGAGG
DS2_S.cha_     175 DYKKEIKHHKHLEIGELGVAAGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEGIAAAAAAGAGG
ASR1_C.max_     9  DYKKEIKHHKHLEIGELGTAAGAFPRLESHKAEKDPENAHKHKIEEEIAAAAAAGGG
ASR_P.arme._   113 DYKKEIKHHKHLEIGELGVAAGVAFALHEKHEAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAVAGGG
ASR_P.per_     106 DYKKEIKHHKHLEIGELGVAAGVAFALHEKHEAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAVAGGG
ASR_P.pyr_     1  -----GGAAGVGAAGTAFALHEKHEAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAVAGGG
VvMSA_V.vin._  62 DYKKEIKHHKHLEIGELGVAAGAFALHEKHEAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAVAGGG
ASR_M.crys_    56 DYAKEIKHHKHLEIGELGVAAGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEIAAAAVAGGG
LP3_P.tae_     61 KAKKEIKHHKHLEIGELGTVAAGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAVAGGG
LP3-3_P.tae_   46 KAKKEIKHHKHLEIGELGXATGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAVAGGG
LP3-1_P.tae_   40 AKKDEIKHHKHLEIGELGTVAAGAFALHEKHAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAVAGGG
LP3-2_P.tae_   24 AKKEIKHHKHLEIGELGVAAGAFALHEKHEAKKDPEHAHKHKIEEIAAAAVAGGG
SoDip22_S.off_ 54 KYKKEIKHHKHLEIGELGVAAGAFALYEKHEAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAVAGGG
OsASR1_O.sat_  50 RYKKEIKHHKHLEIGELGVAAGAFALYEKHEAKKDPEHAHKHKIEEIAAAVAGGG
BSCSP1_Z.mays_ 40 HAKKEIKHHKHLEIGELGVAAGAFALYEKHEAKKDSANAQRHKIEAGVATAAAAGGG
consensus      181 dykke khhkhlekigelgavaagafalhekhkakkKDpehahhKIEEEIAAAAVAGGG

```

```

ASR1_Ly.esc_      84 FAFHEHHEKKEAKKEEKKLRGDTTISSKLLF----
ci21A_Sol.tub_   83 FALHEHHEKKEAKKEQKKAEGGHHHLLF-----
ASR2_Ly.hir_     86 FAFHEHHEKKEAKKEKKEVEGGHHHHHY-----
ASR2_Ly.per.gl_  86 FAFHEHHEKKEAKKEKKEVEGGHHHHY-----
ASR2_Ly.chil_   86 FAFHEHHEKKEAKKEKKEVEGGHHHQHHY-----
ASR2_Ly.esc_    86 FAFHEHHEKKEAKKEKKEVEGGHHHHHY-----
ASR2_Ly.per_    86 FAFHEHHEKKEAKKEGKEAEGGHHHHY-----
ci21B_Sol.tub_  84 FAFHEHHEKKEAKKEKKEAEGGHHHY-----
ASR3_Ly.esc_    -----
Calys_C.sol_    221 FAFHEHHEKKEAKKEEAEAGKHHHFF-----
LLA-23_L.long_  115 YTFHEHHEKKEAKKENEVEGKHHHFFG-----
ASR1_C.mel_     88 FVLHEHHEKKEAKR--EKEEHHHLLF-----
StDS2_S.tub_   240 FAFHEHHEKKEAKKEEAEAGKHHHFFN-----
DS2_S.cha_     235 FAFHEHHEKKEAKKEEAEAGKHHHFFN-----
ASR1_C.max_     69 FAFHEHHEKKEAKKEDEAHGKSTTISFN-----
ASR_P.arme._   173 FAFHEHHEKKEAKKEEESHGKHHHLLF-----
ASR_P.per_     166 FAFHEHHEKKEAKKEEESHGKHHHLLF-----
ASR_P.pyr_     47 FAFHEHHEKKEAKKEEESHGKHHHLLF-----
VvMSA_V.vin._  122 FAFHEHHEKKEAKKEDEAHGKHHHLLF-----
ASR_M.crys_    116 YVFHEHHEKKEAKKEEAEAGKHHHLLF-----
LP3_P.tae_     121 YVFHEHHEKKEAKKEEAEAGKHHHLLFYVRCH---
LP3-3_P.tae_   106 YVFHEHHEKKEAKKEEAEAGKHHHLLF-----
LP3-1_P.tae_   99 YVFHEHHEKKEAKKEEAEAGKHHHLLF-----
LP3-2_P.tae_   83 YVLEHHEHAKKEDKKEEAEAGKHHHLLF-----
SoDip22_S.off_ 114 FAFHEHHEKKEAKKEDAEAGGKHHHFFG-----
OsASR1_O.sat_  110 YAFHEHHEKKEAKKESAEESTEKHHHLLFG-----
BSCSP1_Z.mays_ 100 YAFHEHHEKKEAKKESAEESTEKHHHLLFG-----
consensus      241 fafhehhekkeak e eaeagkhhhh

```

Figura 7: Alineamiento múltiple de secuencias peptídicas de las proteínas ASR conocidas, provenientes de diferentes especies vegetales, realizado mediante el programa CLUSTALW. El sombreado negro y el sombreado gris indican residuos idénticos y similares al consenso, respectivamente. Al pie del alineamiento se muestra la secuencia consenso.

El N-terminal de todas estas proteínas posee un región rica en histidinas a excepción de la ASR de pomelo (*C. máxima*), pera (*P. pyrifolia*) y maíz (*Z. mays*). Hacia el C-terminal también existe una región de alto contenido de histidinas, excepto para el caso de pomelo, maíz, ASR1 y ASR3 de tomate (*L. esculentum*). VvMSA de uva (*Vitis vinifera*) posee en esa región una señal consenso de dirección nuclear. Los dos segmentos de 5 residuos consecutivos de aminoácidos no polares (formados principalmente por alaninas) observados en ASR de tomate comercial, se encuentran también altamente conservados en todas estas proteínas. Aunque el consenso del potencial sitio de miristoilación presente en todas las especies no es siempre el mismo (Tabla 3), este sitio se encuentra siempre adyacente al primer segmento rico en aminoácidos no polares, con excepción de la proteína LLA23 de Lily, cuyo sitio está río arriba de esta región (Tabla 3). En algunos casos, existe en la misma proteína más de un sitio potencial de miristoilación, que en general se encuentra adyacente al otro segmento rico en alaninas (dato no mostrado).

Debido su gran proporción de aminoácidos cargados, todas las proteínas tipo ASR son altamente hidrofílicas y su patrón es muy similar al observado en las ASR de tomate comercial. En todas ellas (Figura 8) se observa la presencia de al menos dos picos hidrofóbicos, que corresponden a las zonas ricas en alaninas.

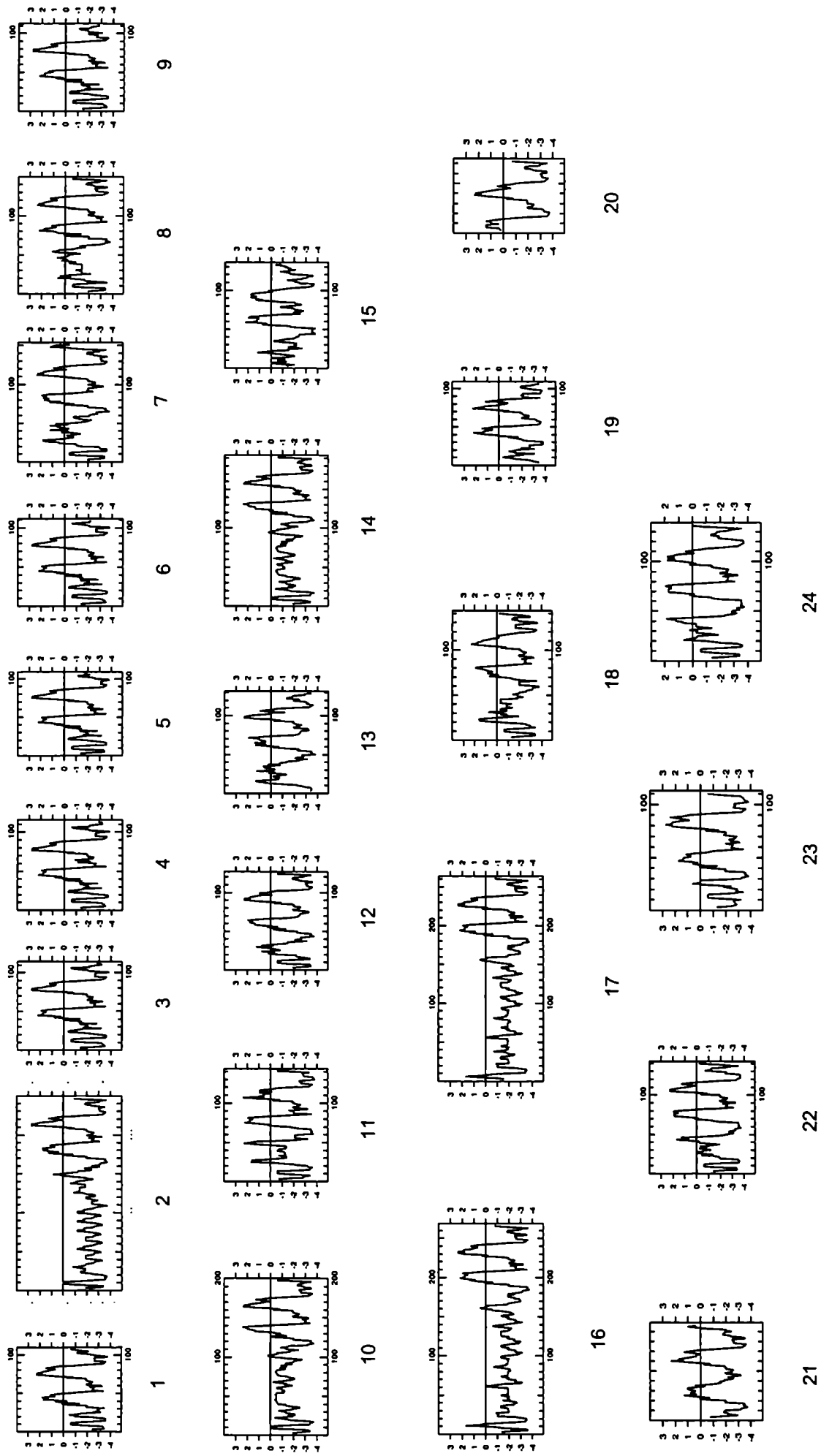


Figura 8: Perfiles hidropáticos según Kyte-Doolittle.

1. Ci21A , 2. Calys, 3. ASR2 (*L.hirsutum*), 4. ASR2 (*L.chilense*), 5. Ci21B, 6. ASR2 (*L.peruv.gland*), 7. LP3, 8. VM5A, 9. ASR2 (*L.peruvianum*), 10. ASR-like (*P.Armeniaca*), 11. ASR (*Mesembryanthemum.crystallinum*), 12. LP3-1, 13. LP3-3, 14. ASR-like (*P.persica*), 15. BSCSP1, 16. SiDS2, 17. DS2, 18. LLA-23, 19. LP3-2, 20. ASR (*Pyrus pyrifolia*), 21. ASR1 (*C.máxima*), 22. SoDip22, 23. ASR 1 (*C.melon*), 24. OsASR1.

Recientemente, Garay-Arroyo et al. (2000) definieron la existencia de una clase de proteínas a la que llamaron *hidrofilinas*, caracterizada por su porcentaje de glicina y por su índice de hidrofilicidad. En esta familia quedan incluidas proteínas tanto vegetales como bacterianas (*E. coli*) y fúngicas (*S. cereviceae*), que interesantemente comparten la característica de estar involucradas en la respuesta a distintos tipos de estrés. El criterio definido por estos investigadores (índice de hidrofilicidad > 1 y % de glicina > 6) es altamente selectivo, ya que sólo el 1% de las proteínas totales lo cumple. Aparentemente, las *hidrofilinas* representarían adaptaciones análogas a un problema común tanto en euca como en procariotas. Se analizó entonces la posibilidad de que las proteínas tipo ASR de tomate y sus homólogos encontrados en distintas especies vegetales pertenezcan a la clase de las *hidrofilinas*, evaluando su porcentaje de glicina y su índice de hidrofilicidad. En la Tabla 4 se muestran los cálculos realizados sobre las proteínas tipo ASR de lo que se desprende que todas ellas pasan el criterio de selección determinado por Garay-Arroyo (2000) para incluirlas en la clase de *hidrofilinas*.

Tabla 4: % de glicina y cálculo de la hidrofilicidad de las proteínas tipo ASR.

Proteína	%Gly	Hidrofilicidad
ASR1 (<i>L. esculentum</i>)	7	1.17
Ci21A (<i>S. tuberosum</i>)	8	1.34
Calys (<i>C. soldanella</i>)	13	1.81
ASR2 (<i>L. hirsutum</i>)	9	1.29
ASR2 (<i>L. chilense</i>)	8	1.27
Ci21B (<i>S. tuberosum</i>)	9	1.23
ASR2 (<i>L. peruv.gland</i>)	8	1.24
LP3 (<i>P. taeda</i>)	6	1.08
VvMSA (<i>V. vinifera</i>)	6	1.16
ASR2 (<i>L. peruv.humifusum</i>)	10	1.27
ASR-like(<i>P. armeniaca</i>)	21	1.32
ASR (<i>M. crytallinum</i>)	8	1.28
LP3-1 (<i>P. taeda</i>)	7	1.30
LP3-3 (<i>P. taeda</i>)	7	1.30
ASR-like (<i>P. persica</i>)	19	1.33
ASR3 (<i>L. esculentum</i>)	6	1.27
BSCP1 (<i>Z. mays</i>)	14	1.23
ASR2 (<i>L. esculentum</i>)	8	1.27

Proteína	%Gly	Hidrofilicidad
StDS2 (<i>S. tuberosum</i>)	15	1.60
DS2 (<i>S. chacoense</i>)	16	1.60
LLA-23 (<i>L. longiflorum</i>)	7	1.22
LP3-2 (<i>P. taeda</i>)	9	1.63
ASR (<i>P. pyrifolia</i>)	10	1.17
ASR1 (<i>C. maxima</i>)	10	1.23
ASR1 (<i>C. melo</i>)	7	1.32
SoDip22 (<i>S. officinarum</i>)	10	1.30
OsASR1 (<i>O. sativa</i>)	9	1.24

COMPORTAMIENTO DE LOS *Asr* DE TOMATE (*L. esculentum*) FRENTE AL ESTRES

Respuesta frente al estrés hídrico

Acumulación de los transcriptos frente al estrés hídrico

Se ha demostrado con anterioridad la expresión de *Asr* en tomate sometido a estrés hídrico y salino (Amitai-Zeigerson et al., 1995) y en fruto maduro (Iusem et al., 1993). Sin embargo, estos datos son previos a conocerse que *Asr* no era sólo un gen, sino una familia formada por al menos tres miembros homólogos entre sí. En este contexto, y con el objetivo de determinar si el comportamiento de cada uno de los *Asr* en condiciones de estrés es distinto en cuanto a órgano y tiempo, se diseñaron oligonucleótidos que pudieran reconocer de manera específica a cada *Asr*, utilizando la técnica de RT-PCR (Figura 9).

Así, se determinó que los tres genes se expresan basalmente a niveles bajos en hoja, raíz y tallo, con la excepción de *Asr3* en hoja y raíz y *Asr1* en tallo, cuya expresión en condiciones normales es alta. *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* son inducidos en la hoja desde las 6 horas de comenzado el estrés, siendo *Asr1* el miembro que presentó una mayor inducción. En la raíz, *Asr2* fue el único miembro que aumentó su expresión a las 24 horas de estrés hídrico, mientras que en tallo *Asr1* y *Asr3* se inducen claramente y *Asr2* parece no variar frente al estrés. (Figura 9). Estos experimentos fueron realizados utilizando ciclos de PCR en los que el producto fuera no saturante, es decir, de manera tal de poder obtener una semicuantificación de la expresión de los genes.

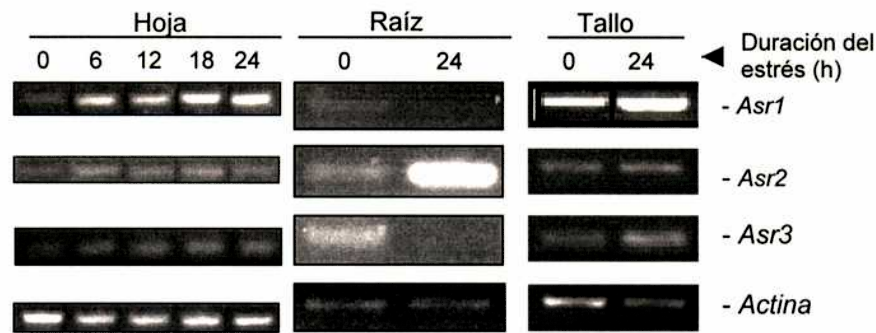


Figura 9: Análisis de la expresión de los genes *Asr* en distintos órganos de plantas de tomate sometidas a estrés hídrico. Experimento de RT-PCR con ARN total extraído de hojas, raíces y tallos de plantas de 1 mes sometidas estrés hídrico durante los tiempos indicados en la figura. Se amplificó el ARN de actina como control de siembra.

La homología de secuencias existente entre las regiones codificantes de los tres genes en estudio, avalaba el uso de esta estrategia que relevó el comportamiento de cada uno de manera individual. Sin embargo, para obtener resultados cuantificables, la técnica clásica de Northern blot es la más usada y confiable. Como se contaba con el ADN del producto de PCR de cada uno de los genes, se decidió probar este método utilizándolos como sondas de hibridación, con la hipótesis de que se evitaría la reacción cruzada no deseada entre los tres miembros, ya que estas sondas representan zonas parciales de cada gen y no el gen completo. Los resultados, presentados en la Figura 10, confirman los obtenidos por RT-PCR e indican que las sondas utilizadas en el Northern blot no producen reacciones cruzadas entre los ARNm. Asimismo, a partir de la cuantificación realizada, se observó que *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* aumentan su expresión en hoja entre 2 y 5 veces luego de 24 horas de estrés hídrico respecto de hojas regadas normalmente. A las 12 horas se produce para todos los genes una disminución leve en su expresión. *Asr2*, el único miembro inducido luego de 24 horas de falta de agua en raíz, aumentó su expresión por lo menos 6 veces en estas condiciones. La expresión basal de *Asr1* en tallo alcanzó niveles comparables a los observados en hoja estresada, aumentado por lo menos un 80% cuando se expuso a 24 horas de déficit hídrico, mientras que la expresión de *Asr3* fue inducida casi 3 veces en esta misma situación.

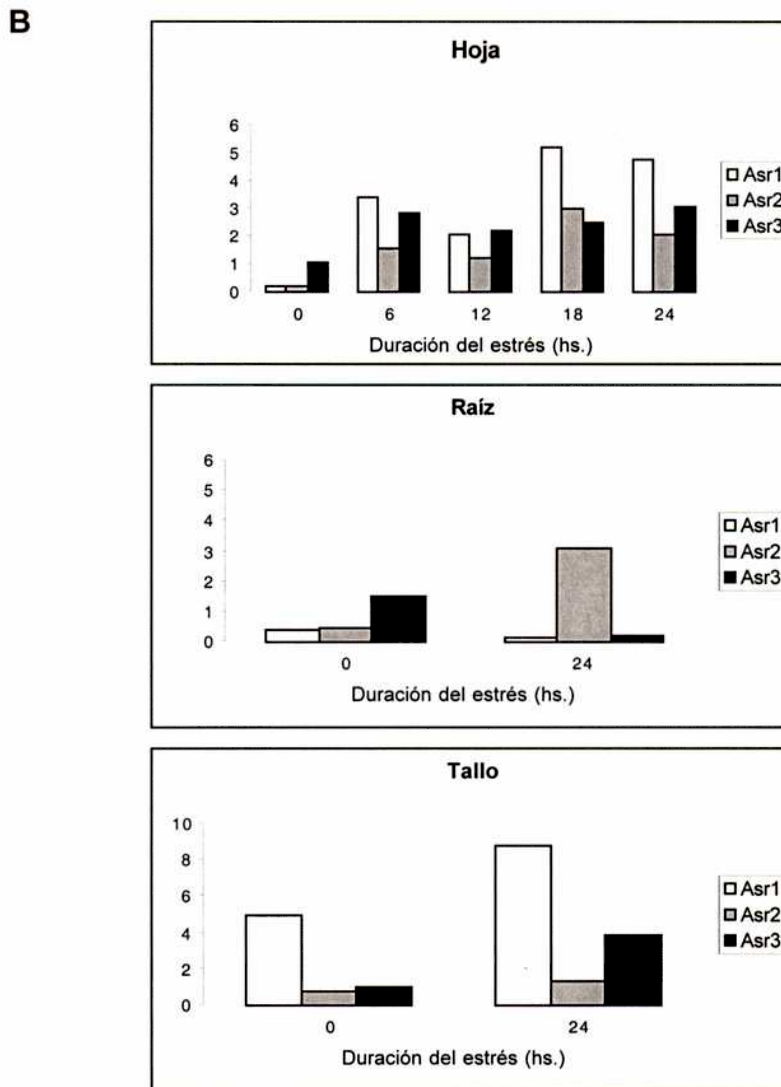
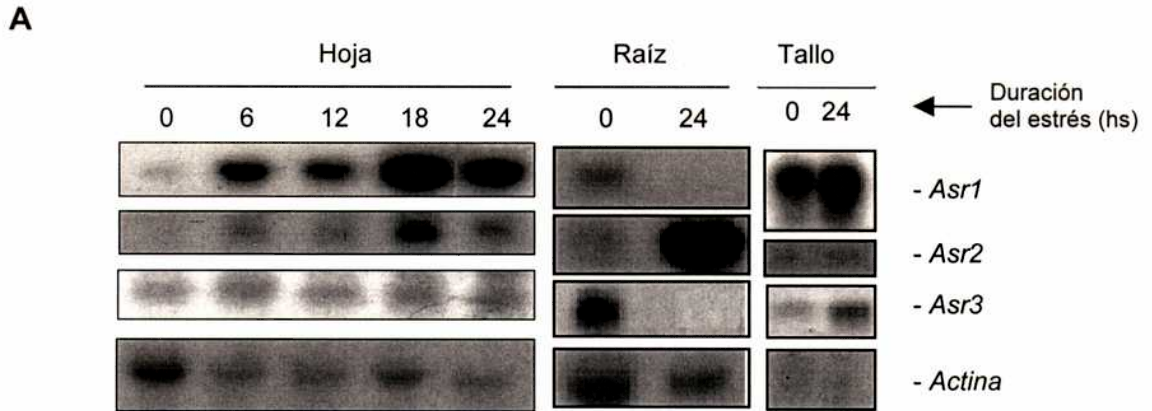


Figura 10: Análisis de la expresión de los genes *Asr* en distintos órganos de plantas de tomate sometidas a estrés hídrico. **(A)** Experimento de Northern blot con ARN total extraído de hojas, raíces y tallos de plantas de 1 mes sometidas estrés hídrico durante los tiempos indicados en la figura e hibridados con sondas *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* específicas y con sonda de actina como control de siembra. **(B)** Cuantificación de la abundancia relativa del ARNm, expresado como acumulación de ARNm de *Asr*/ARNm *Actina* (en el eje de las y).

Es oportuno aclarar que el análisis de la expresión de *Asr3* se realizó sólo en condiciones de estrés hídrico debido a problemas técnicos derivados de la marcación de la sonda. En este sentido, la corta longitud de este amplicón (140pb) pudo ser el motivo de la poca reproducibilidad en la reacción de "random priming".

Acumulación de proteínas en respuesta al estrés hídrico

¿Qué sucede con la expresión de estos genes a nivel proteico?. ¿Existe una correlación con la expresión observada a nivel de mensajero inducida por la falta de agua?. Se contaba con anticuerpos anti-ASR1 obtenidos a partir de ratones inoculados con proteína ASR1 purificada y con ellos se realizaron ensayos de Western blot a extractos de proteína total de distintos órganos. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos: se detectó un banda del tamaño esperado para ASR1 (15 kDa) en raíz y tallo, donde la acumulación de la proteína fue progresiva respecto del tiempo de estrés (Figura 11 A.). En el caso de hoja dicha banda no se observó; en cambio, se visualizó una de aproximadamente 30 kDa (Figura 11 A.). Como control de siembra se utilizó un SDS-PAGE de hoja teñido con Azul de Coomasie (Figura 11B.).

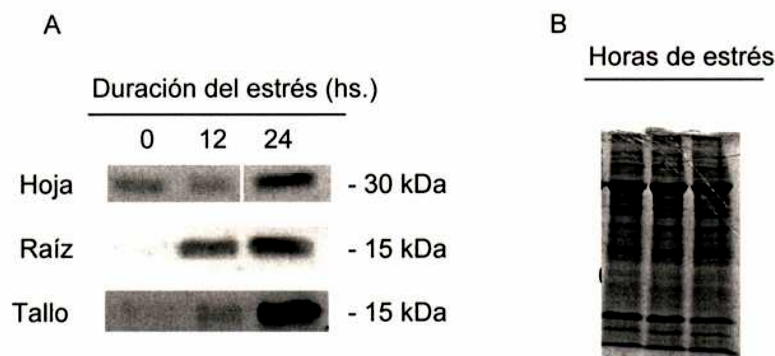


Figura 11: Western blot de distintos órganos sometidos a estrés, utilizando anticuerpo anti-ASR1 (dil 1/200). (A) Las plantas fueron sometidas a estrés hídrico durante el tiempo indicado. 20 µg de extracto soluble proteico de hoja, raíz y tallo se sembraron en SDS-PAGE y se transfirió a filtro de nitrocelulosa para su análisis por Western blot. Se usó el sistema ECL para la detección. (B). SDS-PAGE de hoja teñido con Azul de Coomasie como ejemplo de control de siembra.

Respuesta a otros tipos de estrés

Considerando la posibilidad de que los *Asr* de tomate estén involucrados no sólo en mecanismos de respuesta a estrés hídrico sino también a diversos tipos de estrés ambientales bióticos y abióticos, se analizó su comportamiento en situaciones de bajas temperaturas, daño mecánico e infección por hongos.

De la Figura 12 se desprende que *Asr1* se acumula en respuesta a frío y daño mecánico en los tres órganos analizados. La inducción fue claramente mayor en tallo para los dos tipos de estrés, aunque en este tejido se observa una expresión basal alta en condiciones sin estrés. *Asr1* no modificó su expresión en hojas infectadas por hongos, mientras que *Asr2* mostró únicamente un aumento casi imperceptible en tallo dañado.

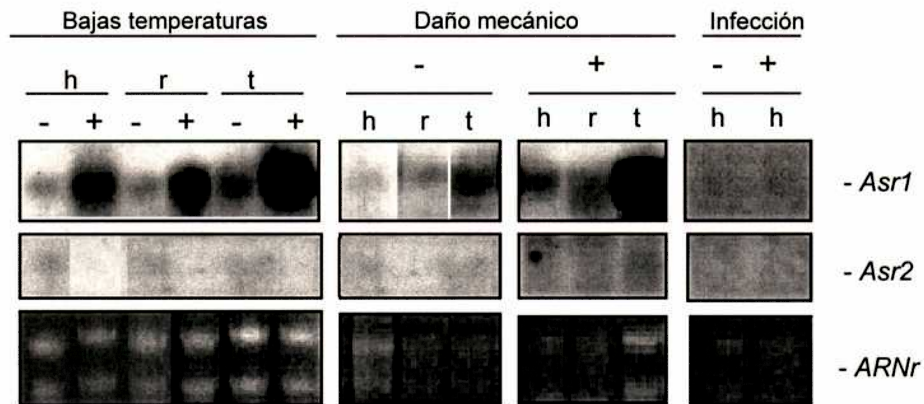


Figura 12: Análisis de la acumulación de transcritos en hoja (h), raíz (r) y tallo (t) de plantas sometidas a diversas situaciones de estrés (+) y en condiciones normales (-) .

Plantas de tomate de 1 mes fueron expuestas a bajas temperaturas, daño mecánico e infección por hongos. Muestras de 20 µg de ARN total se usaron para el análisis por la técnica de Northern blot utilizando *Asr1* y *Asr2* como sonda. El ARNr teñido con BrEt. se utilizó como control de siembra.

Tipo celular en el que se expresan los *Asr* de tomate

Teniendo en cuenta la expresión órgano-dependiente observada a nivel de mensajeros, cabía preguntarse si esta expresión estaba circunscripta a determinados tipos celulares dentro de los tejidos. Como se contaba con productos de PCR que permitían una identificación individual de cada uno de los *Asr*, se los subclonó en pBluescript bajo el promotor de la T7 polimerasa, se los usó de molde para la obtención de ribosondas marcadas con Dig –oxigenina y se los utilizó en ensayos de hibridación *in situ*.

Al analizar la expresión de *Asr1* y *Asr2* en hoja se observó que en condiciones de riego normales están presentes en tejido vascular, específicamente en células acompañantes del floema (Figura 13: 0 hs., panel a y b). Al exponer a las plantas a estrés hídrico, la expresión parece extenderse a células parenquimáticas (Figura 13: 24 hs., panel c y d). En el caso de raíz la expresión de *Asr2* fue la única detectada en condiciones de estrés hídrico (Figura 14: 24 hs., panel b). Cabe aclarar que los controles de detección específica de la ribosonda *Asr2*, que normalmente se realizan con la ribosonda "sense", se llevaron a cabo con una sonda inespecífica, debido a que la sonda "*Asr2* sense" producía la misma marca que la sonda "*Asr2* antisense". Cuando se analizó más detenidamente la estructura de la secuencia de esta sonda, se verificó la existencia de una región interna repetida de 16 nucleótidos, que le permite hibridarse consigo misma. Es muy probable entonces que la ribosonda "sense" también pueda hibridar por medio de esa zona con el mensajero endógeno, produciendo la señal observada.

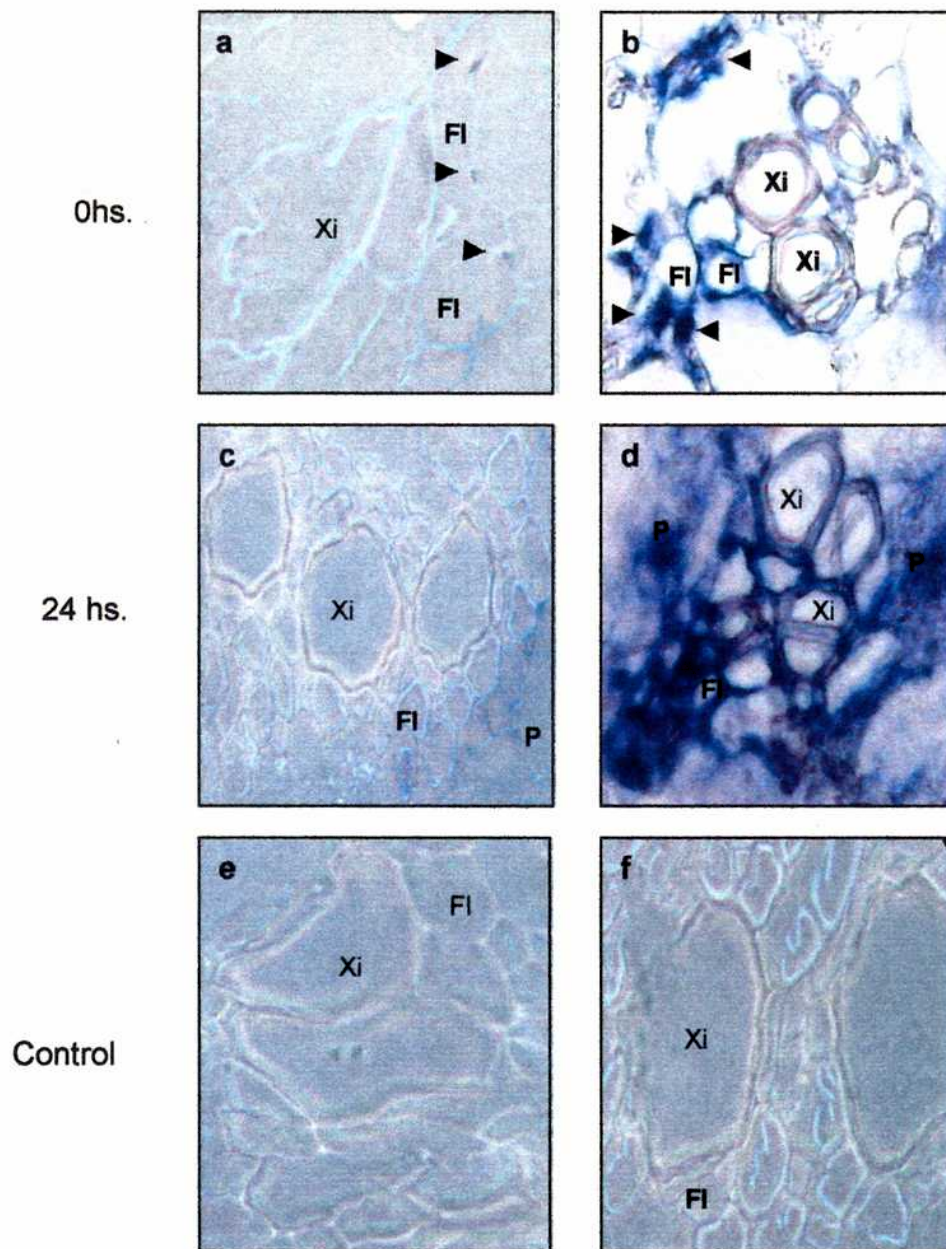


Figura 13: Expresión de los *Asr* en hoja estresada por falta de agua. Hibridación *in situ* de hojas de plantas con un déficit hídrico de 0 y 24hs., utilizando como ribosondas *Asr1* (a y c) y *Asr2* "antisense" (b y d) y como controles *Asr1* "sense" (e) y ribosonda inespecífica (f). Xi: xilema; FI: floema; P: células parenquimáticas. ►: indica célula acompañante del floema.

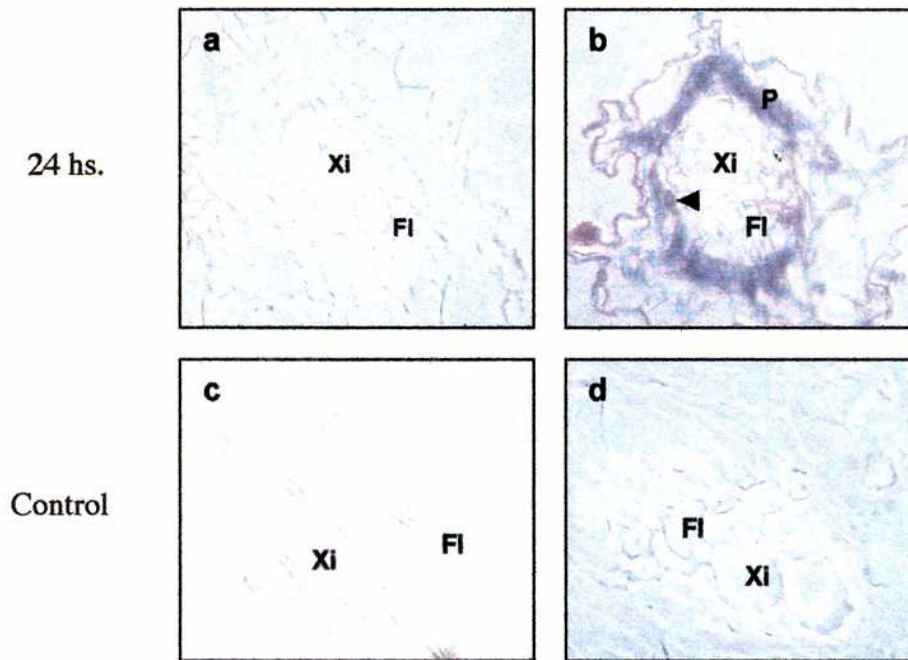


Figura 14: Expresión de los *Asr* en raíz estresada por falta de agua.

Hibridación *in situ* de raíces de plantas con un déficit hídrico de 24hs., utilizando como ribosondas *Asr1* (a) y *Asr2* "antisense" (b) y como controles *Asr1* "sense" (c) y ribosonda inespecífica (d). Xi: xilema; Fi: floema; P: células parenquimáticas. ► :indica célula acompañante del floema.

COMPORTAMIENTO DE LOS *Asr* DE TOMATE EN OTROS PROCESOS

- En la maduración del fruto

La maduración es la fase final de crecimiento y desarrollo del fruto, en la que se producen una serie de cambios que conducen a la senescencia y abscisión del mismo. En 1993, Iusem et al., determinaron que ASR está presente en fruto maduro de tomate y representa el 5% de la proteína total en este órgano. Teniendo en cuenta esto, nos preguntamos cómo sería el comportamiento de estos genes durante el proceso madurativo del fruto y para ello se tomaron tres estadios representativos de este proceso, en base al color del pericarpio: estadio 1, estadio 2 y estadio 3 (ver M y M y Figura 15).

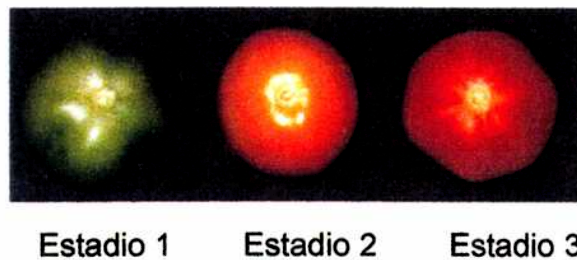


Figura 15: Frutos de tomate en distinto estadio madurativo según color del pericarpio.

Mediante análisis por Northern blot se observó que la expresión de los mensajeros de *Asr1* y *Asr2* muestra un pico máximo al principio de la maduración (estadio 1) para luego decaer rápidamente en los siguientes estadios (2 y 3) (Figura 16).

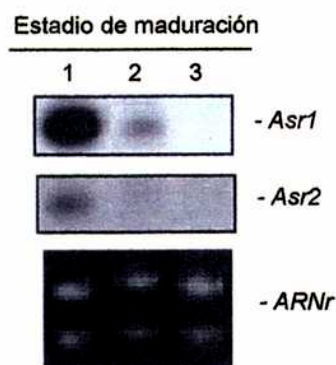


Figura 16: Expresión de transcritos *Asr1* y *Asr2* en la maduración del fruto de tomate. Northern blot de distintos estadios del fruto. Se utilizó *ARNr* teñido con BrEt. como control de siembra.

En cuanto a la acumulación de proteínas en este órgano, el suero anti-ASR1 reveló un patrón de bandas interesante y a la vez complejo. En el estadio 1 y estadio 3, se destaca claramente una banda de 15 kDa, tamaño esperado para ASR1, mientras que en el estadio 2 la presencia de esta banda es más tenue. El estadio 1 además, presenta bandas de 30 kDa, 45 kDa y mayores, tamaños que duplican y triplican al esperado (Figura 17). Estas mismas bandas aparecen en el estadio 2, aunque con diferente intensidad. Se incluyen en esta figura los estadios 0 y -1, que corresponden a frutos con el pericarpio verde como el estadio 1, pero que aún no llegaron al diámetro máximo. En el estadio -1 (3 cm de diámetro) no se reveló presencia de proteína, mientras que en el estadio 0 (5 cm de diámetro) aparecen bandas tenues de 15 y 30 kDa.

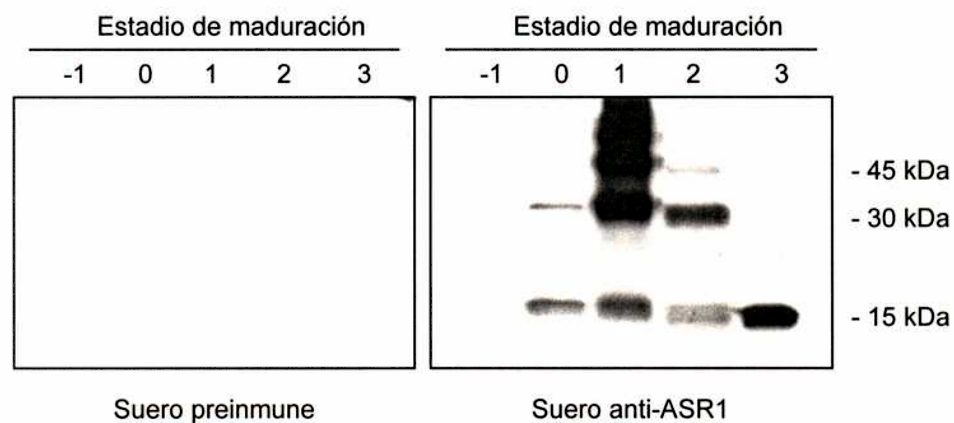


Figura 17: Western blot de distintos estadios del fruto utilizando anti-ASR1 (derecha). Como control se utilizó suero preinmune de ratones normales (izquierda). Se reveló con método quimioluminiscente (ECL).

Este patrón de bandas sugiere la formación de agregados de dos, tres o más polipéptidos, aunque la posibilidad de una modificación postranscripcional o la detección de un nuevo miembro de la familia de mayor tamaño no pueden descartarse. Mientras que el estadio de mayor acumulación de proteína coincide con el pico de expresión de los transcritos (estadio 1), la presencia de la banda de

15 kDa parece estar sujeta de manera inversa a la intensidad de las respectivas bandas de 30 o 45 kDa.

- En el órgano floral

Hasta aquí se analizó el comportamiento de los genes en órganos que fisiológicamente pueden responder a los cambios en el ambiente (como las raíces o la parte aérea de la planta), o que sufren alguna modificación en el tiempo como el fruto en su proceso madurativo. ¿Qué sucede en un órgano especializado como la flor? ¿Son expresados allí los *Asr* en condiciones normales?

Se evaluaron en forma separada las distintas parte de la flor, dividiéndola arbitrariamente en pétalos, sépalos y resto de la flor, que incluye todas las estructuras sexuales (anteras, polen, carpelos, etc.). Mientras que *Asr1* se expresa fuertemente en distintas partes de la flor, en particular en pétalos y en las estructuras sexuales, *Asr2* se acumula levemente en sépalos y estructuras sexuales (Figura 18).

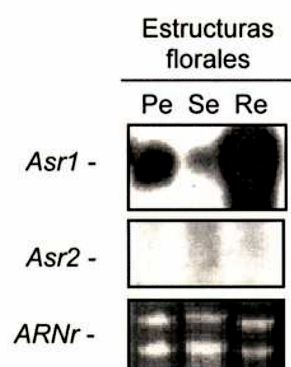


Figura 18: Análisis por Northern blot de la expresión de *Asr1* y *Asr2* en la flor.

Pe: pétalos; Se: sépalos; Re: resto de la flor (estructuras sexuales). Se utilizó el ARNr teñido con BrEt. como control de siembra.

¿ASR forma agregados?

Ante la aparición de bandas del doble del tamaño esperado en los Westerns (hoja y fruto), se evaluó la posibilidad de que ASR estuviera formando agregados (dímeros y trímeros) que no podían separarse por la simple presencia de SDS. Se utilizaron geles con 8M de urea en la corrida electroforética, pero esto no sólo no separó los posibles agregados, sino que además la migración se veía muy distorsionada (resultado no mostrado). Cuando las muestras se incubaron previamente en el buffer de craqueo con 8 M de urea y se sembraron en los geles (también con urea), sin hervir y se realizó la electroforesis a voltaje bajo y constante, se pudo observar un patrón de bandas difuso, pero menos distorcionado y en el cual se ve una disminución parcial de la banda de 30 kDa en favor de la de 15 kDa (Figura 19).

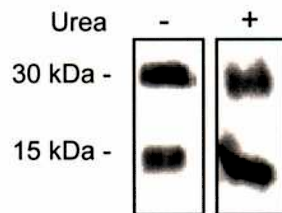


Figura 19: Western blot de fruto utilizando geles y craking buffer con y sin 8 M de urea. Se utilizó anti-ASR1 (1/200) y se reveló con método quimioluminiscente (ECL).

Para asegurar que el aumento de la banda de 15 kDa era consecuencia de la disociación de la banda de 30 kDa, se eluyó esta banda directamente del gel de poli(acrilamida) y al eluido proteico resultante se lo trató con 8M de urea. Esperando observar la liberación de polipéptidos de 15 kDa, esta muestra se corrió nuevamente un gel de poli(acrilamida), se transfirió a membrana y se repitió la hidridación con el anticuerpo. En la Figura 20 B, donde indica la flecha, se ve una banda muy leve del tamaño esperado (monómero de 15 kDa). Lo inesperado fue que el control realizado con el eluido de la banda de 15 kDa migró a la altura de 45

kDa (Figura 20 A), al igual que parte de la banda de 30 kDa tratada con urea (Figura 20 B).

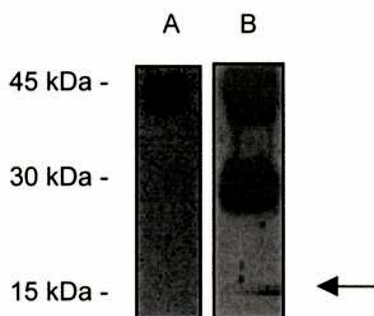


Figura 20: Western blot del eluido de la banda de 15 kDa (A) y de la banda de 30 kDa tratada con urea 8M (B).

ENSAYOS PRELIMINARES DE EXPRESION EN SISTEMAS HETEROLOGOS

- Comportamiento de bacterias que expresan ASR1 frente al estrés

A partir de los resultados obtenidos en la primer parte de este trabajo, en los cuales se determinó que la familia *Asr* de tomate es inducida frente a distintos tipos de estrés, se decidió investigar si la presencia de ASR1 en sistemas heterólogos, confería alguna ventaja frente a situaciones de estrés. Existían antecedentes de trabajos realizados en este laboratorio por el Lic. Javier Moreno, quien utilizó bacterias de la cepa BL21 de *Escherichia coli* transformada con un plásmido portando *Asr1* bajo el promotor pT7, el cual es reconocido por la T7 polimerasa, clonada a su vez en el cromosoma bacteriano bajo un promotor inducible por IPTG. Los ensayos realizados en esa ocasión estaban destinados a determinar si la expresión de ASR1 en bacterias contribuía de alguna manera a su supervivencia frente al estrés generado por la irradiación por luz UV. Los resultados fueron alentadores ya que se observó una diferencia de un orden de magnitud en el crecimiento frente a irradiación de las bacterias que expresaban ASR1 versus las que no lo expresaban. Sin embargo, en este sistema la expresión *per se* de ASR1 resultaba tóxica para la viabilidad bacteriana.

Así, se decidió subclonar la secuencia codificante de *Asr1* en un plásmido cuyo promotor fuera regulable, de manera de poder inducir en forma controlada la expresión de la proteína y repetir estos ensayos enfrentando las bacterias a estrés salino (como vía indirecta de estrés hídrico) y a irradiación por luz UV. El plásmido elegido fue el pBAD24 debido a la vasta bibliografía encontrada donde se reporta su uso (Guzman et al., 1995; Khlebnikov et al., 2000; Concepcion y Nelson, 2003). Este plásmido es regulable por arabinosa y la concentración recomendada en los trabajos es de 0.2%. A esta concentración, la inducción es rápida pero leve, permitiendo a las bacterias crecer normalmente. En nuestro caso, el subclonado de *Asr1* en pBAD24 incluyó un paso extra en el cual se deletionó un fragmento del plásmido que incluía un codón de inicio de la traducción que dejaba fuera de fase el marco de lectura del inserto.

En primer lugar, se verificó el grado de inducción de la proteína. Para ello, una vez obtenido el plásmido deseado, se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5- α , se indujeron con arabinosa y al extracto total de proteínas se les realizó un ensayo de Western blot utilizando anticuerpo anti-ASR1 (Figura 21 A). En la Figura 21 A se observa que la expresión obtenida es baja, ya que el tiempo de exposición para detectar dicha banda proteica fue 5 veces superior a lo normal. Posteriormente se vió que el número de bacterias inducidas con arabinosa es similar al número de bacterias no inducidas (Figura 21 B). Por lo tanto, la expresión de ASR1 en estas condiciones no modificó la viabilidad de las bacterias.

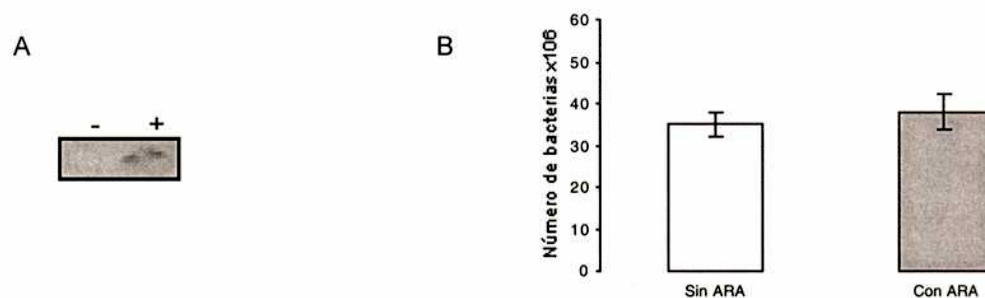


Figura 21: Efecto de ASR1 en la viabilidad bacteriana.

A. Nivel de expresión de ASR1 detectado por Western blot utilizando anti-ASR1 contra extractos proteicos de bacterias DH5- α portando el plásmido pBAD24-ASR1, crecidas en medio sin inductor (-) y medio inductor (+). El tiempo de exposición para el revelado por ECL fue de 10 minutos. **B.** Efecto de la ASR1 en la viabilidad bacteriana. Número de bacterias obtenidas luego de 2 horas de incubación con y sin arabinosa en el medio de cultivo y plaqueo posterior en LB agar.

Una vez asegurada una expresión leve que no afectaba la viabilidad celular, se analizó la sobrevivencia de estas bacterias en medio salino, como forma indirecta de someter a las células a estrés hídrico. Se cultivaron las bacterias en medio LB sólo y medio LB con 0,4 M de NaCl. En la Figura 22 A, se grafican los resultados obtenidos como % de bacterias sobrevivientes en medio salino y se observa que no existen diferencias entre la respuesta de las cepas que expresan ASR1 (con ARA) y las que no lo expresan (sin ARA). Por lo tanto, ASR1 no está confiriendo a las bacterias ninguna ventaja frente al estrés salino en estas condiciones. Luego se realizó el ensayo de exposición a la luz UV, evaluando las dosis de tiempo y distancia que ya había probado J. Moreno, así como también otras dosis de UV, variando el tiempo de exposición y la distancia a la lámpara (ver Materiales y Métodos). En todos los casos, la viabilidad bacteriana disminuyó al aumentar el tiempo de exposición a la luz UV, sin registrarse diferencias entre la sobrevivencia de las bacterias que expresan y que no expresan ASR1 (Figura 22 B).

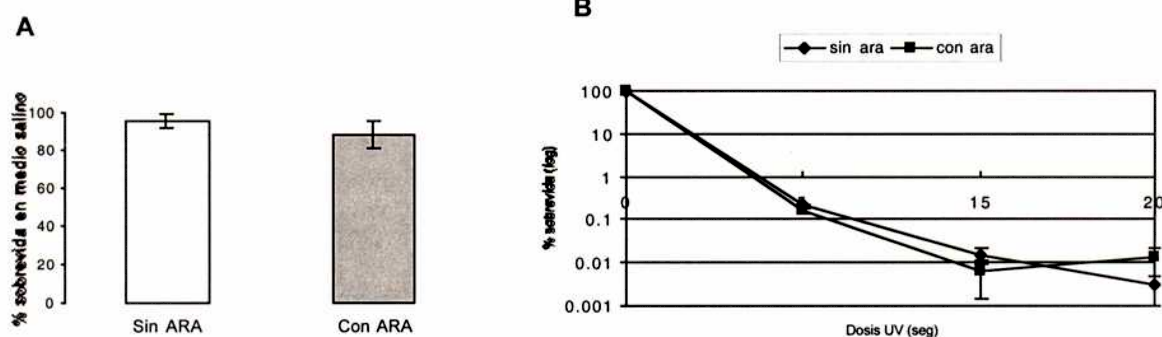


Figura 22: Análisis de la contribución de ASR1 en la respuesta bacteriana a estrés salino (A) expresada como % de sobrevivencia en medio salino (n° bacterias crecidas en medio con NaCl/ n° bacterias crecidas en medio LB) $\times 100$ y análisis de la contribución de ASR1 en la respuesta bacteriana a irradiación por UV (se grafican los resultados obtenidos a una distancia de 30 cm de la fuente de UV) (B).

Comportamiento de levaduras que expresan ASR1 frente al estrés

Con el objetivo de utilizar otro sistema de expresión distinto al procariótico, se comenzó a evaluar en forma simultánea cómo era la respuesta frente al estrés de levaduras que expresan ASR1, analizando su sobrevivencia en medio salino (0,5 M NaCl). En el sistema experimental utilizado, nos encontramos con un par de situaciones a tener en cuenta: por un lado, como se muestra en Figura 23 A, la presencia de ASR1 (Figura 23 B) tiene un efecto negativo en el crecimiento normal de las células. Por otro lado, la galactosa confiere a las levaduras una leve ventaja en su crecimiento (10-15%) al ser agregado al medio como agente inductor del sistema (dato no mostrado). Por lo tanto, no era posible comparar el efecto de la sal entre un cultivo en un medio normal vs. otro en medio inductor. Por lo tanto, el ensayo se realizó utilizando clones que portan el plásmido pYES vacío, como control, y clones transformados con el plásmido pYES-*Asr1*. A ambos se los cultivó en medio inductor (por agregado de galactosa) en presencia y ausencia de NaCl.

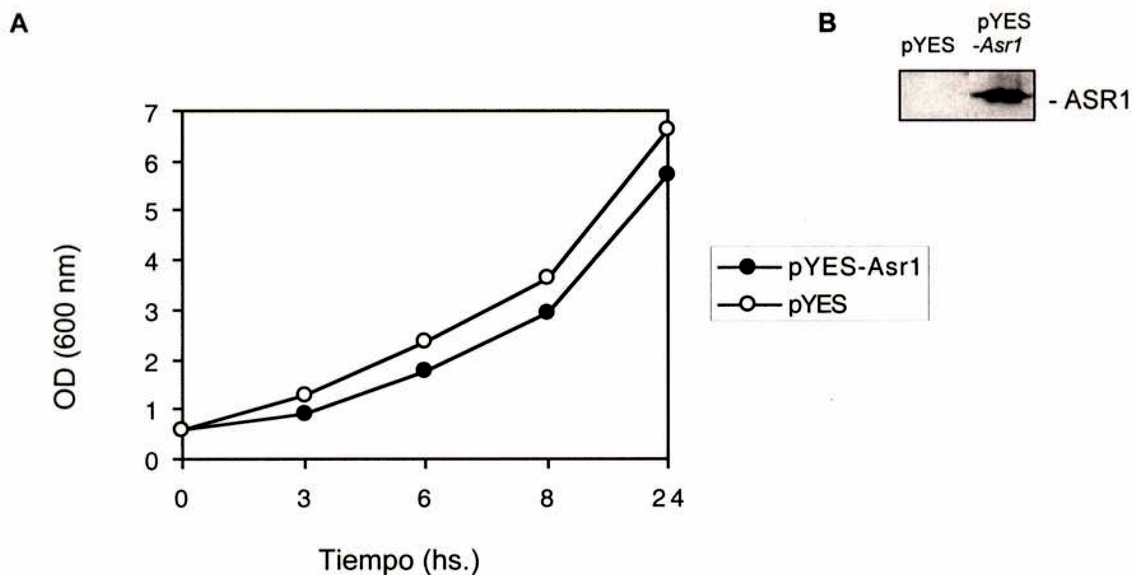


Figura 23: Efecto de ASR1 en la viabilidad de las levaduras que la expresan.

A. Levaduras crecidas en medio inductor (con galactosa). **B.** Western blot de la expresión de ASR1 en levaduras crecidas en medio inductor.

En la Figura 24, se observa que al comparar el crecimiento de las levaduras en medio salino, las células que expresan ASR1 muestran una mayor sobrevida que aquellas células que no expresan la proteína. Esta diferencia es evidente a tiempos cortos, donde la sobrevida de las levaduras que expresan ASR1 se mantiene en el 100% a las 3 horas, para luego ir disminuyendo hasta mantenerse en un 75%-80% durante el tiempo de incubación ensayado. Las levaduras control nunca superaron el 70% de sobrevida, cayendo abruptamente al 50% luego de 24 horas de crecimiento en el medio salino.

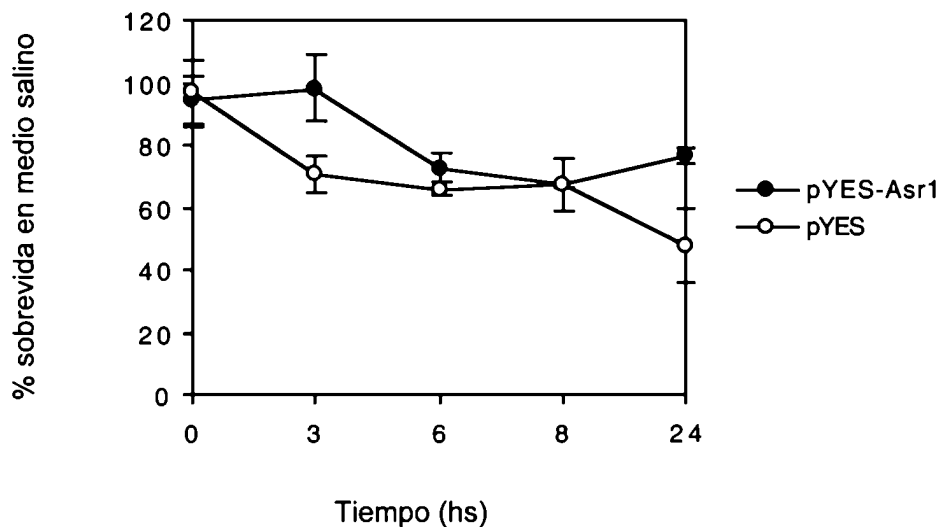


Figura 24: Análisis del comportamiento en medio salino de levaduras que expresan ASR1. Sobrevida en 0,5 M NaCl de levaduras que portan el plásmido pYES vacío y levaduras que portan el plásmido pYES-Asr1 crecidas en medio inductor (con galactosa). La sobrevida en NaCl se expresa tomando como 100% a las levaduras crecidas en medio sin sal.

DISCUSSION

El objetivo principal de este trabajo fue comparar a los miembros de la familia *Asr* de tomate (*L. esculentum*) tanto en su estructura como en su expresión. Teniendo en cuenta que estos genes ya habían sido descritos previamente, resultaba interesante por un lado, poder determinar las características estructurales de relevancia de estas proteínas y por otro, analizar el comportamiento de los genes de esta familia de manera individual. Asimismo, fue objetivo de este trabajo comenzar con la puesta punto de sistemas que permitan determinar la capacidad de estas proteínas de conferir protección *in vivo* frente al estrés.

Con este escenario en mente, en primer lugar se compararon las estructuras proteicas no sólo de los miembros de la familia génica de tomate (*L. esculentum*), sino que se incluyó también en la comparación el resultado de una búsqueda de ASR ortólogos en otras especies vegetales. Por otro lado, se diseñaron estrategias experimentales para observar el comportamiento particular de los miembros de la familia en cuanto a expresión. Por último, se realizaron ensayos preliminares de expresión de proteína en sistemas heterólogos (bacterias y levaduras) y se evaluó su comportamiento frente al estrés.

Analizando la estructura de las ASR

El análisis de las ASR se realizó, en primer lugar, comparando las estructuras de las ASR de tomate (*L. esculentum*) incluyendo luego los resultados de la búsqueda de homólogos, que reveló la existencia de moléculas proteicas conservadas que se acumulan en situaciones de variados tipos de estrés y/o en fruto. Estas proteínas provienen de muy diferentes especies, desde tomate salvaje, pasando por papa (evolutivamente cercana al tomate), uva, pera, melón, pino, etc., hasta algunas monocotiledóneas como el maíz, arroz, y caña de azúcar. Debe destacarse el hecho de haber encontrado homólogos en especies tan lejanas evolutivamente al tomate, pues esto sugiere la universalidad de las funciones de las proteínas para las cuales codifican los genes de la familia *Asr*. Cuando se evaluaron en conjunto todas estas proteínas "tipo ASR", quedó claro que, pese a lo variado del tamaño molecular y del órgano en el cual son inducidas, estas proteínas comparten ciertos rasgos comunes. En primer lugar, los perfiles hidropáticos indican que son altamente hidrofílicas y la abundancia relativa de aminoácidos como glicina, alanina, histidina, glutámico y lisina determinan que estas proteínas se encuentren altamente cargadas. Por otro lado, según la predicción de estructura

secundaria, estas proteínas poseen gran parte de su estructura como "random coil", lo que indicaría que en su estado nativo se encuentran mayormente desplegadas (Garay-Arroyo et al., 2000). El hecho de que un gran porcentaje de la proteína se presente como alfa-hélice, sumado a que se verificó que poseen una estructura secundaria con alta accesibilidad a moléculas de agua (datos aportados por N.Frankel, comunicación personal), podría estar relacionado con un probable rol protectorio de estas proteínas en restringir la pérdida de agua de las células.

Analizando más en detalle los patrones de hidropatía, se observa que todas las ASR, poseen por lo menos dos zonas hidrofóbicas, ubicadas en general hacia el N-terminal. Estas regiones corresponden a dos secuencias ricas en alanina altamente conservadas. La conservación de estas regiones es sugerente ya que podrían corresponder a bolsillos hidrofóbicos o formar parte de zonas internas confiriendo características importantes relacionadas con la función de estas proteínas.

Otra zona conservada en todas las ASR es la que involucra un potencial sitio de miristoilación. Vale la pena destacar que en todos los casos esta secuencia se encuentra adyacente o solapada con la primer zona hidrofóbica y que en algunos casos, donde se verificó un segundo sitio putativo de miristoilación, este coincide con la segunda zona hidrofóbica. Zheng y colaboradores (1993) determinaron que un residuo miristoilo puede unirse a un bolsillo hidrofóbico, aportando estabilidad estructural a la proteína. Se ha reportado además que la miristoilación es importante para la unión a membranas (Vergeres, 1996) y es frecuentemente encontrado en proteínas que las atraviesan. Existen evidencias de que las ASR poseen localización nuclear (Iusem et al., 1993; Gilad et al., 1997), por lo tanto es posible que el grupo miristoilo facilite su pasaje a través de la membrana del núcleo.

Otras regiones de importancia se revelaron al realizar la comparación de las secuencias aminoacídicas de todas las ASR, mediante alineamiento múltiple. La homología compartida por estas proteínas está concentrada en dos dominios, uno hacia el N-terminal de 20 aa y otro hacia el C-terminal de 72 aa. La zona intermedia es variable en secuencia y extensión. El dominio C-terminal de 72 aminoácidos está altamente conservado, y es el que contiene la/s señales de miristoilación y las dos zonas hidrofóbicas.

Hasta aquí, este contexto permite postular que algunas de las características comunes encontradas en las ASR como la alta carga, alta hidrofiliidad, la

estructura secundaria parcialmente desplegada y con alta accesibilidad al agua, los dos dominios conservados (uno hacia el N-terminal y otro hacia el C-terminal), uno de ellos conteniendo por lo menos dos regiones hidrofóbicas con sus potenciales sitios de miristoilación, sean probablemente parte importante de los rasgos estructurales relacionados con la función de estas proteínas.

Focalizándonos nuevamente en la composición aminoacídica, el alto porcentaje de residuos cargados presentes en estas proteínas es un dato muy llamativo. Garay-Arroyo y colaboradores (2000) adoptaron un criterio altamente selectivo basado en el porcentaje de glicina y en el grado de hidrofiliidad, lo que determinó una nueva clase de proteínas a las que denominaron *hidrofilinas*. Esta categoría agrupa diversas proteínas provenientes de muy diferentes orígenes, incluyendo el reino procariota. Todas ellas comparten el hecho de ser inducidas por estrés osmótico, sugiriendo una adaptación común al déficit de agua. Esta clasificación incluye a todas las proteínas LEA, conocidas por su especificidad de expresión en el último estadio de ontogenia de las semillas. Las LEA son mayoritariamente hidrofílicas y se supone que protegen estructuras celulares frente a la pérdida de agua (Durell, 1993). Cuando se analizaron los parámetros propuestos por Garay-Arroyo, todas las ASRs entraron en la categoría de las *hidrofilinas*.

Hasta la fecha, se han clonado y estudiado muchos de los ortólogos a *Asr* de tomate (Canel et al., 1995; Chang et al., 1996; Padmanabhan et al., 1997; Riccardi et al., 1998; Hara et al., 2002; Cakir et al., 2003, etc.); sin embargo no se conoce aún la función de ninguno de ellos. En base a lo analizado esta aquí, se especula con la posibilidad de que desempeñen una función dual: por un lado, la estructura de proteína hidrofílica y con accesibilidad al agua y el hecho de pertenecer al grupo de las *hidrofilinas*, parece indicar un rol protectorio directo de estas proteínas en respuesta al déficit hídrico de la célula; por otro lado, la ubicación nuclear de ASR1 de tomate, reportada por Iusem et al. (1993), y su capacidad de unión a ADN (Gilad et al., 1997), sugiere su participación en la protección de estructuras nucleares, probablemente del ADN durante la pérdida de agua. En este sentido, Silhavy et al. (1995), estudiaron una ASR de papa salvaje (DS2), la cual es homóloga a ASR de tomate en sus regiones N-terminal y C-terminal y posee una región central estructuralmente similar a un cierto tipo de LEA. En la zona C-terminal se encuentra un motivo consenso de dirección nuclear. Su región N-terminal se caracteriza por

poseer un motivo de 13 aminoácidos que se repite 10 veces, que es altamente hidrofílico y que forma una estructura de "random coil". Los autores postulan que en esta porción reside la función de protección al ADN. Las proteínas ASR de tomate no poseen esa repetición N-terminal, pero sí son altamente hidrofílicas y poseen gran parte de su estructura en "random coil", al igual que el resto de sus ortólogos en otras especies.

No se puede descartar, sin embargo, la posibilidad de que las ASR participen de manera directa en la regulación de genes de respuesta a estrés. La reciente aparición en el GenBank de una secuencia ortóloga a ASR, llamada VvMSA (por *Vitis vinifera* Maturation, Stress, ABA), presente en uva, apoya esta hipótesis y aporta interesantes datos en cuanto a la probable función de las ASR. Sus descubridores, Cakir et al. (2003), demostraron que VvMSA se une a un fragmento de 160 pb del promotor VvHT1, un probable transportador de monosacáridos en la uva que se expresa durante la maduración del fruto (Fillon et al., 1999). Al igual que en tomate, la expresión del VvMSA es regulada por ABA, pero en el caso de uva, el ABA sólo tiene efecto cuando actúa en combinación con la sacarosa. Sumado a esto, el hecho de que VvMSA posee localización nuclear, lleva a los autores a proponer que ASR de uva actuaría como parte de un complejo de regulación de la transcripción involucrado en la vía de señalización del ABA y el azúcar. Por lo tanto, otra de las posibles funciones de las ASR es la de participar, como factor de transcripción, en la modificación del metabolismo y reubicación de los carbohidratos desde los tejidos fuente hacia los tejidos de destino, durante la maduración misma del fruto o como respuesta a algún tipo de estrés.

Familia *Asr* de tomate (*L. esculentum*): comportamiento frente al estrés

Los genes *Asr* de tomate fueron extensamente descritos por Iusem et al. (1993), Rossi y Iusem (1994), Amitai-Zeigerson et al. (1995) y Gilad et al. (1997), mientras que Rossi et al. en 1996 determinaron que estos genes se encuentran organizados en una familia y que mapean en el cromosoma 4. Cabe preguntarse en este punto, cuál es el sentido biológico de la existencia de una familia multigénica. Una posible respuesta es que *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* se expresen diferencialmente presentando una especificidad temporal y/o tisular en respuesta a un determinado estrés (van Zee et al., 1995).

En este trabajo se analizaron los patrones de expresión de los genes *Asr* en varios órganos, bajo distintos tipos y duración de estrés. Las dos estrategias utilizadas (RT-PCR y Northern blot) permitieron evaluar el comportamiento de cada gen de manera individual más allá de la homología existente entre los miembros de la familia. Los resultados mostraron claramente que cada *Asr* se comporta de manera diferencial en diferentes órganos tanto en condiciones normales como en situaciones de estrés. Al examinar más en detalle estos patrones, resulta llamativa la elevada expresión en condiciones basales de *Asr1* en tallo y de *Asr3* en raíz y hoja, lo que podría estar indicando que estos genes estén involucrados en algunas funciones básicas de protección en condiciones no estresantes, constituyendo la defensa previa requerida al comienzo del estrés. La expresión diferencial de miembros de otras familias génicas ya ha sido reportada (Germain y Ricard, 1997; Guan y Sacandario, 1998). De hecho, un ortólogo a *Asr* de tomate, *lp3* de pino, mostró especificidad de órgano de cada uno de sus miembros en la respuesta al estrés hídrico (Padmanabhan et al., 1997).

Otra conclusión interesante, surgida de los resultados obtenidos en los experimentos de estrés hídrico en hojas y raíces, indica que las publicaciones previas en las que se observaba un incremento en la expresión de “*Asr*” en hojas en desarrollo de tomate (Gilad et al., 1997), hojas estresadas (Iusem et al., 1993; Amitai-Zeigerson et al., 1995) y raíces estresadas (Amitai-Zeigerson et al., 1995) son en realidad el resultado de la inducción específica combinada de *Asr1*, *Asr2* y *Asr3* en hojas y de *Asr2* en raíces. Es importante subrayar que estos grupos realizaron sus experimentos antes de reconocerse a *Asr* como familia multigénica y que los resultados fueron obtenidos mediante Northern blot utilizando como sonda el ARNm completo de *Asr1*.

La expresión diferencial de miembros de la familia *Asr* también se evidenció frente a otros tipos de estrés. Mientras que *Asr1* incrementó su expresión en todos los órganos analizados luego someter a la planta a daño mecánico y a frío, *Asr2* mostró sólo una inducción casi imperceptible frente al daño si se lo compara con *Asr1*. La infección por hongos no modificó la expresión de ninguno de estos dos genes. En este punto es oportuno señalar que, aunque la transducción de señales generada por el estrés ambiental ha sido objeto de intensos estudios y muchos de sus mecanismos han sido bien caracterizados, el escenario en relación a lo que

ocurre a nivel celular y molecular en una planta sometida a estrés, no es simple. Las respuestas de las plantas al estrés son reguladas por múltiples vías de señalización (Glazebrook J., 2001; Knight et al., 2001) que a menudo se interconectan, produciendo verdaderas redes y generando solapamientos entre los patrones de expresión de genes que son inducidos en respuesta a distintos tipos de estrés (Durrant et al., 2000; Schenk et al., 2000; Seki et al., 2001; Chen et al., 2002). Un ejemplo de ello proviene del análisis de transcriptomas mediante la técnica de "microarrays" que determinó que un número sustancial de genes son regulados coordinadamente por diferentes señales de estrés tales como infecciones fúngicas (Schenk et al., 2000), bajas temperaturas o estrés hídrico (Seki et al., 2001). El entrecruzamiento entre las diferentes vías de señalización es algo tan común en la respuesta de las plantas al estrés (Ingram y Barterls, 1996; Knight y Knight, 2001) que muchos autores se han preguntado si realmente existe una vía de respuesta específica a un determinado tipo de estrés (Knight y Knight, 2001). En el caso de los *Asr* de tomate se observa que, a diferencia de *Asr1*, *Asr2* presenta un el patrón de expresión restringido a un tipo particular de estrés (dentro de los casos de estrés probados). En este sentido, *StDs2*, un ortólogo a *Asr* en papa comercial (*Solanum tuberosum*) es inducido específicamente por estrés hídrico y osmótico pero no por estrés salino, ABA, frío, o anoxia (Doczi et al., 2002). Es probable entonces, que los elementos regulatorios de la transcripción que le permiten a muchos genes (entre los que estaría *Asr1*) responder a varios tipos de estrés, no esten presentes en *Asr2*. En base a la hipótesis de Rossi et al. (1996) quienes sugirieron que *Asr2* sería el gen ancestral a partir del cual surgieron por duplicación los otros dos miembros de la familia, resulta probable que *Asr1* haya surgido como una versión del gen original con la adquisición en su secuencia de nuevos elementos regulatorios que le permitieron tener respuesta más amplia a diferentes tipos de estrés, induciéndose no sólo por falta de agua sino también en respuesta a daño mecánico y bajas temperaturas.

Al analizar la respuesta al estrés hídrico a nivel proteico utilizando el anticuerpo anti-ASR1, se observó una correlación parcial con lo detectado a nivel de ARNm en raíz, tallo y hoja para *Asr1*. En estos órganos la intensidad de la banda proteica aumentó con el tiempo de exposición al estrés. En el caso de hoja, la disminución detectada a las 12 horas concuerda con lo observado en la expresión

del ARNm de *Asr1*. Sin embargo, la presencia de una banda proteica a las 24 horas de estrés hídrico en raíz, tiempo al cual no se detectó mensajero de *Asr1*, indica que, probablemente como consecuencia de la naturaleza policlonal del anticuerpo utilizado, sumado a la homología de las proteínas ASR, la respuesta particular de ASR1 no puede ser identificada mediante este anticuerpo.

El análisis de la expresión a nivel celular mediante la técnica de hibridación *in situ*, mostró que *Asr1* y *Asr2* se expresan de manera específica en células acompañantes del floema de hojas cuando la planta no ha experimentado ningún tipo de estrés. Estos resultados tienen puntos de coincidencia con los obtenidos por Rossi et al. (1998), quienes por medio de una construcción de fusión entre el promotor de *Asr2* y el gen reportero Gus observaron expresión de este gen en sistema vascular de papayas transformadas. Varios son los ejemplos reportados de genes que responden a algún tipo de estrés y cuya expresión en condiciones normales está localizada en tejido vascular y/o en meristema radicular. En este sentido, dentro del grupo de las LEA existe un subgrupo denominado *dehidrinas* y la acumulación de muchos de sus miembros en sistema vascular está ampliamente documentada (Godoy et al., 1994; Houde et al., 1995; Danyluk et al., 1998; Bravo et al., 1999; Nylander et al., 2001). Nylander et al., 2001, quienes estudiaron la expresión de las *dehidrinas* ERD14 y la LT29, han postulado que estas proteínas podrían funcionar como "atractantes" de agua desde el xilema hasta los tejidos de destino. Se ha reportado también la expresión específica en células del floema de otros genes de respuesta a estrés, como SalT en hojas de maíz, inducible por alta salinidad (Furumoto et al., 2000) y Atrab28, una LEA de *Arabidopsis* relacionada con la tolerancia a toxicidad catiónica (Borrell et al., 2002). Recientemente, Sugiharto et al. (2002) determinaron que la expresión de SoDip22, un ortólogo a *Asr* en caña de azúcar, se localiza en células del tejido vascular de la hoja.

El sistema vascular, así como los meristemas, son tejidos cruciales para el crecimiento y la supervivencia de la planta y necesitan una protección adicional en condiciones normales. Como se mencionó anteriormente, la acumulación en condiciones basales de genes de respuesta a distintos tipos de estrés podría representar un sistema de defensa constitutivo. Aunque los resultados de Northern blot mostraron que la expresión basal de *Asr1* y *Asr2* en la hoja no es muy elevada, su presencia específica en células acompañantes de floema es coherente con el

hecho de que el tejido vascular es uno de los tejidos más involucrados en la regulación del estado hídrico de la planta (Davies, 1986). Por otro lado, resulta interesante que la acumulación de los transcritos en hoja se vea extendida hacia las células parenquimáticas circundantes cuando la planta es sometida a estrés hídrico. Es probable que la especificidad tisular inicial en condiciones óptimas se vea alterada ante condiciones adversas ampliándose el tipo celular donde se expresen estos genes. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que esta detección inespecífica de la expresión se deba en realidad a un transporte del ARNm hacia las células parenquimáticas. El movimiento de ácidos nucleicos a larga distancia fue observado también en infecciones virales de plantas (Lucas y Gilbertson, 1994). Posteriormente, evidencias de movimiento intercelular de ARN no viral surgieron de estudios de silenciamiento génico pos-transcripcional (PTGS) (Vaucheret et al., 1998). A partir de trabajos realizados inicialmente por Kuhn y colaboradores (1997), se determinó que el ARN endógeno también es transportado a través del sistema vascular. Luego surgieron otros trabajos que aportan más evidencias y que coinciden en determinar que el transporte de ARN endógeno ocurre más promiscuamente de lo que se pensaba (Sasaki et al., 1998, Xoconostle-Cazares et al., 1999; Ruiz-Medrano et al., 1999). Respecto a la expresión en raíces estresadas, los resultados coincidieron con lo observado por las técnicas de RT-PCR y Northern blot, donde se detectó la expresión de *Asr2* pero no la de *Asr1* bajo esas condiciones de estrés.

¿Qué sucede con la expresión de los *Asr* en órganos que normalmente no están sujetos a estrés? Ya que en condiciones basales el nivel de expresión es variable, se decidió evaluar el comportamiento de estos genes en el fruto y la flor para determinar si dicha variabilidad está presente también en estos órganos.

En fruto, la acumulación de los transcritos de *Asr1* y *Asr2* se evaluó en el pericarpio durante la maduración. Ambos ARNm mostraron un pico en su expresión al comienzo, cuando el fruto está completamente verde, para luego disminuir gradualmente durante el proceso madurativo. Estos resultados difieren de los obtenidos por Gilad et al. (1997), quienes determinaron que la expresión de *Asr* se incrementaba en la maduración del fruto en *L. esculentum* cv Ailsa Craig. Debido a que no se examinó la expresión de *Asr3*, no puede descartarse que el incremento observado por Gilad y colaboradores sea consecuencia de la expresión de este

miembro de la familia en estadios tardíos de la maduración del fruto. Ya que los ensayos realizados en este trabajo se hicieron con *L. esculentum* UC82b (y no con Ailsa Craig), otra posibilidad es que el polimorfismo dependiente del genotipo en las secuencias reguladores de *Asr* pueda influir en este tipo de comportamientos contrastantes, de manera similar a lo hallado en el fruto de pomelo con alta y baja acidez (Canel et al., 1995).

Hasta la fecha, el estudio de la expresión de ortólogos a *Asr* de tomate en otras especies se ha focalizado en el análisis del comportamiento de estos genes en tejidos vegetativos sometidos a algún tipo de estrés. Sólo recientemente se reportó que el *Asr* de uva (VvMSA) se expresa en grandes cantidades al comienzo, para ir declinando hacia el final de la maduración del fruto (Cakir et al., 2003). Por lo tanto, los datos de expresión de VvMSA en fruto coinciden con lo observado para *Asr1* y *Asr2* de *L. esculentum*, (alta expresión al comienzo de la maduración y baja expresión al final).

Al evaluar la expresión de los *Asr* en la flor se observó nuevamente una expresión diferencial de los miembros de la familia *Asr*. A diferencia de *Asr2*, la acumulación de *Asr1* en estructuras de la flor es llamativa por su alta cantidad, sobre todo en pétalos y estructuras sexuales. En este contexto, Imai et al. (1995) reportaron el caso del gen *lea25*, una LEA que se expresa en órganos sometidos a estrés hídrico, así como también en la flor. Tanto en el caso de *lea25* como en el de *Asr1*, es probable que la presencia de estos transcriptos esté circunscripta al polen, ya que en el curso de su desarrollo, el polen pierde agua hasta que su contenido, según las especies, llega al 6-35% (Heslop-Harrison, 1987). Otro ejemplo esta dado por la proteína LLA23 de *Lilium longiflorum* (proteína tipo ASR) que es específica de polen y sus transcriptos se acumulan en la última etapa de su maduración (Wang et al., 1998).

No es de fácil interpretación el hecho de encontrar una alta expresión de *Asr1* en pétalos. Muchos genes que responden a estrés también modifican su expresión en procesos que están relacionados con las distintas etapas del desarrollo de una planta. Tal es el caso del gen ATHB6 de *Arabidopsis*, cuyo patrón de expresión está controlado durante el desarrollo de carpelos y es a su vez regulado en respuesta a diversos tipos de estrés (Soderman et al., 1999). Es probable entonces que la alta expresión de *Asr1* pétalos esté relacionada con la etapa del desarrollo de estos tejidos florales.

Analizando bandas proteicas no esperadas

Cuando se examinó la expresión de las ASR de tomate a nivel proteico, se sabía que el tipo de anticuerpo con el que se contaba (policlonal anti-ASR1) podría brindar información parcial, ya que resultaba altamente probable una reacción cruzada con los demás miembros de la familia. Lo interesante del resultado estuvo dado por la detección de bandas del doble y triple del tamaño esperado (15 kDa para ASR1), tanto en el caso de hoja como en el fruto. Teniendo en cuenta que las ASR poseen motivos consenso de miristoilación y de fosforilación, la primer explicación que podría justificar un aumento de tamaño en la proteína es la de una modificación pos-traducciona. Pero el aporte del grupo miristoilo y/o del grupo fosfato no es suficiente para modificar la movilidad electroforética en la magnitud observada (George y Blackshear, 1992; Thomas et al., 2000; T.Tanos, comunicación personal). Por lo tanto, las diferencias observadas no corresponden a ese tipo de modificación. Otra posibilidad es que el anticuerpo estuviera reconociendo un cuarto miembro no reportado de la familia, de mayor tamaño a los ya conocidos. Sin embargo, el hecho de que las bandas fueran del doble y triple a lo esperado resultaba más que llamativo e indujo a pesar en la posibilidad de que ASR estuviera en realidad formando dímeros y trímeros. Esto, sumado a que se observó una correlación entre las intensidades entre ambas bandas, determinó que se realizaran ensayos teniendo como objetivo “desarmar” los probables agregados. Dado que las ASR no tienen cisteínas, queda descartada la posibilidad de que las uniones fueran a través de puentes disulfuro. Sin embargo, resulta evidente que el tipo de unión no era fácilmente separable por SDS (presente en el “cracking buffer” y en el gel). La naturaleza fuerte de la putativa interacción quedó clara al lograr incrementar sólo parcialmente la banda de 15 kDa luego del agregado de un agente caotrópico como la urea a la solución proteica y al gel. Este resultado era alentador en cuanto a la hipótesis de formación de dímeros, que quedó clara cuando pudo obtenerse una banda de 15 kDa, a partir de la banda de 30 kDa eluída directamente del gel, luego del tratamiento con urea. La sorpresiva detección de una banda de 45 kDa, tanto a partir de la banda de 30 kDa como de la de 15 kDa, refleja la clara tendencia de ASR a formar agregados (homo y/o hete dímeros y trímeros). Dada la posibilidad de formación de “artefactos” generados por los tratamientos a los que se sometió a las proteínas, no es posible determinar cuál sería la conformación nativa

de ASR dentro de la célula, para lo cual son necesarios experimentos de separación en tamiz molecular. Sin embargo, a la luz de los resultados obtenidos, resulta razonable asumir que ASR forma oligómeros, y posiblemente se encuentre en forma multimérica dentro de la célula.

Recientemente Bar Zvi et al. coincidieron en la posibilidad de que ASR1 forme un dímero, y plantean que la porción C-terminal sería la involucrada en la dimerización (datos no publicados). En este sentido, y a pesar de que hasta la fecha no hay datos reportados acerca de la formación de estas estructuras en proteínas tipo ASR, se conocen otros grupos que responden a estrés y que funcionan en forma de dímeros o trímeros. Dentro de las proteínas LEA, que como se sabe responden a estrés hídrico, y que en su mayoría se encuentran como monómeros en su estado nativo (Mc.Cubbin et al., 1985; Ceccardi et al., 1994; Lisse et al., 1996; Garay-Arroyo et al., 2000), existe un pequeño grupo que forman dímeros o tetrámeros (Dure, 1993; Ceccardi et al., 1994; Kazuoka y Oeda, 1994). Otro ejemplo son las proteínas del grupo de las HD-Zip (homeodomain-leucine zipper) de *Arabidopsis*, conocidos factores de transcripción que pueden actuar como activadores (Aoyama et al., 1995) o represores (Meijer et al., 1997) de genes río abajo, uniéndose al ADN blanco como dímeros (Sessa et al., 1993). Soderman et al. (1999) caracterizaron una proteína de este grupo que funciona como dímero y que responde a condiciones de falta de agua. En el caso de ASR de tomate, la formación de oligómeros, sumado a su localización nuclear (Lusem et al., 1993), a la posibilidad de unión a ADN (Gilad et al., 1997) y a su homología con una proteína de uva que se une al promotor de un transportador de hexosas (Cakir et al., 2003), apoyan la hipótesis de la participación de estas proteínas como factores de transcripción en algún paso de la respuesta al estrés y en el desarrollo. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las características de su estructura proteica no permiten descartar su rol en la protección directa a la desecación.

Expresión de ASR1 en sistemas heterólogos

Dado que un gran número de proteínas se expresan en tejidos vegetativos cuando una planta es estresada por déficit hídrico, es razonable proponer que la protección celular bajo condiciones subóptimas de disponibilidad de agua es el resultado del efecto combinado de muchas diferentes proteínas. Esta protección

puede deberse a efectos independientes o aditivos, mediados por proteínas individuales y/o a interacciones de estas proteínas con otras. Sin embargo, tomando como ejemplo el caso de las LEA, donde varios miembros de esos grupos poseen estructuras primarias conservadas y únicas, es también razonable predecir que al menos parte de la putativa función de protección estará dada por el resultado de contribuciones individuales de cada grupo proteico y que esas contribuciones pueden ser demostradas y analizadas independientemente. Es por ello que en la última parte de este trabajo se comenzó con la puesta a punto de sistemas de expresión heterólogos como método para evaluar el probable rol protector de las ASR.

En este sentido, existen en nuestro laboratorio antecedentes de la utilización de *E. coli* como sistema de sobre-expresión de ASR1 para evaluar su aporte frente al estrés por luz UV. La relación de ASR1 con este tipo de estrés surge de experimentos de Covarrubias A.A. y su grupo (comunicación personal) quienes demostraron, mediante ensayos *in vitro*, que al incubar una enzima "reporter" con una *hidrofilina* (clase a la que se demostró pertenecen las ASR) la primera mantuvo su actividad luego de ser irradiada con luz UV, mientras que con otras proteínas, utilizadas como control, la actividad enzimática disminuyó. Basado en estos antecedentes, los resultados de J. Moreno (tesis de Licenciatura), apuntaron en la misma dirección, ya que las bacterias que sobre-expresan ASR1 mostraron una mayor sobrevivencia frente a la luz UV que aquellas que no la expresan. Como se mencionó en "Resultados", la disminución en la viabilidad bacteriana en condiciones sin estrés, generada por la acumulación de ASR1, hacían necesaria una puesta a punto de este sistema de expresión. Esto se logró mediante el subclonado de la proteína en un plásmido con promotor regulable, que permitió generar un cantidad de producto no tóxico para las bacterias. Sin embargo, el efecto protector esperado no se conservó, ni en ensayos de irradiación con UV ni en ensayos de crecimiento en medio salino. ¿Es entonces el efecto protector, resultado de la mera sobre-expresión de cualquier proteína y no de la presencia específica de ASR1?. Los ensayos de J. Moreno descartan esta posibilidad ya que la sobre-expresión de una proteína control no generó el efecto obtenido con ASR1. Las diferencias observadas entre los resultados de J. Moreno y los realizados en este trabajo, podrían atribuirse *a priori* a la utilización de otra cepa de *E. coli* (DH5- α

en vez de BL21) que de por sí tiene una mayor sensibilidad a la irradiación por luz UV. Por lo tanto, es probable que, para poder visualizar la acción protectora dada por bajas cantidades de ASR1 frente al estrés, se necesite una nueva puesta a punto de ciertas variables en este nuevo "background" genético a fin de que el efecto protector de ASR1 frente al estrés impuesto sea evidente; entre ellas, se pueden mencionar la dosis de irradiación utilizada (tiempo y distancia de exposición a la lámpara UV), la concentración salina en el medio de crecimiento, tiempo de exposición a la sal, etc.

Paralelamente, se realizaron ensayos preliminares utilizando el sistema de expresión heterólogo de *S. cerevisiae*. Las levaduras han sido consideradas un excelente modelo eucariota para el estudio de los mecanismos que subyacen a la tolerancia al estrés salino, particularmente porque se ha demostrado que los hongos y las plantas superiores no sólo tienen un sistema de transporte iónico similar en sus membranas plasmáticas (Serrano et al., 1997), sino que también comparten similares mecanismos de detoxificación (Gaxiola et al., 1992) y probablemente, algunas vías de transducción de señales (Lee et al., 1999).

La primera observación interesante es que, pese a que ASR1 causó un efecto perjudicial en el crecimiento de las levaduras, su presencia confirió a las células una ventaja en la sobrevivencia en medio con alta concentración de sal. El hecho de que el mayor porcentaje de sobrevivencia se observe a tiempos cortos puede deberse a que la toxicidad causada por acumulación posterior de la proteína supere el efecto de protección observado inicialmente. Por otro lado, aunque el efecto claramente disminuyó con el tiempo, este parece mantenerse dentro de las 24 horas a diferencia de las levaduras sin ASR1 cuyo porcentaje de sobrevivencia cayó aún más en este período. Estos resultados concuerdan con los obtenidos, entre otros, por Imai et al. (1995) quienes demostraron que LEA25, una LEA de tomate, introducida en levaduras generó un "lag" más corto en su crecimiento frente al estrés salino.

Al analizar estos resultados es oportuno tener en cuenta que las levaduras poseen mecanismos propios de mitigación del estrés que pueden activarse en respuesta a la alta salinidad del medio. Sin embargo, frente al estrés salino, las células expresando ASR1 mostraron una leve ventaja en la sobrevivencia respecto a aquellas que no la expresan. En este contexto, podría señalarse a ASR1 como la responsable de esa ventaja. Sin embargo, se debe ser cuidadoso en este punto ya

que se ha reportado que la producción de proteínas heterólogas en levaduras podrían también gatillar las respuestas intrínsecas de estrés como la producción de glicerol por la vía HOG (High osmolarity glicerol), la cual puede contribuir a la tolerancia al estrés iónico y osmótico (Albertyn et al., 1994). Si bien deberán realizarse ensayos de expresión y desafío en levaduras mutantes para esta vía, de manera de poder asignar fehacientemente a ASR1 la función protectora observada, publicaciones previas de estudios realizados con proteínas de respuesta a estrés (en general LEA) (Zhang et al., 2000; Swire-Clark y Marcotte, 1999; Imai et al., 1995), señalan que este tipo de proteínas (similares en carga y tamaño a las ASR) no activan la vía HOG.

Finalmente, es bueno subrayar las razones por las cuales resulta importante el estudio de genes de respuesta a estrés como los *Asr*. El intentar comprender los mecanismos moleculares que se disparan a partir de una señal abiótica como la falta de agua, el daño o el frío, no sólo resulta apasionante en lo que al conocimiento básico se refiere, sino que además, combinado con estudios en otras áreas del conocimiento como la fisiología vegetal y la ecología, aportará las herramientas indispensables para la producción de plantas que puedan crecer (o al menos que puedan conservar su rendimiento) en ambientes a los que hoy en día se consideran subóptimos o sencillamente no utilizables.

CONCLUSIONES


Se determinó la existencia de características estructurales comunes a las proteínas ASR.


Se comprobó la expresión diferencial de los miembros de la familia génica *Asr* de tomate en distintos órganos y en distintas condiciones de estrés.

Se estableció la localización tisular de la expresión de *Asr1* y *Asr2* en condiciones normales de riego y en condiciones de estrés hídrico.

Se demostró que ASR forma agregados moleculares (dímeros y trímeros).

Se obtuvieron resultados preliminares del rol protector de ASR1 en sistemas de expresión heterólogos.


N. IUSEM


Laura Mastin

BIBLIOGRAFIA

- Abe H., Yamaguchi-Shinazaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosakawa D. y Shinozaki K. (1997). Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulates gene expression. *Plant Cell*. 9, 1859-1868.
- Aguilar P.S., Hernandez-Arriaga A.M., Cybulski L.E., Erazo A.C. y Mendoza D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J*. 20, 1681-1691.
- Alamillo J., Almoguera C., Bartels D. y Jordano J. (1995). Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol Biol*. 29, 1093-1099.
- Albertyn J., Hohmann S., Thevelein J.M. y Prior B.A. (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol pathway. *Mol. Cell Biol*. 14, 4135-4144.
- Almoguera C., Coca M.A. y Jordano J. (1993), Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress. *Plant J*. 4, 947-958.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res*. 25, 3389-3402.
- Amitai-Zeigerson H., Scolnik, P.A. & Bar-Zvi, D. (1993). Secuencia proteica enviada a la base de datos EMBL.
- Amitai-Zeigerson H., Scolnik, P.A. & Bar-Zvi, D. (1995). Tomato *Asr1* mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Sci*. 110, 205-213.
- Aoyama T., Dong C.H., Wu Y., Carabelli M., Sessa G., Ruberti I., Morelli G. y Chua N.H. (1995). Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator *Athb-1* alters leaf cell fate in tobacco. *Plant Cell*. 7, 1773-1785.
- Bittenbender H.C. y Kelly J.F. (1988). En: E. Karmas y R.S. Harris (eds.), *Nutritional evaluation of Food Processing*, Ed.3. Wiley, New York, pp 659-686.
- Borrel A., Cutanda M.C., Lumbreras V., Pujal J., Goday A., Culiáñez-Maciá F.A. y Pagés M. (2002). *Arabidopsis thaliana* *Atrab28*: a nuclear targeted protein related to germination and toxic cation tolerance. *Plant Mol. Biol*. 50, 249-259.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochem*. 72, 248-254.
- Bravo L.A., Close T.J., Corcuera L.J. y Guy C.L. (1999). Characterization of an 80-kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation. *Physiol. Plant*. 106, 177-183.

- Bray, E. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2: 48-54.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R, Eds. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists. Cap22. Responses to Abiotic Stresses pp 1158-1203
- Cakir B., Agasse A., Gaillard C., Saumonneau A., Delrot S. y Atanassova R. (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *The Plant Cell* (versión "on line").
- Callahan A.M., Morgens P.H. y Cohen R.A. (1993). Isolation and initial characterization of cDNAs for mRNAs regulated during peach fruit development. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 118, 531-537
- Canel C., Bailey-Serres J.N. y Roose M.L.(1995). Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiol.* 108, 1323-1324.
- Carpele M., Maiani G., Azzini E., Conti E.M.S., Raguzzini A., Ramazzotti V. y Crespi M. (1996). *Eur.J.Cancer Prev.* 5, 197-206.
- Chang S., Puryear J.D., Dias M.A.D.L., Funkhauser E.A., Newton R.G. y Cairney J. (1996). Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda*): Isolation and characterization of cDNA clones. *Physiol. Plant.* 97, 139-148.
- Ceccardi T.L., Meyer N.C. y Close T.J. (1994). Purification of a maize dehydrin. *Prot Exp Purif.* 5, 266-269.
- Chaumont, F.; Barrieu, F.; Herman, E. y Chrispeel, M. (1998). Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiol.* 117, 1143-1152.
- Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G. y Witham S.A. (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in responses to environmental stresses. *Plant Cell.* 14, 559-574.
- Choi H., Hong J., Ha J., Kang J. y Kim S.Y.(2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J.Biol. Chem.* 275, 1723-1730.
- Concepcion M.B. y Nelson D.R. (2003). Expression of *spoT* in *Borrelia burgdorferi* during serum starvation. *J. Bacteriol.* 185, 444-452.
- Constabel C.P., Bergey D.R. y Ryan C.A. (1995). Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 92, 407-411.
- Cowan I.R. (1982). Regulation of water use in relation to carbon gain in higher plants. In OL Lange, PS Nobel, CB Osmond, H Zeigler, eds, *Physiological Plant Ecology II*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 589-614.

- Danyluk J., Perron A., Houde M., Limin A., Fowler B., Benhamou N. y Sarhan F. (1998). Accumulation of an acid dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*. 10, 623-638.
- Davies, W.J., Metcalfe J., Lodge T.A. y Da Costa A.R. (1986). Plant growth substances and the regulation of growth under drought. *Australian Journal of Plant Physiology*. 13, 105-125.
- DellaPenna D., Alexander D.C. y Bennett A.B. (1986). Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase levels during ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 83, 6420-6424.
- Doares S.H, Narváez-Vásquez J., Conconi A. y Ryan C.A. (1995). Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol*. 108, 1741-1746.
- Dóczy R., Csanaki C. y Banfalvi Z. (2002). Expression and promoter activity of the desiccation-specific *Solanum tuberosum* gene, StDS2. *Plant Cell and Env*. 25, 1197-1203.
- Dure L. III (1993). In *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. (Close, T.J. and Bray E.A., eds.) Vol 10, pp. 91-103, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Durrant W.E., Rowland O., Piedras P., Hammond-Kosack K.E. y Jones J.D.G. (2000). cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell*. 12, 963-977.
- Fillon L., Ageorges A., Picaud S., Coutos-Thévenot P., Lemoine R., Romieu C. and Delrot S. (1999). Cloning and expression of a hexose transporter gene during the ripening of grape berry. *Plant Physiol*. 120, 1083-1093.
- Finkelstein R.R., Tenbarger K.M., Shumway J.E. y Crouch M.L. (1985). Role of ABA in maturation of rapessed embryos. *Plant Physiol*. 78:630-636.
- Frankel N., Hasson E., Iusem N.D. y Rossi M.S. (2003). Adaptive evolution of water-stress induced gene *Asr2* in *Lycopersicon* species dwelling in arid habitats. *Mol.Biol. Evol.* (versión "on line").
- Frey A., Audran C., Marin E., Sotta B. y Mation-Poll A. (1999) Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase expression. *Plant Mol Biol*. 39, 1267-1274.
- Furumoto T., Hata S. y Izui K. (2000) Isolation and characterization of cDNAs for differentially accumulated transcripts between mesophyll cells and bundle sheath strands of maize leaves. *Plant Cell Physiol*. 41(11), 1200-1209.
- Garay-Arroyo A., Colmenero-Flores J.M., Garciarrubio A. y Covarrubias A.A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokariotes and eukariotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem*. 275, 5668-5674.

- Gaxiola R., Larrinoa I.F.D., Villalba M.J. y Serrano R. (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* 11, 3157-3164.
- George D. J. y Blackshear P. J. (1992). Membrane association of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein appears to involve myristate-dependent binding in the absence of a myristoyl protein receptor. *J. Biol. Chem.* 267 (34), 24879-24885.
- Germain V. y Ricard B. (1997). Two *ldh* genes from tomato and their expression in different organs during fruit and in responses to stress. *Plant Mol. Biol.* 35, 949-954.
- Gilad A., Amitai-Zeigerson H., Scolnik P.A. y Bar-Zvi D. (1997). *Asr1*, a tomato water-stress regulated gene: genomic organization, developmental regulation and DNA-binding activity. *Acta Hort.* 447, 441-453.
- Giovannoni J (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 725- 749.
- Giraudat J., Parcy F., Bertauche N., Gosti F., Leung J., Morris PC., Bouvier-Durant M. y Vartanian N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signaling. *Plant Mol. Biol.* 26, 1557-1577.
- Glazebrook J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 301-308.
- Godoy J.A., Lunar R., Torres-Shumann S., Moreno J., Rodrigo R.M. y Pintor-Toro J.A. (1994). Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 26, 1921-1934.
- Gray, J.E, Picton S., Giovannoni J.J y Grierson D. (1994). The use of transgenic and naturally occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. *Plant Cell and Env.* 17, 557-571
- Grierson D. y Schuch W. (1993). Control of ripening. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* 342, 241-250.
- Guan L. y Scandalio J.G. (1998). Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *Sod4* and *Sod4A*, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* 117, 217-224.
- Guzman L-M, Belin D., Carson M. y Beckwith J. (1995). Tight regulation, modulation and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177 (4), 4121-4130.
- Hamilton E.W. III y Heckathorn S.A. (2001). Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by proline and betaine. *Plant Physiol.* 126, 1266-1274.
- Hara, M., Kumagai, K. and Kuboi, T. (2002). Characterization and expression of a water stress responsive gene from a seashore plant *Calystegia soldanella*. *Plant Biotechnol.* 19, 277-281

- Harndahl U., Hall R.B., Osteryoung K.W., Vierling E., Bornman J.F. y Sundby C. (1999). The chloroplast small heat shock proteins undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plant from oxidation stress. *Cell Stress Chaperones*. 4, 129-138.
- Hartl F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381, 571-579.
- Hasegawa P.M., Bressan, R.A., Zhu J.K. y Bohnert H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Mol. Plant Physiol.* 51, 463-499.
- Heslop-Harrison J. (1987). Pollen germination and pollen-tube growth. *International Review of Cytology*. 107, 1-78.
- Higgins D.G., Thompson J.D. y Gibson T.J. (1996). Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* 266, 383-402.
- Houde M., Daniel C., Lachapelle M., Allanrd F., Laliberté S. y Sarhan F. (1995). Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J.* 8, 583-593.
- Ingram, J. y Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 377-403.
- Imai R., Chang L., Ohta A., Bray E.A. y Takagi M. (1995) A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170: 243-248.
- Iusem N.D., Bartholomew D., Hitz W.D. & Scolnik P.A. (1993). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol.* 102, 1353-1354.
- Iwasaki T., Yamagushi-Shinozaki K. y Shinozaki K. (1995). Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol Gen Genet.* 247, 391-398.
- Jackson DP (1991) *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp 163-174.
- Jones H.G. (1980). Interaction and integration of adaptive responses to water stress: the implications of an unpredictable environment. In NC Turner, PJ Kramer, eds, *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*. Wiley, New York, pp. 353-365.
- Kang J-Y, Choi H-I, Im M-Y y Young Kim S. (2002). *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell.* 14, 343-357.

- Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G-H., Hu C.S.A.A. y Verma D.P.S. (1995). Overexpression of Δ - pyrroline 5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108, 1387-1394.
- Kazuoka T. y Oeda K. (1994). Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold-acclimated spinach. *Plant Cell Physiol.* 35, 601-611.
- Kermode A.R. y Bewley J.D. (1987). Regulatory processes involved in switch from seed development to germination: Possible roles for desiccation and ABA. In *Drought Resistance in Plants, Physiological and Genetic Aspects.* Monti L. y Porceddu E. Eds. (Brussels:EEC) 59-76.
- Khlebnikov A., Ris O., Skaug T., Carrier T.A. y Kesling J.D. (2000). Regulatable arabinose-inducible gene expression system with consistent control in *Il* cells of culture. *J.Bacteriol.* 184 (24), 7029-7034.
- Kyte J. y Doolittle R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J.Mol.Biol.* 157, 105-132.
- Knight H. (2000). Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* 195, 269-325.
- Knight H. y Knight M.R. (2001). Abiotic stress signalling pathway: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6, 262-267.
- Kratsch H.A. y Wise R.R. (2000). The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Env.* 23, 337-350.
- Kuhn C., Franceschi V.R., Schulz A., Lemoine R y Frommer W.B. (1997). Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science.* 275, 1298-1300.
- Lee B.N. y Elion E.A. (1999). The MAPKKK *Ste1* regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 9, 12679-12684.
- Leung J. y Giraudat J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49,199-222.
- Levitt J (1980) *Response of Plants to Enviromental Stresses*, Vol 1, Ed.2 Academic Press, New York.
- Lisse T., Bartels D., Kalbitzer H.R. y Jaenicke R. (1996). The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state. *Biol Chem.* 377, 555-561.
- Lucas W.J. y Gilbertson R.L. (1994). Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Annu. Rev. Phytopath.* 32, 387-411.

- Mbeguie-A-Mbeguie D., Gomez R.M. y Fils-Lycaon B. (1997). Molecular cloning and nucleotide sequence of an abscisic acid-stress-ripening induced ASR-like protein from apricot fruit (accession No. U93164). Gene expression during fruit ripening (PGR 97-166). *Plant Physiol.* 115, 1288.
- Mc.Carty D.R. (1995). Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* 46, 71-93.
- Mc.Cubbin W.D., Kay C.M. y Lane B.G. (1985). Hydrodynamic and optical properties of the wheat germ *Em* protein. *Can J Biochem Cell Biol.* 63, 803-811.
- Meijer A.H., Scarpella E., van Dijk E., Qin L., Taal A.J.C., Rueb S., Harrington S.E., McCouch S.R., Schilperoort R.A. y Hoge J.H.C. (1997). Transcriptional repression by *OsHox1*, a novel homeodomain leucine zipper protein from rice. *Plant J.* 11, 263-276.
- Moreno, J. (2002). Tesis de Licenciatura. FCE y N-UBA.
- Nylander M., Svensson J., Tapio Palva E. y Welin B.V. (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 45, 263-279.
- Orozco-Cárdenas M., Narváez-Vásquez J. y Ryan C. (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin and methyl jasmonate. *The Plant Cell.* 13, 179-191.
- Padmanabhan, D.M. Dias, R.J. Newton. (1997). Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda L.*) induced by water deficit stress. *Plant Mol. Biol.* 35, 801-807.
- Pearce G., Strydom D., Johnson S. y Ryan C.A. (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science.* 253, 895-898.
- Quatrano R.S. (1987) In *Plant Hormones and their role in Plant Growth and Development*. Davies P.J. ed (Dordrecht, The Netherlands:Kluwer Academic Publishers) 494-514.
- Reymond, P. y Farmer, E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 404-411.
- Reymond, P.; Weber, H., Damond, M. y Farmer, E. (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 12, 707-719.
- Riccardi F., Gazeau P., de Vienne D. y Zivy M. (1998). Protein changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiol.* 117, 1253-1263.

- Rock C. (2000). Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* 148, 357-396.
- Rossi M.M. y Iusem N.D. (1994). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) genomic clone homologous to a gene encoding an abscisic acid-induced protein. *Plant Physiol.* 104, 1073-1074.
- Rossi M.M. y Iusem N.D. (1995). DNA Sequence, the Journal of Sequencing and Mapping. 5, 225-227.
- Rossi M.M., Lijavetzky D., Bernacchi D., Hopp H.E. y Iusem N.D. (1996). *Asr* genes belong to a tomato gene family of at least three closely linked loci located to chromosome 4. *Mol. Gen. Genet.* 252, 489-492.
- Rossi, M.; Carrari, F.; Cabrera-Ponce, J.; Vazquez-Robere, C.; Herrera-Estrella, L; Gudesblat, G; Iusem, N. (1998). Analysis of an abscisic acid (ABA)-responsive gene promoter belonging to *Asr* gene family from tomato in homologous and heterologous systems. *Mol. Gen. Genet.* 258, 1-8.
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B. y Lucas W.J. (1999). Phloem long-distance transport of *CmNACP* mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development.* 126, 4405-4419.
- Sabehat A., Lurie S. y Weiss D. (1998). Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. *Plant Physiol.* 117, 651-658.
- Sambrook K.J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning-Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuka Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration-and-cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290, 998-1009.
- Sanders D., Brownie C. y Harper J.F. (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* 11, 691-706.
- Sasaki T., Chino M., Hayashi H. y Fujiwaa T. (1998). Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol.* 39, 895-897.
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville T. y Manners J.M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 11655-11660.
- Schneider A., Salamini F. y Gebhardt C. (1997). Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene *ci21A* of potato. *Plant Physiol.* 113, 335-345.
- Schuch W., Hobson G., Kanczler J., Tucker G., Robertson D., Grierson D., Bright S. y Bird C. (1991). Improvement of tomato fruit quality through genetic engineering. *HortScience.* 26, 1517-1520.

- Schwartz S.H., Tan B.C., Mc.Carty D.R., Welch W. y Zeevaart J.A.D. (2003). Substrate specificity and kinetics for VP14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthetic pathway. *BBA. General Subjects*. 1619 (1), 9-14.
- Schweizer P., Buchala A., Dudler R. y Métraux JP. (1998). Induced systemic resistance in wounded rice plants. *Plant J.* 14 (4), 475-481.
- Seki M., Narusaka M, Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinosaki K., Carnici P., Hayashizaki Y. y Shinozaki K. (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*. 13, 61-72.
- Seki M., Kamei A., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr.Op. Biotech.* 14, 194-199.
- Serrano R., Marquez J.A. y Rios G. (1997). Crucial factors in salt stress tolerance. In: Hohmann S., Mager W. (eds.). *Yeast Stress Responses*, pp. 147-169. RG Landes, Austin TX.
- Sessa G., Morelli G. y Ruberti I. (1993). The *Athb-1* and HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO J.* 12, 3507-3517.
- Shen Q. y Ho T.H. (1995). Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell*. 7(3), 295-307.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Curr.Op. Biotech.* 7, 161-167.
- Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (1999). Molecular responses to drought stress. In *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. Ed. by Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. , Austin T.X.: RG Landes. 11-28.
- Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences crosstalk between two stress signal pathway. *Curr.Opin. Plant Biol.* 3, 217-223.
- Silhavy, G. Hutvagner, E. Barta, Z. Banfalvi. (1995). Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol. Biol.* 27, 587-595.
- Smith F.D., Harpending P.R. y Sanford J. (1992). Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *J. Gen. Microbiol.* 138, 239-248.
- Soderman E., Hjellstrom M., Fahleson J. y Engstrom P. (1999) The HD-Zip gene *ATHB6* in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol. Biol.* 40, 1073-1083.

- Stushnoff C., Fowler D.B. y Brule-Babel A. (1984). Breeding and selection for resistance to low temperature, pp. 115-136. In P.B. Vose (ed.). *Plant Breeding-A contemporary basis*. Pergamon Press, Oxford.
- Sugiharto B., Ermawati N., Mori H., Aoki K., Yonekura-Sakakibara K., Yamaya T., Sugiyama T y Sakakibara H. (2002). Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. *Plant Cell Physiol.* 43 (3), 350-354.
- Sutton F., Paul S.S., Wang X.Q. y Assmann S.M. (2000). Distinct abscisic acid signaling pathways for modulation of guard cell versus mesophyll cell potassium channels revealed by expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Physiol.* 124, 223-230.
- Suzuki I., Los D.A., Kanesaki Y., Mikami K. y Murata N. (2000). The pathway for perception and transcription of low temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO J.* 19, 1327-1334.
- Swire-Clark G. y Marcotte W. (1999). The wheat LEA protein *Em* functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.* 39, 117-128.
- Taiz y Zeiger. (1998). *Plant Physiology*. Ed Sinauer Assoc. Cap. 25, Stress Physiology, pp 725-757.
- Tal M. Y Imber D. (1970). Abnormal stomatal behaviour and hormonal imbalance in flacca wilt mutant of tomato. LI. Auxin and abscisic acid-like activity. *Plant Physiol.* 46, 372-373.
- Tanksley S.D., Ganai M.W., Prince J.P., de Vicente M.C. Bonierbale M.W., Broun P., Fulton T.M., Giovannoni J.J., Grandillo S., Martin G.B., Messeguer R., Miller J.C., Paterson A.H., Pineda O., Roder M.S., Wing R.A., Wu W. y Young N.D. (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics.* 132, 1141-1160.
- Thomas J.J., Bakhtiar R. y Sivzdak G. (2000). Mass spectrometry in viral proteomics. *Acc. Chem. Res.* 33, 179-187.
- Tomashow M.F. (1994). *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In E. Meyerowitz, C. Somerville, eds, *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 807-834.
- Tomashow M.F. (1999). Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 571-599.
- Trewavas, A y Malhó, R. (1997). Signal perception and transduction: the origin of phenotype. *Plant Cell.* 9, 1181-1195.
- Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic

acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. PNAS. 97(21), 11632-11637.

- Vaidyanathan, R., Kuruvilla, S., Thomas G. (1999). Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. Plant Sci.140, 21-30.

- van Zee K., Chen F.Q., Hayes P., Close T. y Chen T. (1995) Cold-specific induction of a dehydrin gene family member in barley. Plant Physiol. 108, 1233-1239.

- Vaucheret H., Baclin C., Elmayer T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.B., Mourrain P., Palauqui J.C. y Vernhettes S. (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. Plant J. 16, 651-659.

- Vergeres G., Manenti S., Weber T. y Sturzinger C. (1996). The myristoyl moiety of myristoylated alanine-rich C kinase (MARCKS) and MARCKS-related protein is embedded in the membrane. J.Mol.Biol 270, 19879-19887.

- Wang C-S., Liao Y-E., Huang J-C., Wu t-D., Su C-C. y Ho Lin C. (1998). Characterization of desiccation-related protein in lily pollen during development and stress. Plant Cell Physiol. 39 (12), 1307-1314.

- Wang W., Pelah D., Alergand T., Shoseyov O. y Altman A. (2002). Characterization of SP1, a stress-responsive, boiling-soluble, homo-oligomeric protein from Aspen. Plant Physiol. 130, 865-875.

- Waters E.R., Lee G.J. y Vierling E. (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. J. Exp. Bot. 47, 325-338.

- Xiong L. y Zhu J.K. (2001). Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetics perspectives. Physiol. Plant. 112, 152-166.

- Xiong L. y Zhu J.K. (2002). Molecular and genetics aspects of plant responses to osmotic stress. Plant Cell Environ. 25, 131-139.

- Xiong L., Schumaker K. y Zhu J-K. (2002) Cell signaling during cold, drought and salt stress. The Plant Cell, Supplement .165-183.

- Xoconoslte-Cazares B., Xiang Y., Ruiz-Medrano R., Wang H.L., Monzer J., Yoo B.C., Ms.Farland K.C., Franceschi V.R. y Lucas W.J.(1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. Science. 283, 94-98.

- Zeevaart J.A.D. (1999) Abscisic acid metabolism and its regulation, in Biochemistry and Molecular Biology of Plants Hormones (Hooykaas P.J.J., Hall M.A.K. y Libbenga R., eds), pp.189-207, Elsevier.

- Zhang L., Ohta A., Takagi M. y Imai R. (2000). Expression of plant group 2 and group 3 *lea* genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. J. Biochem.127, 611-616.

-Zhang D-P, Wu Z-Y, Li X-Y y Zhao Z-X. (2002). Purification and identification of a 42-kilodalton abscisic acid-specific-binding protein from epidermis of broad bean leaves. *Plant Physiol.* 128, 714-725.

- Zheng J., Knighton D.R., Xuong N.H., Taylor S.S., Sowadski H.M. y Ten Eyck L.F. (1993). Crystal structures of the myristoylated catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci.* 2, 1559-1573.

- Zhu JK., Salt and drought stress signal transduction in plants (2002) *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247-273.