

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



* 5 3 0 9 6 0 7 2 8 3 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA EN *Saccharum officinarum* Y SU RELACIÓN CON EL ÁCIDO
ABSCÍSICO Y LA SEQUÍA**

Vº Bº Las Directoras

El Doctorando

Ana Maria Vázquez López Lomo

Rosario Linacero de la Fuente

Marisa Gisela Lopez Bilbao

TESIS DOCTORAL

MARISA G. LOPEZ BILBAO

1996



*A Pablo,
por estar siempre
a mi lado*

Quisiera agradecer a todos los miembros del Departamento de Genética, ya que de alguna u otra forma me ayudaron a lo largo de todos estos años.

En especial a mis directoras por su sabiduría y su paciencia infinita.

Al equipo de diseño y montaje que formaron Ana, Charo, Julia y Javier, sin los cuales esta tesis jamás se hubiera terminado de escribir a tiempo.

A mis amigos por brindarme lo mejor, su amistad.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.-CULTIVO IN VITRO, 2	
1.1.-Medio de cultivo, 3	
1.2.-Tipo de explante, 4	
1.3.-Condiciones ambientales, 5	
1.4.-Genotipo, 6	
1.5.-Mantenimiento de los cultivos, 7	
2.-EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA, 7	
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
MATERIAL, 18	
MÉTODOS, 18	
1.-CULTIVO IN VIVO, 18	
2.-CULTIVO IN VITRO, 18	
2.1.-Medios de cultivo, 18	
2.2.-Formación y propagación de callos, 19	
2.3.-Regeneración, 20	
3.-TRATAMIENTOS, 20	
4.-EXTRACCIÓN DE ARN, 22	
5.-TRADUCCIÓN IN VITRO, 23	
6.-ELECTROFORESIS BIDIMENSIONALES DE PROTEÍNAS, 23	
6.1.-Primera dimension, 24	
6.2.-Segunda dimension, 24	
6.3.-Evaluación de la electroforesis, 25	
6.4.-Exposición, 25	
6.5.-Lectura, 26	
7.-EXTRACCIÓN DE ADN, 26	
8.-ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS, 27	
8.1.-Electroforésis de ADN, 27	
8.2.-Electroforésis de ARN, 27	

9.-TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS A MEMBRANAS, 28	
9.1.-De ADN (tipo Southern), 28	
9.2.-De ARN (tipo Northern), 28	
10.-HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS, 29	
10.1.-Marcaje radioactivo de sondas, 29	
10.2.-Hibridación tipo Southern, 29	
10.3.-Hibridación tipo Northern, 29	
11.-AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS, 30	
12.-PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE UN GEL DE AGAROSA, 31	
13.-LIGAMIENTO, 31	
14.-TRANSFORMACIÓN, 31	
15.-AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO, 31	
16.-SECUENCIACIÓN, 32	
17.-ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS, 32	
17.1.-Búsqueda de homologías, 32	
17.2.-Alineamientos, 32	
18.-ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES, 32	
RESULTADOS.....	34
1.- FORMACIÓN DE CALLOS, 35	
2.-REGENERACIÓN IN VIVO, 37	
3.-REGENERACIÓN IN VITRO, 38	
4.-GERMINACIÓN DE EMBRIONES, 41	
5.-TRANSPLANTE A CONDICIONES IN VIVO, 44	
6.-ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EN ELECTROFORÉISIS BIDIMENSIONALES EN GELES DE POLIACRILAMIDA, 44	
6.1.-Análisis de los patrones de proteínas totales, 45	
6.2.-Análisis de los patrones de proteínas traducidas in vitro, 46	
6.2.1.-Embriogenesis somática, 47	
6.2.2.-Estrés hídrico, 50	
6.2.3.-Presencia de ABA, 54	
6.2.4.-Comparación entre los patrones de los tratamientos de sequía y las situaciones de embriogenesis somática, 57	
6.2.5.-Comparación de la respuesta frente al tratamiento de ABA y la	

embriogénesis somática, 61	
6.2.6.-Comparación de los patrones protéicos obtenidos de los tratamientos de sequía y de ABA, 64	
6.2.7.-Comparación conjunto de las tres situaciones, 67	
7.-ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES, 71	
8.-ESTUDIO DE UN GEN TIPO Em, 73	
8.1.-Análisis de la secuencia del clon CM1, 73	
8.2.-Análisis de la expresión del clon CM1, 75	
8.3.-Número de copias en el genoma, 82	
DISCUSION.....	83
1.-CULTIVO IN VITRO, 84	
2.-ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE PROTEÍNAS TRADUCIDAS IN VITRO, 94	
2.1.-Embriogénesis somática, 97	
2.2.-Estrés hídrico, 100	
2.3.-Tratamientos con ABA, 104	
2.3.1.-Embriogénesis y ABA, 105	
2.3.2.-Estrés hídrico y ABA, 107	
2.4.-Análisis conjunto de las situaciones estudiadas, 109	
3.-ANÁLISIS DEL CLON CM1, 112	
RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	120

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- CULTIVO IN VITRO

Según la teoría celular de Schawnn cada célula de un organismo multicelular es una unidad con capacidad para desarrollarse. El cigoto de un organismo pluricelular es totipotente y a partir de él se pueden diferenciar todos los tipos de células y tejidos que componen un individuo adulto. Esta capacidad se pierde en las células animales, sin embargo las plantas conservan su totipotencia en las células diferenciadas. Este hecho se refleja en la naturaleza cuando en una zona dañada de una planta se regenera un órgano completo o embriones adventicios, así como por la existencia de plantas que se reproducen por esquejes donde un fragmento de la planta puede formar una planta entera.

Esta respuesta mostrada in vivo por las plantas puede ser manipulada in vitro cultivando células somáticas o germinales en condiciones fisico-químicas definidas. Esta situación se conoce como cultivo de tejidos y comprende el cultivo de todas las partes de una planta, desde células individuales hasta órganos y tejidos.

Estas células o tejidos cultivados in vitro pueden dar dos tipos de respuesta: una dediferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células denominada callo o una respuesta morfogenética por la cual o se forman órganos (organogénesis) o embriones (embriogénesis somática).

El cultivo in vitro se desarrolló por los años 50 principalmente en dicotiledóneas y en especial en las especies consideradas modelo como zanahoria y tabaco. Las gramíneas por el contrario fueron consideradas durante mucho tiempo como "recalcitrantes", término con el que se denominaron a todas aquellas especies que presentaban dificultades para establecer un cultivo o bien que eran incapaces de mostrar una respuesta morfogenética.

Las primeras publicaciones en gramíneas, en los años 50, describían el establecimiento de cultivos en maíz y *Lolium* aunque incapaces de mostrar respuesta morfogénica y formar plántulas. Las primeras plantas regeneradas in vitro fueron de arroz (Nishi et al. 1968) y caña de azúcar (Heinz y Mee, 1969). A pesar de estos resultados solo se pudieron regenerar plantas a partir del cultivo de tejidos en forma rutinaria a principios de los años 80. Esto fue posible principalmente por la manipulación de diversos factores que influyen en la respuesta in vitro tanto de dicotiledóneas como de monocotiledóneas.

Estos factores, refiriéndonos esencialmente a las monocotiledóneas, corresponden a los siguientes puntos:

- * el estado fisiológico y de desarrollo de los explantes utilizados.
- * el uso de medios nutritivos que contenían concentraciones relativamente altas de auxinas (2,4 D)
- * selección y mantenimiento de los sectores altamente regenerables del callo
- * genotipo del explante

El conocimiento de estos factores permitió el cultivo in vitro especies consideradas como las gramíneas, a las que nos referiremos a continuación. En el caso de las dicotiledóneas permitió mejorar la respuesta al cultivo.

1.1.- Medio de cultivo

Los requerimientos nutricionales de las gramíneas para su cultivo in vitro suelen ser bastantes simples. El medio más utilizado en la mayoría de los casos es el medio de Murashige-Skoog (MS) (1962). Para inducir la proliferación celular generalmente es suficiente agregar la auxina sintética 2,4-D al medio de cultivo. La presencia de esta hormona es imprescindible para la formación de cultivos morfogénicos y para inducir la embriogénesis somática. También se puede adicionar al medio diferentes hormonas o

sustancias para inducir una mejor regeneración o crecimiento del callo como citoquininas, ácido abscísico o prolina.

1.2.-Tipo de explante

Si como explante se utiliza tejido maduro y diferenciado no se obtendrán cultivos morfogénicos aunque se encuentre en el medio de cultivo adecuado. Por el contrario el tipo de tejido que se debe utilizar para iniciar un cultivo debe estar formado por células meristemáticas y sin diferenciar.

Green y Phillips (1975) demostraron que los callos obtenidos a partir de embriones inmaduros de maíz eran capaces de regenerar plantas durante largos periodos de tiempo. Desde entonces este tipo de explante ha sido ampliamente utilizado para iniciar cultivos morfogénicos (revisión Vasil y Vasil, 1995). Los otros explantes inmaduros utilizados corresponden a inflorescencias (Brettell et al., 1980) y a hojas inmaduras (Wernicke y Brettell, 1980).

En los tres casos el estado de desarrollo del explante es un factor crítico en la obtención de cultivos morfogénicamente competentes.

Como indicador del estado de desarrollo del explante en el caso de los embriones inmaduros se tiene en cuenta tanto los días post-antesis como el tamaño del embrión mientras que en el caso de la inflorescencia inmadura se han utilizado explantes de diversas longitudes (revisión Vasil y Vasil 1995).

Cuando se utilizan fragmentos de hoja como explante, solo los fragmentos correspondientes a las zonas basales muestran capacidad morfogénica mientras que los fragmentos más alejados son incapaces de responder al cultivo. En cultivos de hoja de *Sorghum bicolor* (Wernicke y Brettell, 1980) se ha demostrado la existencia de este gradiente ya que las células que se encuentran en una estado casi meristemático "in vivo" son las únicas capaces de proliferar "in vitro", por lo que los explantes se deben escoger de las regiones que espacial y temporalmente sean las más parecidas al meristemo basal.

Este gradiente de respuesta que muestran las hojas al ser utilizadas como explante se ha descrito en numerosas especies, *Secale cereale* (Linacero y Vazquez, 1986), *Panicum maximum* (Lu y Vasil, 1981), *Saccharum officinarum* (Ho y Vasil, 1983), *Zea mays* (Wenzler y Meins, 1986). Este hecho se ha relacionado con la posible existencia de gradientes internos de algunas hormonas.

En *Pennisetum purpureum* (Rajasekaran et al., 1987 a) se observa una disminución de la concentración tanto de ABA como de IAA a medida que la muestra se toma más alejada de la base de las hojas. Por otro lado si se modifican las concentraciones hormonales endógenas por el uso de inhibidores, los explantes tomados después del tratamiento pierden su capacidad regenerativa (Rajasekaran et al., 1987 b)

1.3.-Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales en las que se encuentra la planta donadora durante la formación y desarrollo de los distintos explantes, son de gran importancia en la respuesta que estos darán en el cultivo.

Las condiciones del cultivo, invernadero o campo, la temperatura, humedad o frecuencia de riego, son factores que afectan al desarrollo de la planta y como consecuencia al estado fisiológico del explante. Lürhs y Lörz (1987) observan que la respuesta del embrión inmaduro de cebada en dos años sucesivos es muy variable y atribuyen estas diferencias a las variaciones observadas en el clima en los dos años que se realizaron los experimentos. En embriones inmaduros de maíz se logró incrementar la respuesta al cultivo in vitro, modificando las condiciones ambientales en las que se desarrollaba la planta donadora (Lu y Vasil, 1983; Tomes y Smith, 1985).

No cabe duda que el ambiente en que se desarrolla una planta, con un genotipo dado, determina el estado fisiológico de ésta y por lo tanto del explante para iniciar el cultivo de tejidos.

1.4.-Genotipo

En los primeros trabajos realizados en cultivo in vitro de gramíneas, se observaba que la respuesta obtenida a partir de individuos de distintas especies o distintas variedades o cultivares de una misma especie era diferente lo que indica que el genotipo de la planta donadora influye en la respuesta al cultivo. Estas diferencias genotípicas para formar cultivos morfogenéticos se comprobó en maíz (Duncan et al., 1985), cebada (Lürhs y Lörz, 1987) y centeno (Linacero y Vazquez, 1986, 1990) entre otros. Sin embargo algunos autores mantienen que los factores fisiológicos y ambientales son los que determinan y modifican la respuesta al cultivo de forma prioritaria (Vasil, 1987).

Con la finalidad de caracterizar este control genético se realizaron numerosos trabajos. La primera evidencia sobre el control genético de la regeneración se obtuvo en alfalfa (Bingham et al., 1975) y en esta misma especie se llegó a postular un modelo para la producción de embriones en el que estarían implicados dos genes dominantes complementarios con efecto aditivo (Hernandez Fernandez y Christie, 1989).

En maíz Beckert y Qing (1984) realizaron cruzamientos dialélicos entre líneas puras y observaron que la respuesta al cultivo in vitro es altamente heredable. Entre Se observa un alto nivel de variación genética entre líneas, que se debe a factores de tipo aditivo (Tomes y Smith, 1985).

En trigo se analizaron distintas líneas aloplásmicas y se observó que la frecuencia de regeneración dependía del citoplasma (Mathias et al., 1986) y que la respuesta se podía incrementar por sustitución con el cromosoma 4B (Mathias y Fukui, 1986) de Chinese Spring por el 4B de Cappelle Desprez. Habría un gen mayor de respuesta al cultivo en el brazo 2DL y genes menores en los brazos 2AL y 2BS (Kaleikau et al., 1989) así como otro gen mayor regulador que estaría en el brazo 2BL. En la formación de embriones somáticos actuarían numerosos genes recesivos (De Buyser et al., 1992) a diferencia de lo que ocurre en alfalfa y maíz donde parece ser que son dominantes (Reisch y Bingham, 1980; Hodges et al., 1986).

Todos estos resultados sugieren que la respuesta al cultivo *in vitro* puede ser seleccionada y transferida, mediante técnicas de mejora clásica, a genotipos recalcitrantes de interés.

1.5.-Mantenimiento de los cultivos

Aquellos callos que muestran capacidad regenerativa a través de embriogénesis somática son denominados callos embriogénicos.

Los callos embriogénicos presentan varias características bien definidas (Vasil y Vasil, 1995) ya que son compactos, altamente organizados, de crecimiento lento y de color blanco. Están formados por células isodiamétricas pequeñas con paredes muy delgadas y citoplasma denso y rico. Se han descrito otros tipos de callos embriogénicos que aparecen de manera muy minoritaria y no tienen exactamente la morfología mencionada, pero son los callos que se deben utilizar en especies como maíz o trigo para poder mantener un cultivo embriogénico por tiempo prolongado (Vasil y Vasil, 1995).

Para mantener la capacidad embriogénica de estos callos deben realizarse trasplantes con una frecuencia menor de 30 días, ya que si no los callos comienzan una etapa de pérdida de capacidad regenerativa hasta llegar a la senescencia (Chandler y Vasil, 1984). Se cree que el factor determinante de esta situación es el 2,4-D que debe estar en concentraciones elevadas para mantener en el callo su capacidad regenerativa (Karlson y Vasil, 1986).

La selección de callos y las condiciones de trasplante se deben elegir en cada material utilizado, ya que varían de una especie a otra.

2.-EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La formación de embriones somáticos se describió por primera vez en el año 1980 (Dale, 1980; Vasil y Vasil, 1980; Wernicke y Brettell, 1980) y desde entonces la embriogénesis

somática se ha descrito en prácticamente todas las gramíneas. Los embriones somáticos se originan directamente de una sola célula o indirectamente a partir de masas proembrionicas, que a su vez se originaron de una única célula (Vasil y Vasil 1995). Esta formación a partir de una célula comienza con divisiones internas de segmentación, engrosamiento de paredes celulares y una ruptura temprana de todas las conexiones plasmodémicas que indican un aislamiento con el tejido que rodea a dicha célula (Franz y Schell, 1991).

En general no se siguen los patrones de división celular específicos de los embriones cigóticos aunque en muy poco tiempo aparecen embriones globulares que presentan todas las características de los embriones cigóticos. En monocotiledóneas, la formación de una hendidura lateral en la región apical del embriónide globular indica el inicio de un estadio escutelar (Brisibe et al., 1993). El escutelo comienza a hacerse evidente por un crecimiento lateral por encima de la hendidura. El embrión continúa su desarrollo por estadios cotiledonares donde se desarrolla el coleoptilo y se diferencian los meristemas apicales y radicales (Vasil y Vasil 1995). Algunos embriones desarrollan una estructura similar a un suspensor que lo mantienen unido al callo. La única diferencia morfológica descrita durante el cultivo de embriones somáticos es que presentan mayor tamaño que los embriones cigóticos en *Dactylis glomerata* (Conger et al., 1983). En el caso de las dicotiledóneas, las fases de la embriogénesis cigótica, globular, corazón, torpedo y dicotiledonar están igualmente reflejadas en los embriones somáticos.

El grado de similitud entre los embriones somáticos y cigóticos es asombroso, especialmente si se tiene en cuenta que los embriones somáticos se desarrollan fuera de un tejido materno. El hecho de que se puedan desarrollar embriones normales a partir de células somáticas demuestra que el programa genético de la embriogénesis está dentro de cada célula y puede funcionar en ausencia de productos génicos maternos. Es posible que la composición hormonal del medio de cultivo de los callos imite de alguna forma las señales para iniciar la embriogénesis.

Las hormonas que parecen implicadas directamente en la inducción de la embriogénesis somática son las auxinas, y su disminución o desaparición del medio de cultivo sería la señal para disparar el desarrollo del embrión somático. El tiempo de exposición a esta hormona, que necesitan los explantes es muy variable, desde unas pocas horas en microcallos de alfalfa (Dudits et al., 1993) hasta 7 días para suspensiones de zanahoria (Nomura y Komamine, 1985) eliminándose después la hormona del medio de cultivo para continuar el programa embriogénico. En presencia de auxina las líneas celulares de zanahoria solo pueden desarrollarse hasta el estadio globular pero no pueden continuar su desarrollo (Borkird et al., 1986).

A partir de ese momento los embriones sintetizarían su propia auxina (Michalczuk et al., 1992) que debe tener el transporte polar adecuado para que la embriogénesis sea normal (Liu et al., 1993). En los embriones somáticos la inhibición del transporte polar de auxina provoca en *Brassica juncea* la inducción de la embriogénesis pero produce un cotiledón fusionado cilíndrico.

Sin embargo la diferencia más llamativa entre los embriones cigóticos y somáticos, es que los primeros pasan por una etapa de dormancia después de haber perdido el 95% de su contenido en agua y detener la síntesis de ARN y proteínas (Golberg et al., 1989). En la naturaleza también hay casos donde el embrión después de la maduración no entra en dormancia sino que germina precozmente como el caso de los mutantes vivíparos de *Arabidopsis* y maíz (Ooms et al., 1993; Mc Carty et al., 1991). Incluso los embriones de un gran número de plantas, si se aíslan del resto de la semilla y se cultivan in vitro pueden germinar sin pasar por un período de deshidratación y latencia.

Todas estas evidencias demuestran que los embriones pueden pasar directamente del programa de embriogénesis al de germinación sin entrar en dormancia.

Esta situación pone de manifiesto que el tejido que rodea al embrión cigótico debe enviar una señal que impide la germinación precoz. Este papel lo cumpliría el ácido abscísico (ABA), siendo numerosas las evidencias a favor de esta regulación hormonal (Rock y Quatrano, 1995):

* Existe una correlación entre bajos niveles de ABA y la germinación precoz de embriones cultivados *in vitro*.

* La aplicación de ABA exógeno evita la germinación y favorece el crecimiento de embriones inmaduros.

* La sensibilidad al ABA exógeno es máxima cuando la concentración endógena de ésta hormona es la más alta.

* Las plantas mutantes deficientes en ABA, que tienen niveles muy bajos de esta hormona, presentan embriones que germinan estando aún en el fruto.

De esta forma la acumulación de ABA que se observa en la semillas cuando el embrión está entrando en la etapa de maduración sería la responsable de que el embrión cigótico entrara en dormancia.

Sin embargo, aunque el embrión somático no entra en dormancia, sí acumula ABA y responde a los cambios que se puedan producir en su concentración. En suspensiones de zanahoria al agregar fluridona, un inhibidor del ABA, se detiene el crecimiento de los embriones y éstos no progresan más allá del estadio globular (Hatzopoulus, 1990). En los callos embriogénicos de caña de azúcar la concentración de ABA corresponde a 87.1 pmol/g de tejido seco mientras que en los callos no embriogénicos es de 0.5 pmol/g de tejido seco (Guideroni et al., 1995).

Al mismo tiempo que se incrementa el nivel endógeno de ABA, se observa la acumulación de ARN mensajeros en el embrión, durante las etapas media y tardía de su desarrollo. A las secuencias que codifican estos ARNm se las denominan Lea, por late embryo abundant.

Los embriones aislados en etapas muy tempranas de su desarrollo no sintetizan ni acumulan estos ARNm. Pero si estos embriones se tratan con ABA exógeno se produce una acumulación precoz de los ARNm Lea y otros ARNm.

Las proteínas LEA presentan una gran homología, son solubles y básicas, son ricas en glicina y lisina y presentan pocos residuos hidrofóbicos. Estas características hacen que

sean una proteínas muy hidrofílicas y estables (Dure III et al., 1989). Por todo esto se propone que posiblemente sean proteínas con función de protección frente a la pérdida de agua tan drástica que tiene lugar durante la última etapa de desarrollo de los embriones cigóticos. Sin embargo, estas proteínas también se expresan en los embriones somáticos, como se describe en la revisión de Zimmerman (1993) como ejemplo se puede escoger el gen EMB-1 (Wurtele et al., 1993) que por experimentos de hibridación *in situ* muestra el mismo patrón de expresión en embriones somáticos y cigóticos. La lista de genes Lea que se expresan en los dos tipos de embriones es muy extensa, como los genes ECP31 y ECP40 de zanahoria (Kiyosue et al., 1992, 1993). Esta serie de resultados además, otorgan validez al uso de embriones somáticos como modelo para estudiar la embriogénesis, a pesar de las diferencias en su comportamiento, que ya hemos mencionado.

Aunque los genes Lea han sido clasificados en al menos 6 grupos (Dure III, 1993) por su homología en la secuencia de aminoácidos, se pueden diferenciar en dos grandes grupos: aquellos que solo se expresan en embriones y los que se pueden inducir por tratamientos con ABA tanto en tejido embriogénico como vegetativo.

En los primeros podemos citar a los genes ECP31 y ECP40 que solo se expresan en los embriones de zanahoria (Kiyosue et al., 1992 y 1993) así como las secuencias descritas en maíz por Williams y Tsang (1991 y 1992) y que denominan Emb 564 y Emb5.

Entre los genes Lea que se expresan en tejido vegetativo están, entre otros, la secuencia Em de trigo (Berge et al., 1989), y el gen rab 28 de maíz (Pla et al., 1993). Estas secuencias, independientemente del tejido donde se expresen, pueden ser inducidas por ABA exógeno como ya mencionamos anteriormente.

Aunque los genes Lea potencialmente estén regulados por ABA los distintos patrones de expresión que se observan indican que esta hormona debe formar parte de un complejo mecanismo de regulación.

En las semillas maduras se encuentran niveles altos de algunos ARNm Lea, situación que contrasta notoriamente con los transcritos para proteínas de reserva que se acumulan en

niveles muy altos al mismo tiempo que los transcriptos Lea, pero llegan a niveles muy bajos o indetectables en la semilla madura (Galau et al., 1987). Algunas proteínas de reserva se inducen por ABA como la cruciferina y la napina en *Brassica napus* (Crouch y Sussex, 1981 y De Lisle y Crouch, 1989) y la subunidad β de la β conglicina de soja (Bray y Beachy, 1985). Sin embargo las proteínas de reserva de otras especies no aparecen reguladas por ABA. Esto demuestra la existencia de diferencias entre especies y que diferentes grupos de genes expresados al mismo tiempo en el desarrollo de las semillas están regulados por mecanismos diferentes.

Por otra parte el ABA ha sido siempre considerado una hormona de estrés, cuyos niveles endógenos se elevan como consecuencia de un déficit de agua en las células provocado por distintas situaciones como deshidratación, congelación o aumento de la concentración salina del medio (Chandler y Robertson, 1994 y Voesenek y Van der Veen, 1994). La falta de agua induce una respuesta compleja que se inicia con la percepción de la señal y se manifiesta en cambios a nivel celular y fisiológico.

Estas respuestas también van a depender de la duración y la severidad del estrés, así como del estado de desarrollo de la planta y del tipo de estrés hídrico. Las proteínas que se expresan en las situaciones de estrés se pueden dividir en dos grandes grupos, las que se inducen por ABA y las que no lo hacen (Quarrie, 1990).

Entre las proteínas que se inducen como consecuencia de una situación de estrés y que no se inducen por ABA, llamados por Bray (1993) genes que no responden al ABA, se encuentran aquellos donde la aplicación de ABA exógeno no varía su patrón de expresión como se describe en judía (Guerrero et al., 1990) y en *Arabidopsis* (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992).

Entre las proteínas que se inducen por ABA, los diferentes estreses conectan en la misma cascada de transducción pues el ABA está involucrado en la inducción de numerosas proteínas como consecuencia de la pérdida de agua que estos estreses provocan (Bray 1993). De esta forma algunos genes expresados durante una situación de estrés hídrico

también se expresan durante las fases de maduración debido a los procesos de desecación de la semilla.

Es en este punto donde converge la expresión génica como consecuencia tanto de un estrés hídrico como del desarrollo del embrión, siendo los genes *Lea* los puntos de convergencia o unión, dando fuerza a la hipótesis de que estos genes están involucrados en mecanismos generales de tolerancia a la sequía. Entre estos genes se encuentran los genes *Em* de trigo (Berge et al., 1989) y *Arabidopsis* (Finkelstein, 1993), el gen *rab 28* de maíz (Pla et al., 1991), las dehidrinas de cebada y maíz (Close et al., 1989) entre otros y en todos ellos su expresión está mediada por ABA.

Cuando en la región promotora del gen de EM de trigo (Marcotte et al., 1988) se encontró una caja denominada ABRE (por ABA Responsive) se pensó que todos los genes regulados por ABA tendrían una caja ABRE en su promotor. Sin embargo existen genes regulados por ABA que carecen de una caja ABRE, como el gen *le16* de tomate (Plant et al. 1991) que solo se expresa en tejido vegetativo aéreo frente a situaciones de estrés hídrico o salino o por adición de ABA exógeno. En la planta de la resurrección *Caterostigma plantagineum* tampoco se encuentra caja ABRE en aquellos genes que responden al ABA (Michel et al., 1993).

Además, como ya se ha mencionado, los genes pueden estar regulados por ABA pero presentar un patrón espacial y temporal de expresión completamente distinto unos de otros. Esta situación sugiere que el ABA actúa a través de múltiples mecanismos o que actúan numerosos componentes todavía no identificados además del ABA. En un trabajo donde se comparan ocho genes distintos inducidos por ABA en la embriogénesis de maíz, Williams y Tsang (1994) forman tres grupos, en razón a diversos factores como la concentración de ABA que necesitan para inducirse, el tiempo después de la polinización en que se expresan, si para su expresión necesitan el factor Vp1, si son exclusivos de embriones o también se expresan en tejidos somáticos. Esta situación revela que aún quedan muchísimos puntos oscuros, fundamentalmente en el papel que jugaría el ABA y

de que forma actuaría en la regulación de numerosos genes durante la embriogénesis y/o la sequía.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo planteado en esta tesis es analizar los cambios de expresión que se producen durante la embriogénesis somática, situaciones de estrés hídrico y aplicación de ABA exógeno, estudiándose el grado de relación existente entre estas tres situaciones. Este trabajo se ha realizado en dos variedades de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, una resistente y otra susceptible a sequía.

Como paso previo para realizar el estudio propuesto se ha puesto a punto la técnica de obtención de callos embriogénicos en esta especie.

Todos los estudios de cambios de expresión se han realizado por electroforesis bidimensional de proteínas traducidas in vitro a partir de ARN total de las diferentes situaciones.

Finalmente se ha estudiado el comportamiento del gen Em descrito como un gen Lea en otras especies.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Se utilizaron dos variedades comerciales de caña de azúcar, *Saccharum officinarum* L., cedidas por el Dr. S. González Suarez, Universidad de La Habana, Cuba. Estas variedades se caracterizan por su diferente comportamiento frente a situaciones de estrés hídrico. La variedad Jaronú 605 (JA-605) es resistente a la sequía mientras que la variedad Cuba 8751 (C-8751) es sensible a esa condición.

MÉTODOS

1-CULTIVO IN VIVO

Las plantas de estas dos variedades se mantuvieron en invernadero y se renovaron por resembrado de nuevas plantas. Las plantas adultas se cortaron desde la base y se seccionaron por los entrenudos y estas estacas, formadas por un nudo más varios centímetros de tallo, se colocaron en posición horizontal sobre vermiculita húmeda, con la que se semicubrieron. De esta forma las yemas axilares germinaron. Cuando las nuevas plántulas llegaron a medir unos 10 cm de altura y presentaban un sistema radicular muy desarrollado se pasaron directamente a la tierra.

2-CULTIVO IN VITRO

2.1-Medios de cultivo

La composición básica de todos los medios fue la descrita por Murashige y Skoog en 1962 (MS). Los reguladores de crecimiento empleados fueron: ácido 2,4

diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indol-3-acético (IAA), kinetina (K) y ácido abscísico (ABA). A todos los medios se les añadió sacarosa al 3% (p/v), el pH se ajustó a 5,7 y la concentración de agar fue de 0,8%. Los medios de cultivo se esterilizaron por autoclavado a 1 Kg/cm² de presión, 120°C durante 15 minutos.

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

- Formación de callo: MS+2 (MS + 2 mg/l 2,4-D)

- Mantenimiento de callo: SCC (MS + 3 mg/l 2,4-D + 1.2 mg/l IAA + 0.2 mg/l K)

- Regeneración: SCR (MS + 2 mg/l K + 1.3 mg/l IAA)

2.2-Formación y propagación de callos

En plantas adultas se seleccionó, a partir del último entrenudo, una zona de una longitud de 10 a 15 cm. Se esterilizó en superficie con una solución de etanol al 70% durante unos segundos y luego se sumergió 20 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 5% y Tritón-X100 0.02%. Se lavó profusamente con agua estéril. A partir de este “cilindro” de tejido meristemático se cortaron secciones de aproximadamente 1mm. de grosor. Se comenzó a cortar siempre desde el entrenudo hasta llegar a distinguir las hojas jóvenes enrolladas de manera muy compacta. Cada una de estas secciones se consideró un explante. Se sembraron en medio MS+2 y siempre se colocaron, manteniendo el orden de menor a mayor altura que ocupaban en la planta, en 3 filas de 4 explantes cada una por cada placa Petri. Las condiciones de cultivo fueron de oscuridad y a una temperatura constante de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ por un periodo de 25 días.

A partir de ese momento los trasplantes se realizaron al medio de cultivo SCC cada 25 días, manteniéndose en las mismas condiciones de temperatura y oscuridad.

2.3-Regeneración

Los callos se cogieron entre el 3° y 8° período de subcultivo en el medio SCC, 10 días después de realizar el trasplante. Se sembraron en medio SCR. Las condiciones de cultivo fueron 16 h. de luz (12W/m^2) y 8 h. de oscuridad a una temperatura de 24 ± 1 °C. El cambio de medio de cultivo se realizó cada 30 días aproximadamente. Las plántulas formadas se transplantaron por separado, disgregando el callo original. A los 3 meses del primer trasplante en medio SCR se obtuvieron plantulas de 10 cm. de altura aproximadamente, que se podían sacar de las condiciones de esterilidad y ser sembradas en una parcela de tierra.

La medida de la capacidad de regeneración se realizó en callos, con el mismo número de subcultivos en las dos variedades, que se pasaron al medio SCR. Un mes más tarde se evaluó si el callo había mostrado capacidad de regeneración incluidos aquellos callos que presentaron zonas verdes aunque no se pudiera distinguir una plántula en el momento de la evaluación. Al mismo tiempo se contabilizó el número de plántulas que formó cada callo. Los datos se evaluaron, y se compararon en el primer caso a través de la prueba de chi-cuadrado de contingencia y en el segundo haciendo un análisis de varianza de 1 y 2 factores de efectos fijos.

3.-TRATAMIENTOS

Todos los tratamientos se realizaron por igual en las dos variedades de caña de azúcar.

Para realizar los estudios referentes a la embriogénesis somática, se escogieron los siguientes tiempos:

T0: En este tiempo se fijaron aquellos callos que permanecieron por un espacio de 10 días en medio SCC fresco, entre el 4° y 8° período de subcultivo.

Los restantes tiempos escogidos, se obtuvieron al pasar callos T0 a las condiciones de regeneración (ver 2.3)

T1: Estos callos se caracterizaron por presentar zonas rojizas. Se fijaron a los 5 días de haber sido cambiados a las condiciones de regeneración.

T2: Para este tiempo se eligieron los callos T0 que se mantuvieron durante 15 días en las condiciones descritas arriba. Estos callos presentaron pequeños brotes verdes.

E1: Los embriones globulares de los callos altamente embriogénicos, que sólo llevaban 1 o 2 meses en el medio de cultivo SCC, se escogieron en forma individualizada.

E2: Igual que el punto anterior pero escogiendo embriones escutelares, de los callos altamente embriogénicos cultivados durante 5 días en medio SCR.

Se realizaron dos tratamientos de estrés hídrico, y en ambos casos se partió de los callos T0, tomando a estos callos T0 como control de los tratamientos de sequía.

SEQUÍA FUERTE: Se denominó de esta manera a aquellos tratamientos que produjeron una pérdida del peso fresco de los callos cercana al 50% . Para obtener este grado de deshidratación se dejaron los callos durante un período que oscilaba entre 1 y 2 horas, bajo la corriente de aire de la cabina de flujo laminar, en una placa Petri vacía y destapada .

SEQUÍA SUAVE: En este tratamiento se provocó una pérdida aproximada del 12% del peso fresco. Los callos T0 permanecieron sobre un papel de filtro, dentro de una placa Petri cerrada y en oscuridad, hasta llegar al peso deseado. El tiempo de duración de estos tratamientos fue de unas 24 a 30 horas.

En ambos casos y para comprobar que las condiciones no fueron tan drásticas como para causar la muerte del tejido, se pusieron callos tratados en condiciones de regeneración. Estos callos tratados presentaban una regeneración normal.

Para estudiar la acción del fitoregulador ABA en los callos embriogénicos se realizó el siguiente tratamiento:

ABA: Se tomaron callos T0 y se cultivaron durante 24 horas en un medio de cultivo SCC suplementado con ABA 10^{-4} M, en las mismas condiciones de temperatura y oscuridad que los callos en SCC. En este tratamiento los controles también fueron los callos T0.

Se realizaron otros tratamientos con esta hormona, que se especifican en cada caso, también con callos T0, utilizando dos concentraciones de ABA: 10^{-2} y 10^{-4} M. En el primer caso la duración del tratamiento fue de 24 h. y de 4 días, mientras que con la concentración de 10^{-4} M también se hicieron tratamientos de 9 y 18 días. Los controles de estos tratamientos fueron callos cogidos en los mismos tiempos y mantenidos en el medio SCC.

Después de cada tratamiento se congeló el material en nitrógeno líquido y se guardó en congelador a -80°C hasta el momento de extraer el ARN.

4.-EXTRACCION DE ARN

Se utilizó el método del fenol/SDS, según el protocolo de (Ausubel et al., 1989) con ligeras modificaciones para extraer ARN total.

Se homogeneizó 1 g. de muestra en el mortero, manteniendo el tejido siempre congelado. Se transfirió a un tubo estéril con 15 ml de buffer TLE (0,2M Tris; 0,1M LiCl; 5mM EDTA y pH 8,2) y 750 μl SDS 20% y se agitó vigorosamente. Se agregó un volumen de 7,5 ml de fenol equilibrado con buffer TLE (fenol-TLE) y se mezcló por agitación. Finalmente se añadió otro volumen de 7,5 ml de cloroformo. Después de agitar toda la mezcla se incubó a 50°C durante 20 minutos. Se centrifugó 20 minutos a 4°C , a 10.000 rpm en un rotor JA-20 Beckman. La fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo limpio con 7,5 ml fenol-TLE y 7,5 ml cloroformo y se repitió la centrifugación anterior. Este proceso de lavado se realizó hasta observar que la interfase estaba completamente limpia. Siempre se hizo un último lavado de la fase acuosa con 15 ml de cloroformo. Esta fase se recogió en un tubo de cristal estéril y se agregó 1/3 de este volumen de una solución 8M de CILi. Se dejó precipitar toda la noche a 4°C . Se centrifugó a 4°C durante 20 minutos a 10.000rpm . Se recogió el precipitado en 1 ml de CILi 2M y se traspasó a un tubo Eppendorff. Se realizó una incubación de 30 minutos en hielo y se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 13.000 rpm. El precipitado se lavó con

CILi 2M unas 2 ó 3 veces. Una vez limpio el ARN se disolvió en agua y se le agregó 1/10 vol. de AcNa 3M pH 5,2 y 3 vol. de etanol a -20° C. El ARN se puede conservar de esta forma por tiempo indefinido a -80°C. En el momento de ser utilizado el ARN se recuperó por centrifugación a 13.000 rpm a 4°C y se lavó con una solución de etanol al 70% a -20° C.

Para analizar la calidad del ARN extraído se tuvieron en cuenta dos parámetros:

- a.- La relación existente entre la valoración obtenida en el espectrofotómetro a A_{260} y A_{280} . Aquellas muestras que dieron un valor inferior a 1,5 se descartaron.
- b.- Visualización de los ARN extraídos en una electroforesis en geles de formaldehído.

La valoración del ARN extraído se determinó según la relación:

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g/ml ARN}$$

5.-TRADUCCION *IN VITRO*

Se utilizó el sistema del extracto de germen de trigo de Promega. Para cada reacción, de un volumen final de 50 μl se usaron 6 μgr de ARNtotal, desnaturalizado durante 10 minutos a 67 °C. Como aminoácido marcado se incorporaron 2 μl de L-metionina S^{35} , cuya concentración era de 10,7 mCi/ml (ICN Biomedicals). Las reacciones se realizaron siguiendo las instrucciones de las casas comerciales durante 1 hora a 25 °C. Este material se congeló y liofilizó y se mantuvo a - 80 °C hasta el momento de ser utilizado.

6.-ELECTROFORESIS BIDIMENSIONALES DE PROTEINAS

Se siguió el protocolo descrito por O'Farrell. (1975)

6.1.-Primera Dimensión

Las muestras se separaron según su punto isoeléctrico en geles cilíndricos de 11 cm de largo por 2 mm de diámetro. La preparación de 10 ml de mezcla para estos geles se realizó a partir de 4,8 gr urea; 1,34 ml acrilamida 30% (28,4% acrilamida y 1,6% bisacrilamida); 2 ml NP-40 10%; 400 μ l anfolitos del rango 5 a 7 y 100 μ l anfolitos de 3 a 10; 7 μ l TEMED y 10 μ l persulfato amónico 10%. Para evitar que se seque el gel durante las 2h. de polimerización, una vez servido se cubrió con 10 μ l de agua. Transcurrido este tiempo, se eliminó el agua y se agregaron 20 μ l de buffer A (9,5M urea; 2% NP-40; 5% β mercaptoetanol y 2% anfolitos en la proporción ya descrita), y sobre este 10 μ l de agua. Se permitió que el gel se equilibre durante 2 horas. Finalmente los geles se precorrieron con otros 20 μ l de buffer A fresco en condiciones de voltaje constante durante 15 minutos a 200 volts., 30 minutos a 400 volts. y 30 minutos a 600 volts. En la cubeta superior el buffer utilizado fue una solución de NaOH 0,02M y en la inferior H_3PO_4 0,01M. Las muestras se disolvieron en 25 μ l buffer A, se cargaron sobre el gel después de la precorrida y se cubrieron con 10 μ l de buffer K (9M urea y 1% anfolitos). La electroforesis se realizó a voltaje constante, 600 volts. durante 15 horas y un pulso de 1 hora a 800 volts.

Al terminar la electroforesis, los geles se equilibraron 30 minutos en buffer O (10% glicerol; 50% β mercaptoetanol; 2,5% SDS y 0,625M TrisClH pH 6,8).

6.2.- Segunda Dimensión

La separación de las proteínas según su PM se realizó en un sistema discontinuo.

El gel separador, inferior, se preparó con 16 ml de una solución 30% acrilamida: 0.8% bisacrilamida; 7,5 ml TrisClH pH 8,8; 100 μ l SDS 20%; 0,016 μ l TEMED y 100 μ l persulfato amónico 10%. Aproximadamente 30 minutos más tarde, una vez polimerizado este gel, se cargó el gel concentrador. La preparación de 10 ml de gel concentrador se

llevó a cabo con 1,7 ml de la solución de acrilamida-bisacrilamida, 1,25 ml TrisClH pH 6,8, 50 µl SDS 20%, 10 µl TEMED y 40 µl persulfato amónico. El tiempo de polimerización también fue de unos 30 minutos. Sobre este gel discontinuo vertical se depositó el gel cilíndrico obtenido en la 1ª Dimensión. Se utilizó el siguiente buffer: 1% SDS, 6% Tris base y 14,4% glicina. La corrida electroforética se realizó a corriente constante, en el gel concentrador a 25 mA y cuando el indicador de frente (azul de bromo fenol) llegó al gel separador se disminuyó a 20 o 15 mA. El amperaje al que se corrieron los geles dependió fundamentalmente de la temperatura a la que llegaban éstos. Nunca se redujo la corriente por debajo de los 12 mA.

6.3 - Evaluación de la electroforesis

Al terminar la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución fijadora 40% metanol y 10% ácido acético con Azul de Coomassie al 20% (p/v). Se dejaron teñir durante 1 hora en agitación y luego se realizaron varios lavados con la solución fijadora. De esta forma se pudieron ver las proteínas 2 horas después de terminada la electroforesis. Aquellos geles que mostraron patrones distorsionados en la primera y/o en la segunda dimensión fueron descartados.

6.4.-Exposición

Los geles se cambiaron directamente de la solución fijadora a la solución fluorográfica EN³HANCE (DuPont) y se mantuvieron en agitación durante 30 minutos. Se hicieron 2 lavados de 15 minutos en agua. Se transfirieron a papel 3MM y se cubrieron con film transparente. Se secaron a 65°C durante 1 hora en vacío. Una vez secos y en condiciones de oscuridad se colocaron en contacto directo con la película para rayos X, Kodak X Omat AR (Eastman-Kodak). El tiempo de exposición fue de 1 a 2 semanas a - 80°C. El revelado se realizó según las instrucciones del fabricante.

6.5.- Lectura

La lectura de los patrones obtenidos se hizo por inspección visual. La comparación se realizó 2 a 2 entre los diferentes patrones y considerando las repeticiones hechas en cada uno de los casos estudiados.

7.-EXTRACCIÓN ADN

Se realizó siguiendo el protocolo de (Dellaporta et al., 1983) con modificaciones.

Entre 0.5 y 1 gramo de tejido congelado se homogeneizó en mortero, con nitrógeno líquido. El polvo se transfirió a un tubo de centrifuga con 15 ml de buffer de extracción (100 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl y 10 mM β mercaptoetanol), se añadió 1 ml de SDS 20% y se mezcló vigorosamente. Se incubó 10 minutos a 65°C. Se agregaron 5 ml de acetato potásico 5M, se agitó vivamente y se incubó 20 minutos en hielo. La muestra se centrifugó 20 minutos a 17000 rpm en un rotor JA-20 Beckman. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una gasa y se recogió en un tubo con 10 ml de isopropanol a -20° C. Después de mezclar suavemente, se incubó a -20 °C por lo menos durante 30 minutos. El ADN se precipitó por centrifugación a 15000 rpm, 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado invirtiendo el tubo sobre papel de filtro. El precipitado se dejó resuspender durante 20 minutos con 750 μ l de TE 50 : 10 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8) y se transfirió a un tubo Eppendorf. Se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se añadieron 75 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 500 μ l de isopropanol. Se mezcló y se centrifugó 5 minutos. El precipitado se lavó con etanol 80%, se secó y se resuspendió en 300 μ l de agua. Se fenolizó con igual volumen de PCIA (25 fenol: 24 cloroformo: 1 isoamilalcohol) y se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm. A la fase acuosa se le agregó igual volumen de cloroformo y se centrifugó. Nuevamente se recogió la fase acuosa y se utilizaron 3 volúmenes de etanol 100% frío y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M. Se permitió la precipitación del ADN toda la noche a -20 °C (de esta forma el ADN se puede

guardar por tiempo indefinido), se recuperó por centrifugación y el precipitado se lavó con una solución fría de etanol 70%. El ADN se resuspendió en agua. En todos los casos se trató con RNasa (A + T1).

Para analizar la calidad del ADN extraído se tuvieron en cuenta dos parámetros:

a.- La relación existente entre la valoración obtenida en el espectrofotómetro a A_{260} y A_{280} . Aquellas muestras que dieron un valor inferior a 1,5 se descartaron.

b.- Visualización de los ADN extraídos en una electroforesis.

La valoración del ADN extraído se determinó según la relación:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml ADN}$$

8.-ELECTROFORÉISIS DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS

8.1.-Electroforesis de ADN

Se utilizaron geles entre el 0.8% y 1.2% de agarosa, buffer TAE 1x (40 mM Tris acetato, 1 mM EDTA, pH 8) y bromuro de Etidio (1 $\mu\text{g/l}$), según Sambrook et al. (1989). Las muestras se cargaron en el gel con el buffer de carga: 50% glicerol, 1mM EDTA y 0.25% azul de bromofenol . La electroforesis se realizó en buffer TAE 1x.

8.2.-Electroforesis de ARN

La separación del ARN se realizó en geles con formaldehído. La composición de estos geles fue de 1.2 % agarosa, buffer MAE 1x (20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico y 1 mM EDTA pH 7) y formaldehído 2.2 M. A las muestras de ARN total disuelto en agua se le agregó 3.2 veces su volumen de solución desnaturante (1 buffer MAE 5x : 1.75 formaldehído : 5 formamida). Estas muestras se desnaturizaron 15 minutos a 65 °C. Para cargar las muestras

en el gel se agregó el buffer de carga (50% glicerol, 1mM EDTA, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% Xilano cianol). La electroforesis se realizó en buffer MAE 1x.

Para analizar la calidad del ARN, se añadió bromuro de Etidio a las muestras junto con el buffer de carga, pero si era para realizar una transferencia solo se utilizó BrEt en el marcador de PM. El marcador de PM utilizado fue de la casa USB, y consiste en una serie de transcritos de ARN de 9488 a 363 nucleótidos.

9.-TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLÉICOS A MEMBRANAS

9.1.-De ADN (tipo Southern)

El gel de agarosa se cubrió con solución desnaturalizante (1.5 M NaCl, 0.5M NaOH) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se neutralizó durante 30 minutos en solución neutralizante (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris HCl pH 7.2, 1mM EDTA). La transferencia se realizó a membranas de nylon (Hybond N, Amersham) por capilaridad con una solución 20x SSC (3M NaCl, 0.3 M Citrato de sodio pH 7) durante toda la noche, a temperatura ambiente (Southern 1975). La membrana se lavó 5 minutos en una solución 2x SSC. El ADN se fijó a la membrana a 80 °C durante 2 horas.

9.2.-De ARN (tipo Northern)

El gel de agarosa se lavó 10 minutos en agua. Se transfirió a una membrana de nylon cargada (Hybond N⁺, Amersham) por capilaridad, como ya se explicó en el punto anterior. El ARN se fijó a la membrana a 80 °C durante 2 horas.

10.-HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

10.1.-Marcaje radioactivo de sondas

El marcaje de los ADNs que se utilizaron como sondas se hizo por random primer y se empleó el kit Multiprime de Amersham, siguiendo sus especificaciones. La cantidad de [α P³²] dCTP (ICN, Inc.) utilizada fue de 50 μ Ci, (concentración 10 mCi/ml). La purificación de las sondas marcadas se realizó a través de columnas de Sephadex G-25M (Pharmacia).

10.2.-Hibridación tipo Southern

Las hibridaciones se llevaron a cabo en tubos de vidrio, siguiendo básicamente el protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). Las membranas se prehibridaron durante toda la noche a 62 °C con 50 ml de una solución compuesta por 5x SSPE (0.9 M NaCl, 50 mM fosfato de sodio y 5 mM EDTA pH 7.7), 5x solución Denhardt (Ficoll 0.02%, PVP 0.02% y BSA 0.02%), SDS 0.5% y 500 μ g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. El tiempo de hibridación fue variable de 16 a 20 h a una temperatura de 62°C.

Después de la hibridación los filtros se lavaron en 2x SSPE, 0.1% SDS a temperatura ambiente durante 1 hora, en 0.2x SSPE, 0.1% SDS a 45° C durante 30 minutos y luego dos lavados de 10 minutos a 62° C, primero en 1x SSPE, 0.1% SDS y finalmente en 0.2x SSPE, 0.1% SDS.

10.3.-Hibridación tipo Northern

Los filtros se prehibridaron, toda la noche, a 40 °C en una solución 50% formamida, 5x SSPE, 5x solución Denhardt, 0.5% SDS y 500 μ g/ml de ADN de esperma de salmón

desnaturalizado. En el momento de realizar la hibridación se sustituyó por una solución fresca y se agregó la sonda marcada y desnaturalizada, el tiempo de hibridación fue de 20 a 24 h.. Los lavados realizados fueron idénticos a los del apartado 10.2.

11.-AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Como molde se utilizó ADN genómico. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos:

1 5' TGAATTCAGCTGGACCGCAAGGCTCG 3'

2 5' TGAATTCTGAACTTGGACTCGTCGAT 3'

Estos cebadores específicos llevan en su extremo 5' la diana para la endonucleasa de restricción Eco RI, que aparece subrayada en la secuencia.

Para la amplificación se utilizó la polimerasa termoestable de Promega, en las siguientes condiciones : 50 mM KCl, 10 mM TrisClH pH: 9, 0.1% Tritón X100, 2mM Cl₂Mg, 200 μM nucleótidos, 5 μM de los cebadores.

El termociclador (Peltier PTC-100, M. J. Research Inc.) se utilizó con las siguientes especificaciones:

5 minutos	94° C	
30 segundos	94° C	} 30 ciclos
30 segundos	60° C	
1 minuto	72° C	
10 minutos	72° C	
	4° C	

12.-PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE UN GEL DE AGAROSA

Se corta y extrae de gel de agarosa la banda que se desea purificar. Para esto se utiliza el kit GeneClean II (Bio 101 Inc.) y se siguen sus instrucciones.

13.-LIGAMIENTO

La reacción de ligamiento se realizó con el ADN amplificado y purificado por GeneClean. Como vector de clonaje se utilizó el plásmido Bluescript II SK⁻. Los extremos cohesivos, tanto del inserto como del vector se obtuvieron con la enzima de restricción EcoR I, y una vez inactivada esta enzima los fragmentos se ligaron con la ligasa T4 (Boehringer-Mannheim). La reacción se realizó durante toda la noche a 16° C.

14.-TRANSFORMACIÓN

Se utilizaron células competentes de E. Coli (DH5 α). La selección de colonias transformadas se realizó en medio LB con antibiótico (Ampicilina 50mg/ml) El sistema enzima sustrato: X-Gal e IPTG se utilizó para seleccionar los clones positivos.

15.-AISLAMIENTO DE ADN PLÁSMIDICO

Las preparaciones de ADN plásmidico se realizaron a pequeña escala, siguiendo el protocolo de lisis alcalina descrito en Sambrook et al. (1989), a partir de cultivos de 1.5 ó 10 ml en LB con antibiótico incubados durante una noche a 37°C. EL ADN obtenido se utilizó en digestiones con enzimas de restricción.

Las preparaciones de plásmido para secuenciación se realizaron utilizando el método de purificación QUIAGEN, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

16.-SECUENCIACIÓN

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el servicio de secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid.

17.-ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

17.1.-Búsqueda de homologías

La secuencia de nucleótidos fué comparada con las presentes en distintos bancos; GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, utilizando el programa BLASTP de búsqueda de homologías. La secuencia traducida fué comparada, utilizando el programa BLASTX, con las presentes en los bancos de proteínas: GenBank CDS translation, PDB, SwissProt, PIR, y PDB.

17.2.-Alineamientos

Los alineamientos se realizaron utilizando las aplicaciones Gap y Pileup del programa Genetics Computing Group (GCG) de Wisconsin.

18.-ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Para obtener una ordenación tridimensional que permitiera una representación en el espacio del grado de relación existente entre las 12 situaciones estudiadas se realizó un análisis de componentes principales. Este es el método de ordenación en 2 o 3 dimensiones más comúnmente utilizado. Con los datos de presencia y ausencia de proteínas se construyó una matriz de 1 y 0 respectivamente. Se utilizó el programa NTSYS (Rolf, 1990) para tratar los datos y obtener la representación tridimensional. Las

coordenadas de los ejes corresponden a las combinaciones lineales de las variables originales y resumen las dimensiones de variación. Así el eje principal se corresponde con la dimensión que muestra la mayor varianza de las muestras (Sneath y Sokal, 1973)

RESULTADOS

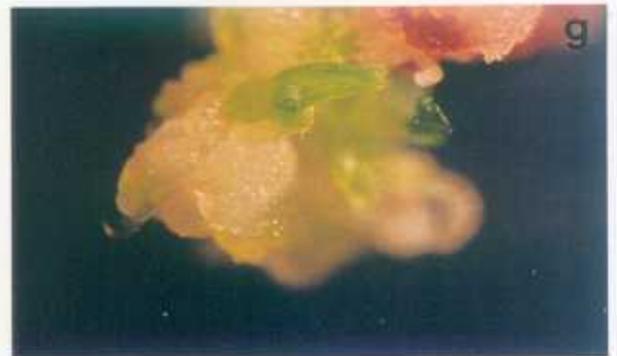
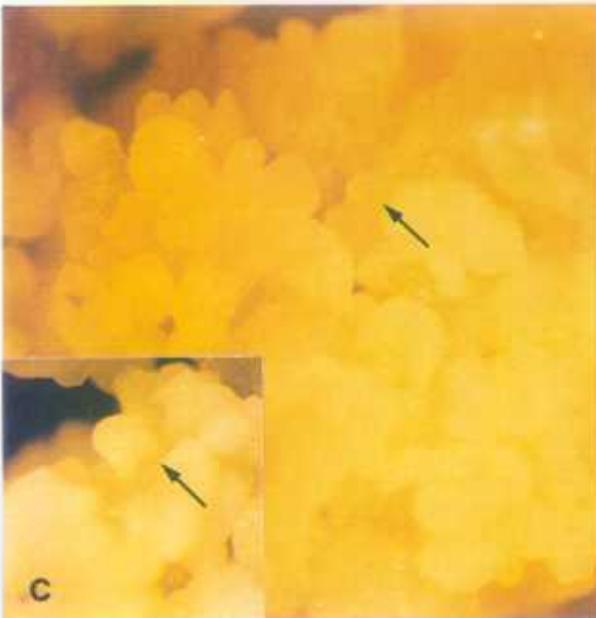
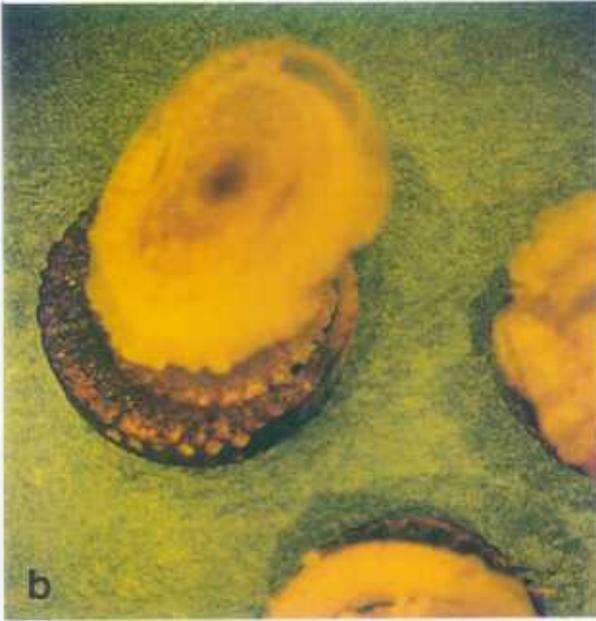
RESULTADOS

1.-FORMACIÓN DE CALLOS

En la inducción de callos, los explantes que se fueron obteniendo (Figura 1a) por corte de hojas inmaduras, se mantuvieron en el orden en que se fueron cortando y así se llamó zona 1 a los primeros doce cortes a partir del último nudo y correspondió a la zona basal, la zona 2 fue la siguiente y la zona 3 correspondía a la zona superior donde ya se visualizaban las hojas jóvenes superenrolladas. En aquellos casos en los que los tallos fueron muy vigorosos se pudieron obtener hasta 12 cortes más. Cada explante fue de unos 2 mm de grosor aproximadamente. De esta forma cada zona abarcó unos 2.5 cm de longitud.

La aparición de tejido desdiferenciado comenzó a los 10 días de cultivo, sobre la zona de corte del explante observándose células grandes que no estaban unidas entre sí. Durante el período de 4 semanas en el medio MS + 2, los cortes mantuvieron su organización ya que el crecimiento de tejido desdiferenciado fue muy lento y restringido a pequeñas zonas. En los últimos explantes de la zona 3, la hoja más externa se fenolizaba por completo, adquiriendo un color entre marrón oscuro y morado, sin formar callo (Figura 1b), mientras que las hojas más internas lo formaban. Los explantes siguientes se fenolizaban por completo y no fueron capaces de formar callo.

Al poco tiempo de pasar el tejido a medio SCC se podían observar embriones somáticos que se habían formado sobre los cortes de las hojas en el medio MS + 2. A partir de este momento y durante el primero y segundo período de cultivo en medio SCC el tejido era completamente heterogéneo, ya que aparecían trozos del explante sin diferenciar, un callo de tejido mucilaginoso y laxo de color grisáceo y zonas altamente embriogénicas. Estas zonas embriogénicas mostraban embriones en estadio globular y escutelar, eran de color blanco, aspecto liso y compacto y altamente organizadas (Figura 1c). Los embriones globulares que llamamos E₁, presentaban un aspecto completamente esférico y se formaban principalmente en la periferia de estos



callos, mientras que en los escutelares (llamados E₂) se podía observar una zona central constituida por el embrión, que parecía un cilindro situado sobre una estructura laminar, el escutelo.

La selección y subcultivo de aquellas zonas embriogénicas permitía que a partir del tercer período de subcultivo, el cultivo estuviera formado por un solo tipo de callo y fuera más homogéneo. Estos callos que ya se comenzaron a observar después del primer subcultivo en SCC, eran de un color marfil o amarillo pálido, con células pequeñas y apretadas aunque disgregables, lisos y suaves y los embriones se observan en una frecuencia más baja. Su aspecto y comportamiento fue similar en las dos variedades. A partir del cuarto subcultivo solo observamos embriones globulares.

Se pudo observar que la zona 2 producía más masa de este callo que la zona 1 en todos los casos y generalmente más que la zona 3 si ésta era la última. En el caso de haber obtenido callos de la zona 4, se obtenía el mismo rendimiento de las zonas 2 y 3.

Estos callos homogéneos, a partir del tercer subcultivo, cuando llevaban 10 días en medio SCC fresco se escogieron como control (T₀) y con ellos se realizaron los distintos tratamientos (Figura 1d).

Después de un año en cultivo los callos comenzaron a presentar un aspecto más mucilaginoso y un ritmo menor de crecimiento no observándose embriones, hasta llegar a los dos años aproximadamente, a formarse un callo blando de células muy grandes y que dejaba de crecer.

2.-REGENERACIÓN IN VIVO

Al comparar la capacidad que mostraron ambos genotipos de formar nuevas plantas a partir de las yemas axilares, de las estacas sembradas en vermiculita, se pudo observar que en la variedad C-8751 era mucho mayor el número de nudos que formaban plantas (R) que el de nudos que no lo hacían (NR) (Figura 1e). Este comportamiento se refleja en la siguiente tabla:

	Nº de nudos	Nudos R	Nudos NR	% R	χ^2
JA-605	46	2	44	4.35	36.329 ***
C-8751	49	31	18	63.26	

*** (p<0.001)

La prueba de chi cuadrado de contingencia revela que las diferencias son altamente significativas.

3.-REGENERACIÓN IN VITRO

A los dos días de pasar los callos T0 a las condiciones de regeneración, se empezaba a observar la aparición de una pigmentación rojiza, que a los 4 días alcanzaba toda la superficie del callo pudiéndose observar embriones escutelares de distintos tamaños (Figura 1f). Esta situación se denominó T1. Una semana más tarde los embriones habían continuado su desarrollo, y comenzaban a distinguirse pequeñas plántulas aunque también persistía algunos embriones escutelares (Figura 1g). A estos callos los denominamos T2.

La tasa de regeneración de los callos embriogénicos fue muy alta en las dos variedades.

La evaluación de la capacidad de regeneración de los callos se realizó con callos que habían sido cultivados 1 mes en medio MS+2 y 2 meses en el medio SCC. Para evitar cualquier variación tanto debida al período de subcultivo como al momento de recogida del material del invernadero, se hicieron todos los trabajos en las dos variedades al mismo tiempo.

Estos callos se mantuvieron durante 1 mes en Magentas con 40 ml de medio SCR en las condiciones de regeneración.

Para evaluar si la capacidad de regeneración era afectada por el tipo de explante inicial se utilizaron callos provenientes de la zona basal 1, de la zona intermedia 2 y de la zona superior 3. Los datos de callos que no regeneraron (NR) y aquellos callos que mostraron capacidad de regeneración (R) se muestra en la siguiente tabla:

Variedad	Explante	Total	NR	R	%R
C-8751	1	166	10	156	93.9
	2	157	8	149	94.9
	3	100	18	82	82.0
JA-605	1	124	18	106	85.5
	2	77	20	57	74.0
	3	70	42	28	40.0

Para poder evaluar si las diferencias observadas eran significativas se hicieron chi-cuadrados de contingencia.

Al evaluar las diferencias dentro de cada variedad, debidas al explante inicial, se obtuvieron los siguientes datos:

En la variedad C-8751, la comparación entre callos formados a partir de la zona basal 1 y la zona intermedia 2 reveló que no existen diferencias significativas entre ambos: $\chi^2 = 0.1314$ ($0.80 > p > 0.70$) no significativo

Al no haber diferencias significativas entre estos datos, se agruparon para hacer la comparación con los callos obtenidos a partir de la zona distal 3: $\chi^2 = 15.1456$ ($p < 0.001$). Estos datos demuestran que las diferencias son significativas y los callos obtenidos de las regiones 1 y 2 regeneran más que aquellos callos que se obtuvieron a partir de la región 3.

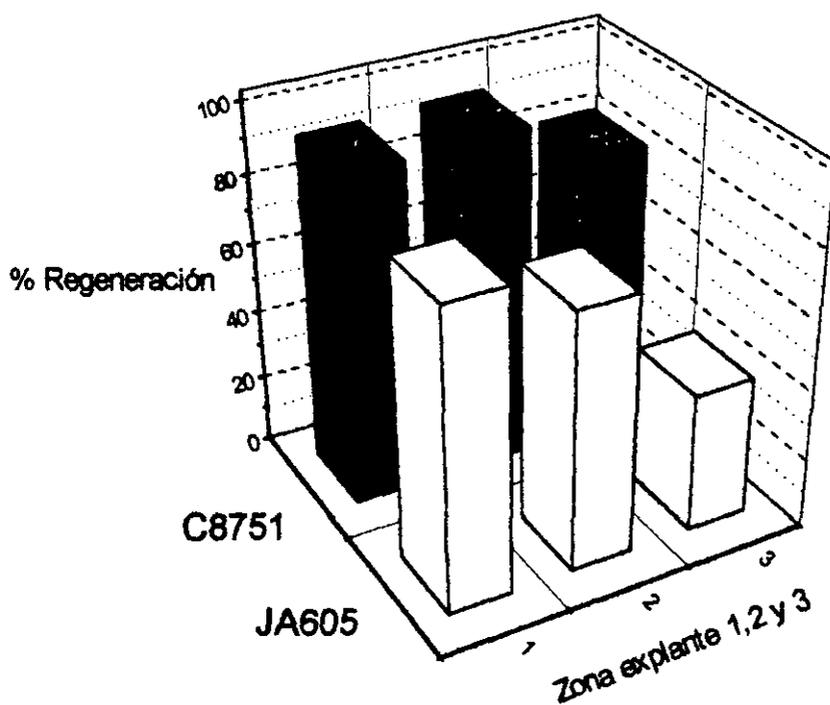
En la variedad JA-605, primero se realizó la comparación para la capacidad de regeneración entre los callos formados a partir de la zona 1 y de la 2: $\chi^2 = 4.0669$ ($0.05 > p > 0.01$) siendo las diferencias significativas.

La comparación de datos entre callos de las zonas 2 y 3 dio el siguiente resultado: $\chi^2 = 17.407$ ($p < 0.001$), siendo esta diferencia significativa.

Por tanto, en esta variedad los callos obtenidos de tres zonas distintas presentan claras diferencias en su capacidad regenerativa.

Para evaluar diferencias entre los dos genotipos se compararon los callos con idéntico origen. Los callos formados a partir de explantes basales, zona 1, dieron el siguiente valor: $\chi^2 = 5.867$ ($0.05 > p > 0.01$). Los callos de la zona 2: $\chi^2 = 21.378$ ($p < 0.001$). Los callos de zona 3: $\chi^2 = 25.099$ ($p < 0.001$).

Las tres comparaciones demuestran que las diferencias entre C-8751 y JA-605 son significativas. La capacidad de regeneración fue mayor en la variedad C-8751 en todos los casos. Todos estos datos se muestran en el siguiente gráfico.



4.-GERMINACIÓN DE EMBRIONES

Para evaluar el número de brotes que podían formar los callos embriogénicos de las dos variedades, y comprobar si había un efecto debido al origen de los callos se contó el número total de brotes que produjo cada callo (llamaremos brote a los embriones germinados).

Variedad	Explante	Callos	Nº brotes	brotes/callos
C-8751	1	112	253	2.26
	2	114	250	2.19
	3	47	82	1.70
JA-605	1	86	234	2.72
	2	52	115	2.21
	3	18	27	1.50

Este recuento se realizó con callos que llevaban 1 mes en condiciones de regeneración y con aquellos brotes que midieron más de 2.5 mm de longitud. Con estos datos se hicieron análisis de varianza. El resultado del análisis de varianza de dos factores fijos fue el siguiente:

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F
brote- var	0.719331	1	0.719331	0.435 (NS)
brote-callos	34.651284	2	17325642	10.488 ***
Interacción	8.7543960	2	4.3771980	2.650 **
Residual	695.49756	421	1.6520132	
Total	742.18735	426		

*** $F_{[2,\infty]} = 6.63$ $p = 0.001$

** $F_{[2,\infty]} = 2.3$ $p = 0.1$

Se observa que la varianza es altamente significativa en la germinación dependiendo del explante del que se forme el callo que regeneró. Sin embargo no existen diferencias en la formación de brotes dependientes del genotipo. A pesar de esto, dado que la interacción fue prácticamente significativa, se realizaron dos análisis de varianza de un factor fijo con los mismos datos evaluando primero el origen de los callos dentro de cada una de las variedades y luego teniendo en cuenta solo la variedad.

Se realizó un análisis de varianza entre número de brotes y origen del callo:

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F
Entre Grupos	32.57813	2	16.289064	9.733 ***
En el Grupo	709.60923	424	1.673607	
Total	742.18735	426		

*** $F_{[2,\infty]} = 6.63$ $p = 0.001$

Estos resultados son coincidentes con la ANOVA de dos factores realizadas en el paso anterior, e indican que los callos de la zona 1 formaron más brotes que los de la zona 2 y éstos más que los de la zona 3, en las dos variedades.

Igualmente se llevó a cabo el siguiente análisis de varianza entre número de brotes y variedad:

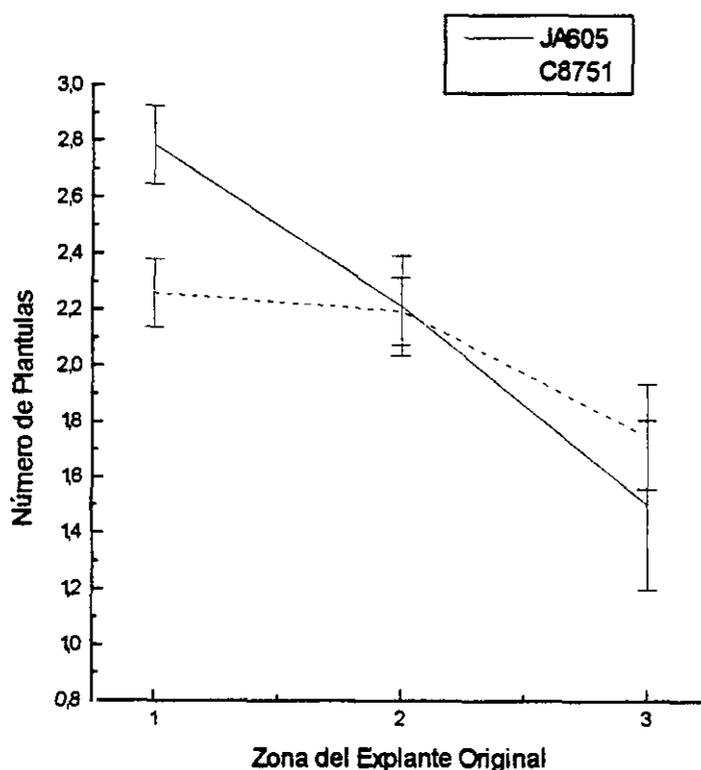
Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F
Entre Grupos	8.78476	1	8.7847562	5.091 *
En el Grupo	733.40263	425	1.7256532	
Total	742.18735	426		

* $F_{[1,\infty]} = 5.0239$ $p = 0.025$

Estos resultados revelan que las diferencias entre variedades son significativas

En el análisis de varianza de dos factores esta situación quedo enmascarada por el hecho de que los callos de la zona 1 forman más brotes en la variedad JA-605 que los de la variedad C-8751 mientras que los de la zona 3 forman más brotes en la variedad C-8751 que en el otro genotipo.

Esto se puede observar en el siguiente gráfico donde se representa el valor medio de brotes formadas a partir de los callos de las tres zonas analizadas en las dos variedades (las barras verticales indican la desviación estandar de los valores).



Se evaluó la capacidad de regeneración que presentaron en ambas variedades, aquellos sectores altamente embriogénicos de los callos heterogéneos que llevaban sólo 1 ó 2 meses en medio SCC y que estaban formados por embriones en estadio globular (E_1) y escutelar (E_2). Después de pasar estos callos embriogénicos a condiciones de

regeneración, se evaluó si regeneraban (R) ó no regeneraban (NR) y se obtuvieron los siguientes resultados:

	Total	R	NR	%
JA-605	51	40	11	78.43
C-8751	47	35	12	74.46

El valor de χ^2 es de 0.2137 ($0.7 > p > 0.5$). Estas diferencias fueron no significativas.

5.-TRANSPLANTE A CONDICIONES IN VIVO

Los brotes obtenidos presentaron un aspecto normal. Después de 3 meses en medio de regeneración, con transplantes realizados cada mes donde las nuevas plántulas formadas se individualizaban y cultivaban por separado en tubo ó Magenta, estas podían ser pasadas a tierra sin inconvenientes. En el pasaje del cultivo in vitro a tierra no se observó mortandad de las plántulas.

Es de destacar que nunca se obtuvieron plántulas vitrificadas ó que presentaran engrosamiento de sus tejidos. No se observaron plántulas albinas a lo largo de todo este trabajo. Las plantas obtenidas por regeneración in vitro y aquellas otras que se formaron por el desarrollo de las yemas axilares in vitro, tenían idéntico aspecto y se adaptaron a las condiciones del invernadero.

Las plántulas recuperadas de la variedad C-8751 fueron siempre más vigorosas y formaban un mayor número de tallos a partir de cada estaca.

6.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EN ELECTROFORÉISIS BIDIMENSIONALES EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Con el fin de evaluar la modificación de la expresión génica producida por las condiciones que se estudiaron en este trabajo se eligió la electroforesis bidimensional en geles de

poliacrilamida (PAGE), que fue descrita por O'Farrell (1975). Esta metodología permite la visualización simultánea de cientos de proteínas en un solo gel. Además como se realiza en condiciones altamente desnaturizantes permite que cada proteína se caracterice a nivel de un único polipéptido. Se ha elegido la electroforesis bidimensional mas comúnmente usada, que consiste en separar las proteínas en la primera dimensión en base a su carga por isoelectroenfoque y luego separar los polipéptidos en la segunda dimensión en presencia de SDS (SDS-PAGE) que produce una separación debida principalmente al peso molecular.

6.1.- Análisis de los patrones de proteínas totales

Las muestras utilizadas fueron T0, T1 y T2 para el estudio de la embriogénesis somática. Para estudiar el efecto del estrés hídrico sobre la expresión se simuló en un estudio preliminar la pérdida de potencial agua agregando polietilenglicol, PEG 3000, al medio de cultivo. La duración de este tratamiento fue de 72 horas en el medio SCC suplementado con 22% PEG 3000 en condiciones de cultivo de callos.

En esta primera etapa del trabajo se extrajeron las proteínas totales, se corrieron en SDS-PAGE y se tñeron con plata. Se obtuvieron patrones proteicos altamente repetibles en todos los casos, aunque con pequeñas variaciones en la intensidad y coloración de las manchas.

El análisis de estos patrones proteicos no reveló diferencias ni entre tratamientos ni entre variedades.

Debido al hecho de no poder encontrar diferencias utilizando este sistema se buscó un sistema mucho más sensible pero que igualmente permitiera el análisis de la expresión de un rango muy amplio de genes. Así se modificó la estrategia de estudio al analizar las proteínas traducidas *in vitro* a partir de los ARN extraídos de las distintas muestras.

6.2.- Análisis de los patrones de proteínas traducidas *in vitro*

A partir de las muestras fijadas en líquido se extrajo el ARN total según el método de SDS/Fenol. El rendimiento fue de aproximadamente 300µg ARN/ g. de tejido. En general no hubo problemas ni de degradación ni de contaminación con ADN.

La traducción *in vitro* se realizó en el sistema de germen de trigo, siguiendo las instrucciones de la casa comercial e incorporando cisteína S³⁵ como aminoácido marcado. De esta forma, las nuevas proteínas impresionaron una película de rayos X, donde quedó reflejado el patrón de expresión de cada situación analizada.

En todas las autoradiografías se pudieron observar unas 250 proteínas.

La comparación entre todos los patrones proteicos se hizo 1 a 1 y en base a la intensidad y posición relativa de cada una de las manchas. Se tomó como patrón de referencia JA-605 T0.

Los patrones proteicos obtenidos para cada uno de los diferentes tratamientos mostraron su repetibilidad.

Para el análisis de las comparaciones solo se tuvieron en cuenta diferencias cualitativas. Se enumeraron 156 proteínas que se pudieron identificar fácilmente debido a su posición e intensidad. De estos 156 polipéptidos, 67 mostraron una expresión diferencial para alguna de las 12 situaciones analizadas.

Estos datos se recogieron en forma de tabla donde la presencia de una proteína se indicó como (+), y la ausencia como (-).

Se construyeron distintas tablas parciales, donde la enumeración otorgada a cada proteína se mantuvo constante. En cada tabla, solo se registraron las proteínas que mostraron diferencias de expresión en el tratamiento analizado. Para la comparación entre bloques de tratamientos, como por ejemplo embriogénesis vs. sequía, solo se tuvieron en cuenta los polipéptidos que variaron entre ambas situaciones y NO dentro de cada una de ellas, ya que estos datos se registraron en sus correspondientes tablas.

6.2.1.- Embriogénesis somática

La comparación de los patrones proteicos obtenidos a partir de callos en los tres estadios escogidos para el estudio de la embriogénesis somática, T0, T1 y T2 se muestra en la Tabla I.

Solo las proteínas 25, 26, 30, 59 y 61 mostraron un patrón de expresión idéntico en las dos variedades. Entre estas proteínas con igual expresión entre variedades, las proteínas 25 y 26 desaparecieron de los callos en T2, mientras que la 30 únicamente se pudo detectar en esos patrones. La proteína 59 se detectó sólo en los callos en T0 pero la 61 no se pudo observar en ese tiempo aunque si estuvo presente en los T1 y T2.

Los 18 polipéptidos restantes difirieron en su expresión entre ambas variedades estudiadas.

Al realizar la comparación de los callos en T0 se detectaron 8 proteínas con diferente expresión, estas fueron: 42, 55, 56, 58, 65, 66, 67 y 68.

Al comparar los callos en T1, éstos se diferenciaron en 8 polipéptidos: 29, 42, 43, 46, 56, 62, 66 y 67.

Las diferencias encontradas fueron mayores al comparar los callos en T2, donde catorce proteínas mostraron una expresión diferencial: 29, 43, 46, 47, 48, 56, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67 y 68.

Una serie de proteínas se expresaron diferencialmente en una única variedad y nunca se tradujeron en la otra.

Así aquellos polipéptidos numerados como 47, 48, y 55 estuvieron presentes únicamente en la variedad JA-605, siendo los dos primeros detectados en T2 y el último solo en T0.

Entre los polipéptidos que se expresaron diferencialmente solo en la variedad C-8751 se encontraron el 42 que estaba presente en T0 y T1 y el 64 que se expresaba solo en T2.

	JA-605			C-8751		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
25	+	+	-	+	+	-
26	+	+	-	+	+	-
29	-	+	-	-	-	+
30	-	-	+	-	-	+
42	-	-	-	+	+	-
43	+	-	-	+	+	+
46	+	-	-	+	+	+
47	-	-	+	-	-	-
48	-	-	+	-	-	-
55	+	-	-	-	-	-
56	-	-	-	+	+	+
58	-	+	+	+	+	+
59	+	-	-	+	-	-
60	+	-	-	+	-	+
61	-	+	+	-	+	+
62	-	-	+	-	+	-
63	+	+	+	+	+	-
64	-	-	-	-	-	+
65	-	+	+	+	+	-
66	+	+	-	-	-	+
67	-	-	+	+	+	-
68	-	-	-	-	-	+

Tabla I: Proteínas detectadas en 2D-PAGE obtenidas por traducción in vitro.

Los números corresponden a las proteínas indicadas en la Figura 2.

+ indica presencia de la proteína.

- indica ausencia de la proteína.

Figura 2 Geles de electroforesis bidimensionales de proteínas traducidas in vitro, a partir de ARN total, en distintas situaciones de la embriogénesis somática en las variedades JA-605 y C-8751.

a T0 JA-605

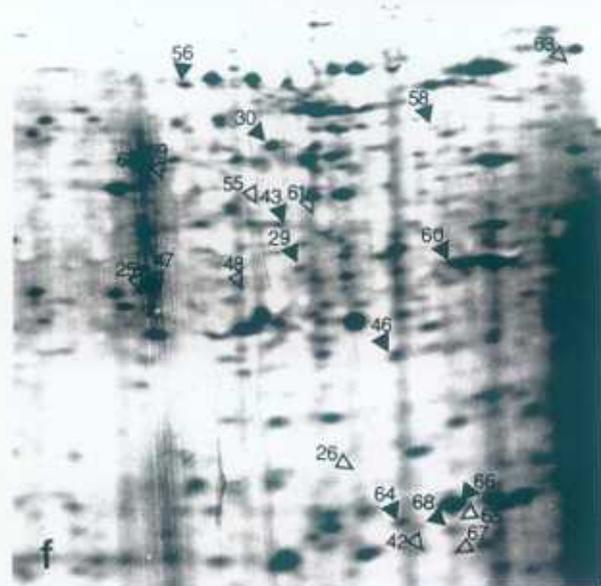
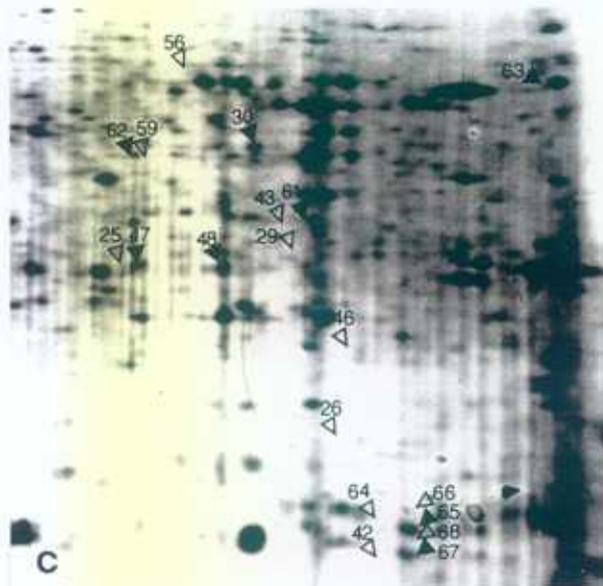
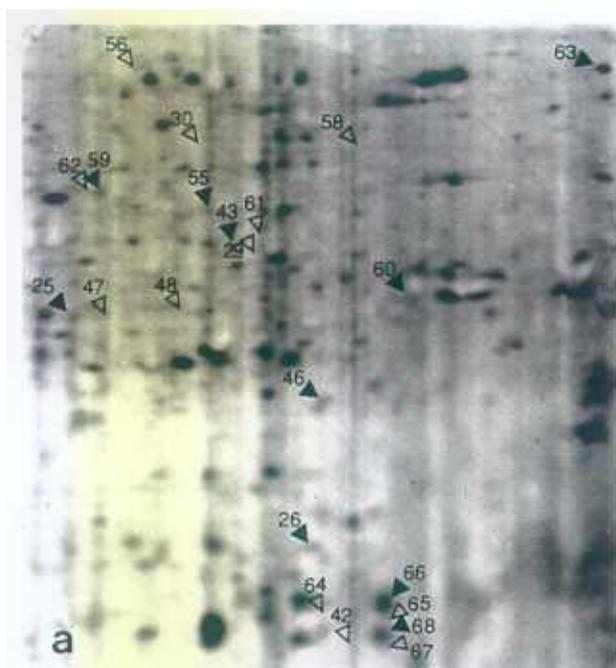
b T1 JA-605

c T2 JA-605

d T0 C-8751

e T1 C-8751

f T2 C-8751



Así mismo otro grupo de proteínas se expresaron en los 3 tiempos de la embriogénesis en una de las variedades, mientras que en la otra presentaban una expresión diferencial. En los patrones de T1 y T2 de la variedad JA-605 desaparecieron los polipéptidos 43 y 46, pero el 58 estuvo ausente en T0 y presente solo en T1 y T2. Por otra parte el polipéptido 63 que se detectó en los 3 tiempos de la variedad JA-605 presentó un patrón diferencial en la variedad C-8751 en donde dejó de expresarse en T2.

La proteína 56 constituyó un caso especial ya que no se pudo detectar en ninguno de los 3 tiempos en la variedad JA-605, mientras que en la otra variedad estuvo presente en los 3 patrones, T0, T1 y T2.

De los 23 polipéptidos que se muestran en la Tabla I, 3 de ellos tienen una expresión diferencial debida a la embriogénesis somática, aunque esta expresión es distinta entre las dos variedades. En la variedad C-8751 la proteína 29 se detectó durante T2 y la proteína 62 estuvo presente en T1, mientras que en la variedad JA-605 lo hicieron en T1 y T2 respectivamente. La proteína 60 mostró una expresión exclusiva en T0 de la variedad JA-605 y en la variedad C-8751 se detectó su expresión tanto en T0 como T2.

6.2.2.- Estrés Hídrico

Los resultados de la comparación de los patrones proteicos obtenidos con callos sometidos a los dos tipos de sequía con sus respectivos T0 y entre ambas variedades se muestra en la Tabla II

Estos datos revelan que 37 polipéptidos presentaron una expresión diferencial frente al stress hídrico.

De este grupo de polipéptidos 15 presentaron un comportamiento idéntico en ambas variedades. De los cuales 8 se expresaron debido al tratamiento de sequía fuerte: 17 a 22, 52 y 64. Las proteínas 23 y 30 únicamente se detectaron en los tratamientos de sequía suave,

	JA-605			C-8751		
	T0	SF	SS	T0	SF	SS
17-22	-	+	-	-	+	-
23	-	-	+	-	-	+
24	+	+	-	+	+	-
27-28	+	+	-	+	+	-
30	-	-	+	-	-	+
31	+	+	-	+	+	+
32	-	+	+	-	-	-
42	-	-	-	+	-	+
43	+	+	-	+	+	+
44-45	-	+	+	-	-	+
47-48	-	+	+	-	+	+
49-50	-	+	-	-	-	-
52	-	+	-	-	+	-
53	+	-	-	+	+	-
54	+	+	-	+	+	+
55	+	+	-	-	+	-
56	-	+	+	+	+	+
57	-	+	-	-	-	-
58	-	+	+	+	+	+
59	+	+	-	+	+	+
60	+	+	-	+	-	-
61	-	-	-	-	-	+
62	-	-	-	-	+	+
63	+	+	+	+	+	-
64	-	+	-	-	+	-
65	-	-	-	+	-	-
66	+	+	+	-	+	+
67	-	-	-	+	-	+

Tabla II: Proteínas detectadas en 2D-PAGE obtenidas por traducción in vitro.

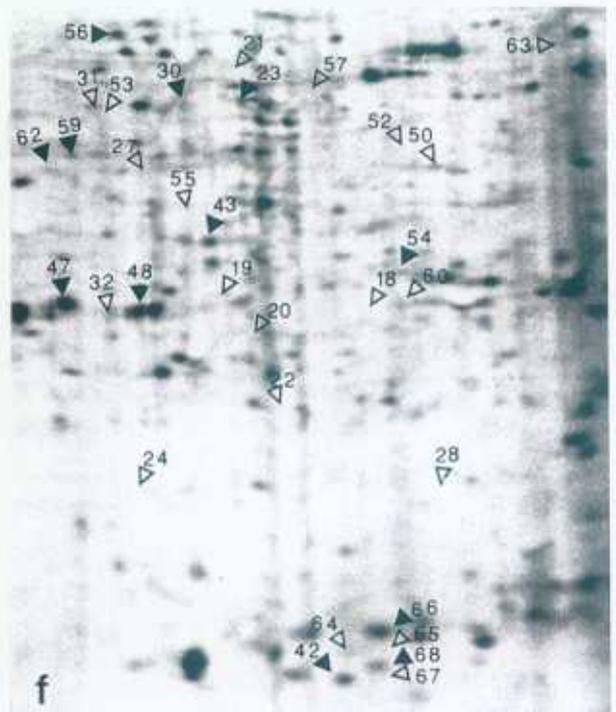
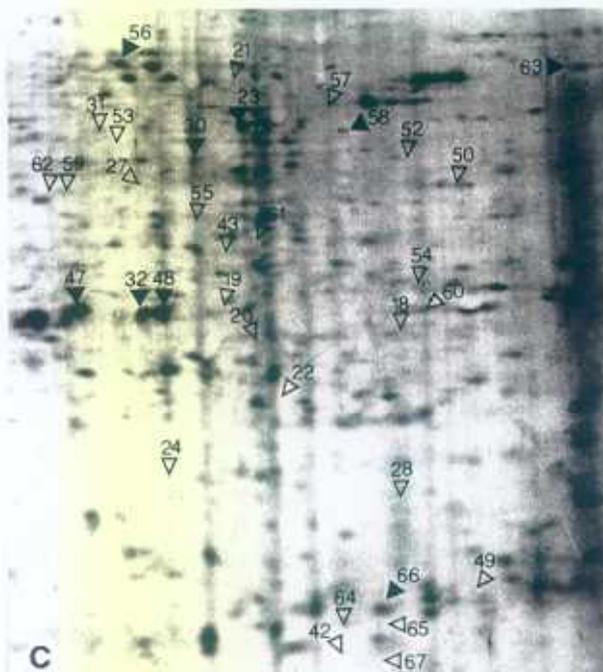
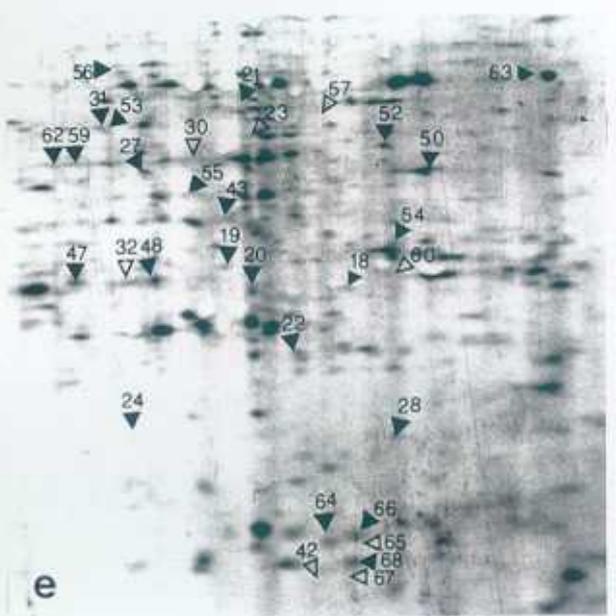
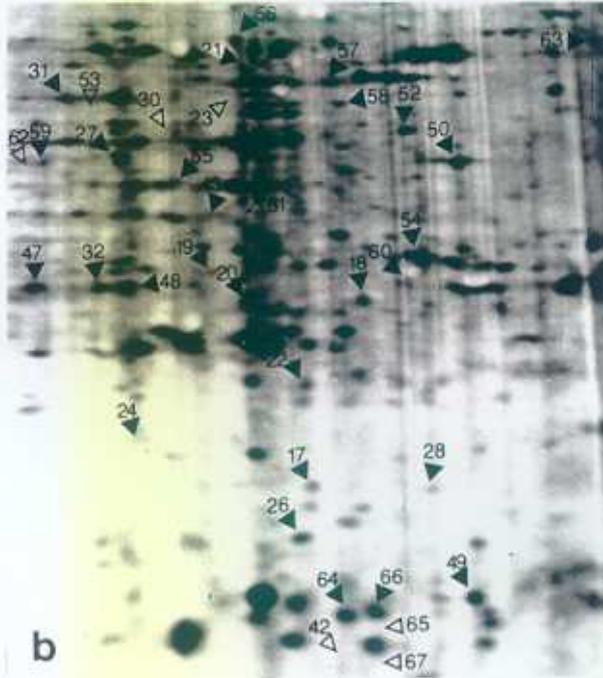
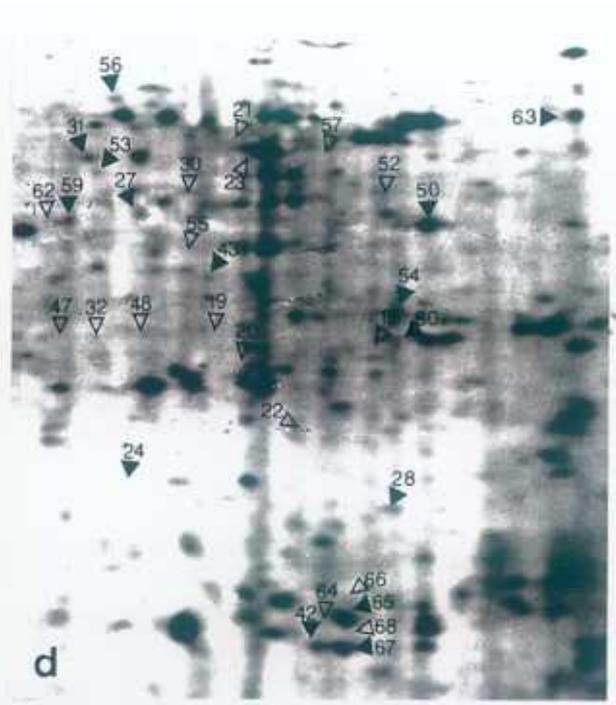
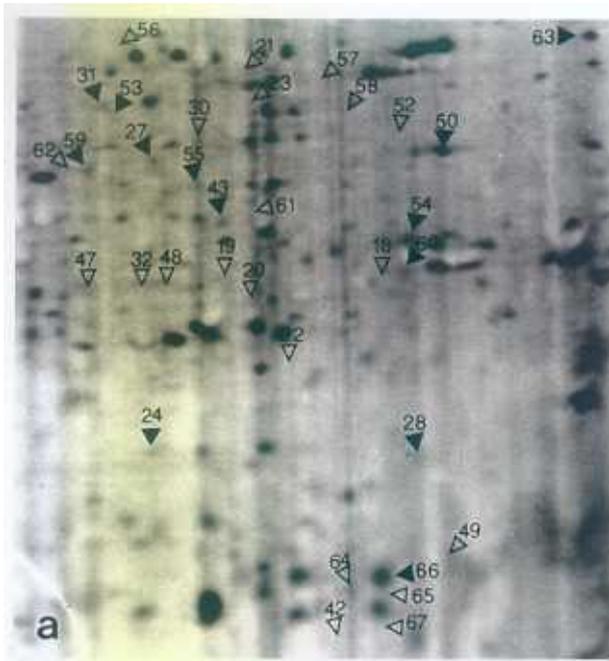
Los números corresponden a las proteínas indicadas en la Figura 3.

+ indica presencia de la proteína.

- indica ausencia de la proteína.

Figura 3 Geles de electroforésis bidimensionales de proteínas traducidas in vitro, a partir de ARN total, en tratamientos de sequía.

- a** T0 JA-605
- b** SF JA-605
- c** SS JA-605
- d** T0 C-8751
- e** SF C-8751
- f** SS C-8751



mientras que las proteínas 24, 27 y 28 no se expresaron en dicho tratamiento. Las proteínas 44 y 48 se tradujeron in vitro cuando los callos sufrieron los dos tipos de sequía.

Los restantes 22 polipéptidos mostraron una expresión diferente entre variedades.

Varias proteínas tuvieron una expresión diferencial en una única variedad, mientras que en la otra variedad su expresión no se pudo detectar en ninguno de los tres casos detectados. Entre las proteínas que se expresaron de forma diferencial y solo en la variedad resistente JA-605 se encontraron los polipéptidos 49, 50 y 57 en los tratamientos de sequía fuerte, y la proteína 32 en aquellos callos que fueron sometidos a los dos tipos de sequía.

Fueron 4 los polipéptidos cuya expresión no se pudo detectar en la variedad JA-605 mientras que en la variedad sensible a la sequía C-8751 mostraron el siguiente patrón de expresión: Las proteínas 42 y 67 estaban presentes en los callos control y de sequía suave y dejaron de traducirse in vitro después del tratamiento de sequía fuerte. La proteína 61 se pudo observar después de la sequía suave y la 62 en los dos tipos de tratamiento de sequía.

Del mismo modo, una serie de polipéptidos mostraron una expresión igual en los tres tiempos analizados en una de las variedades, mientras que en la otra se diferenciaban entre tratamientos. Aquellas proteínas que se diferenciaron por su expresión solo en la variedad JA-605 fueron las numeradas 31, 43, 54 y 59 que dejaron de observarse después de la sequía suave, y las proteínas 56 y 58 que no estaban presentes en los callos T0 y si lo estaban después de los dos tratamientos de sequía. Entre las proteínas que mostraron una misma expresión en las tres situaciones de la variedad JA-605 se encontraron: la proteína 63 que desapareció como consecuencia de la sequía suave y la proteína 66 que estaba ausente en T0 y se expresó después de los dos tipos de sequía.

La comparación tratamiento a tratamiento reveló los siguientes resultados: Comparando la sequía fuerte, 10 polipéptidos mostraron una expresión distinta entre ambos genotipos, aquellos que se pudieron observar en la variedad JA-605 fueron los números 32, 44, 45, 49, 50, 57, 60 y 68 y los números 53 y 62 estuvieron presentes en los patrones de sequía fuerte en la variedad C-8751.

La comparación de los dos tratamientos de sequía suave reveló que 11 proteínas se diferenciaron entre ambas variedades, los péptidos 31, 42, 43, 54, 59, 61, 62 y 68 solo se expresaron en la variedad C-8751, mientras que los polipéptidos 32, 54 y 63 lo hicieron en la variedad JA-605.

El análisis en forma conjunta de los dos tratamientos de sequía reveló los siguientes resultados: La proteína 32 se expresó después de los dos tratamientos de sequía solo en la variedad JA-605, las proteínas 44 y 45 se expresaron como consecuencia de los dos tratamientos en la variedad JA-605 mientras que en la otra variedad solo se expresaron en los callos que sufrieron sequía suave. Las proteínas 47 y 48, que ya se describieron por presentar el mismo patrón de expresión en las dos variedades, se expresaron en los dos tratamientos de estrés. Las proteínas 56 y 58 fueron exclusivas de la sequía en JA-605 ya que en la variedad C-8751, se expresaron en todo momento. La proteína 66 se expresó en todos los casos en la variedad JA-605 pero en la otra variedad mostró una expresión exclusiva de sequía. La proteína 62 se expresó en C-8751 debido a las dos situaciones de estrés pero nunca se detectó en la variedad JA-605.

6.2.3.- Presencia de ABA

La comparación de los cuatro patrones proteicos obtenidos a partir de callos control y callos tratados con ABA en las dos variedades de caña de azúcar se muestra en la Tabla III

Los polipéptidos que mostraron una expresión diferencial como consecuencia de este tratamiento fueron 54.

Entre las dos variedades 35 proteínas mostraron el mismo tipo de patrón. Las 16 proteínas numeradas de 15 a 23, 44, 45, 48, 49, 50, 64 y 68 se observaron en los callos tratados con ABA. Mientras que las proteínas de 1 a 14, 24, 25, 26, 46 y 63 no se expresaron en esa misma situación.

	JA-605		C-8751	
	T0	ABA	T0	ABA
1-14	+	-	+	-
15-23	-	+	-	+
24-26	+	-	+	-
33	-	+	-	-
34-38	+	-	+	+
39-41	+	+	+	-
42	-	-	+	-
44-45	-	+	-	+
46	+	-	+	-
48-50	-	+	-	+
52	-	+	-	-
54	+	-	+	+
55	+	+	-	+
56	-	-	+	-
57	-	+	-	-
58	-	-	+	-
63	+	-	+	-
64	-	+	-	+
65	-	-	+	-
66	+	-	-	+
67	-	-	+	-
68	-	+	-	+

Tabla III: Proteínas detectadas en 2D-PAGE obtenidas por traducción in vitro.

Los números corresponden a las proteínas indicadas en la Figura 4.

+ indica presencia de la proteína.

- indica ausencia de la proteína.

Figura 4 Geles de electrofóresis bidimensionales de proteínas traducidas in vitro, a partir de ARN total, en tratamientos con ABA.

a T0 JA-605

b ABA JA-605

c T0 C-8751

d ABA C-8751



Los restantes 19 polipéptidos varían en su expresión entre variedades. En los callos tratados con ABA de la variedad JA-605, se observaron los polipéptidos 33, 52 y 57 y dejaron de expresarse las proteínas 34, 35, 36, 37, 38 y 54.

No se detectó ninguna proteína que se expresara solo en los tratamientos de ABA de la variedad C-8751, aunque las proteínas 39, 40 y 41 dejaron de observarse en esa condición.

Las proteínas 42, 56, 58, 65 y 67 se detectaron únicamente en T0 de la variedad C-8751, mientras que en el tratamiento con ABA o en la otra variedad no se pudieron detectar. La proteína 55 se expresó en las dos situaciones en la variedad JA-605 y solo en el tratamiento de ABA de la variedad C-8751.

6.2.4.-Comparación entre los patrones de los tratamientos de sequía y las situaciones de embriogénesis somática

Los patrones de T0, T1, T2, sequía fuerte y sequía suave fueron comparados en bloque como embriogénesis vs. pérdida de agua y aquellas proteínas que mostraron una expresión regulada por ambas situaciones se enumeraron en la Tabla IV

De estos 17 polipéptidos solo la proteína 30 tuvo un comportamiento idéntico en las dos variedades, estando presente en T2 y en los tratamientos de sequía suave.

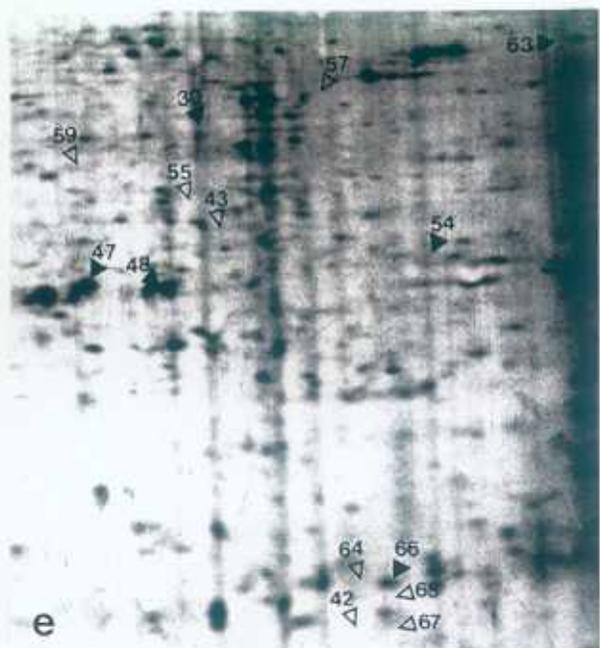
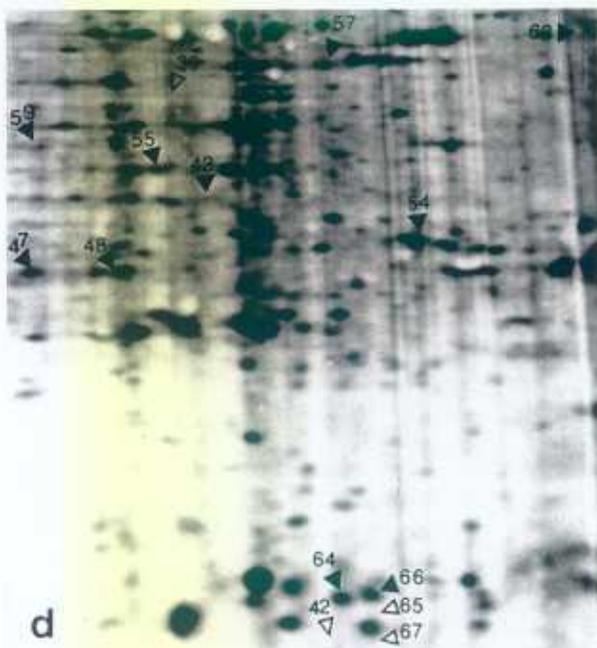
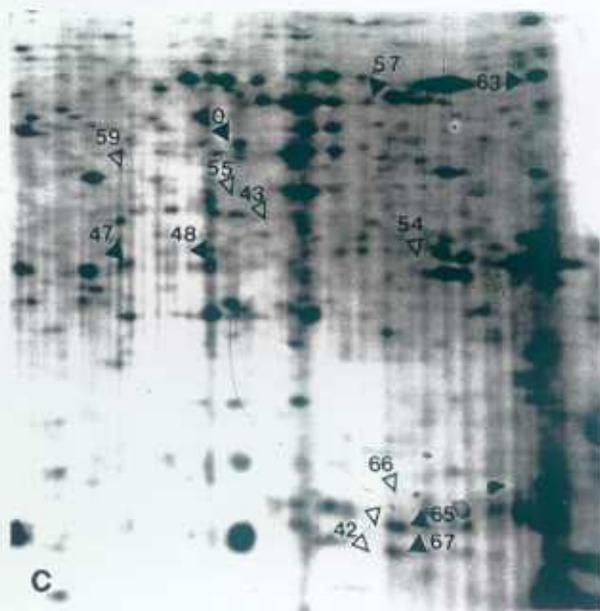
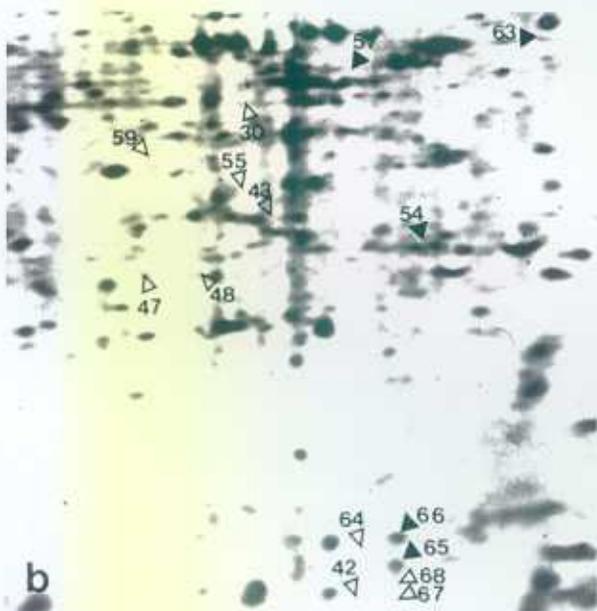
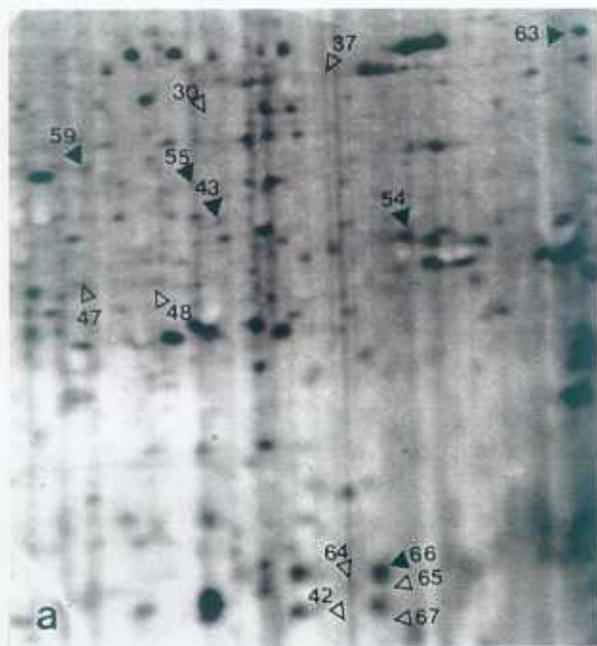
Los restantes 16 polipéptidos presentaron diferencias en su patrón de expresión entre las dos variedades.

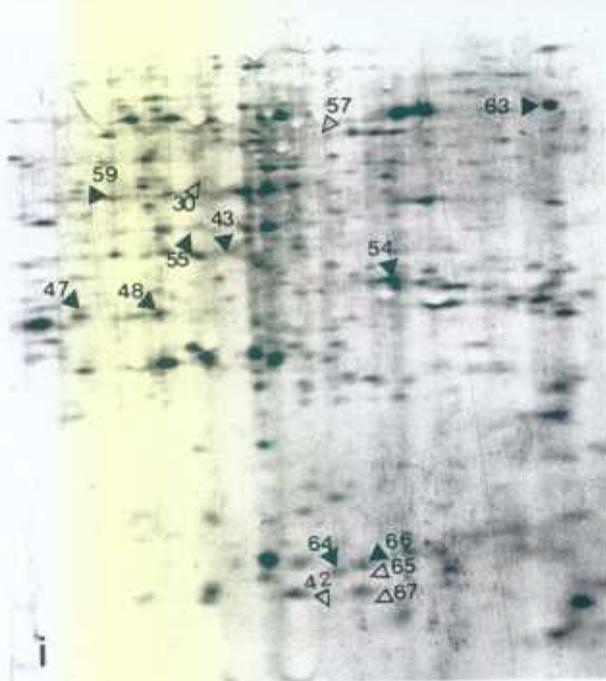
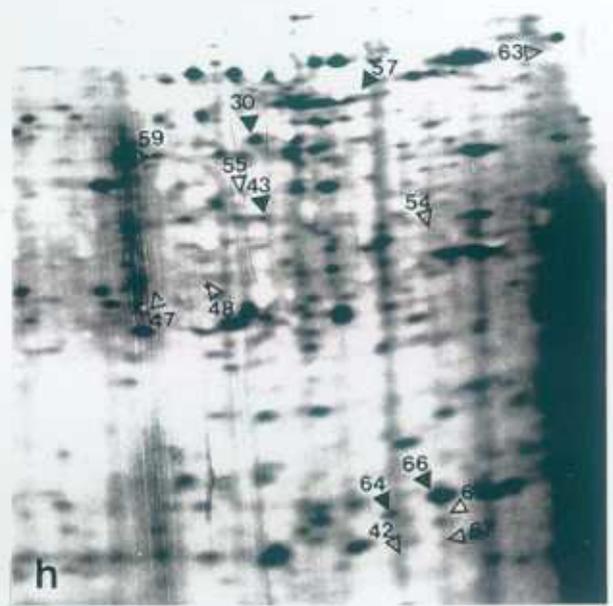
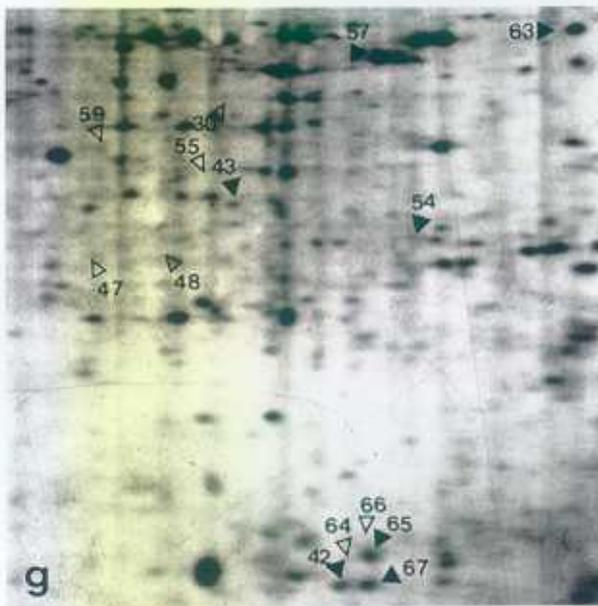
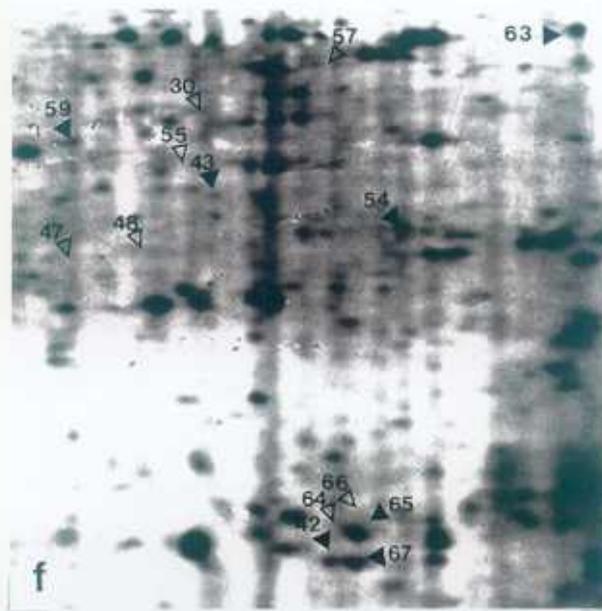
Los polipéptidos 43, 47, 48, 54, 55, 57 y 59 mostraron una expresión relacionada entre situaciones de embriogénesis y estrés hídrico solo en la variedad JA-605 ya que en la otra variedad su expresión era modificada por una única situación. Por otra parte los polipéptidos 42, 61, 62, 63, 64, 65, 66 y 67 mostraron solo en la variedad sensible su presencia o ausencia regulada tanto por situaciones de embriogénesis como de sequía.

La proteína 60 presentó en las dos variedades un patrón diferencial como consecuencia tanto de la embriogénesis como la sequía, aunque distinto entre ambas. Así en JA-605 su expresión

	JA-605					C-8751				
	T0	T1	T2	SF	SS	T0	T1	T2	SF	SS
30	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
42	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
43	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
47	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
48	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
54	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
55	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
57	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
59	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+
60	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
61	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
62	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
63	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
64	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
65	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
66	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
67	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+

Tabla IV: Proteínas detectadas en 2D-PAGE obtenidas por traducción in vitro. Los números corresponden a las proteínas indicadas en la Figura 5.
+ indica presencia de la proteína.
- indica ausencia de la proteína.





se reprimió en T1, T2 y sequía suave y en la var. C-8751 se reprimió en T1, sequía fuerte y suave.

Algunas proteínas se tradujeron como consecuencia tanto de los dos tratamientos de sequía como en T2. En la variedad JA-605 fueron las proteínas 47 y 48, que en la otra variedad se detectaron solo en sequía fuerte y sequía suave, y en la variedad C-8751 fue la proteína 66. En esta última variedad y en las tres condiciones mencionadas la proteína 65 dejó de expresarse.

En la variedad JA-605 las proteínas 43, 55 y 59 desaparecieron de los patrones T1, T2 y sequía suave. Su comportamiento en la variedad sensible fue completamente distinto ya que la número 43 se detectó en las 5 situaciones, la número 55 fue observada solo en sequía fuerte y la número 59 desapareció de T1 y T2. Hubo una sola proteína que se expresó en T1, T2 y sequía suave y fue la proteína 61 en la variedad C-8751 (en la otra variedad su expresión se detectó en T1 y T2).

La proteína 62 se observó en T1, sequía fuerte y sequía suave en la variedad C-8751 pero en la otra variedad estuvo presente únicamente en T2.

La proteína 54 en la variedad JA-605 y la proteína 63 en la variedad C-8751 desaparecieron de los patrones de T2 y sequía suave, pero su comportamiento en la otra variedad fue completamente distinto ya que la primera solo desapareció de T2 pero la segunda estuvo presente en todos los patrones de JA-605.

En la var. C-8751 la mancha 42, que nunca se detectó en la otra variedad, así como la 67 desaparecieron de los patrones T2 y sequía fuerte, por otra parte la mancha 67 también dejó de observarse en sequía suave.

Una única proteína se expresó en las situaciones de T1, T2 y sequía fuerte, fue la proteína 57 en la variedad JA-605, que en la otra variedad fue solo observada en los tiempos de embriogénesis.

6.2.5.- Comparación de la respuesta frente al tratamiento de ABA y la embriogénesis somática.

Estos 13 polipéptidos mostraron un patrón diferencial de expresión provocado por dos situaciones diferentes como la embriogénesis somática y el tratamiento con ABA, como se ve en la Tabla V

Solo las proteínas 25 y 26 mostraron un patrón de expresión idéntico en las dos variedades, desapareciendo de los callos en T2 y tratados con ABA.

Las restantes 11 proteínas se comportaron de diferente forma en las dos variedades.

Dentro de este grupo se encontraron algunas proteínas que respondían de igual forma tanto a la presencia de ABA como al tiempo T2 de la embriogénesis somática. Así en JA-605 desaparecieron las manchas 54 y 66, mientras que la mancha 48 se observó en ambas situaciones. En la otra variedad estas dos proteínas fueron diferenciales para el T2 y para el tratamiento de ABA respectivamente.

En la variedad C-8751 también se observó este patrón de expresión conjunto para T2 y ABA en las proteínas 42, 63, 65 y 67 que dejaron de expresarse, mientras que las proteínas 64, 66 y 68 si expresaron. Estas 7 proteínas mostraron patrones de expresión muy diferentes en la variedad JA-605, así la proteína 42 nunca se pudo observar en la variedad JA-605 y la proteína 63 y 64 solo mostraron un patrón diferencial en los tratamientos de ABA.

Aquí nuevamente surgió el problema de los péptidos 65, 66, 67 y 68 en la variedad JA-605.

Los polipéptidos 46 y 57 mostraron el mismo patrón de expresión en T1, T2 y el tratamiento de ABA en la variedad JA-605. El polipéptido 46 dejó de observarse y el 57 se expresó en los 3 casos, mientras que en la otra variedad el primero desaparecía solo de los tratamientos con ABA y el segundo se expresó en los dos tiempos de embriogénesis.

	JA-605				C-8751			
	T0	T1	T2	ABA	T0	T1	T2	ABA
25-26	+	+	-	-	+	+	-	-
42	-	-	-	-	+	+	-	-
46	+	-	-	-	+	+	+	-
48	-	-	+	+	-	-	-	+
54	+	+	-	-	+	+	-	+
57	-	+	+	+	-	+	+	-
63	+	+	-	-	+	+	-	-
64	-	-	-	+	-	-	+	+
65	-	+	-	-	+	+	-	-
66	+	+	-	-	-	-	+	+
67	-	-	+	-	+	+	-	-
68	-	-	-	+	-	-	+	+

Figura 6 Cielas de electroforesis bidimensionales de proteínas traducidas in vitro, a partir de ARN total, en distintos estadios de embriogénesis somática y tratamientos de ABA.

• T0 JA-605

Tabla V. Proteínas detectadas en 2D-PAGE obtenidas por traducción in vitro. Los números corresponden a las proteínas indicadas en la Figura 6.

+ indica presencia de la proteína.

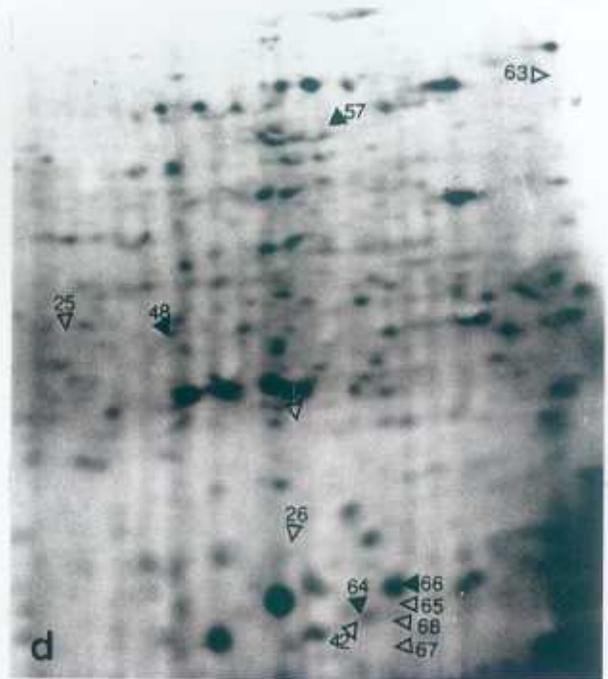
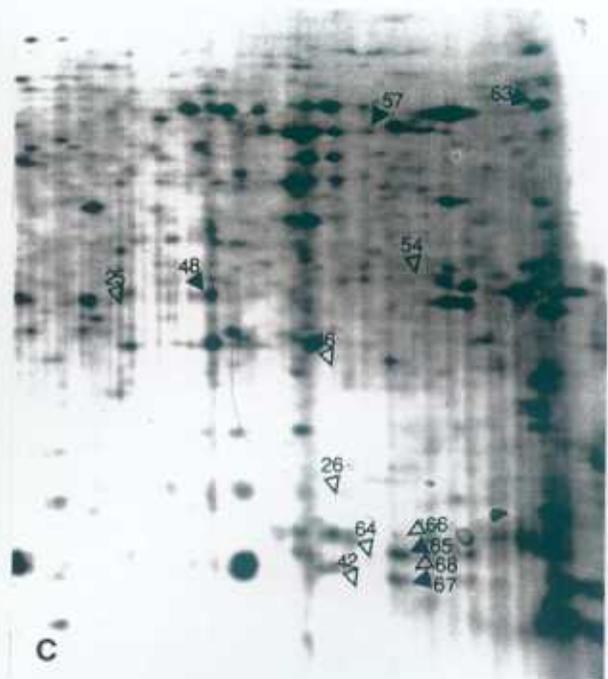
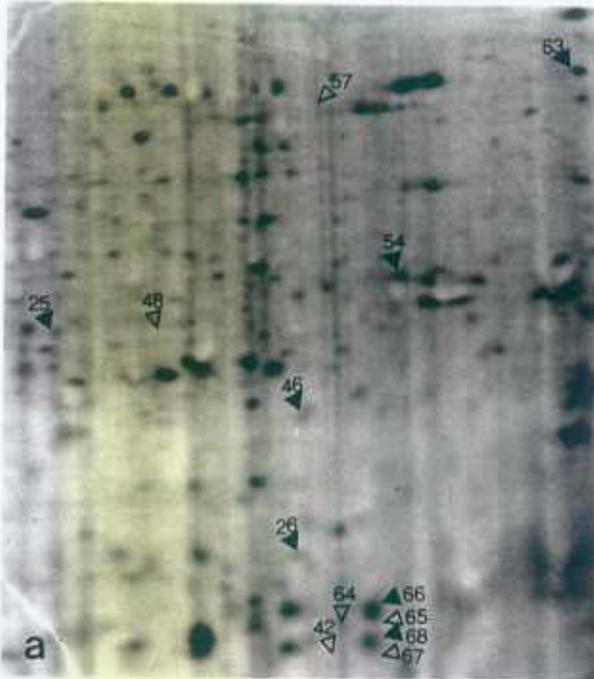
- indica ausencia de la proteína.

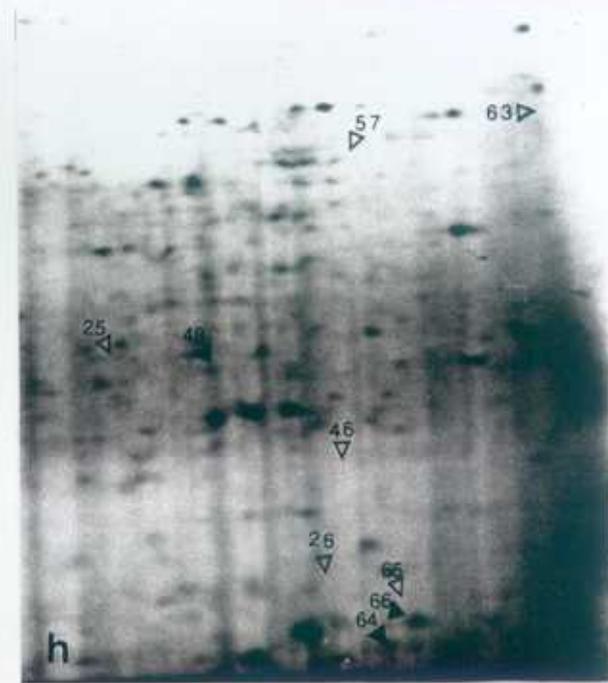
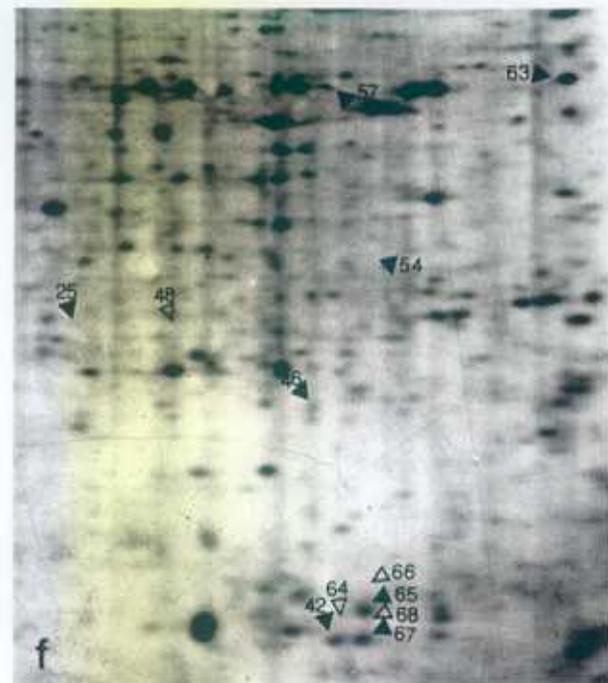
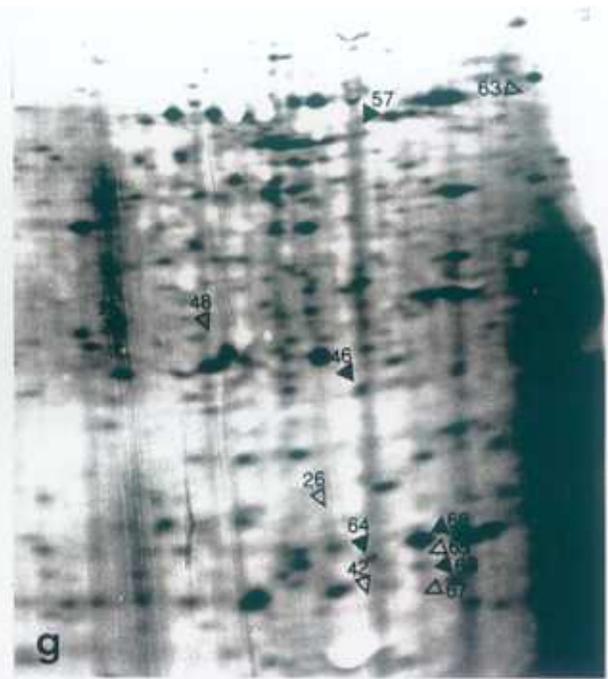
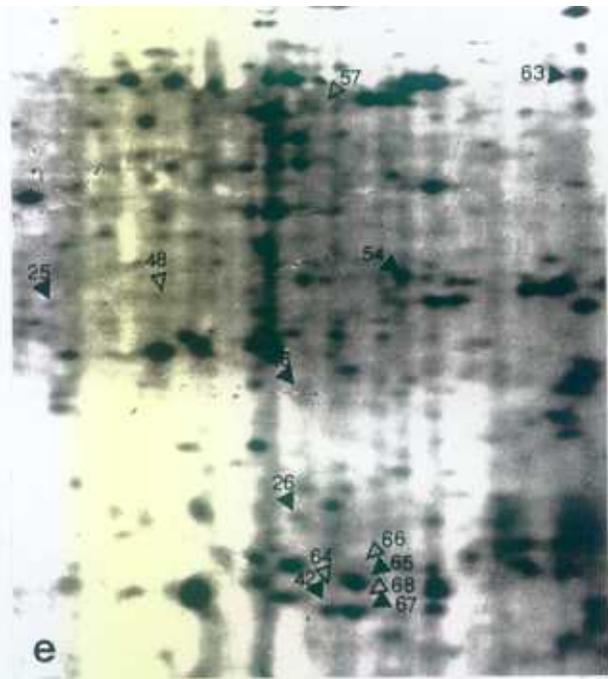
• T0 C-8751

f T1 C-8751

g T2 C-8751

h ABA C-8751





6.2.6.- Comparación de los patrones proteicos obtenidos de los tratamientos de sequía y de ABA

En la Tabla VI se muestran aquellas proteínas que presentaron una regulación similar tanto por los tratamientos de sequía como de ABA. En total fueron 22 polipéptidos.

Los 10 polipéptidos, del 17 al 22, 23, 24, 48 y 64 mostraron en las dos variedades la misma respuesta. Tanto en el tratamiento de ABA como en el de sequía fuerte se observaron las proteínas numeradas del 17 al 22 y la 64. Las proteínas 23 y 24 mostraron igual comportamiento frente a la sequía suave y el ABA, pero mientras la primera se expresó en estos tratamientos, la segunda dejó de expresarse. La proteína 48 apareció tanto por la presencia de ABA como por los dos tratamientos de sequía.

Los polipéptidos con patrones diferentes entre variedades fueron 12.

En la variedad JA-605 no se pudieron observar en ninguna de las situaciones analizadas los polipéptidos 65 y 67, que en la variedad C-8751 se detectaron solo en T0.

En la variedad C-8751 el polipéptido 57 no se expresó en ninguno de los casos pero en la variedad JA-605 se expresó tanto con ABA como con sequía fuerte.

Asimismo en la variedad sensible la proteína 54 se tradujo en las cuatro situaciones y mostró una expresión diferencial en la variedad resistente al dejar de expresarse en sequía suave y ABA.

Además de los polipéptidos 17 a 22 y 64 que ya se describieron por presentar la misma regulación en las dos variedades, existen otras proteínas que se pudieron observar después de los tratamientos de ABA y sequía fuerte. En la variedad JA-605 fueron las proteínas 49, 50, 52 y 57 que en la otra variedad se expresaron de la siguiente forma: 49 y 50 en los tratamientos de ABA, 52 en el tratamiento de sequía fuerte y el 57 que ya se mencionó por no encontrarse en ninguno de los patrones de la variedad C-8751. Por otra parte en esta última

	JA-605				C-8751			
	T0	ABA	SF	SS	T0	ABA	SF	SS
17-22	-	+	+	-	-	+	+	-
23	-	+	-	+	-	+	-	+
24	+	-	+	-	+	-	+	-
44-45	-	+	+	+	-	+	-	+
48	-	+	+	+	-	+	+	+
49-50	-	+	+	-	-	+	-	-
52	-	+	+	-	-	-	+	-
54	+	-	+	-	+	+	+	+
55	+	+	+	-	-	+	+	-
57	-	+	+	-	-	-	-	-
63	+	-	+	+	+	-	+	-
64	-	+	+	-	-	+	+	-
65	-	-	-	-	+	-	-	-
66	+	-	+	+	-	+	+	+
67	-	-	-	-	+	-	-	+

Figura 7. Geles de electroforesis bidimensional de proteínas traducidas in vitro, a partir de ARN total, en distintos tratamientos de ABA y sequía.

a T0 JA-605

b ABA JA-605

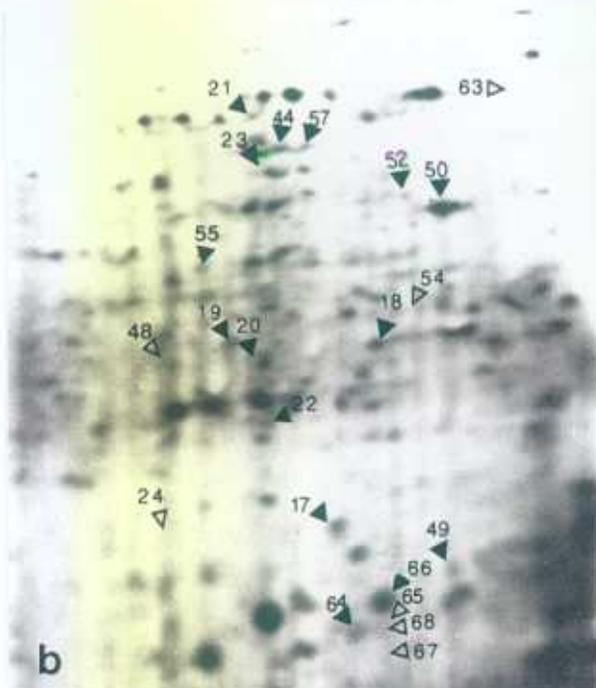
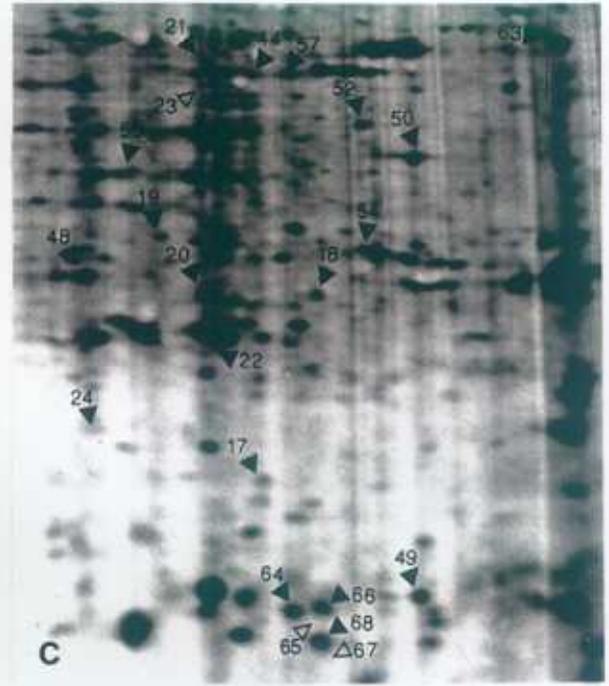
Tabla VI. Proteínas detectadas en 2D-PAGE obtenidas por traducción in vitro. Los números corresponden a las proteínas indicadas en la Figura 7.

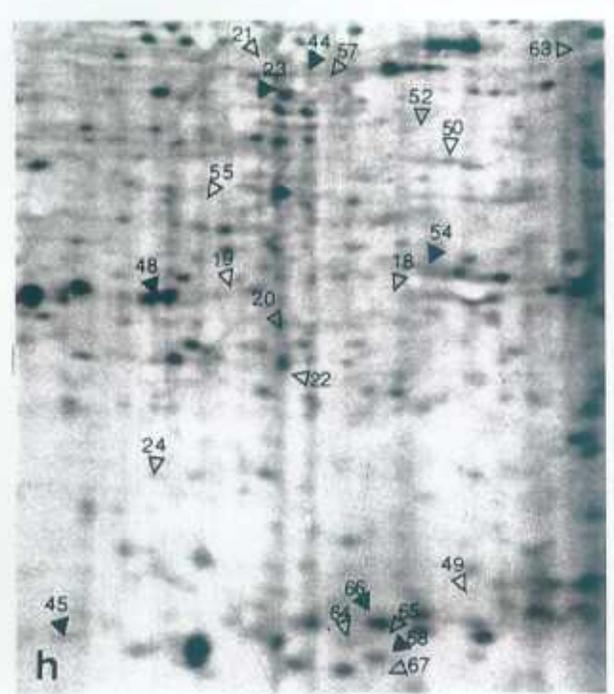
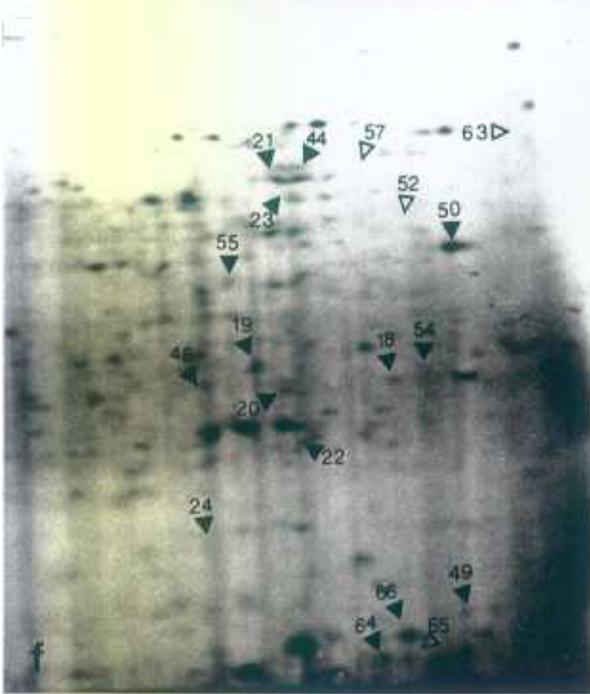
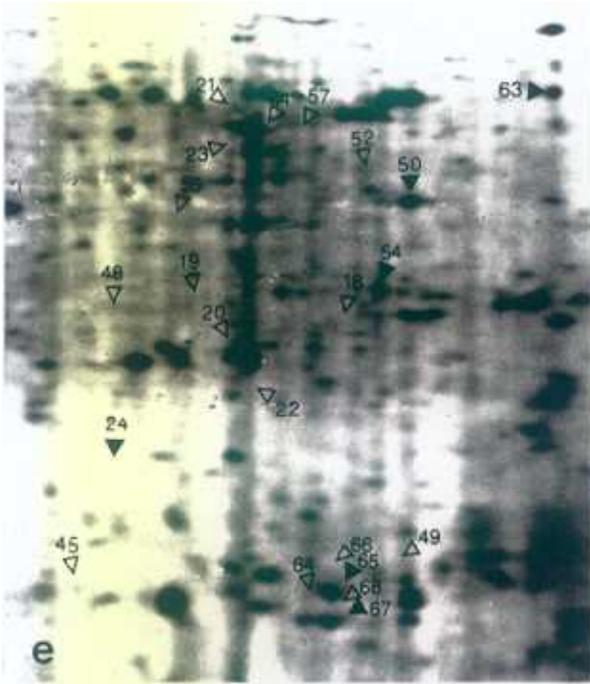
+ indica presencia de la proteína.

- indica ausencia de la proteína.

g SF C-8751

h SS C-8751





variedad el polipéptido 55 se expresó por los tratamientos de ABA y sequía fuerte, mientras que en la variedad JA-605 se encontró también en los patrones T0.

Las proteínas 44 y 45 se expresaron en los 3 tratamientos de la variedad JA-605 pero en la otra variedad solo se expresaron en el tratamiento de ABA y sequía suave. A su vez la proteína 66 también se expresó en los 3 tratamientos pero en la variedad C-8751 y en la otra variedad su expresión se detectó en T0, sequía fuerte y sequía suave.

6.2.7.- Comparación conjunta de las 3 situaciones

Al observar en forma conjunta todos los datos, comparando las 2 variedades y todas las situaciones se obtuvo la Tabla VII.

Todas las proteínas fueron analizadas en las distintas tablas parciales. Solo quedaron por comentar aquellos casos donde se observó una respuesta común entre algún momento de la embriogénesis somática, el tratamiento de ABA y los tratamientos de sequía.

Así en la variedad JA-605 la proteína 48 se expresó en T2, ABA y los dos tratamientos de sequía y la proteína 57 en T1, T2 y los tratamientos de ABA y sequía fuerte. En esta misma variedad la proteína 54 desapareció de los patrones de T2, ABA y sequía suave. En la variedad C-8751 la proteína 64 apareció en las situaciones de T2, ABA y sequía fuerte, y la proteína 66 se expresó además en la sequía suave.

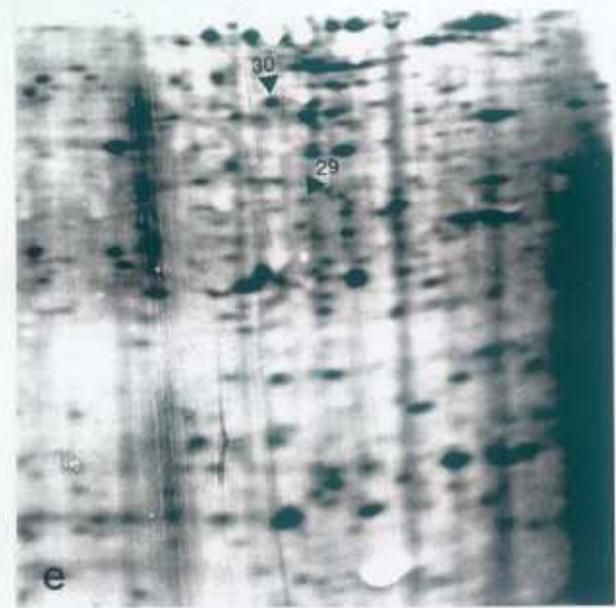
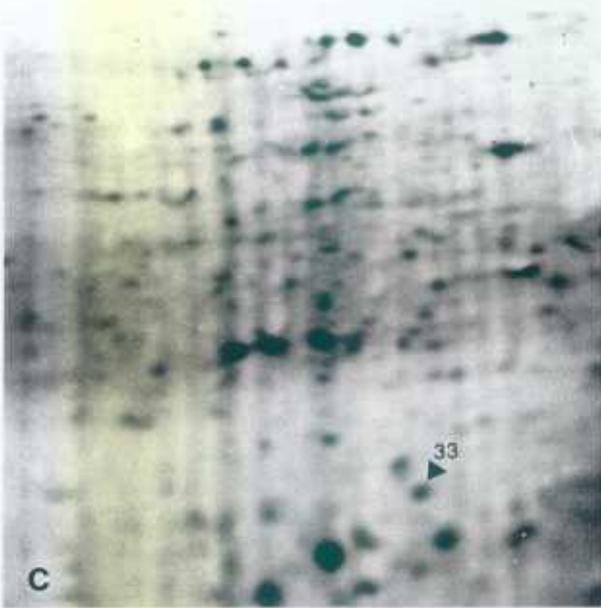
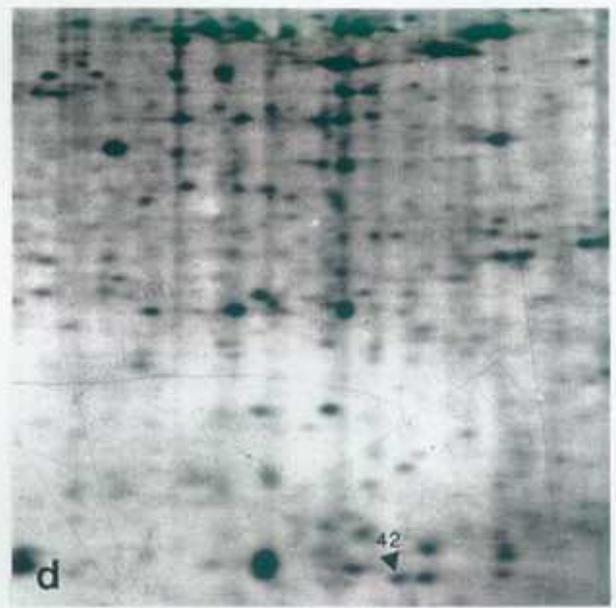
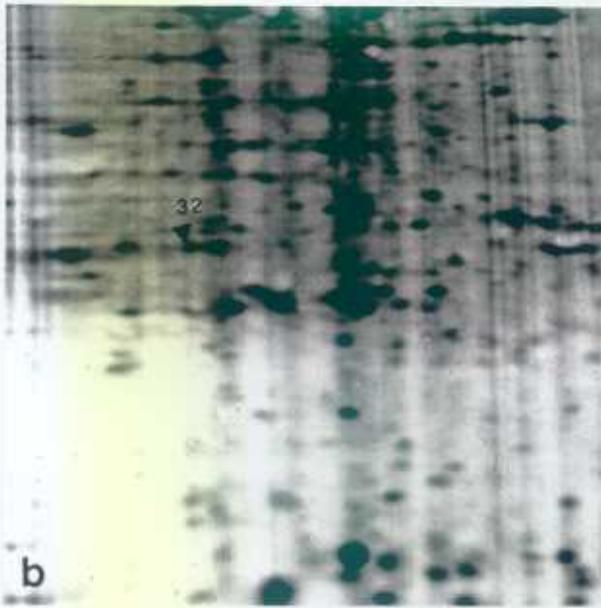
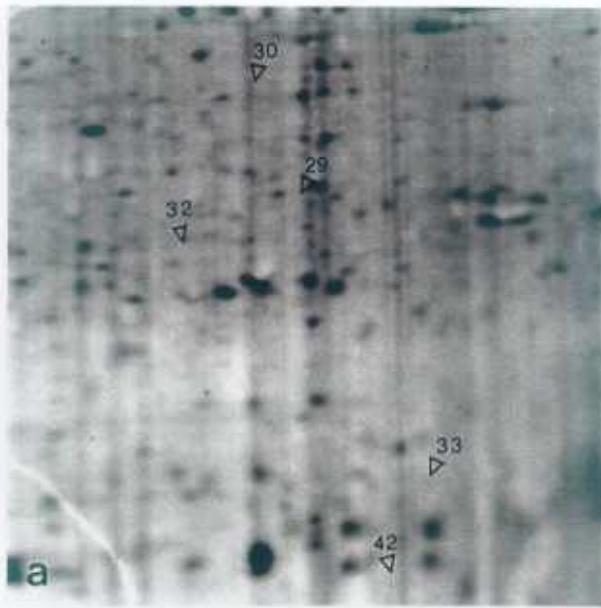
Los polipéptidos que dejaron de expresarse por el conjunto de tratamientos fueron cuatro. Las manchas 42 y 67 desaparecieron de los patrones en T2, ABA, y sequía fuerte. La proteína 63 no se observó en T2, ABA y sequía suave. Por último la proteína 65 no se pudo detectar en los patrones de T2 ni en los tratamientos con ABA o de sequía.

Esta comparación de todos los datos permitió ver numerosas situaciones:

	T0	T1	T2	ABA	SF	SS	T0	T1	T2	ABA	SF	SS
1-14	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
15-16	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
17-22	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
23	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
24	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
25-26	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
27-28	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
29	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
30	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
31	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
32	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
33	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
34-38	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
39-41	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
42	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
43	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
44-45	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
46	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
47	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
48	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
49-50	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
52	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
53	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
54	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
55	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
56	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
57	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
58	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
59	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
60	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
61	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
62	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
63	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
64	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
65	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
66	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
67	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
68	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+

Tabla VII: Proteínas detectadas en 2D-PAGE obtenidas por traducción in vitro. Los números corresponden a las proteínas indicadas en la Figura 8 y en las figuras anteriores.

+ indica presencia de la proteína.
 - indica ausencia de la proteína.



Los 30 polipeptidos numerados del 1 al 30 presentaron un comportamiento idéntico en las dos variedades de caña de azúcar.

Aquellas proteínas del 1 al 16 mostraron un patrón diferencial solo en aquellos callos tratados con ABA, las primeras 14 se reprimieron y las dos últimas se expresaron solo en ese caso.

Las proteínas que solo se indujeron en los tratamientos de ABA y sequía fuerte, fueron seis: 17, 18, 19, 20, 21 y 22. Las proteínas que se regularon por ABA y sequía suave fueron dos, la 23 que se expresó y la 24 que se reprimió.

Los polipeptidos 25 y 26 desaparecieron de los patrones de T2 y ABA.

Los polipeptidos 27 y 28 desaparecieron solo de los patrones de sequía suave.

La proteína 29 se expresó a lo largo de la embriogénesis somática, aunque en JA-605 lo hizo en T1 y en la variedad C-8751 en T2.

Por último la proteína 30 se expresó en las condiciones de T2 y de sequía suave.

Todas las restantes proteínas presentaron un comportamiento diferente entre los dos genotipos.

Dentro de este grupo, 10 proteínas mostraron una expresión diferencial en una sola variedad y debido a una única situación.

Caracterizaron a la variedad JA-605 la mancha 31 que desapareció solo de los patrones de sequía suave y las proteínas numeradas de 34 a 38 que desaparecieron por el tratamiento con ABA, Estos polipéptidos no mostraron expresión diferencial en la otra variedad. En esta misma variedad se observó la expresión exclusiva de dos polipéptidos, el 32 que apareció en los dos tratamientos de sequía y el 33 solo en el tratamiento de ABA.

En la variedad C-8751, como consecuencia del tratamiento de ABA, desaparecieron las proteínas 39 a 41.

Otras dos proteínas mostraron un patrón diferencial en una sola de las variedades. La proteína 42 nunca se pudo observar en la var. JA-605 y en la variedad C-8751 apareció en los patrones de T0, T1 y sequía suave. La proteína 43 estuvo presente en todos los patrones de

C-8751 y en la otra variedad solo estuvo presente en los patrones de T0, ABA y sequía fuerte.

7.- ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis de componentes principales aplicado a la presencia o ausencia de proteínas ha permitido situar los diferentes tratamientos con referencia a los 3 ejes principales de variación, como se muestra en el Figura 9.

El primer componente explica el 46,79 % del total de la varianza, el segundo el 13,15 % y el tercero el 10,77 %. El total de los tres componentes explica el 70,71 % de la varianza total.

En esta Figura se observa que las muestras se ordenan a lo largo del primer componente principal en dos grupos bien diferenciados, uno de ellos formado por los tratamientos de ABA en las dos variedades y el otro grupo incluye las restantes situaciones estudiadas.

El segundo eje principal de variación muestra tres grupos, un grupo esta constituido por los tratamientos de sequía fuerte en ambas variedades, el segundo grupo lo forman los tratamientos de sequía suave y muy cercano a este último se encuentran los tiempos T0, T1 y T2.

La cercanía entre los tratamientos de sequía suave y los tiempos de embriogénesis que se observa a lo largo del segundo eje, se resuelve gracias al tercer componente principal. Este tercer eje también diferencia, aunque no tan marcadamente, los T2 de los tiempos T1.

En general se observa que las muestras se distribuyen en función del tratamiento ya que en cada uno de los tratamientos o tiempos analizados, las dos variedades aparecen juntas. No se observa un agrupamiento por variedad sino por tratamiento.

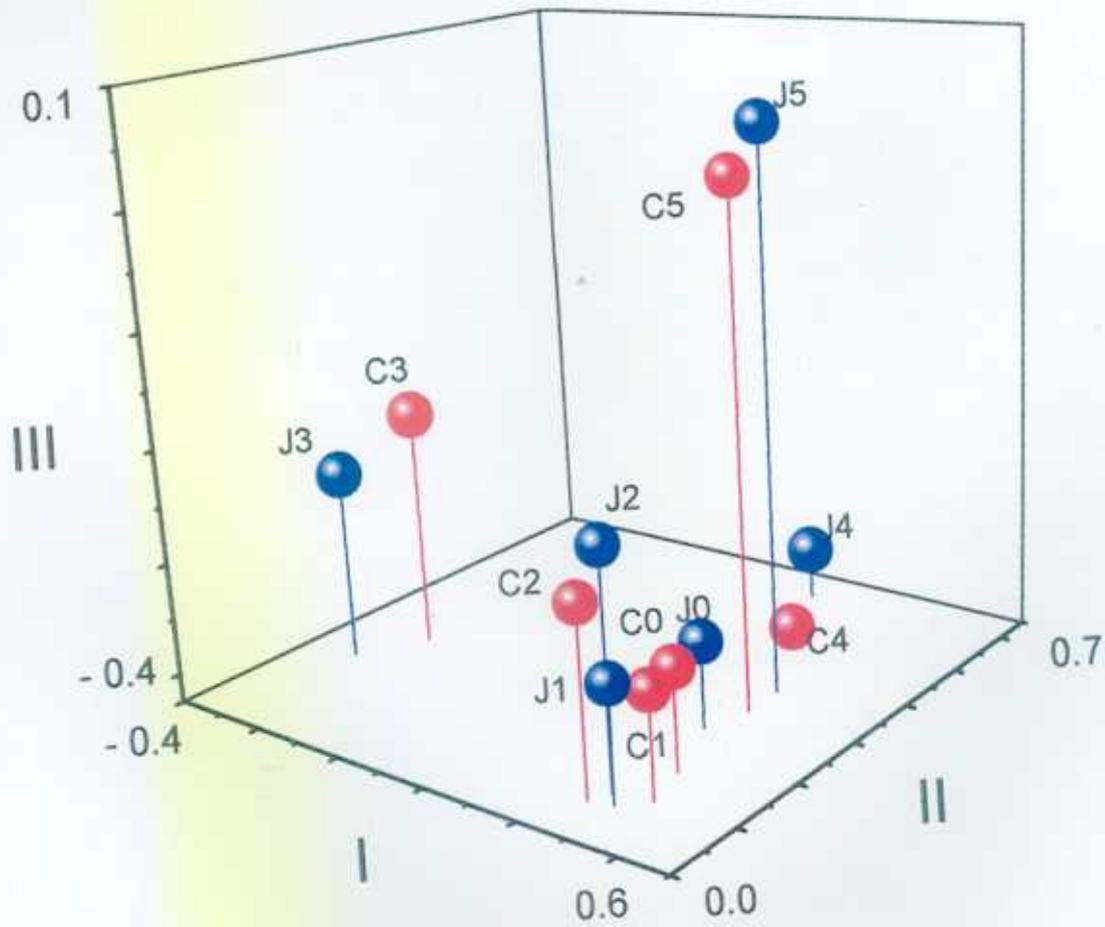


Figura 9.- Análisis de componentes principales

J: JA-605	C: C-8751
0: T0	3: ABA 24 h.
1: T1	4: sequía fuerte
2: T2	5: sequía suave

8. ESTUDIO DE UN GEN TIPO Em

A partir de las zonas altamente conservadas de la secuencia publicada por Williams y Tsang (1991) del clon Emb 564 de ADN copia de maíz, que se expresaba durante la embriogénesis y se inducía por ABA y del clon Em de ADN copia de trigo de (Litts et al., 1987), se diseñaron dos oligonucleótidos utilizando el programa Oligo. Además en sus extremos 5' se agregaron las dianas para la enzima de restricción Eco RI.

Estos oligonucleótidos se utilizaron como cebadores en una reacción de amplificación, donde como molde se utilizó ADN genómico de la variedad JA-605 de caña de azúcar. Como control positivo se utilizaron los ADN de trigo y maíz.

Los productos de esta PCR se resolvieron en una electroforesis en gel de agarosa y se pudo observar una banda de unos 300 pb. El ADN de esa banda se purificó a través de un GeneClean y se clonó en el plásmido Bluescript II SK⁻. Los extremos cohesivos tanto del inserto como del plásmido se obtuvieron cortando con Eco RI, aprovechando las dianas que llevaban en sus extremos 5' los cebadores utilizados en la amplificación.

Una vez transformadas las bacterias de la cepa DH5 α , se seleccionaron aquellas colonias transformadas positivamente utilizando el sistema enzima-sustrato de XGal - IPTG.

El ADN aislado del clon CM1 se digirió con Eco RI y el inserto liberado se utilizó como sonda para analizar:

- el patrón de expresión de este clon.
- el n° de copias que presentaba en el genoma.

8.1.-Análisis de la secuencia del clon CM1

La secuencia obtenida del clon CM1 así como la proteína resultado de su traducción se muestran en la Figura 10

```

a   GAG GGC GAG ACC GTC GTC CCC GGC GGG ACC GGC GGC AAG AGC GTC
b   E   G   E   T   V   V   P   G   G   T   G   G   K   S   V

a   GAG GCC CAG GAG CAC CTC GCC GAA GGT ACGCAATAACCGAGTGCCAGCGC
b   E   A   Q   E   H   L   A   E   G   -----

a   CAGCCATCTTTATTAATTTCTGGTGTGGCTTTAATTGCCTCGAGTCCTCGACGTTTG
b   -----

a   CATGCAGGG CGC AGC CGC GGG GGG CAG ACT CGC AAG GAG CAG CTG
b   ----- R   S   R   G   G   Q   T   R   K   E   Q   L

a   GGG CAT GAG GGG TAC AGC GAG ATG GGG AAG AAG GGC GGT CTG AGC
b   G   H   E   G   Y   S   E   M   G   K   K   G   G   L   S

a   ACC ACG GAG GAG TCC GGC GGC GAG CGC GGC GCC AGG GAG GGT GTC
b   T   T   E   E   S   G   G   E   R   G   A   R   E   G   V

a   GAC A
b   D

```

Figura 10 Secuencia de nucleótidos del clon CM1 (a) base 1-72 exón 1, bases 166-294 exón 2 bases 73-165 intrón. Secuencia de aminoácidos (b) deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del clon CM1. Aparece subrayada la zona del intrón.

Una búsqueda utilizando los programas BLASTN y BLASTX mostró que esta secuencia estaba relacionada con genes Lea muy parecidos al gen Em de trigo (Litts et al.1987). De la comparación con estas secuencias se dedujo la existencia de un intrón que abarcaba desde la base número 73 a la base número 163, siendo el tamaño del inserto de 293 pares de bases.

Las secuencias, tanto nucleotídicas como de aminoácidos, de los genes que presentaban una mayor homología con el clon CM1 fueron comparadas utilizando la aplicación *pileup* del programa GCG. Los alineamientos obtenidos cuando se comparan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se recogen en la Figuras 11 y 12.

Por otro lado se ha calculado el porcentaje de homología entre la secuencia nucleotídica y de aminoácidos del clon CM1 y las descritas en otros genes tipo Em, utilizándose la aplicación *gap* del programa GCG. Estos resultados se recogen en la Tabla VIII en la que se ha indicado el porcentaje de identidad y de similitud en la secuencia de aminoácidos, así como el porcentaje de homología en la secuencia nucleotídica del exón 1, exón 2 y del intrón. Se observa la existencia de una gran homología tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos en todas las comparaciones realizadas con la región codificadora. La mayor homología se encontró con el gen Emb 564 de maíz (91.045% de aminoácidos idénticos) y la menor con el gen Em de *Arabidopsis thaliana* (76.119% y 74.627% de aminoácidos idénticos). Sin embargo la homología en la zona del intrón fue baja en todos los casos.

Por otro lado se ha comparado las secuencias de aminoácidos de tres miembros de la familia génica B19 de cebada (Figura 13), observándose que aunque la longitud de la proteína es diferente el gen gB19.1b presenta una gran homología con otros miembros de la familia.

8.2- Análisis de la expresión del clon CM1

Para conocer la expresión de este clon se extrajo el ARN total de distintas muestras y se realizó una hibridación tipo Northern.

Figura 11 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de genes *Lea* tipo *Em* en distintas especies.

Cebada	gB19.1b
Caña	CM1
Trigo	Em H5
Arroz	Osem
Maíz	Emb 564
<i>A. Thaliana</i>	Em-like
Zanahoria	EMB-1

	1				50
Cebada	aaggcccgcg	aggggtgagac	cgtcgtcccc	ggcggcaccg	gtgggaagag
CañaCG	AGGGCGAGAC	CGTCGTCCCC	GGCGGGACCG	GCGGCAAGAG
Trigo	atggcccgcg	agggggagac	cgtcgtcccc	ggcggcaccg	gtgggaagag
Arroz	atggccaggg	agggccagac	cgtcgtcccc	ggcggcaccg	gchgcaagag
Maiz	aaggctcgcg	agggcgagac	cgtcgtcccc	ggcgggaccg	gchgcaagag
A. thaliana	agggcaaaga	agggcgagac	cgtcgtgcca	ggtggtacgg	gaggcaaaag
Zanahoria	agggcgaggc	aaggagagac	cgtggttctt	ggcgggactg	gtgggaagag

	51				100
Cebada	cctcgaggcg	cacgataacc	tcgccgaagg	tacgtgcatg	cgcgagaat
Caña	CGTCGAGGCC	CAGGAGCACC	TCGCCGAAGG	TACG.CAATA	ACCGAGTGCC
Trigo	cctcgaggcg	caggagcacc	tcgccgacgg	ta.....tgcttc
Arroz	cctcgaggcc	caggagaacc	tcgccgaggg	tatgcaaat	aatactgaaa
Maiz	cgtcgaggcc	caggagcacc	tcgccga...
A. thaliana	cttcgaagct	caacagcatc	tcgctgaagg	t.cattctt.tctc
Zanahoria	tcttgaagcc	cagcagcacc	ttgctgaagg	tacatgcat.ataa

	101				150
Cebada	gtcgatgtac	tgattgcttgag	cgatctgtga	cctcccatac
Caña	AGCGCCAGCC	ATCTTTATTAAT	TTCCTGGTGT	TGGCTTTAAT
Trigo	ctctacttgc	gtttcgcttgag	cgacctgtga	cttctggtac
Arroz	cttttgatag	atcaaacttg	ccatttcatt	cggtatttcg	gttgaagtac
Maiz
A. thaliana	ttattcatgg	ttgcgtatgt	ttcaagttag	gtatttaggc	tagagta..a
Zanahoria	ttgatcatag	attccatgtg	tatgtttgtt	gcttccatgc	atgattatga

	151				200
Cebada	tgattgctag	cattgctcta	tgctgcattt	gtgcagggcg	cagccgtggc
Caña	TGCCTCGAGT	CCTCGACGTT	TGC.....	ATGCAGGGCG	CAGCCGCGGG
Trigo	tcattactgg	cgttgtttgtg	tac.gcattt	gtgcagggcg	cagccgcggg
Arroz	gtaactaata	tgcgtagctg	tgcatcgatc	gatcagggcg	cagccgcggg
Maizagggcg	cagccgcgga
A. thaliana	cgagattaat	gtttgtggaa	tatttattat	atgaaggag	gagccgagga
Zanahoria	catgtttgag	ttgtgaacat	atgtatata	atcagggag	gagcaaaagga

	201				250
Cebada	gggcagactc	gcagggagca	gatgggggag	gaggggtaca	gcgagatggg
Caña	GGGCAGACTC	GCAAGGAGCA	GCTGGGGCAT	GAGGGGTACA	GCGAGATGGG
Trigo	ggggagactc	ggaaggagca	gctcggggag	gaggggtacc	gcgagatggg
Arroz	gggcagacga	ggaaggagca	gatgggggag	gaagggtacc	gcgagatggg
Maiz	ggccagactc	gcagggagca	gctggggcag	caggggtaca	gcgagatggg
A. thaliana	gggcaaactc	gaaaggagca	gttaggaact	gaaggatata	agcagatggg
Zanahoria	gggcagacga	ggaaggagca	gctggggaggg	gaagggtata	atgagatggg

	251				300
Cebada	gcgcaagggc	gggctgagca	ccaacgatga	gtccggcggc	gagcgcgccg
Caña	GAAGAAGGGC	GGTCTGAGCA	CCACGGAGGA	GTCCGGCGGC	GAGCGCGGCG
Trigo	gcgcaagggc	gggctgagca	ccatggagga	gtctggtggc	gagcgcgccg
Arroz	gcgcaagggc	ggcctcagca	ccggcgacga	gtccggcggc	gagcgcgccg
Maiz	gaagaagggc	ggtctgagca	ccacggacga	gtccggcggc	gagcgcgccg
A. thaliana	acgcaaaggt	ggtcttagca	ccggagacaa	gcctggtggg	gaacacgctg
Zanahoria	acgcaagggg	ggtctgagca	acaacgatata	gtctggcggt	gagcgcgctg

	301				350
Cebada	ccagggaggg	catcgacatc	gacgagtcca	agttcaagac	caagtcttag
Caña	CCAGGGAGGG	TGTCGACA..
Trigo	ccagggaggg	gatcgagatc	gatgagtcca	agttcaagac	caagtcttaa
Arroz	cccgcgaggg	catcgacatc	gacgagtcca	agtacaagac	caagtcttag
Maiz	ccagggaggg	cgtcacgatc	gacgagtcca	agttaccaaa	gtagtcttat
A. thaliana	aggaggaagg	agtcgagata	gacgaatcca	aattcaggac	caagacctaa
Zanahoria	agcaggaagg	cattgacatc	gatgagtcca	agttcaggac	caaaaagtga

	1				50
1EG	ETVVPGGTGG	KSVEAQEHLA	EGRSRGGQTR
2	MASG.QES.R	KELDRKAREG	ETVVPGGTGG	KSVEAQEHLA	EGRSRGGQTR
3	MASGQQE..R	SQLDRKAREG	ETVVPGGTGG	KSLEAHENLA	EGRSRGGQTR
4	MASGQQE..R	SQLDRKAREG	ETVVPGGTGG	KSLEAHENLA	EGRSRGGQTR
5	MASGQQE..R	SQLDRKAREG	ETVVPGGTGG	KSLEAHDNLA	EGRSRGGQTR
6	MASGQQQQGR	SELDRMAREG	QTVVPGGTGG	KSLEAQENLA	EGRSRGGQTR
7	MASG.QEKGR	SELDLAREG	QTVVPGGTGG	KSVEAQEKLA	EGRSRGGQTR
8	MAS.QQE..K	KQLDERAKKG	ETVVPGGTGG	KSFEAQQHHLA	EGRSRGGQTR
9	MAS.QQE..K	KQLDERAKKA	ETVVPGGTGG	KSFEAQQHHLA	EGRSRGGQTR
10	MAS.QQE..K	KELDARARQG	ETVVPGGTGG	KSLEAQQHHLA	EGRSKGGQTR
11	MASRQON..K	QELDERARQG	ETVVPGGTGG	KRVEAQQHHLA	EGRSKGGQTR
	51				101
1	KEQLGHEGYS	EMGKKGGLST	TEESGGERGA	REGVD.....
2	REQLGQQGYS	EMGKKGGLST	TDESGERAA	REGVTIDESK	FTK.....
3	REQMGEEGYS	EMGRKGGLST	NDESGERAA	REGIDIDESK	FKTKS.....
4	REQMGEEGYS	EMGRKGGLST	NDESGERAA	REGIDIDESK	FKTKS.....
5	REQMGEEGYS	EMGRKGGLST	NDESGERAA	REGIDIDESK	FKTKSX....
6	KEQMGEEGYR	EMGRKGGLST	GDESGERAA	REGIDIDESK	YKTKS.....
7	KEQMGEEGYS	EMGRKGGLST	NDESGERAA	REGIDIDESK	FKTKS.....
8	KEQLGTEGYQ	QMRKGGLST	GDKPGGEHAE	EEGVEIDESK	FRTKT.....
9	KEQLGTEGYQ	QMRKGGLST	GDKPGGEHAE	EEGVEIDESK	FRTKT.....
10	KEQLGEGEYH	EMGRKGGLSN	NDMSGGERAE	QEGIDIDESK	FRTKK.....
11	KEQLGTEGYK	EMGRKGGLST	MDKSGEERAR	EEGIEIDESK	FRTSANKDND M

Figura 12.-Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes genes Em. Las diferentes secuencias tipo Em que mostraban homología con la secuencia de aminoácidos deducida a partir del clon CM1 se alinearon utilizando la aplicación *pileup* del programa GCG.

Especie	Gen	Aminoácidos		Nucleótidos		
		Identidad	Similitud	exon1	exon2	intron
Maíz ¹	Emb564	91.045%	98.507%	98.630	91.538	
Trigo ²	Em	85.075%	94.030%	86.301	87.692	36.620
Arroz ³	Osem	83.582%	95.522%	91.781	83.077	36.449
Cebada ⁴	gB19.1b	82.090%	97.015%	87.324	87.692	43.902
Trigo ⁵	Em H2	83.582%	97.015%	89.041	86.154	38.889
Trigo ⁶	Em H5	83.582%	97.015%	86.301	86.154	
Zanahoria ⁷	Emb-1	77.612%	89.552%	76.712	68.462	37.363
<i>A. thaliana</i> ⁸	Tipo Em	76.119%	86.567%	78.082	65.385	36.082
<i>A. thaliana</i> ⁹	Em	74.627%	86.567%	76.712	66.154	34.066
<i>V. radiata</i> ¹⁰	Em	76.119%	89.552%	75.342	62.308	

1. Williams y Tsang (1991)
2. Stacy et al. (1995)
3. Futers et al. (1993)
4. Futers et al (1993)
5. Hattori et al. (1995)
6. Litts et al. (1991)
7. Wurtele et al. (1993)
8. Finkelstein et al. (1993)
9. Gaubier et al. (1993)
10. Van Damme (1995)

Tabla VIII.-Porcentajes de homología de secuencia de aminoácido y nucleótidos entre el clon CM1 y genes tipo Em en distintas especies.

```

1
LEA B19.3 MASGQQRSE LDRMAREGET VVPGGTGGKT LEAQEHLAG RSRGGQ...
LEA B19.4 MASGQQRSE LDRMAREGET VVPGGTGGKT LEAQEHLAG RSRGGQTRKE
gB19.1b MASGQQERSQ LDRKAREGET VVPGGTGGKS LEAHDNLAG RSRGGQ...

51
LEA B19.3 .....TRKD QLGEEGYREM GHKGGETRKE QLGEEGYREM
LEA B19.4 QLGEEGYREM GHKGGETRKE QLGEEGYREM GHKGGETRKE QLGEEGYREM
gB19.1b .....

101
LEA B19.3 GHKGGETRKE QMGEEGYHEM GRKGGLSTME ESGGERAARE GIDIDESKFK
LEA B19.4 GHKGGETRKE QMGEEGYREM GRKGGLSTMN ESGGERAARE GIDIDESKFK
gB19.1b .....TRRE QMGEEGYSEM GRKGGLSTND ESGGERAARE GIDIDESKFK

151
LEA B19.3 TKS.
LEA B19.4 TK..
gB19. 1b TKSX

```

Figura 13.-Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes genes de la familia B19 de cebada. Los alineamientos se realizaron utilizando la aplicación *pileup* del programa GCG.

Las muestras analizadas fueron las siguientes:

- plántulas de trigo germinadas en ausencia o en presencia de ABA, de la misma forma que describen Berge et al. (1989) para analizar la expresión del gen Em de trigo. Las plántulas germinadas con ABA se escogieron como control positivo de nuestra hibridación.

- las restantes muestras correspondían a tratamientos o situaciones concretas de embriogénesis en caña de azúcar. En los callos de las dos variedades se realizaron tratamientos con ABA a dos concentraciones distintas 10^{-2} y 10^{-4} M y los callos se fijaron a las 24 horas y a los 4 días de tratamiento. Mientras que con la concentración más alta los callos comenzaron a oscurecerse a partir de 5º día, hasta fenolizarse por completo, con la concentración de 10^{-4} M esto no ocurrió y también se pudieron fijar callos a los 9 y 18 días de tratamiento. Los controles de estos tratamientos fueron callos que permanecieron en el medio SCC durante el mismo período de tiempo (Figura 14a).

Se cogieron callos en los que se realizó un tratamiento de sequía suave y sequía fuerte, siendo el control los callos T0, al igual que los analizados por traducción in vitro y 2D PAGE. También se analizaron los embriones somáticos en dos estadios que llamamos E₁ y E₂ que fueron escogidos en forma individualizada (Figura 14b).

Como control negativo se utilizaron las hojas de plantas adultas crecidas en invernadero.

El análisis de estos filtros revela que en el control positivo hay una fuerte hibridación. De todas las muestras de caña de azúcar deshidratadas o tratadas con ABA analizadas ninguna hibridó con la sonda. Solo los embriones somáticos E1 y E2 mostraron una hibridación muy tenue.

Se comprobó que todos los carriles analizados tuvieran cargada la misma cantidad de ARN por hibridación de los mismos filtros con una sonda ARN ribosómico (pRE12).

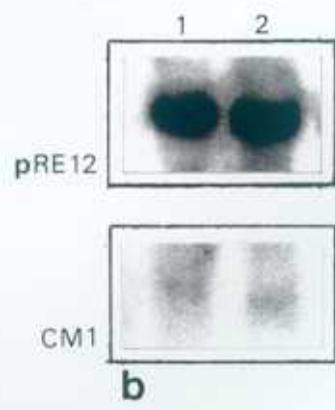
Figura 14.- Hibridaciones con la sonda CM1.

a.- Hibridación tipo Northern de ARN total de callos tratados con ABA 10^{-4} M (A) y 10^{-2} M (B) y un número variable de días. T, Trigo tratado con ABA; J, variedad JA-605; C, variedad C-8751.

b.- Hibridación tipo Northern de ARN total de embriones tipo E1 (1) y E2 (2) de la variedad C-8751.

c.-Hibridación tipo Southern de plantas de caña de azúcar de las dos variedades : J (JA-605) y C (C-8751)

- 1.- Digestión con Eco RI.
- 2.- Digestión con Kpn.
- 3.- Digestión con BamH1.
- 4.- Digestión con BamH1 + EcoRI
- 5.- Digestión con EcoRI + Kpn



8.3.-Número de copias en el genoma

Utilizando 12 μg del ADN genómico, obtenido a partir de plantas maduras de las dos variedades de caña de azúcar, se realizaron digestiones con diferentes endonucleasas.

Las restricciones se hicieron con 1.5 u de enzima/ μg ADN en todos los casos y las enzimas utilizadas fueron: Eco RI, Bam HI, Kpn, HindIII y Pst I. Se realizaron digestiones simples o por combinaciones de dos enzimas. La hibridación tipo Southern de estas digestiones, con la sonda del clon CM1 marcada radioactivamente (Figura 14c), reveló los siguientes resultados:

- No hay diferencias en los fragmentos de restricción entre las dos variedades.
- El número de copias es bajo ya que en las distintas digestiones dobles se observan unos diez fragmentos.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1-CULTIVO IN VITRO

En el cultivo de tejidos, las gramíneas fueron consideradas durante dos décadas como especies recalcitrantes, es decir, incapaces de regenerar plántulas a partir de los callos. Una de las primeras especies donde se obtuvieron plantas regeneradas fue en la caña de azúcar (Heinz y Mee 1969). Solo la utilización de tejidos jóvenes y poco diferenciados como explante inicial en gramíneas permitió la formación de plántulas regeneradas. Sin embargo en las dicotiledóneas, especialmente en las especies consideradas modelo como zanahoria y tabaco, el cultivo de prácticamente cualquier órgano o tejido no presentaba dificultades obteniéndose plantas regeneradas fácilmente.

Los tejidos poco diferenciados que se comenzaron a utilizar como explantes incluían *inflorescencias jóvenes y embriones u hojas inmaduras*. Sin embargo, no todos los explantes se comportan de la misma manera ya que se obtienen distintas respuestas al cultivo dependiendo de cual se utiliza, como demuestran en cebada Ruiz et al. (1992) al comparar el porcentaje de callo embriogénico que producen dos tipos diferentes de explantes.

En el caso de caña de azúcar, siempre se utilizaron como explante inicial las hojas inmaduras (Liu y Chen 1976 , 1978; Ho y Vasil 1983; Chen et al 1988b) de plantas adultas crecidas en el campo o invernadero o también a partir de plántulas obtenidas in vitro. En el caso de utilizar plantas adultas se cortan las hojas inmaduras enrolladas en secciones de unos 2 mm, desde su base hasta una longitud de 10 a 15 cm, dependiendo fundamentalmente del tamaño de la planta donadora. En nuestro trabajo siempre se utilizaron las hojas inmaduras de plantas crecidas en el invernadero, de la misma forma que describen estos trabajos.

La formación de callo se realizó en oscuridad en el medio MS + 2 que solo lleva 2 mg/l de 2,4 D. Esta concentración de la auxina sintética fue considerada la más adecuada

para la formación de callo en el cultivo de muchas gramíneas como trigo (Wernicke y Milkovits 1984), centeno (Linacero y Vazquez 1986) y cebada (Ruiz et al. 1992). Sin embargo en caña de azúcar Ho y Vasil (1983) y Chen et al. (1988a), consideran que la concentración óptima para el inicio del cultivo es de 0.5 a 1.5 mg/l, suplementado sus medios de cultivo con leche de coco al 5%, en el último trabajo también utilizan hidrolizado de caseína, sin embargo en nuestro caso no lo consideramos necesario ya que los resultados que obtenemos son semejantes e incluso superiores a los de estos autores. Los callos comenzaron a formarse sobre la superficie de corte del explante, tanto en la que estaba en contacto directo con el medio de cultivo como en la que tenía su superficie libre. Estos callos, al igual que observaron Ho y Vasil (1983), no se formaron en ningún caso sobre la lámina de las hojas enrolladas.

Al mes de cultivo en medio SCC se podían observar diferentes tipos celulares creciendo en el mismo callo. Esta heterogeneidad es habitual en la formación de callos de gramíneas y cada tipo celular suele recibir una denominación específica. Así Vasil y Vasil en su extensa revisión sobre cultivo de tejidos de gramíneas de 1995, denomina callos embriogénicos de tipo I a los callos compactos formados por células pequeñas y blancas; sin embargo como ya se mencionó en la introducción existen especies cuyos callos embriogénicos presentan unas características un poco diferentes. Así en maíz los callos con mayor capacidad embriogénica no son los del tipo I sino unos callos de crecimiento rápido y más blandos que se denominan de tipo II y en trigo los callos embriogénicos de aspecto típico se denominan de tipo A y solo se pueden mantener por muy poco tiempo y se utilizan los callos denominados de tipo C que no son ni tan blandos ni friables como los de maíz pero también mantienen su capacidad de regeneración por mucho tiempo.

Taylor y colaboradores (1992) describieron 4 tipos de callos en caña de azúcar y esa misma nomenclatura también se mantuvo en el trabajo sobre embriogénesis en *Saccharum* de Guiderdoni et al. (1995). En este trabajo mantendremos en parte esta nomenclatura ya que observamos los mismos tipos celulares. Así Taylor et al. (1992) llaman callo tipo I a unas células grandes y semi-translúcidas que se observan a partir de

los 5 días de cultivo, sobre la superficie de corte del explante mientras que el callo de tipo II es aquel que se observa a los 15 días de cultivo, su aspecto es blando, mucilaginoso y grisáceo. Nosotros consideramos que entre estos dos tipos de callos, que no regeneran y con un aspecto muy similar, no hay diferencias y que posiblemente estén formados por las mismas células del explante, que en presencia de 2,4 D, se engrosan pero son incapaces de dividirse. Además en cuanto se realiza la primera selección para mantener el cultivo, este tipo de células deja de aparecer. Como callo tipo III, Taylor describe los que en resultados hemos denominado callos altamente embriogénicos y como callo tipo IV al callo que hemos observado que comienza a formarse después del segundo periodo de subcultivo y que se puede mantener a lo largo de los 15 a 18 meses de duración del cultivo.

Por tanto el callo compacto de tipo III, sería aquel que hemos llamado altamente embriogénico y está formado por embriones globulares y escutelares, estando los primeros generalmente en la periferia de estos callos que suelen crecer sobre restos del explante. Esta descripción de los embriones coincide con los resultados publicados por Brisibe et al. (1993) donde describen la embriogénesis somática de caña de azúcar en el microscopio electrónico y muestran que los primeros embriones en aparecer son los globulares y luego comienzan a diferenciarse los embriones escutelares en los que se distingue un eje central, el embrión, alrededor del cual crece el escutelo .

Con respecto a la concentración de 2,4-D que se necesita para mantener los callos embriogénicos nuestras observaciones están de acuerdo con los trabajos de Ho y Vasil (1983) y Taylor et al. (1992). En estos trabajos describen que la concentración óptima de esta hormona debe estar entre 2.5 y 3 mg/l para que los callos embriogénicos permanezcan desdiferenciados y que en medios con una concentración menor de esta hormona se produce la pérdida de la capacidad embriogénica. En nuestro caso hemos observado que si el tiempo de transplante superaba las 4 semanas y se dejaban los callos por un periodo de 5 a 6 semanas en el mismo medio de cultivo, estos callos dejaban de tener un aspecto embriogénico y se tornaban mas blandos y algo mucilaginosos. Sin

embargo según el trabajo de Chen et al. (1988b) lo más adecuado para mantener los callos embriogénicos durante 1 año, sería la alternancia entre 2 medios de cultivo uno con 1 mg/l y otro con 3 mg/l 2,4-D, posiblemente esta sea la causa del bajo porcentaje de formación de callo embriogénico que describen estos autores.

La adición de IAA y K en el medio SCC se debe al hecho de que estas hormonas, según Nabors et al. (1983), incrementan la regeneración posterior de los callos durante el cultivo de tejidos de los cereales. En todas las publicaciones mencionadas anteriormente acerca del cultivo de callos de caña de azúcar el medio de mantenimiento que se utiliza está suplementado con un 5% de leche de coco natural, que se sabe que es una fuente natural de citoquininas mientras que el medio SCC está suplementado exactamente con 0.1 mg/l K.

En lo referente a la duración del cultivo los callos de las dos variedades se pudieron mantener en el medio SCC por un periodo de 1 año y medio aproximadamente, similar al tiempo que describen otros autores. El aspecto de estos callos no variaba prácticamente salvo que al transcurrir un año sus células se tornaban de mayor tamaño hasta que, después de un año y medio, dejaban de crecer completamente. Se debe destacar que muchos de estos callos no se oscurecieron ni cambiaron su aspecto, mientras que otros se fueron fenolizando progresivamente hasta oscurecerse por completo.

Las dos variedades formaron los mismos tipos de callo con unas frecuencias similares y respondieron de igual forma a los distintos orígenes de los explantes. En los dos genotipos los explantes de la zona 2 formaban más callo embriogénico que los explantes de las zonas 1 ó 3. Así no se encontraron diferencias genotípicas en la inducción, la morfología ó en el comportamiento de los callos embriogénicos.

Cuando los callos embriogénicos se cultivaron en un medio sin 2,4-D y en presencia de luz, observamos que los dos genotipos presentaron diferencias en su respuesta a la regeneración. En gramíneas esta respuesta diferencial dependiente del genotipo ha sido ampliamente descrita en la literatura, como en maíz (Hodges et al. 1986), cebada (Lühns y Hörz 1987), arroz (Chu y Croughan 1990), centeno (Linacero y Vazquez 1986) e

incluso en caña de azúcar (Chen et al. 1988a y Taylor et al. 1992). En nuestro caso el genotipo que mejor se comporta corresponde a la variedad C-8751 como se observa en el gráfico (pag.40), donde se puede ver que el mejor porcentaje de regeneración en la variedad JA-605 es de un 85% mientras que el peor en la variedad C-8751 alcanza un 82% de regeneración. El hecho de que encontremos claras diferencias debidas al genotipo en la capacidad de regeneración y no las encontraremos en la formación de callos, pone de manifiesto que estas 2 situaciones son controladas de forma independiente.

Esta situación fue descrita en alfalfa por Hernandez-Fernandez y Christie (1989) que postulan que la formación de callo estaría regulada por un solo locus mientras que la regeneración estaría bajo el control de 2 genes complementarios. En cebada, Lürhs y Lörz (1987) encontraron que de 21 líneas que formaban callo solo 15 producían callo embriogénico de las cuales solo 8 eran capaces de regenerar plantas. En centeno, Linacero y Vázquez (1986) también demostraron que algunos genotipos podían formar callo pero estos eran incapaces de regenerar.

La relación existente entre genotipo y competencia morfogenética es compleja e indirecta. Según Vasil (1987) esta relación está tan influenciada por las condiciones fisiológicas y ambientales de la planta donadora, que la acción del genotipo prácticamente no se debería tener en cuenta. El efecto del estado de la planta donadora sobre la respuesta al cultivo se ha descrito ampliamente, como por ejemplo en cebada (Lürhz y Lörz 1987) donde los resultados en cultivos de embrión inmaduro no fueron repetibles de un año al siguiente ya que las condiciones climáticas fueron completamente distintas. Con el fin de minimizar estos efectos y que las condiciones fisiológicas fueran lo mas parecidas posibles, las dos variedades se sembraron en la misma parcela del invernadero y fueron cortadas, cultivadas y transplantadas al mismo tiempo. La evaluación también se llevó a cabo de forma simultánea.

De esta forma las diferencias observadas serían en su gran mayoría debidas al genotipo, y a diferencia de lo afirmado por Vasil, pensamos que el genotipo es tan importante como

el estado fisiológico de la planta para determinar el tipo y grado de respuesta morfogénica.

Hemos observado que el nivel de regeneración dentro de cada variedad, depende de la posición del explante en la planta donadora y esta diferencia se puede apreciar en el gráfico (pag. 40). La variedad JA-605 presentaba una clara disminución del nivel de regeneración a medida que el explante original era escogido a mayor distancia de la base de las hojas inmaduras y las diferencias entre las 3 zonas en que hemos considerado a las hojas inmaduras fueron significativas. En la variedad C-8751 este gradiente en la capacidad de regeneración no fue tan acentuado, incluso los callos de la zona 1 y de la zona 2 no mostraron diferencias significativas entre si, con un nivel de 94% de callos que regeneran mientras que de los callos de la zona 3 solo un 82% regeneró. La existencia de un efecto de gradiente se ha descrito en la mayoría de los trabajos donde el explante se obtiene, a partir de hoja inmadura, así cuanto mas alejado se coja el explante de las células meristemáticas tanto menor sera su capacidad de formar callo, así como de que estos regeneren.

Así en sorgo, Wernicke y Milkovitz (1984) describen al igual que nosotros que los tejidos más diferenciados tienden a acumular fenoles y son incapaces de desdiferenciarse, estos tejidos se tornan de un color marrón oscuro y mueren.

En el cultivo de caña de azúcar Ho y Vasil (1983) ya describieron este efecto de gradiente en la respuesta morfogénica, aunque estos autores describen que aquellas hojas mas diferenciadas no producen callo y forman numerosas raicillas en contraste con nuestros datos donde los explantes que no forman callo no producen ningún tipo de respuesta morfogénica. Nosotros podemos decir que en nuestro caso el efecto de gradiente, en las dos variedades, fue muy marcado, no solo en la regeneración como se ve en el gráfico (pag. 40) sino también en la formación de callo. Los explantes formaban callo, sin presentar ningún cambio ni en la forma ni el tipo de callo sino en la frecuencia, ya que los últimos explantes incapaces de formar callo se fenolizaban por completo sin presentar ninguna otra variación, como ya mencionamos.

Una posible explicación para la existencia de un gradiente de respuesta es la existencia de diferentes concentraciones endógenas de distintas hormonas, fundamentalmente ABA y IAA. Para analizar esta posibilidad Rajasekaran et al. (1987b) en *Pennisetum purpureum* midieron los niveles endógenos de ABA, IAA y citoquininas en las tres regiones de las que cogían el explante, una basal, una intermedia y otra distal. En los explantes de la región basal encontraron niveles muy altos de ABA, que va disminuyendo marcadamente a medida que se alejan de dicha zona basal a pesar de lo cual los niveles de ABA siguieron siendo elevados. Al tratar la planta donadora crecida in vitro con fluridona, un inhibidor de la síntesis de ABA, observaron que esos explantes eran incapaces de formar callo embriogénico y que esta capacidad podía ser restaurada parcialmente por la aplicación de ABA exógeno. Cuando utilizaron inhibidores de giberelinas y un oxidante de IAA no detectaron ningún efecto en el comportamiento de los cultivos. Esta situación lleva a pensar que el ABA juega un papel fundamental en el establecimiento del gradiente morfológico que presentan las hojas inmaduras utilizadas como explantes.

Wernicke y Milkovitz (1984) señalan en su trabajo que la velocidad con que las células pierden la competencia y la totipotencia depende del genotipo. Es posible que esta sea la explicación de la diferencia existente entre las dos variedades en cuanto al gradiente

La germinación de los embriones, también llamada conversión por algunos autores, parece estar controlada de forma independiente tanto de la inducción de callo, como de la capacidad de regeneración que los mismos. Lürhz y Lörz (1987) describieron que de 15 líneas de callos embriogénicos de cebada, solo 8 fueron capaces de formar plantas y en centeno Linacero y Vazquez (1990) observaron que todas las variedades utilizadas formaban callo pero solo en algunos casos era embriogénico y formaba plantas. En nuestro caso las dos variedades formaron plantas pero aquellos callos que mostraron un menor porcentaje de regeneración fueron los que por el contrario formaron un mayor número de plántulas, aunque en las dos variedades tanto la inducción como la formación de callo fue de un nivel prácticamente idéntico.

La formación de plántulas se observaba a partir de los 10 días de encontrarse los callos embriogénicos en condiciones de regeneración, con la aparición de botones verdes pudiendo distinguirse pequeños brotes unos 5 días más tarde. Las plántulas regeneradas que se obtuvieron en todos los casos fueron normales. También las plántulas formadas a partir de las yemas axilares in vivo fueron siempre normales, por lo que estas dos variedades mostraron una gran estabilidad fenotípica.

Esta estabilidad podría ser explicada por ser una especie octoploide y contar con un número alto de juegos cromosómicos que haría que esta especie pudiera soportar mejor una mutación. Como además éstas suelen ser recesivas no se manifestarían en el fenotipo.

La estabilidad fenotípica in vitro observada en nuestro trabajo, podría corroborarse con numerosos trabajos realizados en caña de azúcar, donde muestran que en esta especie hay una alta estabilidad genética. Los análisis de plantas regeneradas a partir de callos se realizaron con diferentes abordajes: morfológicos (Irvine 1984), análisis de RFLPs (Chowdhury y Vasil 1993), y RAPD (Taylor et al. 1995). Sin embargo hay que tener presente que algunos de los primeros trabajos en variación somaclonal se hicieron en caña de azúcar (Liu y Chen 1976, 1978). En nuestro caso no se realizó un análisis de la descendencia, ni citológico para poder saber si esa estabilidad fenotípica observada se correspondía o no con una estabilidad en el genoma. Por lo tanto solo podemos afirmar que los dos genotipos que hemos utilizado son fenotípicamente estables y que en lo que se refiere al genoma del género *Saccharum* existen evidencias tanto a favor como en contra de su estabilidad in vitro.

En este trabajo nunca se utilizaron callos que tuvieran más de un año en cultivo para regenerar plantas y tal vez por eso no se hayan observado plantas albinas como describen en *Pennisetum purpureum* Chandler y Vasil (1984) al utilizar cultivos viejos.

El aspecto normal y homogéneo que mostraron las plantas regeneradas en nuestro caso se podría deber al hecho de haber sido obtenidas por embriogénesis somática, aunque, por supuesto, no podemos descartar que alguna plantilla haya surgido por

organogénesis. La homogeneidad fenotípica debida a la regeneración a través de embriogénesis somática en caña de azúcar se describe en el trabajo de Chowdhury y Vasil (1993). Este último autor (Vasil 1987) describe que la regeneración de plantas por embriogénesis somática en las gramíneas sería la causante de la uniformidad fenotípica y que la embriogénesis somática actuaría como filtro de aquellas células que llevaran alguna mutación de importancia ya que el proceso embriogénico tanto en plantas como en animales selecciona negativamente a aquellos embriones que porten una aberración.

La evaluación del número de plántulas se realizó, en callos embriogénicos, después de un mes de cultivo en condiciones de regeneración. Se debe tener presente que puede haber existido algún problema de competencia debido al espacio y a la disponibilidad de nutrientes entre los diferentes embriones presentes en un mismo callo para poder desarrollar un brote. Así aquellos callos con un número elevado de embriones pueden no haber desarrollado todos ellos y por consiguiente no producir el número de brotes que se esperarían *a priori*. Con el fin de minimizar este problema los callos utilizados fueron pequeños, de unos 5 mm de diámetro.

Como se puede observar en el gráfico (pag. 43) los genotipos presentaron una respuesta cruzada y existe un claro efecto de gradiente. Así en los callos formados a partir de explantes de la zona 1, la variedad JA-605 formó más brotes que la otra variedad, mientras que en los callos de la zona 3, JA 605 fue la variedad que formó menos brotes.

De estos resultados se desprende que la germinación de los embriones depende del genotipo. Ya hemos comentado que tanto los tipos de callos como los tiempos de transplante fueron idénticos en ambas variedades para minimizar cualquier variación debida al estado fisiológico de las plantas donadoras del explante.

La existencia de un gradiente parece también bastante evidente. Los callos de zona 1 produjeron un mayor número de brotes, seguidos de la zona 2 y por último los callos obtenidos de la región mas distal fueron los que produjeron el menor número de brotes.

Tal vez este gradiente que se observa en el número de brotes que pueden formar los diferentes callos sea solo un reflejo del gradiente ya descrito para la regeneración, y de

esta forma los callos de la zona 1, que eran los que mostraban mayor capacidad de regeneración, podrían por consiguiente formar un mayor número de plántulas. Así en la variedad C8751 donde los callos de las zona 1 y 2 presentaban niveles casi idénticos de regeneración, también se muestran niveles similares en la conversión como se aprecia en el gráfico (pag. 43) para las zonas 1 y 2.

Si tenemos en cuenta los gráficos (pag. 40 y 43) parecería que la variedad JA-605 es capaz de convertir mejor sus embriones. En los callos de tipo 3 de esta variedad solo el 42% regeneraron, pero para la formación de brotes muestra unos niveles similares a la variedad C-8751 aunque en este caso el 82% de estos callos regeneraban. En los callos de la zona 1 esta situación parece más evidente ya que en la variedad JA-605 el 85 % de los callos regeneraron pero su eficiencia en la conversión fue mucho mayor con 2.8 brotes/callos mientras que en la variedad C-8751 el nivel de regeneración fue del 93% y estos callos produjeron 2.3 brotes/callos.

Evaluando en conjunto tanto la regeneración como la conversión, la variedad C-8751 forma un mayor número de plantas durante el cultivo in vitro, ya que regenera independientemente del origen del explante mucho mejor que la otra variedad, en lo referente a la formación de brotes solo se ve superada por la variedad JA-605 en los callos de zona 1, siendo esta diferencia muy pequeña ya que se encuentra entre 2.8 y 2.3 brotes/callos.

Estos datos de regeneración y germinación in vitro se corresponden con los resultados observados in vivo donde la variedad C-8751 forma un número mucho mayor de plantas a partir de yemas axilares. Además en esta variedad se forma un número mayor de tallos a partir de cada estaca sembrada en la tierra y siempre son más vigorosos que los de la variedad JA-605.

Aunque parece evidente la mejor respuesta del genotipo C-8751 tanto al cultivo in vivo como in vitro se debe destacar que las dos variedades formaron callos embriogénicos y presentaron altos niveles de regeneración y conversión.

2.-ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE PROTEÍNAS TRADUCIDAS IN VITRO

La electroforesis bidimensional, basada en la carga y tamaño de las proteínas, es un procedimiento idóneo para el análisis simultáneo de cientos de proteínas. Esta técnica es por lo tanto muy utilizada para abordar temas muy diferentes en la biología, como el cambio de expresión que producen distintos sustratos en un líquen (López Bilbao et al. 1996), analizar proteínas que se inducen por déficit hídrico (Covarrubias et al. 1995) o analizar la divergencia genética (Aquadro y Avise 1981).

Esta técnica de electroforesis bidimensional de proteínas se ha utilizado también para caracterizar especies así Zeng y Singh (1993) diferencian *Drosophila simulans* de *D. sechellia* con un 8% del total de proteínas analizadas. Un nivel similar de variación se detectó en la comparación de patrones proteicos de dos líneas de maíz, donde el polimorfismo detectado fue de un 11% del total de proteínas (Leonardi et al. 1987).

Sin embargo, analizando la electroforesis bidimensional de proteínas totales teñidas con plata dentro del complejo *Saccharum*, Ramagopal (1990) encuentra que solamente el 3.6% de las proteínas muestran variación interespecífica y la variación intergenérica queda determinada por el 5.3% de todas las proteínas resueltas. La comparación dentro de la especie *Saccharum officinarum* de dos variedades reveló una variación del 0.9% del total de proteínas. Estos niveles de polimorfismo resultan extraordinariamente pequeños ya que se comparan 5 especies del género *Saccharum* y 5 especies relacionadas: *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* y *Sclerostachya*, donde las diferencias morfológicas son importantísimas, y los números cromosómicos varían desde $2n=30$ hasta $2n=118$. Debemos destacar que el bajo nivel de polimorfismo que describe este autor no se debe a la técnica *per se*, que es capaz de detectar cambios en muchas situaciones, sino al material de estudio.

En nuestro caso al estudiar en las dos variedades de caña de azúcar los patrones teñidos con plata de las muestras T0, T1 y T2 además de aquellas sometidas a una situación de estrés hídrico con PEG, no encontramos diferencias entre las dos variedades. Esta

situación está de acuerdo con el trabajo ya citado de Ramagopal que encuentra solo un 0.9% de variación entre variedades de la misma especie. Parece bastante claro que el nivel de polimorfismo dentro de las cañas de azúcar es bajo.

El hecho de no haber detectado polimorfismo no es un caso particular para la caña de azúcar ya que hay numerosos trabajos en otras especies donde no se detecta variabilidad en el patrón proteico a pesar de la existencia de una clara diferencia morfológica. Así, el análisis de 19 líneas de *Drosophila simulans* (Ohnishi et al. 1982) o en humanos utilizando tejido renal (Smith et al. 1980) no reveló ni una sola proteína polimórfica.

Es un poco difícil de explicar este comportamiento, donde muestras que difieren notoriamente en su morfología y/o fisiología muestran poca ó ninguna variación mientras que en otros casos el nivel de polimorfismo que se puede detectar es muy alto. Una posibilidad es que las proteínas que modifican su expresión, se encuentran en tan baja concentración que no se puedan detectar en el gel. Otra posibilidad es que se encuentren en zonas del gel muy densamente pobladas y su expresión quede enmascarada por otras proteínas.

Hay que tener presente que al realizar este tipo de estudios para analizar los cambios que produce en la expresión génica una situación dada, también se están reflejando en el patrón electrofororético todas las proteínas que nunca varían en su expresión, como las proteínas ribosómicas. Esta situación hace que el nivel de variación que se detecte sea menor que el que realmente ocurre entre las proteínas que se expresan en el momento de estudio.

Por todas las razones mencionadas se eligió el sistema de transcripción in vitro seguido de 2D-PAGE de las nuevas proteínas para analizar los cambios que producían, en la expresión génica de la caña de azúcar, en la embriogénesis y el estrés hídrico.

La transcripción in vitro permite analizar solo a los ARNm que se están transcribiendo durante el tratamiento o situación seleccionada. Además se incorpora el aminoácido cisteína marcado radioactivamente, que aumenta la sensibilidad de la detección en 2 ó 3

ordenes de magnitud, y permite la detección de aquellas proteínas que representen menos del 10% del total de proteínas.

A pesar de las ventajas que ofrece esta técnica se debe tener presente que se pierde la información acerca de la regulación a nivel de traducción, puesto que al realizarse la traducción *in vitro* podemos observar proteínas que *in vivo*, aparecerían posteriormente. Esta discrepancia entre los patrones de proteínas *in vivo* y los observados al traducir los ARNm han sido puestos en evidencia por Duré III et al. (1981). Por lo tanto estos patrones electroforéticos si bien brindan información muy valiosa acerca de los genes que se están transcribiendo, no se ajustan exactamente a la realidad.

Este nuevo abordaje reveló diferencias entre los patrones proteicos analizados. La comparación de los callos control mostró que las variedades sólo se diferencian en 8 proteínas traducidas *in vitro*. Este bajo nivel de polimorfismo detectado está de acuerdo con nuestro trabajo previo con proteínas totales teñidas con plata y con la publicación de Ramagopal que ya se ha discutido.

Asimismo otros trabajos también demuestran la baja tasa de variabilidad existente dentro del complejo *Saccharum* en general analizando la actividad génica. Al-Janabi et al. (1994) secuencian dos loci del genoma mitocondrial y dos loci de cloroplastos, además analizan con nueve sondas diferentes los fragmentos de restricción obtenidos con siete enzimas del genoma mitocondrial, los resultados que obtienen los llevan a sugerir que el complejo es evolutivamente muy joven o bien que la tasa de evolución dentro de los *Saccharum* es completamente diferente de otros taxa. Dentro de las variedades comerciales de caña de azúcar no observaron variación sugiriendo que esto implicaría un monocultivo con relación al citoplasma de todas las variedades de caña en todo el mundo. Esta teoría del "monocultivo citoplasmático" la mencionan nuevamente Sobral et al. (1994) pues al analizar el genoma de cloroplastos con 12 sondas que representan el genoma completo de cloroplastos de arroz, no encuentran variación entre las cañas de azúcar cultivadas para la producción azucarera.

2.1.-Embriogénesis somática

La embriogénesis, como ya se describió en la introducción es una de las etapas fundamentales del desarrollo, donde se determinan los ejes de polaridad y simetría así como los diferentes tipos de células y tejidos que darán lugar a una planta adulta. Al analizar los patrones proteicos obtenidos durante el análisis de la embriogénesis somática hay que tener presente por lo tanto, que la embriogénesis es un proceso básico del desarrollo. Partiendo de esta premisa todos aquellos genes que estén implicados directamente en este proceso deben comportarse de la misma forma dentro de una especie y posiblemente estén conservados durante la evolución por lo cual, incluso podrían ser muy parecidos entre géneros relacionados. Debido a esto las variedades JA-605 y C-8751 deben presentar el mismo patrón de expresión como consecuencia del desarrollo y maduración del embrión somático.

Uno de los trabajos pioneros en el estudio de la embriogénesis, y los cambios de expresión que esta provoca, fue publicado por Dure III et al. (1981). En el se estudian las poblaciones de ARNm de semillas de algodón y su variación en estadios específicos de la embriogénesis (embrión inmaduro, embrión maduro y semilla seca) mediante traducción in vitro, síntesis in vivo de proteínas y proteínas totales. Describen 5 poblaciones de ARNm. La primera población está formada por 32 manchas que se expresan durante la embriogénesis y las primeras horas de germinación. El segundo grupo con 6 miembros se expresan en la embriogénesis solamente. El tercer grupo estaría formado por las proteínas de reserva ya que el ARNm, desaparece en la embriogénesis tardía y no se observa en los embriones maduros. Aquellos ARNm que son abundantes en la embriogénesis tardía y se sintetizan en abundancia en la germinación temprana forman el cuarto grupo. La última población, formada por 14 manchas, llega a ser abundante en la embriogénesis tardía pero desaparece durante las primeras horas de germinación, a esta población de ARNm se los denominó genes Lea (late embriogenesis abundant).

Sanchez-Martínez et al. (1986) analizan los cambios de expresión en embriones cigóticos de maíz por electroforesis bidimensional de proteínas marcadas in vivo y de ARNm traducidos in vitro. En este caso realizan tres agrupamientos y no cinco como en el trabajo de Dure III, y abarcan una población embriogénica de 7 proteínas que aparecen tanto en embriones jóvenes como maduros, una población de maduración compuesta por 44 proteínas que aparecen en la maduración, de las que 22 serían proteínas LEA y por último 13 proteínas de germinación.

Al comparar las muestras T0 y T1 donde los callos crecían en medio SCC y SCR respectivamente, las proteínas que varían en estos dos medios son solo dos: 59 y 61. La proteína 59 se expresa solo en T0, por lo que podría ser considerada una proteína de embriogénesis temprana y la proteína 61 se expresa en T1 y T2 y podría ser considerada de embriogénesis tardía y germinación.

Un nivel de variación muy similar al que hemos detectado se pudo observar en *Arabidopsis thaliana* (Huang y Yeoman 1995) donde se compararon los 2D-PAGE de proteínas totales de callos embriogénicos cultivados en presencia de 2,4-D y una semana después de haber sido transferidos a un medio sin auxinas. Solo se observan 4 proteínas diferenciales que estos autores consideran como polipéptidos exclusivos de callo embriogénico.

Las proteínas que presentan el mismo patrón de expresión en T0 y T1 pero varían en T2 son las 25, 26 y 29. Esta variación solo se puede deber al progreso del embrión y su germinación. Según la nomenclatura utilizada por Dure III, la proteína 30 sería de germinación y las proteínas 25 y 26 serían de embriogénesis temprana y de embriogénesis tardía respectivamente.

Debemos destacar que en general los trabajos realizados con embriones cigóticos como los de Dure III y Sanchez-Martínez, ya mencionados, describen un nivel de variación mucho más alto que en los trabajos donde se analizan los embriones somáticos como es nuestro caso o el de Huang y Yeoman.

Todos los trabajos publicados para el estudio de la embriogénesis somática utilizando 2D-PAGE se limitan al estudio de la inducción comparando el patrón de expresión del explante y del explante después de un cierto período de tiempo en el cultivo, como en el caso de *Arabidopsis*, ya mencionado, o en el de *Cichorium* (Boyer et al. 1993). También se analiza la expresión de callo embriogénico y no embriogénico en café (Menéndez-Yuffa et al. 1994), zanahoria (Wilde et al. 1988) o caña de azúcar (Guiderdoni et al. 1995). En todos los casos el número de proteínas polimórficas no es superior a 10.

Hay que tener en cuenta que algunos genes de embriogénesis pueden estar expresándose en T0, ya que en la revisión de Zimmerman (1993) se observa que la expresión de numerosos genes de embriogénesis tardía tiene lugar en etapas más tempranas como las masas proembriónicas y los estadios globular o corazón de los embriones somáticos de zanahoria. Como en nuestro caso todos los tratamientos se han realizado sobre callos en estadio T0 es posible que consideremos a estos genes de embriogénesis, que ya se estarían expresando, como si fueran constitutivos y de esta forma estaríamos infravalorando el número de ellos que estarían implicados en este proceso.

Por otra parte todas las publicaciones que se han mencionado en esta discusión realizan el análisis de un único genotipo. De esta forma todas las diferencias observadas se atribuyen a la embriogénesis y son tenidas en cuenta aunque posiblemente no estén relacionadas con dicho proceso, por lo que el número real de proteínas implicadas en embriogénesis en estos trabajos puede ser menor que el que indican.

Si en nuestro trabajo se analiza una única variedad, el nivel de polimorfismo aumenta notoriamente con 18 proteínas variables en la variedad JA-605 y 15 en la variedad C-8751. Esta situación refleja claramente que cuando se quiere asociar una proteína con un función determinada debe estar también asociada a un genotipo concreto. Si se quiere generalizar es necesario analizar diferentes genotipos dentro de la especie estudiada, para eliminar la variación intra-varietal.

En nuestro caso, al realizar la comparación entre las dos variedades se puede observar que estas se diferencian en un número mayor de proteínas a medida que aumenta el

período de desarrollo de la embriogénesis. Así y como ya discutimos, los T0 se diferencian en 8 proteínas, mientras que los T1 lo hacen en 10 y los T2 en 14. Esta situación podría estar relacionada con las diferencias encontradas en la capacidad de regeneración y de conversión entre las dos variedades, que se discutieron en la sección de cultivo de tejidos, mientras que en la inducción y mantenimiento de callo embriogénico (T0) no se apreciaron diferencias entre ambos genotipos.

2.2.-Estrés Hídrico

La falta de agua desencadena una respuesta compleja por parte de la planta que comienza con la percepción del estrés y se inicia una cascada de señales que se manifiestan por cambios a nivel celular, fisiológico y de desarrollo. Esta respuesta depende del grado y duración del estrés, del genotipo de la planta y del estadio de desarrollo, además del tipo de estrés (Bray 1993).

El tipo de estrés elegido para nuestro análisis fue la deshidratación. En un primer momento se realizó con PEG que en el medio de cultivo provoca un cambio de osmolaridad y produce el mismo efecto que la pérdida de agua. Los trabajos donde se simula una situación de estrés con PEG son numerosos e incluso se llega a comparar la expresión génica durante el estrés tanto provocado con PEG como por deshidratación en una atmósfera seca y la respuesta que provocan ambos tratamientos suele ser similar, como en raíces de arroz donde la expresión del clon salt se induce por PEG y por falta de riego entre otras situaciones (Claes et al. 1990). Sin embargo, algunos autores describen al PEG como una sustancia tóxica para las células y de difícil absorción, por lo que el tratamiento debe ser siempre superior a las 24 horas. Como en nuestro trabajo se analiza el cambio de expresión en proteínas traducidas in vitro, se descartó el uso del PEG para evitar que hubiera cambios de expresión debidos a la toxicidad y que modificaran así los resultados obtenidos por causa de la sequía.

En suspensiones de arroz transformadas con el gen Em (Bostock y Quatrano 1992) estudian la inducción de dicho gen por diversas situaciones, observando que se induce frente a un estrés hídrico suave donde la pérdida de peso es del 10% aproximadamente, mientras que no se induce por un tratamiento más severo donde la pérdida de agua es del 50%. Al existir por tanto un comportamiento diferente, al menos en el gen Em, frente a condiciones más o menos severas de deshidratación, se decidió realizar dos tratamientos de estrés hídrico, uno al que llamamos fuerte, ya que era rápido e intenso (dos horas y 50 % de pérdida de peso fresco) y otro suave donde se llegaba a la pérdida de un 12 % del peso del callo a lo largo de unas 30 horas sobre papel de filtro.

La relación entre el genotipo de las plantas y la respuesta ante una situación de estrés fue estudiada por Baszczyński et al. (1985) utilizando 50 líneas de maíz tratadas con calor a 30 °C y a 45 °C. Observaron que la gran mayoría de polipéptidos se sintetizaban en todos los genotipos aunque se presentaban algunas diferencias cualitativas y cuantitativas, pero todos los genotipos expresaban 6 proteínas que estos autores habían caracterizado como de respuesta al heat shock. De esta forma podría existir una relación entre genotipo y respuesta al estrés, posiblemente debida a una diferencia en la sensibilidad de las plantas controlada por el genotipo.

En nuestro trabajo se utilizan dos genotipos de caña de azúcar, cuya principal diferencia es su respuesta a la sequía, como ya se describió en materiales.

Ninguno de los genotipos muestra un nivel de expresión diferencial mayor que el otro. En la variedad JA-605 hay 21 proteínas que muestran un patrón diferencial entre T0, SF y SS mientras que en la variedad sensible son 20 proteínas, aunque no siempre el nivel de expresión diferencial que presentan es tan parecido como se verá en otros casos.

Todas aquellas moléculas cuya función es preservar las membranas, los liposomas y las proteínas celulares durante la sequía se denominan osmoprotectores. Muchas de estas sustancias son azúcares como la trehalosa que reemplazaría al agua en la formación de puentes H con las proteínas celulares. Otras serían proteínas con función enzimática para inactivar a las fosfolipasas, responsables de oxidar los fosfolípidos de membrana y

degradarlos (Crowe et al. 1993). La familia de proteínas inducidas por sequía en cebada se han denominado dehidrinas (Robertson y Chandler 1992) y alguna de ellas tiene una estructura similar a los inhibidores de fosfolipasas. Otras sustancias osmoprotectoras son los compuestos de amonio cuaternario y los de sulfonio terciario. El más común entre las plantas superiores es la glicina betaina que se encuentra en al menos 11 familias entre monocotiledóneas y dicotiledóneas. Otros osmoprotectores son la prolina betaina, la B alanina betaina y el dimetil sulfonio propionato (Rhodes y Hanson 1993). Es muy posible que alguna de estas proteínas se sinteticen durante los tratamientos de sequía que realizamos, aunque a través de un electroforesis bidimensional es imposible comprobarlo. La diferencia de expresión entre los tratamientos de sequía fuerte y sequía suave pone de manifiesto que las células vegetales reconocen de alguna forma la magnitud del estrés que sufren y acorde con la circunstancia modifican la expresión génica expresando en cada caso diferentes productos génicos específicos.

Aquellas proteínas que muestren el mismo patrón de expresión en las dos variedades deben estar involucradas en un mecanismo generalizado de defensa y/o adaptación al estrés en la especie *Saccharum officinarum*.

De las 15 proteínas que muestran el mismo patrón de expresión en las dos variedades, 8 se deben al tratamiento de sequía fuerte, la sequía suave induce dos proteínas y reprime la expresión de otras 3, mientras que 2 proteínas se expresan como consecuencia de ambos tratamientos. Esta situación refleja que cuando el estrés es suave la respuesta implica cambios fisiológicos y de expresión también moderados o suaves, pero cuando la deshidratación es muy importante, ya que los tejidos pierden el 50% de su peso fresco, la respuesta que muestran las células en nuestro sistema de estudio es la expresión simultánea de varios genes. Cabe pensar que estas nuevas proteínas estén relacionadas con la protección de las células frente al proceso de pérdida de agua.

Aquellas proteínas que muestran un comportamiento diferente entre genotipos como consecuencia de los tratamientos de sequía, deben estar involucradas en la resistencia o susceptibilidad de ambas variedades, o bien pueden ser proteínas de respuesta general al

estrés hídrico pero que cada genotipo controla de forma diferente. Las proteínas que podrían conferir la resistencia a la sequía a la variedad JA-605 serían aquellas que solo se expresan en dicha variedad como las proteínas 32, 49, 50 y 57. Es posible que una sola de estas proteínas sea la responsable de la resistencia en esta variedad mientras que en las restantes podrían expresarse como una consecuencia de ésta situación. Posteriormente comentaremos el caso de proteína 32.

Los niveles de variación que hemos detectado son semejantes a los obtenidos Damerval et al. (1988) al analizar distintos tipos de raíces de *Brassica napus* durante situaciones de estrés hídrico. En dicho trabajo se estudia el patrón de proteínas totales por 2D-PAGE y de las 424 proteínas que identifican 101 son polimórficas, 52 de las cuales son exclusivas del tratamiento de sequía lo que representa un 16% del total de proteínas.

Sin embargo el nivel de polimorfismo que detectamos es mucho mayor que el indicado en otros trabajos donde también utilizan la electroforesis bidimensional. Así King et al. (1992) analizan los ARNm de trigo y encuentran en hojas 12 proteínas y en raíces 10 proteínas con expresión diferencial debida a la sequía. Chandler et al. (1993) en cotiledones de guisantes, analizan las proteínas marcadas in vivo y las diferencias entre las muestras control y las sometidas a una atmosfera seca durante 10 días se reduce a 7 proteínas que muestran diferencias cuantitativas.

El alto nivel de polimorfismo que hemos detectado también se observa al comparar con los resultados de Ramagopal y Carr (1991). Analizan la expresión en suspensiones de caña de azúcar frente al estrés provocado por una alta concentración salina. Aunque el estrés es distinto, como ya se comentó anteriormente, está también mediado por ABA y provoca cambios de osmolaridad que implican en definitiva la disminución de agua disponible. Así encuentran 18 ARNm que aumentan su expresión, 8 que disminuyen su nivel de expresión y no observan diferencias cualitativas. Las explicaciones para esta diferencia pueden ser varias, desde que los genotipos de caña de azúcar utilizados son diferentes hasta que la deshidratación provoca más cambios de expresión que la

concentración salina, o bien que en nuestro trabajo utilizamos un sistema mucho más resolutivo que el utilizado por Ramagopal y Carr que analizan proteínas totales.

2.3.-Tratamientos con ABA

El ácido abscísico actúa en un gran número de situaciones, como se describe en las revisiones de Chandler y Robertson (1994) y de Voesenck y van der Veen (1994). Esta hormona entre otras funciones modula el crecimiento y desarrollo de las plantas especialmente durante la formación de semillas estando también implicada en la respuesta a los estreses del medio ambiente que involucran pérdida de agua.

Los niveles endógenos de esta hormona se han medido en diversas ocasiones, lo que permite conocer el rango de concentración con actividad fisiológica y los cambios que se producen en su concentración debido a diferentes situaciones. Así en hojas de plántulas de trigo la concentración es de 0.27×10^{-6} M ABA por g de tejido seco y al deshidratar estas hojas los niveles se elevan hasta 0.5 y 2.5×10^{-6} M, es decir 2 a 9 veces más que la concentración original (Berge et al., 1989). El nivel del ABA también aumenta notoriamente en la maduración del embrión, por ejemplo en las semillas de cebada durante el desarrollo del embrión el nivel de esta hormona fluctúa de 0.5 a 2×10^{-6} M por g de tejido seco (Morris et al., 1991). La concentración hormonal no se eleva solo en la embriogénesis cigótica sino también en los embriones somáticos. En los callos embriogénicos de caña de azúcar la concentración es de 87.1×10^{-9} M mientras que en los callos no embriogénicos es de 0.5×10^{-9} M por g de tejido seco (Guiderdoni et al., 1995).

En nuestro trabajo para analizar los cambios de expresión que provoca esta hormona utilizamos un medio de cultivo con concentración de 10^{-4} M y la duración del tratamiento fue de 24 h. De esta forma se trata de imitar la elevación de la concentración

endógena de ABA que se produce en algunas situaciones como mencionamos en el párrafo anterior.

La concentración de 10^{-4} M está dentro del rango de concentraciones descritas en la literatura. Hasta el momento no hay descrito en la literatura un efecto tóxico de esta hormona pero al realizar tratamientos con ABA 10^{-2} M, los callos se fenolizaban a los 4 días y eran incapaces de regenerar.

Cuando se comparan los patrones de los callos control y los callos tratados con ABA, es cuando se observa el mayor número de proteínas diferenciales, 55 en total y dentro de cada variedad 46 en JA-605 y 45 en C-8751. Esta situación de elevado polimorfismo se puede apreciar claramente en el análisis de componentes principales donde el tratamiento con ABA es la situación que más se diferencia de los callos control y se corresponde con la acción del ABA en diversas situaciones (Chandler y Robertson, 1994). La acción del ABA parece encontrarse bajo un control en ocasiones distinto para los diferentes genotipos como demuestran las 20 proteínas con diferencias en el patrón de expresión entre ambas variedades.

A todas estas proteínas nos referiremos a continuación al comparar aquellas que intervienen en la embriogénesis y/o en la sequía.

2.3.1.-Embriogénesis y ABA

Durante la embriogénesis cigótica, cuando el embrión comienza a madurar y empieza la síntesis de las proteínas de reserva se elevan los niveles endógenos de ABA hasta llegar a un máximo justo antes de que la semilla entre en dormancia (Rock y Quatrano, 1995) y luego este nivel decae hasta ser indetectable en las semillas secas. Esta correlación entre concentración hormonal y desarrollo embrionario hace suponer que el ABA pueda tener un papel importante durante la embriogénesis como ya comentamos. El papel que juega el ABA en la fase tardía de la embriogénesis se pone de manifiesto con la existencia de

mutantes relacionados con ABA. Los mutantes denominados vivíparos de *Arabidopsis* y maíz, en los que el embrión germina precozmente, cuando la semilla está aún unida a la planta madre, son incapaces de sintetizar ABA o bien son insensibles a la hormona (Mc Carty et al., 1989; Koornneef et al., 1982). Por otra parte cuando se agrega el inhibidor de la síntesis de ABA, la fluoridona, a las semillas de maíz durante su desarrollo se produce la germinación precoz de los embriones (Hole et al., 1989).

La acción del ABA sobre la expresión génica durante la embriogénesis también se ha estudiado como demuestra Dure III et al. (1980) al que ya mencionamos anteriormente. El grupo de proteínas que posteriormente denominaron Lea, que aparecen en la embriogénesis tardía de las semillas de algodón, y desaparecen rápidamente durante la germinación, se puede inducir prematuramente si se incuban las semillas con ABA. Esta situación se repite con los ARNm de las proteínas Lea de trigo (Berge et al., 1989), cebada (Hong et al., 1988) y arroz (Mundy y Chua, 1988) que pueden reaparecer en las plántulas si éstas se tratan con ABA. El análisis de nuestros datos reveló que solo dos proteínas tenían el mismo patrón de expresión en las dos variedades, que como ya se discutió en la sección de embriogénesis, deben ser las únicas fundamentales para la misma. El tratamiento con ABA y la fase más tardía de la embriogénesis, cuando el embrión se convierte a plántula producen la inhibición de estas dos proteínas. Como ya mencionamos, el ABA se eleva en la embriogénesis tardía, por lo que parece probable que estas sean unas proteínas que se inhiben durante la conversión de los embriones. Hasta el momento no se han descrito promotores represibles por ABA y aún menos en la embriogénesis donde hasta ahora solo se han descrito proteínas inducidas por ABA pero no se puede descartar que esta hormona pueda reprimir la transcripción de algunos genes, como ocurriría e nuestro caso

Sin embargo si hubiéramos analizado un único genotipo el resultado sería completamente diferente ya que se observa un distinto comportamiento entre variedades. Así, si se hubiera trabajado solamente con la variedad C-8751 hubiéramos detectado un mayor número de proteínas que se regulan tanto por el tratamiento con ABA como durante T2,

detectando en esta variedad proteínas que se expresan durante la embriogénesis tardía y también se inducen por ABA, como muchos de los genes *Lea* descritos (Dure III et al., 1989).

Debemos mencionar de nuevo el hecho de que en los embriones somáticos de zanahoria (Zimmerman, 1993) los genes *Lea* se inducen en etapas muy tempranas de la embriogénesis, así como que los cultivos embriogénicos de caña de azúcar tienen concentraciones elevadas de ABA (Guiderdoni et al., 1995) no siendo por tanto asimilables la embriogénesis in vivo e in vitro en estos aspectos. Por lo tanto, debido a estas dos situaciones es posible que en nuestro caso existan proteínas que se estén induciendo en los callos T0, lo que nos llevaría a infravalorar la cantidad de proteínas polimórficas inducidas por ABA y/o embriogénesis.

Al igual que en el caso de la embriogénesis la expresión de los genes *Lea* in vivo e in vitro solo se analiza en una única variedad de la especie que se está estudiando. Sin embargo nuestros datos, demuestran que la expresión durante la embriogénesis tanto mediada por ABA como independientemente de esta hormona está claramente controlada de forma diversa en distintas variedades.

Estas proteínas que muestran una expresión diferencial entre variedades probablemente no estarían implicadas directamente en la embriogénesis sino que se regularían diferencialmente como consecuencia del aumento de concentración de ABA que se produce en ese período.

2.3.2.-Estrés hídrico y ABA

Inmediatamente después de una situación de estrés hídrico se elevan los niveles endógenos de ABA, como ya comentamos anteriormente. Las proteínas inducidas debido a la disminución del potencial agua se pueden dividir en dos categorías: las que se

regulan por ABA y las que no. Quarrie (1990) refleja esta situación al analizar por 2D-PAGE las proteínas marcadas in vivo con S³⁵ en plántulas de arroz sometidas a sequía, encontrando tres proteínas que aumentan su expresión debido al tratamiento, dos de las cuales también aumentan su expresión por tratamiento con ABA. Sin embargo en otros casos todas las proteínas inducidas por estrés hídrico también se expresan en los tratamientos con ABA, como en plántulas de maíz, en las que se analizan electroforésis bidimensionales de proteínas marcadas in vivo (Heikkila et al, 1984), o en las proteínas totales de plántulas de *Phaseolus vulgaris* (Covarrubias et al., 1995).

Nuestros resultados, tanto en la variedad resistente como en la variedad sensible a la sequía, están de acuerdo con el trabajo de Quarrie, ya que encontramos proteínas de sequía que se inducen por ABA y otras que no lo hacen. Es de destacar que gran parte de las proteínas que discutimos anteriormente al referirnos a los tratamientos de sequía y que mostraban el mismo patrón de expresión en las dos variedades, también modifican su expresión por el tratamiento de ABA. Las dos variedades difieren en su respuesta a la sequía ya que una variedad es resistente y la otra es sensible a la deshidratación, pero ambas variedades expresan un gran número de proteínas del mismo modo, como todo el grupo de proteínas que se regulan por ABA y sequía fuerte o por ABA y sequía suave. Estas proteínas demuestran que las células reconocen el nivel de deshidratación al que se ven sometidas y pueden desencadenar dos tipos diferentes de respuestas aunque estén mediadas por ABA. En lo referente a las proteínas que mostraban una expresión diferente entre variedades durante la sequía y por lo tanto que podrían estar involucradas en conferir resistencia a la sequía a la variedad JA-605, se puede decir que aproximadamente la mitad son reguladas por ABA y la otra mitad no lo están.

Entre las secuencias que se expresan durante la sequía pero no son inducidas por la acción del ABA se encuentran dos genes descritos por Guerrero et al. (1990) y Yamaguchi-Shinozaki et al. (1992) en guisante y *Arabidopsis* respectivamente. Sus secuencias se caracterizan por tener 6 dominios de unión a membrana y una estructura en forma de canal por lo que posiblemente su función sea facilitar el movimiento de agua

desde la vacuola al citoplasma. Posiblemente alguna de las proteínas que hemos detectado que se inducen por sequía y no por la adición de ABA exógeno, sea similar a alguna de estas secuencias tanto entre las que muestran la misma expresión en ambas variedades como las que no lo hacen.

Entre las secuencias descritas que se inducen por situaciones de sequía y por tratamientos con ABA se encuentran los genes *le 16* y *le 4* de tomate (Plant et al. 1991 y Cohen et al. 1991) ambos se expresan solo en tejido vegetativo y se diferencian en que el primero nunca se expresa en la raíz. En nuestro caso solo analizamos la expresión génica en callos embriogénicos, por consiguiente es posible que existan otras diferencias de expresión que no estemos considerando, ya que es posible que la resistencia se exprese a un nivel fisiológico, de rango superior al celular. En nuestro sistema solo los mecanismos de resistencia celulares serían detectables por lo que es posible que alguno de los genes implicados en la resistencia no estuvieran activados o fueran inhibidos por las condiciones de cultivo. Se puede concluir que las células pueden responder frente a una situación de estrés hídrico a través de la acción del ABA o independientemente de esta hormona y que en cualquiera de estas dos alternativas se pueden expresar unas determinadas proteínas en respuesta a una fuerte disminución del potencial agua de la célula u otras diferentes si la deshidratación es suave.

2.4.-Análisis conjunto de las situaciones estudiadas

Como ya se descrito a largo de esta discusión entre las numerosas proteínas que se traducen durante la embriogénesis tardía, muchas de ellas se pueden inducir precozmente por la adición de ABA y estarían involucradas en el proceso de adaptación que debe sufrir el embrión cigótico para superar el período de dormancia. Por lo tanto la embriogénesis, la respuesta al estrés hídrico y a la presencia de ABA exógeno comparten mecanismos de regulación conjunta y consecuentemente un cierto número de proteínas se inducirán o reprimirán de una forma coordinada.

Precisamente para evaluar si existen mecanismos coordinados de regulación de algunas de las proteínas se realiza un análisis conjunto de todas las situaciones analizadas. La comparación de todos los patrones simultáneamente permite ver distintas situaciones que quedaban enmascaradas durante los diferentes análisis parciales y son las que se discutirán en este apartado.

No hemos encontrado en las dos variedades ninguna proteína cuya inducción se promueva tanto por el proceso de embriogénesis como por la sequía o por la adición de ABA, como ocurre en alguna de las proteínas LEA. Sin embargo es posible que estemos considerando alguna proteína de este tipo como constitutiva, ya que los callos control son embriogénicos y todos los tratamientos se realizan en este callo. (Ver discusión previa).

Al analizar las variedades por separado sí encontramos algunas proteínas que muestran una regulación semejante por embriogénesis, ABA y sequía. Estas proteínas podrían ser diferenciales entre variedades debido al hecho de que ambos genotipos difieren en la resistencia al estrés hídrico, siendo posible que sean proteínas implicadas en la respuesta a la sequía reguladas por ABA, y que se expresan en las otras dos situaciones por la presencia de la hormona en los últimos estadios de la embriogénesis o por la aplicación exógena de la misma.

El análisis conjunto de todos los datos también muestra que prácticamente la mitad de las proteínas polimórficas presentan el mismo patrón de expresión en las dos variedades. Esta situación queda reflejada en el análisis de componentes principales donde se observa un agrupamiento espacial por tratamientos, apareciendo las variedades siempre juntas frente a las diferentes situaciones analizadas.

Al observar la tabla conjunta de las proteínas se desprende que solo tres proteínas se expresan en una única variedad mientras que en la otra no se puede detectar su presencia en ninguna de las situaciones estudiadas. Una de estas proteínas es la 42 que solo se expresa en la variedad C-8751 durante T0, T1 y sequía suave. Las otras dos proteínas

únicamente se tradujeron en la variedad JA-605 como consecuencia de los tratamientos de sequía (proteína 32) y de ABA (proteína 33).

Era de esperar que fueran muy pocas las proteínas que se expresaran en una única variedad no solo por el hecho evidente de que son dos variedades de la misma especie sino porque como ya describimos el análisis de componentes principales, muestra que ambos genotipos responden más o menos de la misma manera.

Esta situación pone de manifiesto que la resistencia a la sequía de la variedad JA-605 se debería a una regulación distinta sobre las mismas secuencias que comparte con la otra variedad y/o por la acción de unas pocas proteínas que las diferencian. Este último caso corresponde a las proteínas 32 y 33 que mencionamos anteriormente siendo la primera una posible proteína de resistencia.

Asimismo el análisis de todos los datos muestra que la proteína 29 es claramente una proteína que se induce durante la embriogénesis y no se induce su expresión ni por adición de ABA o por la deshidratación. Anteriormente cuando analizamos las situaciones embriogénicas esta proteína no fue considerada como de importancia para el desarrollo ya que se regulaba diferencialmente dependiendo de la variedad. Sin embargo queda claro que es una proteína de embriogénesis tardía y de germinación que muestra una diferencia temporal de expresión controlada por el genotipo. Estas diferencias temporales podrían relacionarse con el comportamiento in vitro no siempre idéntico de las dos variedades. También hemos detectado otra proteína de embriogénesis tardía o germinación que se induce, en este caso, durante el tratamiento de sequía suave (proteína 30). Hasta el momento no se ha citado ninguna proteína con este tipo de regulación en la aún no demasiado extensa literatura. Esta es la primera descripción de una proteína de embriogénesis tardía que se induce por sequía sin estar esta regulación mediada por ABA.

De este análisis global de resultados queda por mencionar el hecho de que los tres tiempos de embriogénesis aparecen representados, en el análisis de componentes principales, muy cercanos entre si como era de esperar debida al bajo número de

proteínas que parecen directamente relacionadas con la función embriogénica en nuestros análisis Este gráfico (pag. 72) también muestra que el tratamiento de sequía suave aparece muy cercano a los tiempos de la embriogénesis, por lo que parece claro, que esta sequía suave se asemeja a la deshidratación que debe sufrir un embrión cigótico durante su desarrollo al entrar en la etapa de dormancia. Aunque las semillas pierden prácticamente el 90% de su peso en agua, este proceso debe ser lento y progresivo, como en las semillas de soja donde dura unos 20 días (Goldberg et al., 1989). Parece bastante probable por lo tanto, que las proteínas que se inducen durante la embriogénesis para hacer frente a la sequía y entrar en dormancia, deben ser aquellas que se pueden inducir por el tratamiento de sequía suave, como la proteína 30 que mencionábamos anteriormente.

3.-ANÁLISIS DEL CLON CM1

Durante la fase final del desarrollo de las semillas tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas se acumula en el embrión un grupo de productos génicos que incluye a varias proteínas como la lectina, el inhibidor de la amilasa, proteínas de membrana, proteínas de reserva y un número considerable de proteínas cuya función aún no se conoce pero que parecen estar relacionadas con la capacidad del embrión para tolerar la desecación. entre estas últimas se encuentra la proteína Em de trigo. esta proteína también se acumula en tejido vegetativo en respuesta al estrés hídrico y es inducible por ABA.

Esta respuesta al ABA del gen Em de trigo, es independiente del tipo de tejido (Rock y Quatrano, 1995) razón por la cual ha sido estudiado, entre otros, para tratar de conocer el control de la expresión génica mediada por ABA. Marcotte et al. (1988) han demostrado que una región de 646 pb del promotor es necesaria y suficiente para conferir la respuesta al ABA de este gen. Dentro de esta región del promotor se realizaron ensayos de delección (Marcotte et al., 1989) y analizando la expresión

transitoria del gen GUS se identificó una región de 62 pb que contiene el elemento específico de respuesta al ABA al que se denominó ABRE por ABA Responsive Element. Dentro de este elemento ABRE existen dos cajas altamente conservadas que se denominaron Em1a y Em2. Si se producen mutaciones en la caja Em1a la respuesta al ABA se pierde por completo o se reduce muchísimo (Guiltinan et al., 1990) por lo que es muy probable que esta caja de 8 pb sea la responsable de conferir esa capacidad de respuesta a la hormona.

Esta secuencia está conservada en genes regulados por ABA como los Rab en arroz (Mundy et al., 1990) o en numerosos genes Lea de algodón (Baker et al., 1988) entre otros, y también en genes inducidos por heridas como en el promotor del inhibidor II de la proteinasa de tomate (PI-II) (Keil et al., 1986). A esta caja Em1a se une la proteína reguladora denominada "bZIPproteins" o proteínas de cremallera de leucina, EmBP-1, que pertenece a una familia de proteínas altamente conservadas que reconocen secuencias de la zona promotora de numerosos genes (Guiltinan y Miller, 1994). Si en la caja Em1a se produce la substitución de 2 pb, la proteína EmBP-1 es incapaz de unirse por lo que cuando se analiza la expresión génica regulada por ABA se observa que esta se reduce. Por lo tanto es la unión de esta proteína a la caja ABA la que controla la respuesta al ABA.

Además la caja ABRE es exactamente igual al motivo G-box que se encontró en numerosos promotores de levaduras (Donald et al. 1990), en promotores de plantas regulados por luz visible y ultravioleta como la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (Giulano et al. 1988) o en el promotor de la alcohol deshidrogenasa 1 de maíz que se induce anaeróbicamente.

También se pueden encontrar secuencias muy parecidas al motivo ABRE/G-box en las regiones promotoras de genes de bacterias, virus y mamíferos.

Todos estos datos revelan que estas cajas o motivos están muy conservados, manifestando la importancia de estas regiones reguladoras.

Como se ha visto en la parte de resultados, la secuencia del gen Em está también altamente conservada no solo en las monocotiledóneas sino también se ha detectado en numerosas dicotiledóneas.

La comparación de secuencias muestra que es una proteína altamente conservada con niveles de identidad superiores al 90% entre las proteínas de las gramíneas. Incluso estos niveles son altísimos al comparar con dicotiledóneas, aunque las monocotiledóneas y las dicotiledóneas hayan divergido en un período que abarca de los 150 a los 300 millones de años. Incluso entre las gramíneas que muestran el grado de homología más cercano a la secuencia del clon CM1, como maíz y cebada, la divergencia ocurrió hace unos 50 millones de años (Zurawski et al., 1984). A pesar de este alto grado de homología existen casos como es el de la cebada en que los miembros de la familia, B19, presentan diferencias en la longitud de la proteína, si bien las secuencias comunes mantienen una alta homología entre si y con los genes homólogos de otras especies.

El hecho de que sea una proteína tan claramente conservada, que se expresa durante la embriogénesis tardía en especies muy diferentes tales como trigo o *Arabidopsis* indica que deben ser muy importantes para la supervivencia del embrión cigótico.

Estas secuencias se encuentran en un número muy bajo de copias en el genoma. En especies diploides parece un gen de copia única como el gen Emb 564 de maíz (Williams y Tsang, 1991) o en zanahoria el gen EMB-1 (Wurtele et al., 1993). En trigo, una especie hexaploide, el gen Em (Litts et al., 1987) pertenece a una pequeña familia multigénica, de unos 10 miembros que presentan un grado de homología elevado ya que los distintos fragmentos de restricción hibridan aproximadamente con la misma intensidad.

El clon CM1 está representado en el genoma de caña de azúcar por pocas copias. Aquí al igual que en el caso de trigo, debemos tener presente que la caña de azúcar es una especie octoploide. El número de copias es de 10 aproximadamente.

En lo que se refiere a la expresión de estas secuencias, como ya se explicó en la introducción, los genes Em de trigo y los genes Emb 564 y Emb 5 de maíz entre otros se

diferencian en su patrón de expresión pues mientras el primero se puede inducir por ABA o estrés hídrico en cualquier tejido, los genes de maíz entre otros solo se expresan en tejido embriogénico y nunca se pudo detectar su expresión en tejidos vegetativos tratados.

El clon CM1 presenta un patrón de expresión diferente a cualquiera de los descritos anteriormente, puesto que aunque detectamos su expresión en los embriones somáticos E1 y E2, si bien el nivel de expresión es muy bajo, no se induce en el callo embriogénico ni con ABA ni en los tratamientos de sequía.

El bajo nivel de hibridación no se debe a alguna causa técnica ya que la sonda hibrida fuertemente con el gen Em de trigo, utilizado como control positivo que como hemos visto es prácticamente idéntico a la secuencia de caña de azúcar, y ambos poseen un intron, de aproximadamente la misma longitud, por lo cual no se puede pensar que el intron interfiera en la hibridación de la sonda ya que lo haría también con el gen de trigo. Por esto parece evidente que la baja intensidad que se observa en la hibridación es el reflejo de un bajo nivel de expresión.

Es posible que la diferencia en el nivel de expresión se deba a que en la mayoría de las especies se analiza el comportamiento de estas secuencias en embriones cigóticos y no en somáticos. Se ha descrito que la expresión de los genes Lea tiene lugar tanto en embriones cigóticos como somáticos de zanahoria (Zimmerman, 1993). Sin embargo el patrón de expresión es completamente diferente ya que en embriones somáticos se detectan, estos genes propios de la embriogénesis tardía, en estadios tan tempranos como los embriones globulares o incluso las masas proembriónicas, como ya hemos comentado anteriormente.

Sin embargo el nivel de expresión del gen EMB-1 (Wurtele et al., 1993) durante la embriogénesis somática es un poco más bajo que los que se muestran en el embrión cigótico. Esta puede ser la razón por la cual en nuestro caso los niveles detectados son tan bajos.

Por otro lado el único gen de una monocotiledónea estudiado en los dos tipos de embriogénesis, gen HyPRP (José-Estanyol et al., 1992), solamente se expresa durante la embriogénesis cigótica. Esto podría indicarnos un comportamiento diferencial entre mono y dicotiledóneas si bien podría ser una situación particular de este gen.

En cualquier caso el comportamiento frente a ABA y tratamientos de sequía no parece asimilable a ninguno de los descritos ya que si bien existen diferencias entre especies, en cuanto a la expresión de los genes Em en tejidos somáticos tratados con ABA, en todos los casos descritos la expresión de este gen se incrementa en los embriones cigóticos en presencia de la hormona.

Desconocemos cual es el motivo de esta falta de expresión puesto que no parece lógico que una secuencia tan altamente conservada en la evolución y con un comportamiento en su expresión igualmente conservado, no se vaya a comportar de una manera semejante en caña de azúcar. Quizás las condiciones en que se realizan nuestro experimento resultan inhibitorias para su expresión. Se podría tener en cuenta que en nuestros tratamientos el 2,4-D está siempre presente, mientras que en los trabajos a los que antes nos hemos referido, realizados en condiciones in vitro, esta auxina está ausente.

Igualmente durante los procesos in vivo se conoce que la concentración de IAA disminuye drásticamente al final de la fase de torpedo, momento en el que comienza a incrementarse la concentración endógena de ABA y a expresarse el gen Em. La posible relación entre el 2,4-D y la falta de expresión de Em necesita ser comprobada.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se pudieron establecer cultivos altamente embriogénicos en las dos variedades utilizadas.

La base de la hoja inmadura resultó un explante idóneo para el establecimiento de callos embriogénicos.

En los dos genotipos los explantes de la zona 2 formaron más callo embriogénico que los explantes de las zonas 1 o 3.

Los callos que se formaron de explantes de la zona 1 presentaron el nivel más alto de regeneración y conversión.

La comparación de las dos variedades reveló que el genotipo C-8751 regenera en un nivel más alto que la otra variedad tanto *in vivo* como *in vitro*.

La electroforesis bidimensional de proteínas traducidas *in vitro* se reveló como un buen método para el análisis simultáneo de cambios en la expresión génica. Se detectaron 67 proteínas polimórficas al comparar los patrones obtenidos entre los distintos tiempos de embriogénesis, los tratamientos con ABA y los de deshidratación.

Se encontraron cuatro proteínas relacionadas con la embriogénesis. Estos datos están de acuerdo con lo publicado por otros autores.

El mayor número de proteínas diferenciales aparecen en el tratamiento con ABA, observándose dieciseis proteínas variables en ambos genotipos (23.8%).

La respuesta al estrés hídrico puede ser dependiente o independiente del ABA y en ambos casos las células pueden responder de forma distinta a un estrés hídrico fuerte o moderado. Se encontraron seis proteínas que responden a la sequía fuerte y a la adición del ABA (8.9%) y dos proteínas que se regulan debido a la sequía suave y al ABA (2.9%).

La proteína 32 podría estar relacionada con la resistencia a la sequía de la variedad JA-605.

Se aisló un clon correspondiente a una secuencia parcial de los genes Lea denominados de tipo Em.

El análisis de la secuencia mostró que a nivel de exones, ésta tiene una alta homología con los genes antes descritos.

La expresión de este clon difiere de la indicada para los genes homólogos de otras especies, encontrándose niveles muy bajos de ARNm durante la embriogénesis. No se pudo inducir su expresión por tratamientos de ABA ni de sequía. Se desconoce la causa de este comportamiento.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

S. M. Al-Janabi, M. McClelland, C. Petersen y B. W. S. Sobral (1994). Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the *Andropogoneas: Saccharinae*. *Theor. Appl. Genet.* 88: 933-944.

C. F. Aquadro y J. C. Avise (1981). Genetic divergence between rodent species assessed by using two-dimensional electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. of Sci. U.S.A.* 78: 3784-3788.

F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. y Struhl, eds (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, N.Y. pp. 4.1.1-4.1.8.

J. C. Baker, C. Steele y L. DureIII (1988). Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* 11: 277-291.

C. L. Baszczyński, D. B. Walden y B. G. Atkinson (1985). Maize genome response to thermal shift. En: *Changes in Eukaryotic gene expression in response to environmental stress*. Editores: B. G. Atkinson y D. B. Walden. Academic Press Inc. pp 349-369

M. Beckert y C. M. Qing (1984). Results of a diallel trial and a breeding experiment for *in vitro* aptitude in maize. *Theor. Appl. Genet.* 68: 247-251.

S. K. Berge, D. M. Bartholomew y R. S. Quatrano (1989). Control of the expression of wheat embryo genes by abscisic acid. *The molecular basis of plant development*. R. L. Goldberg, ed. Liss New York. pp 193-201.

E.T: Bingham, L. V. Hurley, D.M. Katz y W. Saunders (1975). Breeding of alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Sci.* 15: 719-721.

C. Borkird, J. H. Choi y Z. R. Sung (1986). Effect of 2,4-D on the expression of embryogenic program in carrot. *Plant Physiology* 81: 1143-1146.

R. M. Bostock y R S. Quatrano (1992). Regulation of Em gene expression in rice. interaction between osmotic stress and abscisic. *Plant Physiol.* 98: 1356-1363.

C. Boyer, J. L. Hilbert y J. Vasseur (1983). Embryogenesis-related protein synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence in *Cichorium*. *Plant Science* 93: 41-53.

E. A. Bray y R. N. Beachy (1985). Regulation by ABA of conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 79: 746-750.

E. A. Bray (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.

R.I.S. Brettell, W. Wernicke y E. Thomas (1980). Embryogenesis from cultured immature inflorescences of *Sorghum bicolor*. *Protoplasma* 104: 141-146.

E. A. Brisibe, D. Nishioka, H. Miyake, T. Taniguchi y E. Maeda (1993). Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane (1993) *Plant Science* 89: 85-92.

S. F. Chandler y I. K. Vasil (1984). Optimization of plant regeneration from long term embryogenic callus culture of *Pennisetum purpureum* Schum. (Napier grass) J. Plant Physiology 117: 157-161.

P. M. Chandler, R. Munns y M. Robertson (1993). Regulation of dehydrin expression. Plant response to cellular dehydration during environmental stresses. T. J. Close & E. A. Bray eds. 159-166.

P. M. Chandler y M. Robertson (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 113-141.

W. H. Chen, M. R. Davey, J. B. Power y E. C. Cocking (1988a). Sugarcane protoplasts: factors affecting division and plant regeneration. Plant Cell Reports 7: 344-347.

W. H. Chen, M. R. Davey, J. B. Power y E. C. Cocking (1988b). Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. J. Exp. Bot. 39: 251-261.

M. K. U. Chowdhury y I. K. Vasil (1993). Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of hybrid sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.). Theor. Appl. Genet. 86: 181-188.

Q. R. Chu y T. P. Croughan (1990). Genetics of plant regeneration in immature panicle culture of rice. Crop. Science 30: 1194-1197.

B. Claes, R. Dekeyser, R. Villarroel, M. Van den Bulcke, G. Bauw, M. Van Montagu y A. Caplan (1990). Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. Plant Cell 2: 19-27.

T. J. Close, A. A. Koort, P. M. Chandler (1989). A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol. Biol.* 13: 95-108.

A. Cohen, A. L. Plant, M. S. Moses y E. A. Bray (1991). Organ-specific and environmentally regulated expression of two abscisic acid-induced genes of tomato. *Plant Physiol.* 97: 1367-1374.

B.V.Conger, G. E. Henning, D. J. Gray, J. K. Mc Daniel (1983). Direct embryogenesis from mesophyll of orchardgrass. *Science* 221: 850-851.

M. L. Crouch y Y. M. Sussex (1981). Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* (L.) embryos in vivo and in vitro. *Planta* 153: 64-74.

J. H. Crowe, L. M. Crowe, S. B. Leslie y E. Fisk (1993). Mechanisms of stabilization of dry biomolecules in anhydrobiotic organisms. Close y Bray editores. pp: 11-20.

A. A. Covarrubias, J. W. Ayala, J. L. Reyes, M. Hernandez y A. Garcarrubio (1995). Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiology* 107: 1119-1128.

P.J. Dale (1980). Embryoids from cultured immature embryos of *Lolium multiflorum*. *Z. Pflanzenphysiol.* 100: 73-77.

C. Damerval, N. Vartanian y D. de Vienne (1988). Differential two-dimensional protein patterns as related to tissue specificity and water conditions in *Brassica napus* var. *oleifera* root system. *Plant Physiology* 86: 1304-1309.

J. De Buyser, J. L. Marcotte y Y. Henry (1992). Genetic analysis of in vitro wheat somatic embryogenesis. *Euphytica* 63: 265-270.

A. J. De Lisle y M. L. Crouch (1989). Seed storage protein transcription and mRNA levels in *Brassica napus* during development and in response to exogenous abscisic acid. *Plant Physiol.* 91: 617-623.

R. G. K. Donald y A. R. Cashmore (1990). Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis* rcbS-1a promoter. *EMBO J.* 9: 1727-1726.

D. Dudits, L. Bogre, L. Bako, D. dedeoglu, Z. Magyar, T. Kapros, F. Fefoldi y J. Gyorgyey (1993). Key components of cell cycle control during auxin-induced cell division. En: *Molecular and Cell Biology of the Plant Cell Cycle*. Editores J. Ormrod y D. Framcos. Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp. 111-131.

D. R. Duncan, M. E. Williams, B. E. Zehr y J. M. Widholm (1985). The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* 165: 322-332.

L. Duré III (1993). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal* 3: 363-369.

L. Duré III, S. C. Greenway y G. A. Galau (1981). Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination: Changing Messenger Ribonucleic Acid Populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* 20 :4162-4168.

L. Dure III, M. Crouch, J. Harada, T.H.D. Mundy, R. Quatrano, T. Thomas y Z.R. Sung (1989). Common amino acid domains among the LEA protein of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12: 475-486.

R. R. Finkelstein (1993). Abscisic acid-insensitive mutations provide evidence for stage specific signal pathways regulating expression of an *Arabidopsis* late embryogenesis abundant gene *Mol. Gen. Genet.* 238: 401-408.

P. F. Franz y J. H. N. Schel (1991). Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). *Can. J. Bot.* 69: 26-33.

T. S. Futers, S. Onde, M. Turet y A. C. Cuming (1993). Sequence analysis of two linked Em genes from wheat. *Plant Mol. Biol.* 23: 1067-1072.

G. A. Galau, N. Bijaisoradat y D. W. Hughes (1987). Accumulation kinetics of cotton late embryogenesis-abundant mRNAs and storage protein mRNAs: coordinate regulation during embryogenesis and the role of abscisic acid. *Dev. Biol.* 123: 198-212.

P. Gaubier, M. Raynal, G. Hull, G. M. Huestis, F. Grellet, C. Arenas, M. Pages y M. Delseny (1993). Two different Em-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Mol. Gen. Genet.* 238 (3), 409-418.

G. Giuliano, E. Pichersky, V.S. Malik, M.P. Timko, P.A. Scolnik y A.R. Cashmore (1988). An evolutionary conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 7089-7093.

R.B. Goldberg, S.J. Barker y L. Perez-Grau (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 56: 148-160.

C.E. Green y R.L. Phillips (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci.* 15: 417-421.

F. D. Guerrero, J.T. Jones y J.E Mullet (1990). Turgor responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted .Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* 15: 11-26.

E. Guiderdoni , B. Merot, T. Eksomtramage, F. Paulet, P. Feldmann y J.C. Glaszmann (1995). Somatic embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum* Species). En : *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 31 Somatic Embryogenesis and Syntetic Seed II*. Editor Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag pp. 93-113.

M. J. Gultinan, W. R. Marcotte Jr. y R. S. Quatrano (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250: 267-271.

M. J. Gultinan y L. Miller (1994). Molecular characterization of the DNA-binding and dimerization domains of the bZIP transcription factor, EmBP-1. *Plant Mol. Biol.* 26: 1041-1053.

T. Hattori, T. Terada y S. Hamasuma (1995). Regulation of the Osem gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of cis-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1. *Plant J.* 7: 913-925.

J. J. Heikkila, J. E. Papp, G. A. Schultz y J. Derek Bewley (1984). Induction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyls by water stress, abscisic acid and wounding.

D. J. Heinz y G. W. P. Mee (1969). Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum*

species. *Crop Sci.* 9: 346-348.

M. M. Hernandez-Fernandez y B. R. Christie (1989). Inheritance of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genome* Vol 2: 318-321.

W. J. Ho y I. K. Vasil (1983). Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 110: 169-180.

T. K. Hodges, K. K. Kano, C. W. Imbrie y M. R. Becwar (1986). Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Bio/Technology* 4: 219-223.

D. J. Hole, J. D. Smith y B. G. Cobb (1989). Regulation of embryo dormancy by manipulation of abscisic acid in kernels and associated cob tissue of *Zea mays* L. cultured in vitro. *Plant Physiol.* 91: 101-105.

B. Hong, S. J. Uknes y T-H. D. Ho (1988). Cloning and characterization of cDNA encoding a mRNA rapidly induced by ABA in barley aleurone layers. *Plant Mol. Biol.* 11: 495-506.

B. Huang y M. M. Yeoman (1995). Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* L.. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol 31. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. Editor Y. P. S. Bajaj. Springer-Verlag. pp. 371-384.

M. José-Estanyol, L. Ruiz-Avila, P. Puigdomenech (1992). A maize embryo-specific gene encodes a proline-rich and hydrophobic protein. *Plant Cell* 4: 413-423.

E. K. Kaleikau, R. G. Sears y B. S. Gill (1989). Control of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 78: 783-787.

S.B. Karlsson y I.K. Vasil (1986). Morphology and ultrastructure of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* Schum. (Napier grass). *Amer. J. Bot.* 73: 894-901.

M. Keil, J. Sanchez-Serrano, L. Schell y L. Willmitzer (1986). Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Nucleic Acids Res.* 14: 5641.

S. W. King, R. A. Vierling y H. T. Nguyen (1992). Changes in mRNA species during drought stress in winter wheat. *Crop Science* 32: 822-825.

T. Kiyosue, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, K. Higashi, S. Satoh, H. Kamada y H. Harada (1992). Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot. *Plant Mol. Biol.* 19: 239-249.

T. Kiyosue, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, H. Kamada y H. Harada (1993). cDNA cloning of ECP40, an embryogenic cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 21: 1053-1068.

M. Koornneef, M. L. Jorna, D. L. C. Brinkhorst van der Swan y C. M. Karssen (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* L. *TAG* 61: 385-393

A. Leonardi, C. Damerval y D.Vienne (1987). Inheritance of proteins ammounts comparison of two-dimensional electrophoresis patterns of leaf sheaths of two maize lines (*Zea mays* L.) and their hibrids. *Genetical Research* 50: 1-5.

R. Linacero y A. M. Vázquez (1986). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Science* 44: 219-222.

R. Linacero y A.M. Vázquez (1990). Somatic embryogenesis from immature inflorescences of rye. *Plant Science* 72: 253-258.

J. C. Litts, G. W. Colwell, R. L. Chakerian y R. S. Quatrano (1987). The nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the wheat Em protein. *Nucl. Acids Res.* 15: 3607-3618.

J. C. Litts, G. W. Colwell, R. L. Chakerian y R. S. Quatrano (1991). Sequence analysis of functional member of the Em gene family from wheat. *DNA Seq.* 1: 263-274.

M. C. Liu y W. H. Chen (1976). Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding I Creation of genetic varietion through callus culture. *Euphytica* 25: 393-403.

M. C. Liu y W. H. Chen (1978). Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding II Perfomance and yield potential of callus derived lines. *Euphytica* 27: 273-282.

C. M. Liu, Z. H. Xu y N. H. Chua (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5: 621-630.

M. G. Lopez-Bilbao, C. Molina y A. Reyes (1996). A substrate dependent genic expression modification study in the lichen *Xanthoria parietina*. *Cryptogamie Bryol. Lichénol* 17: 15-22.

C. Lu y I. K. Vasil (1981). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. *Theor. Appl. Genet.* 59: 275-280.

C. Lu y I. K. Vasil (1983). Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.) *Theor. Appl. Genet.* 62: 285-290.

R. Lührs y H. Lörz (1987). Plant regeneration in vitro from embryogenic cultures of spring and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 75: 16-25.

W. R. Marcotte, C. C. Bayle y R. S. Quatrano (1988). Regulation of wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts. *Nature* 335: 454-457.

W. R. Marcotte, S. H. Russel y R. S. Quatrano (1989). Abscisic acid-responsive sequences from the Em gene of wheat. *Plant Cell* 1: 969-979.

R. J. Mathias y K. Fukui (1986). The effect of specific chromosome and cytoplasmic substitutions on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus. *Theor. Appl. Genet.* 71: 797-800.

R. J. Mathias, K. Fukui y C. N. Law (1986) Cytoplasmic effects on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus. *Theor. Appl. Genet.* 72: 70-75.

D. R. Mc Carty, C. B. Carson, P. S. Stinard y D. S. Robertson (1989) Molecular analysis of viviparous-1: An abscisic acid-insensitive mutant of maize. *Plant Cell* 1: 523-532.

A. Menéndez-Yuffá, E. G. de García y M. Segura Nieto (1994). Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Catimor. *Plant Cell Reports* 13: 197-202.

D. Michel, F. Salamini, D. Bartels, P. Dale, M. Baga y A. Szalay (1993). Analysis of a desiccation and ABA-responsive promoter from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant J.* 4: 29-40.

L. Michalczuk, T. J Cooke y J. D. Cohen. (1992). Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochem* 31: 1097-1103.

P. C. Morris, P. C. Jewer y D. J. Borsels (1991) Changes in water relations and endogenous ABA content of wheat and barley grains and embryos during development. *Plant, Cell and Environment* 14: 443-446.

J. Mundy y N. H. Chua (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *Embo J.* 7: 2279-2286.

J. Mundy, K. Yamaguchi y N. H. Chua (1990). Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid responsive promotor of a rice rab gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1406-1410.

T. Murashige y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

M. W. Nabors, J. W. Heyser, T. A. Dykes y K. J. DeMott (1983). Long duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta* 157: 385-391.

T. Nishi, Y. Yamada y E. Takahashi (1968). Organ differentiation and plant restoration in rice callus. *Nature* 219: 508-509.

K. Nomura y A. Komamine (1985). Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol* 79: 988-991.

J. J. J. Ooms, K. M. Leon-Kloosterziel, D. Bartels, H. Koornneef y C. H. Karssen (1993). Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 102: 1185-1191.

S. Ohnishi, A. J. Leigh Braun , R. A. Voelker y C. H. Langley (1982). Estimation of genetic variability in natural populations of *Drosophila simulans* by two-dimensional and starch gel electrophoresis. *Genetics* 100: 127-136.

P.H. O'Farrell (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.

P. M. Pechan, D. Bartels, D. C. W. Brown y J. Schell (1991). Messenger RNA and protein changes associated with induction of *Brassica micropore* embryogenesis. *Planta* 184: 161-165.

M. Pla, J. Vilardell, M. J. Guiltinan, W. R. Marcotte, M. F. Niogret, R. S. Quatrano y M. Páges (1993). The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab28*. *Plant Mol. Biol.* 21: 259-266.

A. Plant, A. Cohen, M. S. Moses y E. A. Bray (1991). Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought and abscisic acid-induced gene of tomato. *Plant Physiology* 97: 900-906.

S. A. Quarrie (1990). Water stress proteins and abscisic acid. *British Society for Plant Growth Regulation. Monograph 21. Cambridge Laboratory, U. K.* pp. 13-27.

S. Ramagopal y J. B. Carr (1991). Sugarcane proteins and messenger RNAs regulated by salt in suspension cells. *Plant Cell and Environment* 14: 47-56.

S. Ramagopal (1990). Protein polymorphism in sugarcane revealed by two-dimensional analysis. *Theor. Appl. Genet.* 79: 297-304.

K. Rajasekaran, M. B. Hein, G. C. Davies, M. G. Carnes y I. K. Vasil (1987a). Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. *J. Plant Physiology* 130: 13-25.

K. Rajasekaran, M. B. Hein y I. K. Vasil (1987b). Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum. *Plant Physiol* 84: 47-51.

M. Rakoczy-Trojanowska y S. Malepszy (1993). Genetic factors influencing regeneration ability in rye (*Secale cereale* L.) immature inflorescences. *Theor. Appl. Genet.* 86: 406-410.

B. Reisch y E. T. Bingham (1980). The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. *Plant Sci. Letters* 20: 71-77.

D. Rhodes y A. D. Hanson (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384.

M. Robertson y P. M. Chandler (1992). Pea dehydrins: identification, characterization and expression *Plant Mol. Biol.* 19: 1031-1044.

C. D. Rock y R. S. Quatrano (1995). The role of hormones during seed development. En: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Ed P. J. Davies. Kluwer Academic Publisher Holanda. pp. 671-697.

J. Rolf (1990). *NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Dept. Ecol. Evol.

M. L. Ruiz, J. Rueda, M. I. Pelaez, F. J. Espino, M. Candela, A. M. Sendino y A. M. Vázquez (1992). Somatic embryogenesis, plant regeneration and somaclonal variation in barley. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28. 97-101.

J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

D. Sanchez-Martínez, P. Puigdomenech y M. Pagés (1986). Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos. *Plant Physiology* 82: 543-549.

S. C. Smith, R. R. Racine y C. H. Langley (1980). Lack of genic variation in the abundant proteins of human kidney. *Genetics* 96: 967-974.

P. H. A. Sneath y R. R. Sokal (1993). *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.

E. M. Southern (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

B. M. S. Sobral, D. P. V. Braga, E. S. Lahood y P. Keim (1994). Phylogenetic analysis of chloroplast restriction enzyme site mutations in the *Saccharinae* Griseb. subtribe of the *Andropogonae* Dumort. tribe. *Theor. Appl. Genet.* 87: 843-853.

R. A. Stacy, M. Espelund, S. Saeboe-Larsen, K. Hollung, E. Helliesen y K.S. Jakobsen (1995). Evolution of the Group 1 late embryogenesis abundant (Lea) genes: analysis of the Lea B19 gene family in barley. *Plant Mol. Biol.* 28: 1039-1054.

P. W. J. Taylor, T. A. Fraser, H. L. Ko y R. J. Henry (1995). RAPD analysis of sugarcane during tissue culture. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, 241-246.

P. W. J. Taylor, H. L. Ko, S. W. Adkins, C. Rathus y R. G. Birch (1992). Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28: 69-78.

D. T. Tomes y O. S. Smith (1985). The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays*) germoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 70: 505-509.

E. J. Van Damme y W. Peumans (1995). Isolation and cDNA cloning of an Em protein from mung bean (*Vigna radiata*) axes. GenBank Database Document U31211.

I. K. Vasil (1987). Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *J. Plant Physiol.* 128: 193-218.

I. K. Vasil y V. Vasil (1980). Clonal propagation. En: *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*. *Int. Rev. Cytol. Supp.* 11A. Ed: I. K. Vasil. pp. 143-173.

I. K. Vasil y V. Vasil (1995). In vitro culture of cereals and grasses. En: *Plant Cell and Tissue Culture*. Ed: I. K. Vasil y T. A. Thorpe. *Kluwer Academic Publishers*, Holanda. pp. 293-312.

L. A. C. J. Voeselek y R. Van der Veen (1994) The role of phytohormones in plant stress: too much or too little water. Review. *Acta Bot. Neerl.* 43 (2) p 91-127.

H. Wenzler y F. Meins Jr. (1986) Mapping regions of the maize leaf capable of proliferation in culture. *Protoplasma* 131: 103-105.

W. Wernicke y L. Milkovits (1984) Developmental gradients in wheat leaves-response of leaf segments in different genotypes cultured in vitro. *J. Plant Physiology* 115: 49-58.

W. Wernicke y R. Brettell (1980). Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. *nature* 287: 138-139

H. D. Wilde, W. S. Nelson, H. Booij, S. C. de Vries y T. L. Thomas (1988) Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta* 176: 205-211.

B. Williams y A. Tsang (1991) A Maize gene expresses during embryogenesis is abscisic acid-inducible and highly conserved. *plant Mol. Biol.* 16: 919-923.

B. Williams y A. Tsang (1992). Nucleotide sequence of an abscisic acid-responsive, embryo-specific maize gene. *Plant Physiol.* 100: 1067-1068.

B. Williams y A. Tsang (1994). Analysis of multiple classes of abscisic acid-responsive genes during embryogenesis in *Zea mays*. *Dev. Genet.* 15: 415-424.

E. S. Wurtele, H. Wang, S. Durgerian, B. J. Nikolau y T. H. Uhlrich (1993). Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus Carota*. *Plant Physiol.* 102: 303-312.

K. Yamaguchi-Shinozaki, M. Koizumi, S. Urao y K. Shinozaki (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* 33: 217-224.

L. W. Zeng y R. S. Singh (1993). A combined classical genetic and high resolution two-dimensional electrophoretic approach to the assessment of the number of genes affecting hybrid male sterility in *Drosophila simulans* and *D. sechellia* *Genetics* 135: 135-147.

J. L. Zimmerman (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423.

G. Zurawski, M. T. Clegg, y A. H. D. Brown (1984). The nature of nucleotide sequence divergence between barley and maize chloroplast DNA. *Genetics* 106: 735 -749.