



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Aislamiento y caracterización molecular de genes
que codifican para proteínas ricas en prolina,
asociadas a la pared celular en plantas de frijol
Phaseolus vulgaris (L.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

ABRAHAM IGNACIO MARTÍNEZ ROMERO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Director de Tesis
DR. FRANCISCO CAMPOS ÁLVAREZ

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

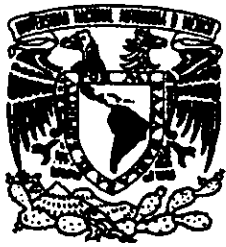


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

“Aislamiento y caracterización molecular de genes que codifican para proteínas ricas en prolina, asociadas a la pared celular en plantas de frijol Phaseolus vulgaris (L.)”

realizado por Abraham Ignacio Martínez Romero.

Con número de cuenta 9038854-7, pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de tesis Dr. Francisco Campos Álvarez
Propietario

Propietario Dr. Víctor Manuel Valdés López

Propietario Dr. Federico Esteban Sánchez Rodríguez

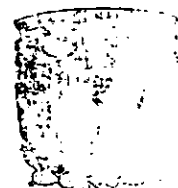
Suplente Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles

Suplente Dr. Antonio Eusebio Lazcano-Araujo Reyes

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Edna María Suárez Díaz

Consejo Departamental de Biología
Dr. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A mis abuelos Celia y Roman

A mi madre Silvia por enseñarme
todo lo hermoso de la vida

A mi padre Eduardo por enseñarme
el valor del trabajo

A los dos por su apoyo y amor
incondicional.

A Magda y Lalo por ser mis dos
grandiosos hermanos.

A mis camaradas de toda la vida
Rogelio, Miguel y Victor.

Agradecimientos

A mi director de tesis Dr. Francisco Campos Álvarez, alias PANCHO, por la dirección y revisión de este trabajo, por contribuir a mi formación académica y no solo por ser mi asesor, sino por ser un buen amigo. Gracias.

A la Dr. Alejandra Alicia Covarrubias Robles, quiero darle las gracias por su apoyo, sugerencias y comentarios, y por todas las facilidades otorgadas para el uso del laboratorio en la realización de esta tesis.

A mis sinodales Dr. Antonio E. Lazcano-Araujo Reyes, Dr. Victor M. Valdés López y Dr. Federico E. Sánchez Rodríguez, por la revisión y comentarios sobre el contenido de la tesis los cuales ayudaron para el buen término de la misma.

A los miembros del laboratorio: Blanca, Adriana, Liz-Pa, Larissa, Marina, Sonia, Esperanza, LuzMa, Rosi, José Luis, Emmanuel, gracias por su apoyo y amistad.

A todos mis compañeros de la facultad y en especial a Elena, Ligia, Marcela, Elizabeth y Cinthya.

A Alma y a su hijo Alejandro.

A mi amiga Lourdes.

Al programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL).

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), proyecto IN224096.

INDICE

INDICE	1
Introducción	3
Generalidades	3
La importancia del agua en la vida de las plantas	3
El estrés y los factores ambientales que lo provocan	4
Resistencia a la sequía	5
Regulación de la respuesta al estrés osmótico	6
La Pared Celular	8
Composición molecular de la pared celular	8
Función de las paredes celulares	9
Modificación de la pared celular	9
Proteínas estructurales y enzimas en la pared celular	10
Extensinas	11
Proteínas ricas en prolina (PRPs)	12
Antecedentes	14
objetivos	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares	16
Material y Métodos	17
Preparación de geles de agarosa para el análisis de DNA	17
Electroforesis del RNA en geles de agarosa en presencia de formaldehído	18
Enzimas utilizadas	19
Material Vegetal	20
Germinación	20
Tratamiento de déficit hídrico	20
Características de la genoteca de cDNA usada	21
Vectores de clonación utilizados	21
Sondas de cDNA utilizadas	21
Tamizado diferencial	22
Plateado de la genoteca de cDNA y transferencia de las placas de lisis a membrana	22
Condiciones de hibridación y lavado de las membranas	22
Hibridación y tamizado diferencial	22
Identificación de colonias de bacterias con plásmidos recombinantes	27
Extracción a gran escala y purificación de plásmido	27

Purificación del plásmido.....	29
Secuenciación de DNA	29
Marcaje de sondas radioactivas	31
Análisis de las Secuencias Obtenidas	31
Extracción y Analisis del RNA total	32
Resultados.....	33
Obtención y aislamiento de cDNAs relacionados a PvPRP2	33
Subclonación de los cDNAs aislados	33
Análisis de las secuencias de cDNA.....	36
Análisis de los patrones de expresión de los genes Pvrp durante el estrés hídrico.....	42
Discusión.....	45
Conclusiones	50
Bibliografía	51

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Las plantas terrestres, que abarcan a las briofitas, pteridofitas y embriofitas, evolucionaron a partir de progenitores acuáticos fotosintéticos conocidos como algas verdes (**Bhattacharya, et al.**, 1998, **Kenrick, et al.**, 1997, **Qui, et al.**, 1999). Su transición de un habitat acuático a una forma de vida terrestre, hace al menos 480 millones de años, fue uno de los sucesos evolutivos más importantes de su historia y los organismos derivados de esta sucesión evolutiva, tuvieron que adaptarse al ambiente terrestre, en donde el agua siempre fluctuante, era y sigue siendo el requerimiento y la presión ambiental más importante para su crecimiento, desarrollo y función.

Para poder sobrevivir bajo estas condiciones, fue esencial que las plantas desarrollaran características adaptativas que les ayudaran a explotar y obtener (raíz), distribuir (sistema vascular) y conservar (epidermis) el agua, (**Raven, 1992, Scagel, et al.**, 1984). Uno de los más notables cambios que se dio en las plantas, fue el surgimiento de distintos tipos celulares. La variedad en tamaños, formas y funciones diferentes de las células vegetales fue determinada ampliamente por la aparición de las paredes celulares. Desde el momento en que cada tipo celular tuvo su individualidad, las mutaciones en los genes que controlaban su crecimiento, tamaño, y forma celular, vía su acción sobre las paredes celulares, fueron y son los mayores agentes de la diversificación evolutiva, entre otros. Esta variabilidad celular refleja de manera directa la vasta diversidad ecológica de las plantas (**Kieliszewski, et al.**, 1994, **Stebbins, et al.**, 1992).

La importancia del agua en la vida de las plantas

La mayoría de los recursos intercambiados, entre las plantas y el medio ambiente en que habitan, se da a través del agua. El agua es el compuesto más abundante en las células vegetales y debido a sus cualidades polares, tiene una gran influencia en las propiedades y estructuras moleculares de ácidos nucleicos, proteínas, membranas, polisacáridos y otras moléculas hidrofílicas. Desde el punto de vista fisicoquímico, las fuerzas cohesivas y adhesivas regulan su movimiento a través de los sistemas de

transporte (floema y xilema). Además es un excelente solvente, ya que por una parte es el medio por el cual las moléculas se mueven dentro y entre las células, y por otra es donde se llevan a cabo todas las reacciones bioquímicas de los procesos metabólicos existentes dentro de la célula (Nilsen, 1996, Taiz, 1991). Debido a los muchos significados que tiene el agua para la vida de las plantas, la cantidad de agua disponible para estas en muchos hábitats naturales y sistemas agrícolas, constituye una condición de estrés ambiental.

El estrés y los factores ambientales que lo provocan

Una gran diversidad de especies vegetales distribuidas en toda la superficie terrestre habita una amplia variedad de ambientes con diferente composición de condiciones abióticas e interacciones bióticas. A lo largo del proceso evolutivo, las plantas desarrollaron características morfológicas, anatómicas y fisiológicas que aseguraron el éxito de sus poblaciones en condiciones medioambientales muy heterogéneas.

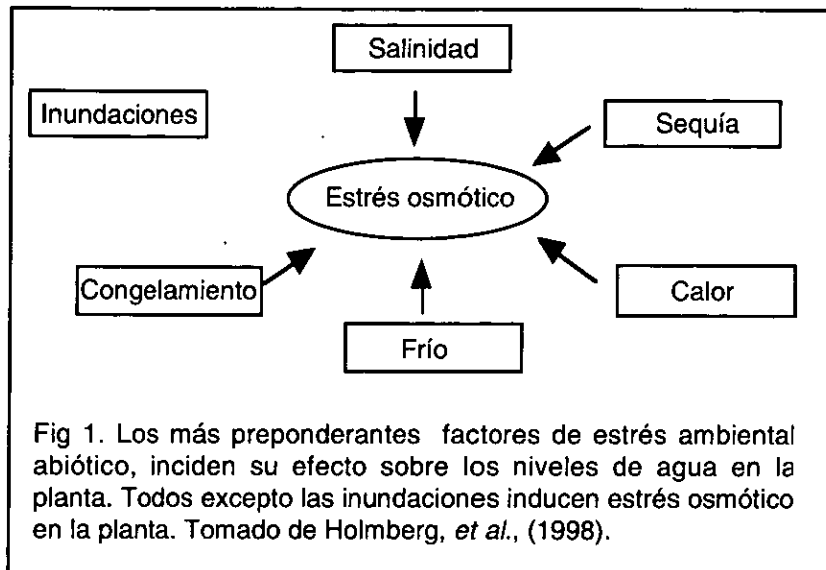
El estrés se presenta cuando las condiciones ambientales, estimulan un cambio fisiológico en las plantas que ocasiona la reducción del crecimiento y la disminución de su productividad o que favorece y ha favorecido el desarrollo de estrategias fisiológicas y morfológicas que permiten la consecuente aclimatación de la población o adaptación de la especie a lo largo del tiempo (Nilsen, 1996).

Una gran cantidad de factores ambientales pueden influir en el proceso fisiológico normal de una planta, y pueden ser divididos en dos grandes categorías: a) abióticos y b) bióticos (Tabla 1).

Abióticos		Bióticos
Físicos	Químicos	
Sequía	Polución del aire	Competencia
Temperatura	Metales pesados	Alelopatía
Radiación	Pesticidas	Herbivoría
Inundación	Toxinas	Enfermedades
Viento	pH del suelo	Hongos patógenos
Campos Magnéticos	Salinidad	Virus

Tabla 1. Lista parcial de diversos factores que son fuente de estrés ambiental en las plantas. Tomada de (Nilsen, 1996).

Con excepción de las inundaciones, todas las fuentes de estrés ambiental abiótico como la temperatura (el calor y el frío), sequía, congelamiento y la salinidad, inducen un estrés osmótico (Holmberg, *et al.*, 1998, Shinozaki, *et al.*, 1996), (Figura 1).



Los conceptos de estrés hídrico, déficit hídrico y deshidratación, son ampliamente utilizados para referirse a las situaciones donde la insuficiente disponibilidad de agua, limita el crecimiento, la productividad, el desarrollo normal y la supervivencia de las plantas (Holmberg, *et al.*, 1998, Smirnoff, 1998, Zhu, *et al.*, 1997).

Resistencia a la sequía

La respuesta morfológica, anatómica y fisiológica de las plantas al estrés hídrico, puede ser dividida en tres grandes estrategias: a) *escape* b) *tolerancia* y c) *evasión*, (Ludlow, 1993, Nilsen, 1996) (Tabla 2).

a) *Escape*. Las plantas pueden escapar a la sequía cuando cerca de la temporada de lluvias las semillas germinan, creciendo rápidamente, floreciendo y produciendo semillas antes de que el suministro de agua se agote.

b) *Tolerancia*. Una planta presenta tolerancia cuando en la condición de estrés es capaz de mantener una actividad metabólica alta, similar a la que se produce en condiciones naturales óptimas. Los mecanismos mediante los cuales las plantas pueden tolerar la limitación de agua son: producción de proteínas protectoras para mantener el potencial de turgor.

c) *Evasión*. En contraste, la evasión ocurre cuando las plantas tienen una severa reducción de la actividad metabólica que puede ocasionar el desarrollo de un estado de latencia. Los mecanismos por los cuales las plantas pueden evadir la limitación de agua son: a) reducción de la pérdida de agua por evaporación y b) aumento en la captación y acumulación de la misma.

Escape	
	Ciclo de vida corto
	Plasticidad en el desarrollo
	Extensión de la latencia
Tolerancia	
	Mantener el potencial de turgor (ajuste del potencial osmótico)
Evasión	
	Reducción de la pérdida de agua
	Aumento de la acumulación de agua
Tabla 2. Mecanismos mediante las plantas pueden escapar, tolerar ó evadir la limitación de agua. Tomada de (Ludlow, 1993, Nilsen, 1996)	

Regulación de la respuesta al estrés osmótico

En respuesta al estrés osmótico, se incrementa la expresión de un conjunto de genes, mientras que otros tantos a su vez inician su expresión, bajo las nuevas condiciones de estrés (Zhu, *et al.*, 1997). Paralelamente se ha visto que genes que estaban siendo generalmente expresados en condiciones normales, bajan el nivel de su expresión parcial o totalmente (Chandler, *et al.*, 1994, Sachs, *et al.*, 1986, Tabaeizadeh, 1998).

La maquinaria que dirige los eventos celulares que regulan la expresión de genes bajo la inducción del estrés osmótico, cumplen con el modelo celular general desarrollando una compleja cascada de transducción de señales que pueden ser dividida en tres eventos generales:

a) *Percepción o reconocimiento del estímulo.* Se piensa que bajo las condiciones de estrés hídrico, las células vegetales disminuyen la presión de turgor, volumen celular, el potencial osmótico y existe una alteración de las conexiones de la pared celular y la membrana plasmática (**Bray, 1997**).

b) *Transducción y amplificación de la señal.* El ácido abscísico (ABA) está involucrado en eventos relacionados con el desarrollo y es mediador en un gran conjunto de respuestas adaptativas en las plantas a las condiciones medioambientales adversas, como son la sequía y la salinidad (**Giraudat, 1995**). Sin embargo, una serie de reportes indican que ABA, no es el único regulador en la inducción de algunos genes por estrés hídrico, (ABA-independientes) (**Bray, 1997, Chandler, et al., 1994, Shinozaki, et al., 1996**). El ABA se ha considerado como una hormona de estrés ya que su concentración de ABA puede aumentar o disminuir dramáticamente a causa de factores abióticos o bien como parte de los procesos de desarrollo normal de las plantas.

c) *Activación de un conjunto de genes implicados en la respuesta al estrés y acumulación de proteínas.* Como resultado de lo anterior, hay una modificación de la expresión génica a nivel transcripcional que tiene como consecuencia la inducción diferencial de nuevos genes; el producto de esta inducción permite a las plantas hacer los ajustes bioquímicos y estructurales, para contender con las condiciones de estrés (**Sachs, et al., 1986**). Por otro lado, también se presenta la represión gradual de otros genes normalmente ya expresados, cuyos productos pueden ser inapropiados para la nueva situación que se enfrenta (**Chandler, et al., 1994**). Los productos de estos genes son clasificados en dos grupos: El primer grupo incluye proteínas cuya probable su función sea conferir tolerancia al estrés hídrico, y el segundo contiene factores proteicos involucrados en promover la regulación de las señales de transducción y expresión génica en respuesta al estrés (**Imgram, et al., 1996, Leung, et al., 1998, Shinozaki, et al., 1997**).

LA PARED CELULAR

Composición molecular de la pared celular

La pared celular vegetal es una entidad molecular compleja formada de polisacáridos (celulosa), lignina, suberina, ceras, proteínas, enzimas, calcio, boro y agua (Cassab, 1998). Después de ser secretada al espacio extracelular, los polímeros de la pared se autoensamblan (el ensamblado está también mediado por una actividad enzimática (Cosgrove, 1997)), depositándose en capas alrededor y junto a la superficie externa de la membrana plasmática. Su composición y estructura molecular depende del tipo celular, tejido, órgano y especie de cada planta (Taiz, 1991).

La estructura química de la pared primaria de las plantas monocotiledóneas varía sustancialmente con respecto a las dicotiledóneas (Carpita, 1996). La pared primaria de estas últimas se compone aproximadamente de 30% de celulosa, 30% de hemicelulosa y 35% de pectina. La parte correspondiente a las proteínas representa el 1-10% (Lamport, 1965, Reiter, 1998).

La idea general de la pared primaria es la de una estructura de polímeros compuesta de dos poblaciones principales de polisacáridos: la celulosa y los componentes de la matriz. La celulosa proporciona fuerza y estructura a la pared celular, formando microfibrillas cristalinas que están embebidas en un complejo altamente hidratado de polisacáridos compuesto de hemicelulosas y de pectinas. Estas moléculas se unen a la superficie de la celulosa quizá formando enlaces que unen a las microfibrillas cristalinas entre sí o como un lubricante protector para prevenir el contacto directo entre microfibrillas. Las pectinas forman un gel que embebe la red de celulosa-hemicelulosa, actuando como un relleno para prevenir la agregación y el colapso de la red y para modular la porosidad de la pared celular. El agua es el componente más abundante de la pared celular, aproximadamente del 75% al 80% del agua en un planta se encuentra en la matriz y, aporta dos tercios de la masa en la pared celular de tejidos en crecimiento (Cosgrove, 1997, Reiter, 1998).

Función de las paredes celulares

De manera general, la pared en la célula vegetal cumplen con diversas funciones en el ciclo de vida de las plantas. Tiene una función estructural, actuando como exoesqueleto que provee la rigidez necesaria para dar soporte a los diferentes tejidos del cuerpo de las plantas y paralelamente regula el crecimiento, dirigiendo la orientación de la división y expansión celular junto con el citoesqueleto (**Carpita, 1993, Hable, et al., 1999**). Se piensa también que percibe y regula el estímulos ambientales, y además, permite la comunicación intercelular (**Lucas, 1995**) y el intercambio selectivo de sustancias y hormonas (**Momonoki, 1997**). También otorga protección en contra de enfermedades e infecciones por parte de hongos, bacterias y virus. Asimismo protege las plantas del daño ocasionado por insectos y por el ramoneo de animales herbívoros (**Stebbins, et al., 1992**)

Modificación de la pared celular

La biosíntesis y especialización de la pared celular esta regulada con precisión en el tiempo y el espacio. La pared se modifica continuamente reorganizando sus elementos, tanto en los procesos de desarrollo y crecimiento vegetal, así como en el transcurso de un estrés ambiental, debido a condiciones abióticos y/o por interacciones bióticas del medio (**Reiter, 1998, Showalter, 1993**). Estos procesos están caracterizados por la modificación física y química de la pared celular ya existente, a causa de una actividad enzimática y/o por la adición de nuevo material.

Recientemente se han reportado diversos genes inducidos por estrés osmótico, que codifican para proteínas de la pared celular o para enzimas implicadas para su formación y metabolismo (**Colmenero-Flores, et al., 1997**) (Tabla 3).

Proteína	Especie	Inducibilidad	Referencia
S-Adenosil-metionina-sintasa	Tomate	NaCl y deshidratación	(Espartero, <i>et al.</i> , 1994)
Extensina (<i>SAP1</i>)	Winged bean	NaCl	(Esaka, <i>et al.</i> , 1992)
Rica en prolina (<i>SbPRP2</i>)	Soya	Deshidratación	(Creelman, <i>et al.</i> , 1991)
Rica en prolina quimérica (<i>MsPRP2</i>)	Alfalfa	Dehidratación	(Deutch, <i>et al.</i> , 1995)
Peroxidasa	Tomate	NaCl	(Botella, <i>et al.</i> , 1994)
Similar a Cys-proteasa (<i>Cyp15a</i>)	Judía	Deshidratación, NaCl	(Jones, <i>et al.</i> , 1995)
p33 y p36	Frijol	Deshidratación	(Covarrubias, <i>et al.</i> , 1995)

Tabla 3. Proteínas de la pared celular inducidas por estrés osmótico. Tomada de (Colmenero-Flores, *et al.*, 1997).

Proteínas estructurales y enzimas en la pared celular

Además de la gran cantidad de polisacáridos que integran a la pared celular, entre otros elementos, la pared celular cuenta también con: a) *enzimas* y b) *proteínas estructurales*. Es en la pared primaria, donde se encuentran a la mayor parte de las proteínas en la pared celular (Marcus, *et al.*, 1991).

Un número importante de enzimas están asociadas a la pared celular (Cassab, 1998). En el crecimiento y desarrollo de las plantas, y en los eventos de estrés, la pared celular se modifica constantemente por acción enzimática. La función precisa de las enzimas en la pared celular es desconocida, pero sin duda se encuentran involucradas en numerosos procesos celulares que van desde la modificación de la pared, actuando sobre al mayoría de los polisacáridos y otros sustratos presentes, hasta en el transporte de metabolitos y la señalización celular. Se ha visto que también ejercen su actividad en la pared de bacterias y hongos, potencialmente patógenos. Por estas razones, se ha sugerido que también la pared es una parte metabólicamente activa de la célula al igual que otros compartimentos que la forman (Cosgrove, 1997, Lamport, 1965).

Las proteínas estructurales de la pared celular presentan diferentes abundancias de acuerdo al tipo celular, órgano de la planta y estado de maduración de éstas. Su acumulación también se afecta por estímulos ambientales (factores abiótico e interacciones bióticas), lo cual altera la composición y variación estructural de la pared celular. Estas proteínas son ricas en uno o dos aminoácidos; tienen dominios de secuencia altamente repetidos, y pueden estar abundante o escasamente glicosiladas; no

tienen actividad enzimática conocida y pueden ser inmovilizadas dentro de la pared por entrecruzamientos covalentes. Aún se desconoce las interacciones intermoleculares que se establecen entre las proteínas con los otros componentes de la pared que se encuentran en su vecindad (Cassab, 1998).

Sin embargo, a las proteínas de pared en las células vegetales se les ha clasificado y descrito de acuerdo a su composición predominante de aminoácidos. Las más conocidas son: las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), grupo que incluye a las extensinas, las proteínas ricas en prolina (PRPs), las arabinogalactanas (AGPs) y las proteínas quiméricas, que tienen una mezcla de dominios. También se incluye a las proteínas ricas en glicina (GRPs). Aunque su función precisa se desconoce, se han sugerido posibles funciones relacionadas al dominio de su secuencia, a la localización en el cuerpo de la planta y a su patrón morfogénico general.

La información que a continuación se proporciona acerca de la estructura, la expresión, la localización, las interacciones intermoleculares y las funciones de las extensinas y de las proteínas ricas en prolina en las células vegetales, procede de las siguientes fuentes (Cassab, 1998, Keller, 1993, Kieliszewski, *et al.*, 1994, Marcus, *et al.*, 1991, Showalter, 1993).

EXTENSINAS

Estructura. Las extensinas en plantas dicotiledóneas están ampliamente representadas, mientras que en monocotiledóneas (gramíneas) su número es reducido, (Carpita, 1996). Son proteínas ricas en hidroxiprolina (Hyp) y en serina (Ser) y en alguna combinación de aminoácidos como: la valina (Val), tirosina (Thr), histidina (His) y lisina (Lys). Poseen dominios de secuencia altamente repetidos de la forma Ser-(Hyp)₄. En las extensinas muchos de los residuos de prolina se hidroxilan para generar hidroxiprolina, las cuales se encuentran glicosiladas con uno a cuatro residuos de arabinosa y también algunos residuos de serina se presentan glicosilados con una unidad de galactosa (Gal). Además, las extensinas son proteínas básicas con puntos isoeléctricos de ~10, lo anterior es el resultado de su alto contenido en residuos de lisina.

Expresión. La expresión de la extensina se incrementa en respuesta a diversas condiciones y tratamientos como: el daño mecánico, la infección viral y de hongos, los

elicitores endógenos y de hongos, el etileno, la luz roja, el estrés por calor, el glutatión en cultivos celulares y durante el desarrollo.

Localización. Estos estudios revelan que la extensina se localiza preferencialmente en las células del esclerénquima y del cambium vascular, aunque también han sido asociadas a los tejidos del floema y del xilema secundario.

Interacciones moleculares. La extensina se insolubiliza lentamente quedando inmóvil dentro de la pared celular a causa de la formación de uniones covalentes, pero existen escasas evidencias de la naturaleza de estas uniones, ya que no se conoce como interactúan las extensinas entre ellas mismas, ni tampoco con los demás constituyentes (proteínas y polisacáridos) que se encuentran integrando la pared celular. Los estudios realizados en diferentes especies de plantas, han propuesto diversos mecanismos de entrecruzamiento como posibles respuestas a la unión covalente entre las extensinas. Tales propuestas son los casos de la unión de residuos de tirosina (isoditirosina y la diisoditirosina), la unión de la extensina con la pectina de la matriz celular así como la peroxidación de la misma.

Función. Las propiedades estructurales conocidas, la expresión génica así como su localización en células y tejidos de la extensina, pueden dar indicios de su función, pero no existen evidencias directas de esto todavía. Se piensa que las extensinas podrían estar involucradas en los procesos del desarrollo, la cicatrización de heridas y en la defensa de la planta contra patógenos.

PROTEÍNAS RICAS EN PROLINA (PRPs).

Dentro de este grupo se encuentran dos tipos de proteínas. Las proteínas ricas en prolina propiamente dichas y las nodulinas, que están formando parte constitutiva de las paredes celulares en el nódulo en raíces infectadas por bacterias en plantas leguminosas.

Estructura. Las PRPs y las nodulinas están caracterizadas esencialmente, con algunas variaciones dentro de grupo, con el dominio de secuencia (Pro-Pro-X-Y-Lys)_n donde X ó Y pueden ser valina (Val), tirosina (Tyr), histidina (His) y glutamina (Gln). Se encuentran poco glicosiladas y carecen notablemente de Ser. Además el análisis de

algunos motivos muestran una Hyp exclusivamente en la segunda posición del pentámero (Pro-Hyp-X-Y-Lys)_n.

Expresión. Se ha indicado que las PRPs están implicadas en el desarrollo, por ejemplo, inicio de la germinación, en la formación de la vaina y en los primeros estadios de nodulación. Su expresión se induce por corte, elicitores endógenos y de hongos, etileno, en cultivos celulares, sequía y luz.

Localización. Las PRPs muestran patrones de expresión muy específicos en células y tejidos. Comúnmente están presentes en el xilema, las fibras, las esclereidas, la epidermis, la capa de aleurona y el parénquima del nódulo.

Interacciones moleculares. Como las extensinas, las PRPs se encuentran insolubilizadas en la matriz de la pared celular. El proceso de insolubilización parece ocurrir rápidamente en respuesta al estrés (elicitores procedentes de hongos) y quizá pueda estar mediado quizá por el aumento de peróxido de hidrógeno y catalizada por una peroxidasa existente en la pared. Sin embargo el mecanismo que provoca la insolubilización de las PRPs es desconocido. Se ha propuesto que la PRPs y la HGRPs están involucradas en el proceso de lignificación debido a la afinidad de los sustrato fenólico por los residuos propil en la estructura de estas proteínas.

Función. Las PRPs pare ser que participan en algunos aspectos del desarrollo del xilema, ovario, embrión, nódulo y diferenciación de la vaina, pero sus funciones específicas todavía son desconocidas.

ANTECEDENTES

En ensayos realizados con extractos de proteínas básicas provenientes de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), sometidas a estrés hídrico, se ha encontrado una acumulación abundante de dos proteínas con peso molecular de 33 y 36 kD, a las que se denominó p33 y p36, respectivamente [Ayala, 1993 #65; Covarrubias, 1994 #60; García-Gomez, 1999 #108]. Hasta el momento se ha determinado que estas proteínas pertenecen a la familia de las PRPs. Estas proteínas presentan las siguientes características:

- a) Se encuentran asociadas a la pared celular.
- b) Poseen un alto punto isoeléctrico, por lo que son de naturaleza básica.
- c) p33 y p36 poseen propiedades de adhesión.
- d) No solo se inducen por déficit hídrico sino también por tratamiento con ABA. La aplicación de ABA a plantas de frijol provoca la disminución de la longitud del hipocotilo y un incremento en la cantidad de las proteínas p33 y p36, tanto en hipocotilo como en raíz pero, sin embargo no se detectan en epicotilo.
- e) El patrón de inducción en la acumulación de las proteínas p33 y p36 es bastante diferente en cada uno de estos órganos. Aunque los niveles finales de acumulación son iguales para ambas, p33 se acumula con una cinética más rápida y por tanto es también es la primera en llegar a la máxima acumulación tanto en hipocotilo como en raíz. En el hipocotilo después de 12 horas de haber comenzado el estrés por falta de agua en el suelo, existe un incremento sustancial de ambas proteínas alcanzando su máximo nivel de acumulación hacia las 72 horas. Por el contrario, la raíz, alcanza los niveles máximos de acumulación hacia las 24 horas después de iniciado el estrés hídrico en hipocotilo p33 y p36 aumentan su cantidad en 50 y 60 veces respectivamente. Asimismo en raíz, la acumulación para ambas es de 60 veces, en comparación con plantas bien irrigadas.
- f) Ambas proteínas están relacionadas antigénicamente, con la familia de proteínas tipo *Proteínas Ricas en Prolina* de soya, en plantas de soya, (*Glycine max*).

g) Se ha obtenido la secuencia de aminoácidos parcial a partir de péptidos generados por degradación parcial con quimiotripsina de ambas proteínas

p33	a) KPPVEKPPVY·KPPVEKPPVY
p36	b) KPPVEKPPVY·KPPVEKPPVY·KPPVEKPPVY
	c) KPPVEKPPVY·KPPVEKPPVY

Las secuencias internas tienen el motivo PPVYKPPVEK el cual es característico de las PRPs.

h) La secuencia del amino terminal de p33 (NYDVPPVEKPPVYKPPVEKP) y la de p36 (NYDKPPVEKPPVYKPPVEK) es parecida al amino terminal de una PRP de alfalfa, (*Medicago truncatula*) llamada MsPRP4 (Wilson, *et al.*, 1994).

Los datos anteriores nos indican fuertemente que las proteínas p33 y p36 son parte de la familia de proteínas tipo PRP de frijol. Hasta ahora solo se ha caracterizado formalmente a la familia de PRPs de soya, careciéndose de datos para frijol. Por otro lado poco se conoce sobre su función, tanto durante el crecimiento y desarrollo de la planta, como durante la respuesta a estrés osmótico. Por ello hemos considerado importante llevar a cabo un análisis detallado de esta familia en frijol.

OBJETIVOS

Hasta ahora se ha señalado que las proteínas p33 y p36 se encuentran asociadas a la pared celular y pertenecen a la familia génica de las proteínas ricas en prolina (PRPs). El propósito de este trabajo es el de llevar a cabo una caracterización más detallada de esta familia génica en plantas frijol.

Objetivo general

Estudiar la familia de las proteínas ricas en prolina

Objetivos particulares

- 1.- Aislar miembros relacionados a la familia de proteínas ricas en prolina, por el método de tamizado diferencial.
- 2.- Caracterizar los patrones de expresión de estos genes, en condiciones control y por limitación en la disponibilidad de agua en el sustrato (déficit hídrico).

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de geles de agarosa para el análisis de DNA

Para el análisis de plásmidos y fragmentos de cDNA se usaron geles de agarosa. La concentración de la agarosa en los geles dependió del tamaño del DNA analizado. Para moléculas de 3.0 a 0.5 kb se utilizó 1 % de agarosa y para muestras de DNA con un tamaño menor a 0.5 kb se utilizaron geles al 2 %. Antes de cargar el DNA en el gel, fue mezclado el amortiguador de carga (2 x) y la muestra de DNA en una relación de 1:1, (Cuadro 1).

Cuadro 1. Amortiguador de carga para DNA (6 x)	
Glicerol 25 %	0.3 M
Tris base a pH 8 con HCl	50 mM
Azul de bromofenol 0.20 %	3.0 mM
Xilen cianol 0.20 %	5.0 mM

El amortiguador TBE 1x, añadido con 10 µg/ml de bromuro de etidio, se usó en la elaboración y corrida del gel. El gel corrió a 150 voltios y al final de la corrida las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UV), (Cuadro 2)

Cuadro 2. Amortiguador TBE (5 x)	
Tris base a pH 8 con HCl	0.4 M
Acido bórico	0.4 M
EDTA a pH 8.0 con NaOH	10 mM

El DNA fue desnaturalizado (**Kempter, et al.**, 1991), antes de ser transferido desde el gel hacia una membrana de nylon (Hybond N⁺), (**Khandjian**, 1980, **Southern**, 1975). El gel fue incubado en una solución alcalina durante 20 min y posteriormente, fue lavado dos veces durante 10 min en una solución neutralizante llevándolo a un pH menor a 9.0 (Cuadro 3).

Cuadro 3			
Solución desnaturalizante		Solución neutralizante	
NaCl	1.5 M	NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 N	Tris base a pH 8 con HCl	1 M

Electroforesis del RNA en geles de agarosa en presencia de formaldehído

El RNA total de las plantas se analizó en geles de agarosa en presencia con formaldehído al 37 % a una concentración de 0.78 M (Lehrach, *et al.*, 1977). Se prepararon geles al 1.5 % de agarosa. El amortiguador MAE 1x fue utilizado en la preparación del gel y durante la corrida. Los geles corrieron a 200 voltios, (Cuadro 4)

Cuadro 4. MAE (10x)	
MOPS	0.2 M
Fosfato de sodio a pH 7.5 con NaOH	50 mM
EDTA de pH 8.0 con NaOH	10 mM

Para cargar el RNA en el gel, se mezclaron 4 volúmenes del amortiguador de carga 1.25 x con 1 volumen de la muestra del RNA a fraccionar (Davis, *et al.*, 1986, Sheiness, *et al.*, 1986). Las muestras se incubaron a una temperatura de 65 °C, durante 5 min antes de ser cargadas en el gel (Cuadro 5) Al término de la corrida, el gel fue lavado con una solución de SSC 10x durante 20 min antes de ser transferido (northern-blot) a membranas de nylon.

Cuadro 5. Amortiguador de carga para ARN (1.25 x)	
Formamida desionizada	18 M
Formaldehído al 37%	2.6 M
MAE 10x	1.25 x
Glicerol al 80%	1 M
Azul de bromofenol 2 %	30 µM

Enzimas utilizadas

Las enzimas utilizadas se obtuvieron de Boehringer-Mannheim-GmbH y Gibco-BRL*
(Cuadro 6)

Cuadro 6	
Enzimas de restricción*	DNA Polimerasa*
<i>Eco</i> RI	T4 DNA Ligasa
<i>Eco</i> RV	Klenow
<i>Bam</i> HI	<i>Taq</i> polimerasa

Material Vegetal

GERMINACIÓN

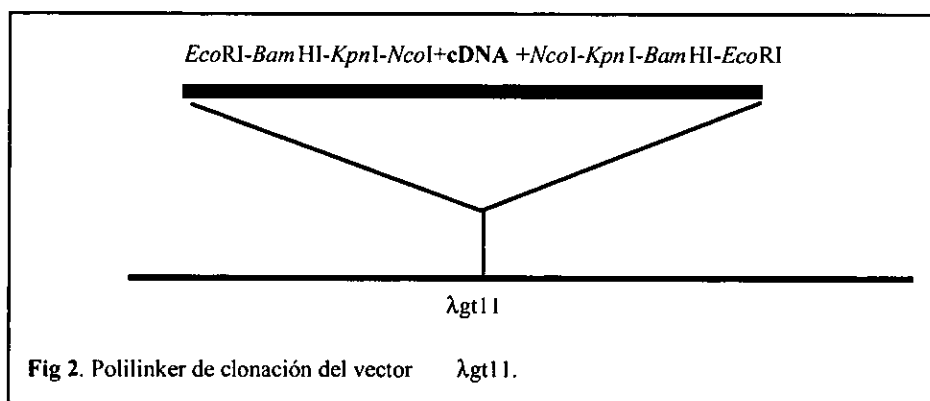
Se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Negro Jamapa obtenida de la Productora Nacional de Semillas (PRONALSE, km2 carretera Santiago a Internacional Ixcuintla, Nay., México.). La semilla fue desinfectada con blanqueador comercial (Cloralex) al 10% (v/v) durante 10 min y enjuagada con agua corriente hasta lavar todo el exceso de Cloralex. Las semillas fueron colocadas en una bandeja sobre toallas de papel saturadas con agua, las bandejas se cubrieron con papel aluminio y los frijoles se pusieron a germinar por cuatro días en oscuridad a una temperatura de 25°C. Las plántulas se seleccionaron por su tamaño. Algunas plántulas se cosecharon y disectaron en hipocotilo y raíz. Los tejidos colectados fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a una temperatura de -80 °C hasta ser utilizados.

TRATAMIENTO DE DÉFICIT HÍDRICO

Durante el tratamiento de déficit hídrico, las plántulas fueron transplantadas en vermiculita con diferente cantidad de agua. Las condiciones de crecimiento del lote control (1 x) fueron de 5.0 ml de agua por cada gramo de vermiculita. La condición de crecimiento experimental (1/8 x) correspondió a un octavo de la cantidad de agua agregada en la vermiculita del control 0.625 ml/gr. Las condiciones impuestas para cada tratamiento fueron constantes durante todo el experimento, pesando las charolas diariamente y agregando agua hasta recuperar el volumen perdido por evaporación. Las plantas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento de ambiente controlado en oscuridad a una temperatura constante de 25°C durante 72 hrs a una humedad relativa del 75 %. Los tejidos colectados fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a una temperatura de -80 °C hasta ser utilizados.

Características de la genoteca de cDNA usada

La genoteca de cDNA se obtuvo a partir de RNA poli (A)⁺ obtenido del tejido radicular de plantas de frijol de la variedad negro Jamapa, con 21 días de crecimiento sometidas a déficit hídrico durante 5 días y paralelamente fueron tratadas con ABA durante 48 hrs (Covarrubias, 1994). En la síntesis de la genoteca se utilizó el bacteriófago λ gt11 como vector de clonación (Figura 3). El sitio de clonación *Eco*RI del vector fue modificado al añadir un “polilinker” con la construcción *Eco*RI-*Bam*HI-*Kpn*I-*Nco*I. El cDNA insertado en el fago va unido por sus extremos a el polilinker (Figura 2). Se utilizó la cepa *Escherichia coli* Y1090 en la propagación del bacteriofago λ gt11.



Vectores de clonación utilizados

El vector utilizado para la clonación de los insertos de cDNA fue el plásmido pKS⁻ (Stratagene). El plásmido posee una parte del gen *lacZ* y lleva un gen de resistencia a ampicilina para la selección de las bacterias con este antibiótico.

Sondas de cDNA utilizadas

Durante el trabajo se utilizó una clona de cDNA que codifica para una proteína rica en prolina denominada *PvPRP2*, la cual fue aislada y caracterizada por (Colmenero-Flores, *et al.*, 1997). Además, se clonó la zona correspondiente a la región 3' no traducida (UTR) del gen *PvPRP2*, a la cual llamamos 3'*PvPRP*, para utilizarla como sonda específica.

TAMIZADO DIFERENCIAL

Para la obtención de genes relacionados al gen *PvPRP2* se llevó a cabo un tamizado diferencial de la genoteca de cDNA.

Plateado de la genoteca de cDNA y transferencia de las placas de lisis a membrana

El plateado y titulación de la genoteca de cDNA se realizó de acuerdo al método de plateado del bacteriófago descrito por (Maniatis, *et al.*, 1989). Cinco cajas de Petri de 150 mm de diámetro fueron plateadas con aproximadamente 50,000 placas de lisis cada una. Las placas de lisis fueron transferidas a membranas de nylon. El DNA del bacteriófago se fijó covalentemente a la membrana con 0.4 N de NaOH durante 20 min. Las membranas fueron enjuagadas dos veces con una solución de SSC 2x para quitar el hidróxido de sodio (Benton, *et al.*, 1977)

Condiciones de hibridación y lavado de las membranas

HIBRIDACIÓN Y TAMIZADO DIFERENCIAL

Antes de ser hibridadas las membranas se prehibridaron a una temperatura de 40°C con 10 ml de PSE 1x durante 30 min (Church, *et al.*, 1984) (Cuadro 7). Al finalizar la incubación, la solución de prehibridación se reemplazó por otros 10 ml de 1x de PSE nuevo junto con la sonda de cDNA desnaturalizada de *PvPRP2*. La hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a la misma temperatura de la prehibridación.

Cuadro 7. Solución de hibridación PSE (1 x)	
SDS 10%	7 %
Fosfato de sodio a pH 7.5 1 M	0.3 M
EDTA pH 8.0	1 mM

Al finalizar la hibridación la sonda es retirada y las membranas son lavadas en condiciones relajadas durante 15 minutos dos veces, en una solución al 0.1% de SDS y 0.4x de SSC a una temperatura de 40°C. Al finalizar el lavado, las membranas se expusieron a una película de rayos X. Las autoradiografías mostraron señales de

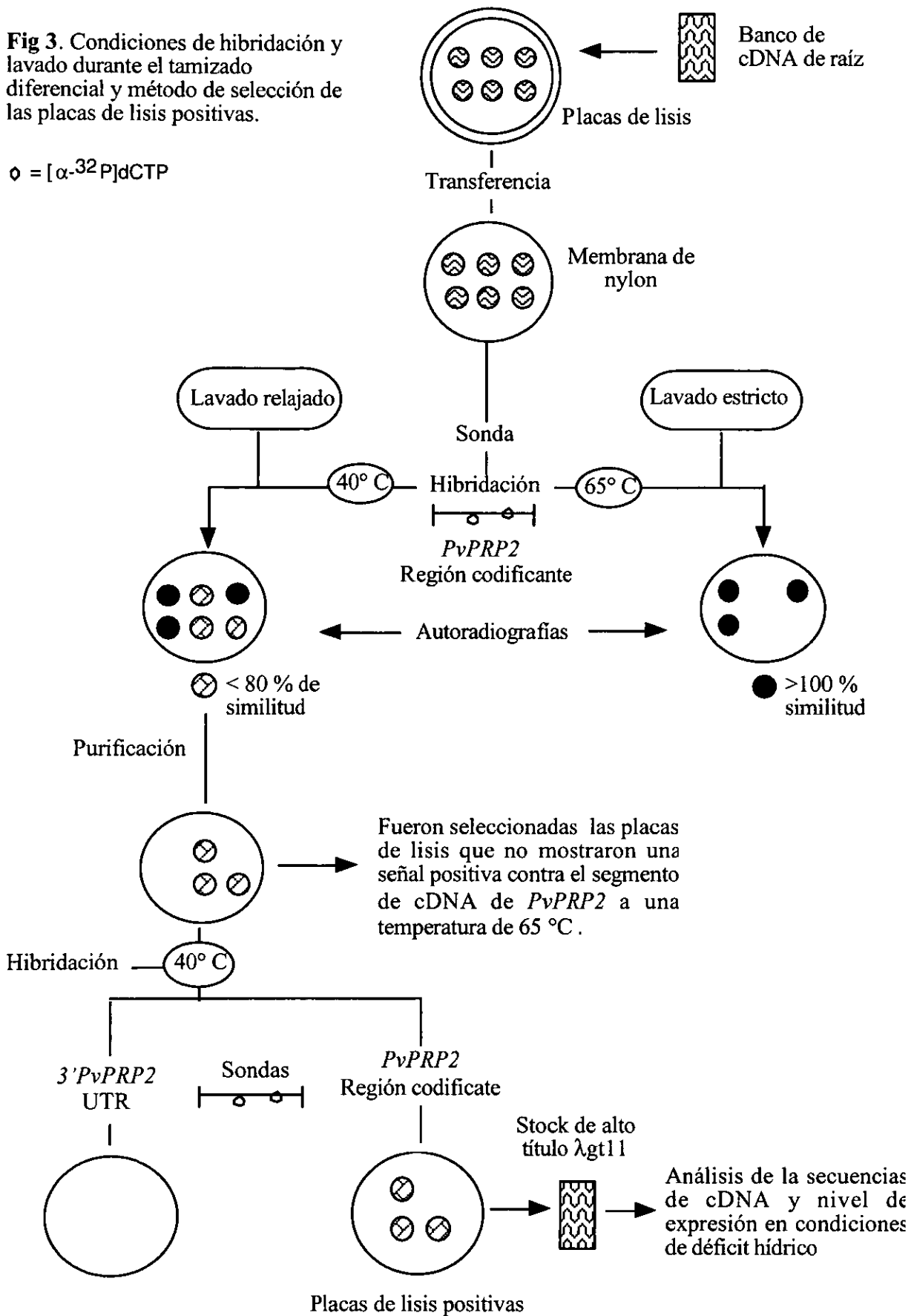
hibridación de fuerte intensidad (con de más del 80% de similitud) en su secuencia y débil intensidad (con menos de un 80% de similitud).

Sin dejar secar, las membranas húmedas nuevamente se prehibridaron e hibridaron como se mencionó anteriormente, pero a una temperatura de 65°C. Al terminar la incubación se lavaron rigurosamente durante 15 min dos veces, en una solución al 0.1% de SDS y 0.1x de SSC a una temperatura de 65°C. La autoradiografía reveló solo señales de fuerte intensidad.

Fueron seleccionadas únicamente las placas de lisis que no dieron señal positiva contra el fragmento de *PvPRP2* a una temperatura 65 °C, es decir se seleccionaron secuencias de cDNA parecido pero no idéntico a la sonda utilizada en el rastreo.

Fig 3. Condiciones de hibridación y lavado durante el tamizado diferencial y método de selección de las placas de lisis positivas.

◊ = [α - 32 P]dCTP



Selección de bacteriofagos por picado y purificación

Las placas de lisis elegidas fueron purificadas por el método de picado de placas de bacteriófago (Maniatis, *et al.*, 1989). Usando una pipeta Pasteur se picó una placa única bien aislada de las demás y se depositó en 1 ml del amortiguador SM, guardando la solución a 4°C entre 4-6 hrs para permitir la difusión del bacteriofago. Para corroborar que los fagos aislados contenían cDNAs relacionados *PvPRP2*, las placas aisladas fueron hibridadas contra el 3'*PvPRP2* a 40°C. Aquellos fagos que dieron señal positiva fueron desechados. De las placas seleccionadas por hibridación con 3'*PvPRP2*, se realizó un banco de fago de alto título utilizando el amortiguador SM. Asimismo, se realizó la extracción de DNA del bacteriofago con el amortiguador λ diluyente que se empleó en la remoción de las partículas del bacteriofago λ a partir de placas de lisis confluentes (Maniatis, *et al.*, 1989).

Cuadro 8.	
Amortiguador diluyente	
Tris base a pH 7.5 con HCl	10 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	8.0 mM
Amortiguador SM	
NaCl	100 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	8.0 mM
Tris base a pH 7.5 con HCl	50 mM
Solución de gelatina	2%

Aislamiento y clonación de los insertos de cDNA

El DNA del bacteriofago λ se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* ó *BamHI*. Los insertos de cDNA liberados por digestión, fueron clonados en el sitio de correspondiente a sus extremos cohesivos en el vector pKS⁻ aislados de los geles de agarosa por el método descrito por (Vogelstein, *et al.*, 1979). Algunos insertos también fueron obtenidos por amplificación mediante el procedimiento de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). En este caso los insertos se clonaron en el sitio *EcoRV* del plásmido pKS⁻ ya que tanto los insertos como el vector poseen extremos romos. Durante el PCR se utilizaron como moldes los oligonucleótidos de λ gt11 “reverse” y λ gt11 “forward”.

Cuadro 9. Condiciones de los ciclos del PCR			
	Tiempo	Tem. °C	Núm. de ciclos
Primer ciclo	2 min	94	1
Desnaturalización	30 seg	94	30
Alineamiento	30 seg	50	
Extensión	1 min	72	
Ultimo ciclo	10 min	72	1

Para la ligación de los insertos en el plásmido se utilizó la enzima T4 DNA ligasa, que cataliza la formación del enlace fosfodiéster entre el 5'-fosfato y el 3' hidroxilo terminal en una molécula de DNA de cadena doble. La reacción de ligación favorece la unión de los insertos de cadena doble por sus extremos (cohesivos o romos) integrándose al plásmido pKS^r. La reacción de ligación fue añadida a 200 µl de células competentes *Escherichia coli* (XL1-Blue) para su transformación (Hanahan, 1986). Posteriormente las células fueron recuperadas en 1 ml de medio LB a 37°C durante 30 min. Se platearon de 50 a 200 µl de células en presencia de X-Gal e IPTG.

Identificación de colonias de bacterias con plásmidos recombinantes.

Los métodos que se utilizaron para identificar las colonias de bacterias con plásmidos recombinantes fueron: complementación- α de β -galactosidasa y rastreo de colonias por hibridación. Para la complementación- α de β -galactosidasa las bacterias transformadas fueron seleccionadas en medio LB a una concentración de 0.1mg/ml de ampicilina, en presencia de 40 μ l X-Gal (20 mg/ml) y 40 μ l de IPTG (20 mg/ml). El plásmido pKS⁻ posee una porción del gen *lacZ* el cual contiene la secuencia regulatoria-promotora y el fragmento que codifica para la porción del amino terminal de la proteína β -galactosidasa. Por otra parte, la cepa XL1-Blue codifica para la porción carboxilo terminal de la misma proteína. Ambos fragmentos son inactivos pero al asociarse pueden formar una proteína enzimáticamente activa (complementación- α) (Ullmann, *et al.*, 1967), que actúa sobre un sustrato cromogénico (X-Gal) (Horwitz, *et al.*, 1964), tornando de color azul colonias de bacterias transformadas (Lac⁺), en las cuales no se encuentran plásmidos recombinantes. Entonces las colonias de bacterias de color blanco son resultado de la transformación de bacterias con plásmidos recombinantes, donde el inserto al situarse cerca del sitio múltiple de clonación codifica para un amino terminal incapaz de hacer complementación- α . El IPTG fue utilizado como inductor del promotor del gen *lacZ*. Para el rastreo de colonias transformantes por hibridación fue utilizado el método de hibridación *in situ* de colonias de bacterias descrito por (Grunstein, *et al.*, 1975), sobre membranas de nylon, el cuál permite el rastreo por hibridación de las colonias transformadas con plásmidos recombinantes. El DNA fue fijado a la membrana con una solución de hidróxido de sodio 0.4M e hibridada a una temperatura de 40°C, utilizando la sonda de cDNA *PvPRP2*.

Extracción a gran escala y purificación de plásmido

Los plásmidos recombinantes fueron extraídos de las bacterias por el método de lisis alcalina descrito por (Birnboim, 1983, Birnboim, *et al.*, 1979). Una noche antes las bacterias transformadas se sembraron 100 ml de medio líquido LB. Las células se colectaron por centrifugación durante 2min/10,000 rpm/4°C. El medio LB fue desechado y las células resuspendidas y lavadas en 20 ml de agua. Las bacterias se volvieron a colectar y se resuspendieron en 5 ml de agua. Inmediatamente fueron lisadas

al tratarlas con 10ml de la solución II recién preparada, mezclandolas por inversión suavemente, dejandolas en hielo por espacio de 10 min, (el SDS desnatura las proteínas y el NaOH desnatura el DNA del plásmido y el DNA cromosomal), (Cuadro 10). La solución de lisis se neutralizó agregando 7.5 ml de la solución III, se mezcló suavemente y se dejó en hielo durante 60 min (el acetato de potasio neutraliza la solución causando inmediatamente la unión covalente del DNA del plásmido al alinearlos rápidamente). La mezcla fue centrifugada durante 15min/10,000 rpm/4°C. El DNA cromosomal y las proteínas fueron precipitadas junto con el SDS al formar un complejo con el potasio, quedando en el sobrenadante de forma soluble el DNA del plásmido. El plásmido se precipitó a partir del sobrenadante con 15 ml de isopropanol en hielo. Se centrifugó a 10min/10,000 rpm/4°C. La pastilla de DNA se resuspendió en 5 ml de agua y además se añadió 5 ml de LiCl 6 M a la solución incubándola en hielo durante 15 min, para precipitar el exceso de RNA. La solución se centrifugó a 10 min/10,000 rpm/4°C. Se desechó la pastilla de RNA y se recuperó el sobrenadante, el DNA de plásmido se precipitó nuevamente con isopropanol. La pastilla se resuspendió en 1.6 ml de agua y se agregó 10 µl de RNasa al 1% incubando la solución durante 15 min a 37°C. La solución se repartió en dos tubos Eppendorf. El DNA se extrajo un par de veces con una solución de fenol:cloroformo (1:1), recuperándose el sobrenadante. El DNA de plásmido fue precipitado con 50 µl de acetato de sodio 3 M de pH 5.2 con ácido acético glacial y 700 µl de isopropanol, y se centrifugó durante 5min/14,000rpm a temperatura ambiente. Las pastillas fueron resuspendidas en 150 µl de agua y se juntaron en un solo tubo. A los 300 µl se les añadió 1 ml de la solución etanol:acetato de amonio 7.5 M (6:1) y se centrifugó durante 5min/14,000 rpm a temperatura ambiente precipitando el DNA de plásmido. La pastilla se lavó con etanol al 70% y fue resuspendida en 200 µl de agua.

Cuadro 10.				
Solución II (Lisis alcalina)		Solución III		
NaOH	0.2N		Acetato de potasio	5 M
SDS	1.0%		Acido acético glacial	2 M

Purificación del plásmido

El DNA del plásmido fue purificado por ultracentrifugación a equilibrio en gradientes de cloruro de cesio CsCl, (**Radloff, et al.**, 1967). A una solución de DNA se le agregó agua en cantidad suficiente hasta llegar a un volumen de 4.5 ml, asimismo se añadió 500 µl de bromuro de etidio (10mg/ml) y 5.3 gr de cloruro de cesio. La solución se centrifugó a 10,000 rpm por 10min a temperatura ambiente para eliminar el exceso de contaminantes, RNA y proteínas, y se corroboró su densidad ($\delta = 1.53-1.56$ gr/ml). Por último, se transfirió en tubos para ultracentrifuga (VTi90), cerrados de forma hermética se colocaron en un rotor de ángulo fijo Tipo 90 Ti (Beckman). La ultracentrifugación se realizó en 16 hrs a una velocidad 60,000 rpm.

Secuenciación de DNA

Las enzimas que son capaces de sintetizar nuevas cadenas de DNA sobre una cadena molde o templado se denominan DNA polimerasas (DNApol). Brevemente, la DNA *pol* no puede inicializar la cadena complementaria sobre el templado sin la presencia de una región 3'hidroxi terminal (3'-OH). Esta región es ofrecida por un cebador de DNA (oligonucleótido) que en principio es alineado al templado. Los deoxinucleótidos (dNTPs) añadidos en el extremo terminal de la cadena cebadora en crecimiento, se seleccionan por el apareamiento de las bases complementarias al templado. Esto involucra la formación de un puente fosfodiéster entre el grupo 3'-OH terminal de la cadena primer en crecimiento y el grupo 5'-fosfato del deoxinucleótido que va ser añadido, de manera que la nueva cadena es sintetizada en el sentido 5'→3' (**Ausubel, et al.**, 1994, **Lewin**, 1994).

La DNA *pol* puede también incorporar bases análogas a los nucleótidos. El método de secuenciación de DNA desarrollado por (**Sanger, et al.**, 1977), toma ventaja de esta capacidad para usar 2',3'-dideoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs) como sustratos. Cuando el dideoxinucleótido es incorporado a el 3'-OH terminal de la cadena primer en crecimiento, la elongación de la misma es terminada selectivamente en A, C, G o T, debida a que el extremo terminal de la cadena carece de grupo 3'-OH terminal.

La secuencia fue hecha con el estuche de secuenciación Sequenase Version 2.0 T7 DNA Polymerase de United States Biochemical (USB). La reacción de secuencia se realizó en dos etapas: en la primera etapa, llamada de marcaje, la cadena cebadora se extiende sobre el templado utilizando los dNTPs de forma limitada, incluyendo a [α - ^{35}S]dATP. En la segunda etapa, llamada terminación, la reacción de marcaje se para y se divide en cuatro reacciones diferentes de (A,C,G y T). A cada una se le añade cantidades no limitantes de dNTPs, además de los cuatro ddNTPs terminadores para inducir la terminación. Los productos de cada reacción se resuelven por separado en un gel de secuenciación.

La secuencia fue facilitada también por el uso del secuenciador automático 377 ABIPrism de Perkin Elmer Applied Biosystems, que se encuentra en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Éste analiza por medio de una computadora, las moléculas de DNA marcadas con colores fluorescentes, a través de un sistema de detección láser. En el método cada uno de los ddNTPs terminadores están marcados solo con un color fluorescente diferente, (Big Dye Terminator). En comparación con el método anterior, se tiene solo una reacción, en donde se encuentran todos los componentes (templado, primer, enzima [Ampli*Taq* DNA Polymerase, FS], dNTPs y ddNTPs). El método se basa en el sistema de ciclo de secuencia "Cycle Sequencing Ready Reaction" *, el cual consiste en sucesivos encuentros de desnaturalización, alineamiento y extensión, en un termociclador. Los productos derivados de esta reacción son cargados en un solo carril en el gel de secuenciación para separarlos.

*<http://www2.perkin-elmer.com/ab/techsupp/doclib/ga/multi/refguide/pdf/DNASeqCG.pdf>

Marcaje de sondas radioactivas

Las clonas de cDNA que se utilizaron como sondas fueron marcadas con [α - 32 P]dATP mediante el método de "random primer" (Feinberg, *et al.*, 1983, Feinberg, *et al.*, 1984). Brevemente, a una dilución en agua de 40 a 80 ng de DNA, se le añadió 2 μ l de una mezcla de hexanucleótidos al azar pb(N)6 a una concentración de 0.4mg/ml, hasta llegar a un volumen final de 12.5 μ l. La mezcla se calentó a una temperatura de 95°C durante 5 min y se enfrió en hielo durante el mismo tiempo. Al término de la incubación se añadió 2.5 μ l de cada una de las siguientes soluciones: BSA 10x (Albúmina de Suero Bovino), una mezcla de nucleótidos dATP, dGTP, dTTP (con una concentración de 0.2 mM para cada uno) y amortiguador Klenow 10x. Finalmente se añadió 1 μ l de la enzima Klenow (2u/ μ l) y 4 μ l de [α - 32 P]dATP. La reacción se llevó a cabo en el volumen final de 25 μ l y se incubó a 37°C al cabo de 30 min. Antes de añadir la sonda de cDNA a la solución de hibridación, ésta se incubó a 95°C durante 5 min para desnaturalizarla. La sonda se colocó en hielo hasta el momento de agregarla en la solución de hibridación.

Análisis de las Secuencias Obtenidas

Para obtener la identidad y la homología a nivel de ácidos nucleicos para cada una de la clonas de cDNA aisladas, se utilizó el programa de computación FastA, (Pearson, *et al.*, 1988). FastA busca la similitud entre la secuencia de cDNA estudiada y un grupo de secuencias del mismo tipo (DNA) depositadas en un banco de datos específico. La base de datos utilizada para el trabajo fue la DDBJ (*DNA Data Base of Japan*), con dirección URL:

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

La comparación (gap y bestfit) y edición (assamble, translate, y publish) de las secuencias de cDNA se realizó empleando el paquete de computación Wisconsin Package Version 10.0 de Genetics Computer Group (GCG) Madison, Wisc., con direcciones:

URL: <http://www.gcg.com/>

URL: <http://gcg.ceingebi.unam.mx>

URL: <http://www.gcg.com/genhelp/unix/gcgmanual.html>

Extracción y Análisis del RNA total

Para la extracción total de RNA se siguió el método descrito por (De Vries, *et al.*, 1988). La concentración de RNA fue determinada por espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm ($1D.O.260 = 40$ mg de RNA). Se analizaron 10 μ g de RNA por northern-blot en geles de agarosa al 1.5 % conteniendo formamida-formaldehído (Lehrach, *et al.*, 1977). Para determinar que la cantidad y la integridad del RNA era la correcta en el gel, se visualizaron los RNAs ribosomales teñidos con bromuro de etidio en el transiluminador de luz ultravioleta (UV). El gel fue lavado con SSC 10x durante 20 min y la transferencia en seco se llevó a cabo toda la noche utilizando como soporte una membrana de nylon. La hibridación se realizó a una temperatura de 65°C.

RESULTADOS

Obtención y aislamiento de cDNAs relacionados a PvPRP2

En este trabajo se utilizó una genoteca de cDNA construida a partir de RNA poli (A)⁺ procedente del tejido radicular de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con 21 días de crecimiento, sometidas a déficit hídrico y a tratamiento con ABA, (Covarrubias, 1994). Se rastrearon de esta genoteca 2.5×10^5 fagos por el método de tamizado diferencial (ver Materiales y Métodos), utilizando como sonda la clona de cDNA que codifica para el gen *PvPRP2* (Colmenero-Flores, *et al.*, 1997). Se aislaron treinta bacteriofagos, de los cuales quince de ellos fueron analizados. Para corroborar que los cDNAs escogidos estaban relacionados a *PvPRP2* pero que no eran idénticos a este, fueron hibridados a una temperatura de 65°C contra una sonda específica que contiene la región 3' terminal de *PvPRP2*. De los quince fagos seleccionados cinco de ellos mostraron señal positiva contra el 3' no traducida de *PvPRP2* por lo que fueron descartados. De los 10 fagos restantes se produjo un banco de fago de alto título, con aproximadamente 7.10×10^9 a 1.74×10^{10} pfu/ml, para su posterior análisis. Los bacteriofagos fueron nombrados como *Pvrp* correspondiente a las palabras *Phaseolus vulgaris* ricos en prolina

Subclonación de los cDNAs aislados

Para la obtención de los insertos de cDNA integrados en el DNA de los bacteriofagos, en primer lugar se extrajo DNA de fago y, posteriormente, se digirió el DNA aislado con la enzima de restricción *Bam*HI. Sólo el DNA de cuatro de los bacteriofagos pudo ser digerido, por lo que el resto de los cDNAs se recuperaron por el método de PCR a partir del banco de fago de alto título. De manera particular, el bacteriofago *Pvrp7* presentó un sitio interno para *Bam*HI, por lo que el inserto de cDNA completo se liberó digiriéndolo con la enzima *Eco*RI. Los cDNAs recuperados de los bacteriofagos tienen un tamaño que va de los 0.4 hasta los 1.1 kb (Tabla 4).

Todos los insertos de cDNA fueron separados en un gel de agarosa al 1.8 %, por duplicado, y transferidos a una membrana de nylon. Una de las membranas se hibridó contra la sonda de cDNA que codifica para el gen *PvPRP2* a una temperatura de

40°C (condiciones relajadas). Por otro lado la membrana restante se hibridó contra la sonda específica 3' no trducida de *PvPRP2* a 65°C (condiciones estrictas). Las membranas se expusieron a una película de rayos X. Bajo condiciones relajadas de hibridación todos los insertos de cDNA hibridaron con diferente intensidad. Por el contrario, a condiciones estrictas de hibridación ninguno de los insertos hibridó contra la sonda específica 3' no trducida de *PvPRP*, con excepción del inserto excepto *Pvrp10* (dato no mostrado). De lo anterior concluimos decir que los insertos analizados se encuentran relacionados con el gen de *PvPRP2*, pero sin embargo estos no son idénticos a éste (ver Tabla 5 y Figura 4).

Fago λ	Extracción de DNA	Digestión	Amplificación por PCR	Tamaño kb
<i>Pvrp1</i>	—	-	+	0.8
<i>Pvrp2</i>	—	- ^a	+	0.9
<i>Pvrp3</i>	—	+	ND	0.5
<i>Pvrp4</i>	—	- ^a	+	0.5
<i>Pvrp5</i>	—	+ ^a	ND	0.7
<i>PvSAMS2-6</i>	—	+	ND	1.1
<i>Pvrp7</i>	—	+ ^{a,b}	ND	1.0
<i>Pvrp8</i>	ND	ND	+	0.6
<i>Pvrp9</i>	ND	ND	+	0.4
<i>Pvrp10</i>	—	-	+	0.9

El DNA del bacteriofago fue extraído y digerido con las enzimas de restricción ^a*Bam*HI y ^b*Eco*RI. Asimismo los insertos de cDNA fueron amplificados por PCR.

	Sonda de hibridación	
	<i>PvPRP2</i>	3' <i>PvPRP2</i>
<i>PvPRP2</i>	+++	+++
<i>Pvrp1</i>	++	-
<i>Pvrp2</i>	++	-
<i>Pvrp3</i>	+++	-
<i>Pvrp4</i>	+++	-
<i>Pvrp5</i>	+++	-
<i>PvSAMS2-6</i>	+	-
<i>Pvrp7</i>	++	-
<i>Pvrp8</i>	+	-
<i>Pvrp9</i>	+	-
<i>Pvrp10</i>	+++	+

+ Nivel de hibridación
- Sin hibridación

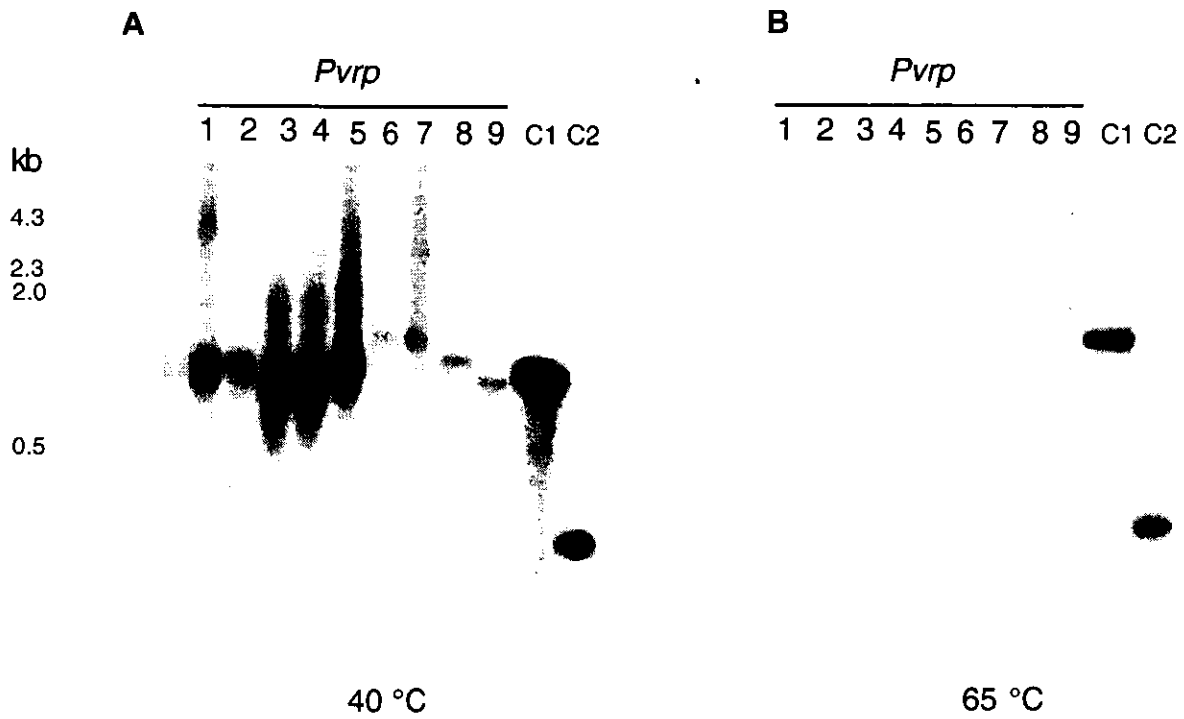


Figura 4. Análisis por Southern-blot de los insertos de cDNA aislados . Los insertos de cDNA (*Pvvp*) fueron hibridados contra las sondas *PvPRP2* (A) y contra 3' *PvPRP2* (B) por separado. En el carril 6 se encuentra el inserto que codifica para *PvSAMS2-6* , en el carril (C1) se encuentra el cDNA del gen *PvPRP2* y en el (C2) se encuentra localizada la región 3' no traducida del gen *PvPRP2*.

De los insertos analizados cinco se subclonaron en el vector pKS⁺ y fueron nombrados como pPvrp (plásmido). Los insertos Pvrp5 y Pvrp7, que fueron aislados por restricción enzimática, se subclonaron en el sitio de clonación de BamHI y EcoRI, respectivamente. Por otro lado, los insertos Pvrp1 y PvSAMS2-6 que se obtuvieron por amplificación en PCR, se subclonaron en el sitio de clonación de EcoRV. En el caso de Pvrp10, que también fue obtenido por PCR, se digirió junto con el plásmido en presencia de la enzima de restricción EcoRI y posteriormente fue subclonado, (Tabla 6). Los demás cDNAs fueron almacenados para su posterior análisis.

Fago λ	Clona de cDNA	Sitio de clonación en pKS ⁺
Pvrp1	pPvrp1	EcoRV
Pvrp5	pPvrp5	BamHI
PvSAMS2-6	pPvrp6	EcoRV
Pvrp7	pPvrp7	EcoRI
Pvrp10	pPvrp10	EcoRI

Análisis de las secuencias de cDNA

La secuencia nucleotídica de cada una de las clonas se comparó, con el banco de datos denominado DDBJ, (*DNA Data Bank of Japan*), mediante el empleo del programa de computación FastA (Pearson); de esta manera se determinó, la identidad de cada cDNA aislado, y además, se calculó la similitud a nivel de nucleótidos para cada uno de los cDNAs con su secuencia correspondiente (Tabla 7).

Clona	Secuencia homóloga	Organismo	%	Referencia
pPvrp1	Extensina (GG08-1)	<i>Glycine max</i>	84	(Mahalingam, et al., 1998) ^a
pPvSAMS2-6	S-adenosil-L-metionina sintetasa (CRSAMS2)	<i>Catharanthus roseus</i>	80	(Schröder, et al., 1997) ^b
pPvrp7	Extensina (uG-18)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	65	(Showalter, et al., 1991) ^c
pPvrp10	Proteína rica en prolina (PvPRPP2)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	99	(Colmenero-Flores, et al., 1997) ^d
Número de acceso ^a AF047052 ^b Z71272 ^c X55685 ^d U72768				

Las clonas *pPvrp1* y *pPvrp5* se secuenciaron usando el “primer” universal, obteniéndose la secuencia a partir de la región 3' terminal. Ambas secuencias presentaron un 98% de identidad (Figura 5). El análisis de su secuencia muestra un alta similitud con el gen *GG08-1* (Figura 6), que codifica para una nodulina de soya.

```

pPvrp1      1  CTGTANTTNTACNAAATCCCCCTCCTCCTCCTCCTCCTTACCACTANTANATACCACCCCTTG      60
pPvrp5      1  .....ATNCNAAATCCCCCTCCTCCTCCTCCTCCTTACCACTACTAGATACCACCCCTTG      60

61  CATCACA.CCACATGGATCTATGCAGAAAGTGTGGAAGTGAAGTGAANCCATGAAGGG      120
61  CATCACACCCACATGGATCTATGCAGAAAGTGTGGAAGTGAAGTGAAGCCATGAAGGG      120

121  GAAGGTGCACTTTGCTTGCAGATCCCCCGAAGAAGTATAAATGTTTATCAATTGTTTAG      180
121  GAAGGTGCACTTTGCTTGCAGAT.CCACGAAGAAGTATAAATG.TTTATCAATTGTTTAG      180

181  AGAACTGTGTTTAGTTCAATAGTTATTATGCTTTTGTCTATTATTAGACAGTTGTAAGG      240
181  AGAACTGTGTTTAGTTCAATAGTTATTATGCTTTTGTCTATTATTAGACAGTTGTAAGG      240

241  CACTGTGTTATACATGTGTCTGCACTTGTCTGCATCTGTTGTAATTTTCAAAGTCCCTCTT      300
241  CACTGTGTTATACATGTGTCTGCACTTGTCTGCATCTGTTGTAATTTTCAAAGTCCCTCTT      300

301  TATCAACCTCATCACCAATAAATTATTCCTTCTCAC      336
301  TATCAACCTCATCACCAATAAATTATTC.....      336

```

Figura 5. Alineamiento de las clonas *pPvrp1* y *pPvrp5*. Ambas secuencias resultaron ser las mismas con un 98% de identidad.

La clona *pPvSAMS2-6* se secuenció usando el “primer” universal, obteniéndose la secuencia a partir de la región 5' terminal (Figura 7). La clona mostró una alta similitud con el gen que codifica para la enzima S-adenosilmetionina-L-sintetasa del tipo II, perteneciente a *Catharanthus roseus*, nombrado como *CRSAMS2*. La clona obtenida contiene el cDNA completo del gen de *SAMS2* de frijol

La clona *pPvrp7* se secuenció empleando, el “primer” universal y reverso consiguiéndose la secuencia desde la región 5' terminal y 3' terminal, respectivamente (Figura 8). La secuencia de cDNA presentó una alta similitud con un gen que codifica para una extensina de tomate (*Lycopersicon esculentum*), denominado como *uG-18*.

A	<i>pPvpr10</i>	89	ACAAGCCCCAGTAGAAAAACCTCCAGTTTACAAAGCCCCAGTTAGAANNCCACCAGTG	148
	<i>PvPRP2</i>	134	ACAAGCCCCAGTTGAGAAACCACCAG.TTTACAAGCCCCAGTTGAGAAGCCACCAGTG	193
	<i>Phaseolu vulgaris</i>	149	TNACAAGCCCCAGTTAGAGAGCNACCAGTG	179
		194	.TACAAGCCCCAGTAGAGAAGCCACCAGTG	224
B	<i>pPvpr10</i>	101	CCACCAGTGGAGAAGCCACCAGTGACAAGXCCCCAGTTGAGAAGCTCCGGTGTACAAG	160
	<i>PvPRP2</i>	1	60
	<i>Phaseolu vulgaris</i>	161	CCCCCAGTTGAGAAGCTCCGGTGTACAAGCCACCAGTAGAGAAGCCACCGGTTTACCAGC	220
		61CGGTTTACCAGC	120
		221	CACCATACGGGAAGCCACCTCACCCAAAGTACCCCTCCAAGCACCAACTGATTACACGCGC	280
		121	CACCATACGGGAAGCCACCTCACCCAAAGTACCCCTCCAAGCACCAACT GATTACACGC .C	180
		281	ATTCTGAAGTATGTTAAGAG.TGTATCTGA.....	340
		181	ACTCTGAAGTATGTTAAGAGTTGTATCTGAAGTATATGATAAATAAAAGTTGTAGCTACT	240
		341	400
		241	CTACCATTGTCATGCTCAGATATGTAGTTTACTTTACAAATCATTTGTTTACAGTGTGT	300
		401	460
	301	GGCCAAGATAAGAGTGTAAATGGATGCATGAATGTAAAACGGACAAACAATATGTATGGTC	360	
	461	507	
	361	TTTCTTCTGAAAGCTATGAATAATAGAACTTTATGATTTTGATATT	407	

Figura 9. Comparación de la secuencia a nivel nucleótidos del gen *PvPRP2* de *Phaseolus vulgaris* (Colmenero, et al., 1991) contra la clona *pPvpr10*. La secuencia de *pPvpr10* se obtuvo desde el 5' terminal (A) y desde el 3' terminal (B). Las negritas indican el codon de término del gen *PvPRP2* y se muestra el segmento deletado de la región 3' no traducida de *pPvpr10*.

La clona *pPvpr10* fue secuenciada utilizando tanto el primer reverso y el universal, con lo cual se obtuvo la secuencia de la clona, desde la región 5' terminal y desde el 3' terminal respectivamente, (Figura 9) La secuencia de cDNA tiene una alta similitud a las proteínas ricas en prolina (PRPs). Su porcentaje de identidad con el gen *PvPRP2* de frijol es del 99.0%, así que la clona *pPvpr10* es idéntica a la sonda *PvPRP2* utilizada en el rastreo diferencial del banco de cDNA. Ambas presentan un porcentaje de identidad del 80%. Al hacer un análisis de la clona *pPvpr10*, se encontró que la secuencia nucleotídica se encuentra deletada la región 3' no traducida, faltando 197 pares de bases con respecto a la región 3' de la región no traducida del gen 3'*PvPRP2*.

Análisis de los patrones de expresión de los genes Pvrp durante el estrés hídrico.

Para determinar los niveles de acumulación de los transcritos codificados por los cDNAs de *Pvrp*, se analizaron por northern-blot 10 µg de RNA total de plántulas de frijol de cuatro días transferidas a vermiculita y sometidas a condiciones optimas de irrigación (1x) o bajo déficit hídrico (1/8x) durante 3 días.

Como se ve en la Figura 10, los transcritos de los 8 *Pvrp* aislados, excepto el de *Pvrp9*, se detectaron fácilmente, lo cual nos indica que estos genes se expresan con niveles moderadamente abundantes en la plántulas de frijol, es decir que se expresan más en la raíz que en los hipocotilos de la plántula. Cuando las plántulas sufren déficit hídrico moderado (1/8x) los niveles de acumulación de la mayoría de los genes *Pvrp* disminuyen (Figura 11). Sin embargo, los niveles de *Pvrp3*, *Pvrp4* y *Pvr9* no parecen estar modulados por el estrés hídrico. El cDNA de *Pvrp9* parece codificar para un gen constitutivo ya que no se ven cambios de su expresión, ni en las diferentes partes de la plántula, ni cuando la planta sufre deshidratación. Los cDNAs de *Pvrp3*, *Pvrp4* y *PvSAMS2-6*, codifican para genes de más de 3kb. Se usó como control positivo la clona del gen *PvPRP2* cuyo transcrito se acumula abundantemente en la raíz de plántulas de cuatro días y en condiciones de estrés hídrico.

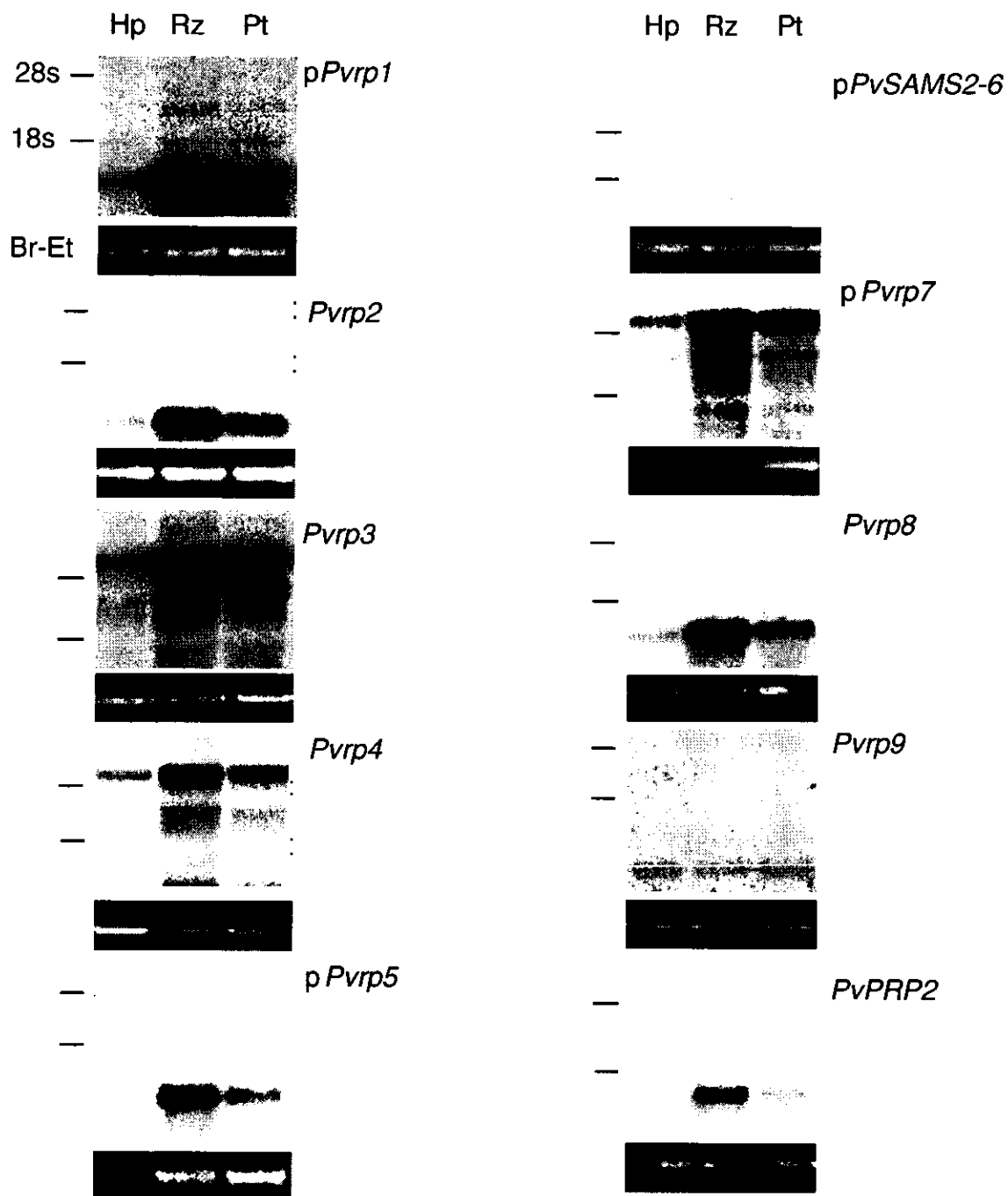


Figura 10. Análisis de la acumulación de los transcritos de cDNA en diferentes órganos de la plántula. Fueron analizados el hipocotilo (Hp), la raíz (Rz) y plántulas enteras (Pt) después de 4 días de haber germinado. Para los northern-blot se cargaron 10 µg de RNA total por cada una de las muestras y fueron resueltas en un gel desnaturizante con formaldehído y al 1.5 por ciento de agarosa. Se presenta también el ribosomal 28s teñido con bromuro de etidio (Br-Et), el cual muestra la carga y la transferencia del rRNA. Los insertos de cDNA aislados fueron utilizados como sondas y las membranas fueron incubadas en condiciones estrictas de hibridación (65°C). Se utilizó como control de la expresión la clona *PvPRP2*.

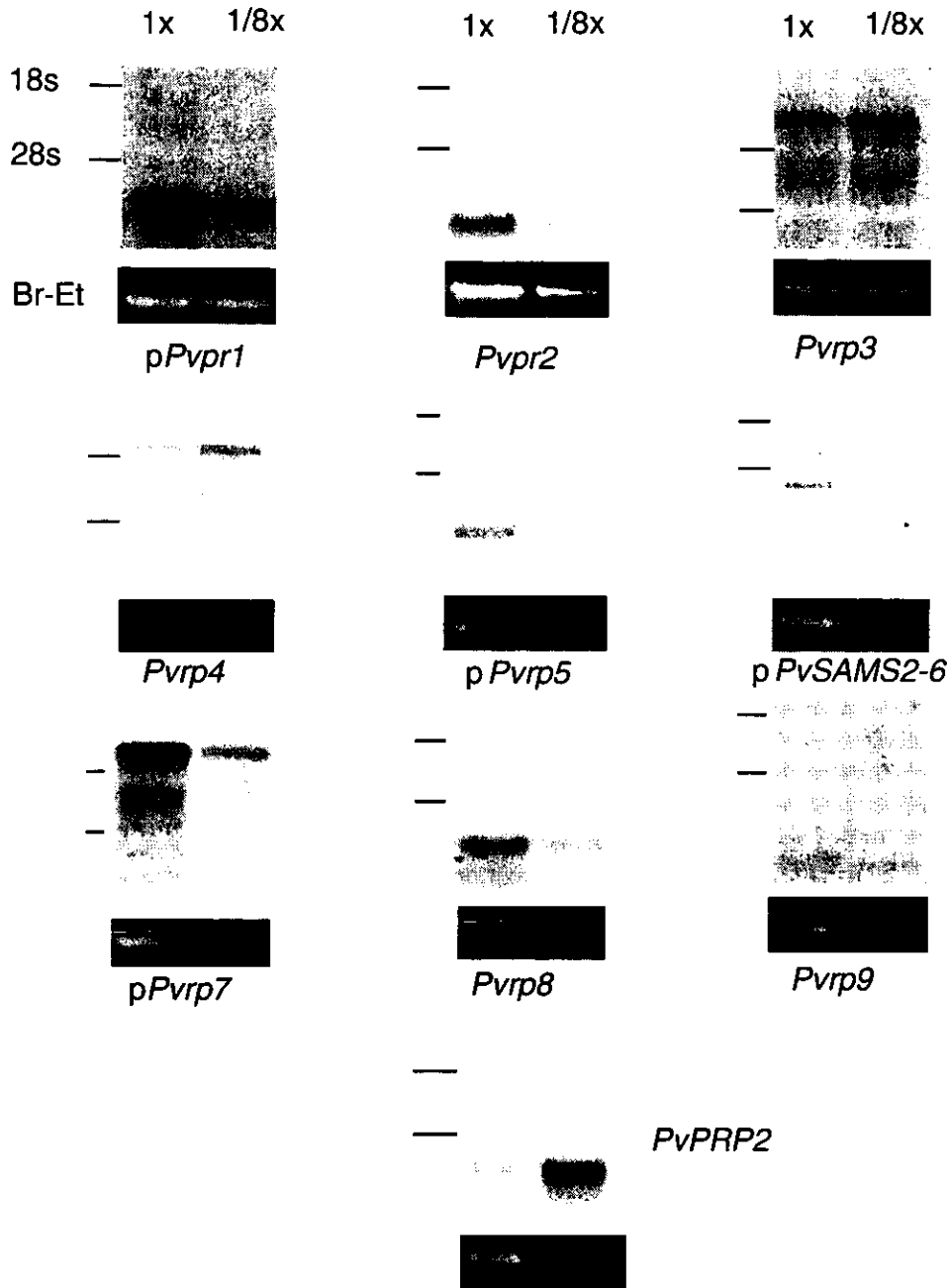


Figura 11 Análisis del nivel de inducción de los transcritos en plántulas enteras después de 7 días de haber germinado en diferentes condiciones de crecimiento: condiciones óptimas de irrigación (1X) y con déficit hídrico (1/8X). Para los northern-blots se cargaron 10 μ g de RNA total por cada una de las muestras y fueron resueltas en un gel desnaturalizante con formaldehído y al 1.5 por ciento de agarosa. Se presenta también el ribosomal 28s teñido con bromuro de etidio (Br-Et), el cual muestra la carga y la transferencia del rRNA. Los insertos de cDNA aislados fueron utilizados como sondas y las membranas fueron incubadas en condiciones estrictas de hibridación (65°C). Se utilizó como control de la expresión la clona *PvPRP2*.

DISCUSIÓN

En plantas de frijol la limitación de agua induce la acumulación de dos proteínas denominadas como p33 y p36 (*ver antecedentes*). Las principales características que distinguen a estas proteínas son: a) se encuentran asociadas a la pared celular, b) se inducen por estrés hídrico o por la presencia de la fitohormona ácido abscísico (ABA), c) tienen un alto contenido de prolina, d) ambas se encuentran relacionadas antigénicamente con las proteínas ricas en prolina de soya (*SbPRP*).

Durante este trabajo de investigación se aislaron por medio del método de tamizado diferencial secuencias de genes que codifican para las proteínas ricas en prolina procedentes de la pared celular en plantas. Este fue el caso para las clonas denominadas como pPvrp1, pPvrp5 y pPvrp7, que codifican para proteínas tipo extensina. También fue seleccionada la clona pPvrp10, que codifica para el gen *PvPRP2*, el mismo que fue utilizado como sonda para rastrear el banco de cDNA. Asimismo, fue aislada una secuencia homóloga a la enzima S-adenosil-L-metionina sintetasa II (*SAMS2*). Aunque no fueron clonados el resto de los cDNAs aislados en el tamizado diferencial, se observó la acumulación de sus productos en los diferentes órganos de la planta (hipocotilo y raíz).

Las clonas pPvrp1 y pPvrp5 codifican para el mismo gen, ya que presentaron un 98% de identidad a nivel de nucleótidos entre ambas. El análisis de su secuencia reveló que pPvrp1 y pPvrp5 posee una alta similitud con el *GG08-1* de soya aislado por (**Mahalingam, et al.**, 1998), encontrándose incluso una similitud del 84% de identidad sobre la región 3' no traducida en ambos genes. Este dato nos sugiere que ambos genes han divergido muy poco. Ello probablemente sea debido a que la región 3' UTR sea

importante para su expresión, existiendo una presión selectiva para que ésta no sufra grandes cambios.

En un trabajo anterior (**Hong, et al.**, 1994) se ha reportado que el dominio Ser-(Pro)₄-Val-Lys-Tyr en el gen *SbHRPG3* dentro de este dominio se encuentra el pentapéptido Pro-Pro-Val-Tyr-Lys, el motivo característico de la familia génica de las proteínas ricas en prolina de (**Hong, et al.**, 1987, **Hong, et al.**, 1990). Este motivo se encuentra dentro de la secuencia de *pPvrp1* y *pPvrp5*, lo cual podría explicar porqué fueron seleccionadas estas clonas durante el tamizado diferencial.

Se determinó que las secuencias más parecidas a *pPvrp1* *pPvrp5* con respecto a su región estructural, son el gen *MtN12* de alfalfa (**Gamas, et al.**, 1996), y *did2* de *Sesbania rostrata* (**Goormachtig, et al.**, 1995), con 67% y 65% de identidad a nivel de nucleótidos, aunque los transcritos de *MtN12* y *did2* se encuentran acumulados específicamente en los nodulos de estas plantas, nosotros hemos detectado los transcritos de *pPvrp1-5* abundantemente en la raíz de plántulas de frijol y sus niveles de expresión disminuyeron notablemente durante condiciones de estrés hídrico.

La clona de cDNA *pPvrp7* codifica para una extensina de tipo I. Estas únicamente se detectan en las regiones del tallo y raíz, y se ven inducidas positivamente por daño y en presencia de etileno, pero no responden a tratamiento con ácido abscísico ni en condiciones de estrés hídrico (**Showalter, et al.**, 1992, **Showalter, et al.**, 1991). *pPvrp7* con una identidad del 65% con el gen *uG18* en tomate, este último posee en su secuencia numerosas repeticiones del hexadecapéptido Ser-(Pro)₄-Ser-Pro-Ser-(Pro)₄-(Tyr)₃-Lys. Formas semejantes de este hexadecapéptido han sido localizadas en *Hyp2.13*, *Hyp3.6* y en *TomJ10*; de igual forma, todos estos genes se inducen positivamente por causa de un daño mecánico (**Corbin, et al.**, 1987, **Zhou, et al.**, 1993). El transcrito de la clona

pPvrp7 se acumuló con preferencia en la región de la raíz y también es regulada negativamente durante la baja disponibilidad de agua.

Contrario a lo que esperabamos, la clona *pPvSAMS2-6*, que codifica para la enzima que cataliza la única vía de biosíntesis conocida del cofactor S-adenosil-L-metionina, (*SAM*), no se encuentra relacionada con las proteínas ricas en prolina de pared celular en plantas. Desconocemos la razón de su selección durante el tamizado diferencial. Una posibilidad es que este gen posea una región rica en prolinas o glicinas, lo cual fue suficiente para servir como blanco para que la sonda empleada *PvPRP2* la seleccionara como una clona positiva durante el rastreo. Su abundancia en la raíz es mayor con respecto a la del hipocotilo y la regulación de sus transcritos se regula negativamente durante el déficit hídrico. Entre otros procesos celulares, *SAMS* se encuentra involucrada en tejidos que requieren y producen grandes cantidades de lignina (**Peleman, et al., 1989, Peleman, et al., 1989**). De acuerdo a lo anterior (**Azaizeh, et al., 1991**) y (**Cruz, et al., 1992**) reportaron una lignificación acelerada en raíces de maíz y sorgo en condiciones de estrés hídrico y en presencia de sal, respectivamente, además, se le ha visto vinculada en la formación de las paredes celulares vegetales (**Gowri, et al., 1991**).

Durante las condiciones óptimas de crecimiento la acumulación de los transcritos de las clonas aisladas en la raíz es notable, sobre todo en comparación con la región del hipocotilo en donde la presencia de los transcritos es menor. Algunos estudios indican que la tasa de acumulación de los polímeros que constituyen a las paredes vegetales en tallo y raíces jóvenes, es elevada particularmente en las zonas de máxima expansión celular durante el crecimiento (**Schmalstig, et al., 1990, Silk, et al., 1984**). De manera general, se ha mencionado que algunas regiones de la pared celular están sujetas a una sustitución dinámica de sus elementos (“turnover”), por lo que se lleva a cabo simultáneamente una activa síntesis y degradación de algunos de los polímeros que integran la pared celular en las plantas. Esto no ocurre solamente durante

el ataque de organismos patógenos o por daño mecánico, sino también estos procesos que son parte normal durante el desarrollo y el crecimiento vegetal. Ambos procesos se caracterizan por una expansión de la pared celular, paso que requiere por un lado de un debilitamiento estructural mediado por la actividad de enzimas hidrolíticas, y paralelamente una alta tasa de síntesis de polímeros con su inmediata integración a la nueva pared en crecimiento (**Brett, et al.**, 1996, **Cosgrove**, 1997).

Hasta ahora muchos investigadores se han dedicado a ratar de entender como los genes se regulan positivamente durante el estrés por sequía. Sin embargo, la respuesta a la sequía involucra también la regulación negativa en la expresión de algunos genes específicos (**Tabaeizadeh**, 1998). Aunado a lo anterior, observamos que durante las condiciones de baja disponibilidad de agua en el sustrato, el nivel de expresión de la mayoría de los cDNAs aislados es regulado negativamente. Esto nos indica que el producto de estos genes pueden no ser necesarios o empleados por la planta en las nuevas condiciones fisiológicas que enfrenta, es decir, que la presencia de sus transcritos es más apropiada bajo otras condiciones como son las ambientales a causa de factores abióticos y/o bióticos, o por encontrarse en alguno de los diferentes estadios de desarrollo y en el transcurso del crecimiento vegetal. El papel bioquímico y funcional *in vivo* de estos productos génicos es desconocido (**Chandler, et al.**, 1994, **Sachs, et al.**, 1986, **Sauer, et al.**, 1990)

La aplicación del método del tamizado diferencial en la búsqueda de secuencias similares que codifiquen para proteínas ricas en prolina, tiene una serie de desventajas, ya que el método es poco específico. Lo anterior queda justificado por los siguientes puntos:

- a) Fue seleccionado el gen *PvPRP2* nuevamente, a causa de que su región 3' no traducida se encontraba trunca,
- b) Fue aislado el gen *pPvSAMS2-6* como clona positiva y,

c) Asimismo, habría que tomar en cuenta que el dominio de las proteínas ricas en prolina (PPV(Y/E)K) puede encontrarse intercaladas en la secuencia de las proteínas tipo extensinas, es decir, existen proteínas quiméricas en las paredes vegetales que tienen una mezcla de ambos o más dominios, por lo que muchas secuencias son candidatas potenciales a ser seleccionadas por igual.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Conclusiones

En el presente trabajo se aislaron y clonaron cuatro genes que codifican para proteínas de pared celular ricas en prolina, a las que denominamos como *Pvrp*.

Se aisló además una clona de cDNA homóloga a la enzima *SAMS2* (S-adenosil-L-metonina-sintetasa-II).

Los transcritos de los genes *Pvrp* se acumulan con preferencia en la región de la raíz y se regulan de manera negativa durante condiciones de estrés hídrico.

El análisis parcial a nivel de ácidos nucleicos de los genes *Pvrp* aislados revela que ninguna de estas clonas codifica para las proteínas p33 ni p36.

BIBLIOGRAFÍA

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** (1994). *Current protocols in molecular biology*. Janssen, K. (ed). USA. John Wiley & Sons, Inc.
- Azaizeh, H. and Steudle, E.** (1991). Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiology*. **97**: 1136-1145.
- Benton, W.D. and Davis, R.W.** (1977). Screening λ recombinant clones by hibridization to single plaques *in situ*. *Science*. **196**: 180.
- Bhattacharya, D. and Medlin, L.** (1998). Algal phylogeny and origin of land plants. *Plant Physiology*. **116**: 9-15.
- Birnboim, H.C.** (1983). A rapid alkaline extraccion method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*. **100**: 243-255.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraccion method for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. **7**: 1513-1523.
- Botella, M.A., Quesada, M.A., Konowicz, A.K., Bressan, R.A., Pliego, F., Hasegawa, P.M. and Valpuesta, V.** (1994). Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. *Plant Molecular Biology*. **25**: 105-114.
- Bray, E.A.** (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*. **2**: 48-54.
- Brett, C. and Waldron, K.** (1996). Physiology and biochemistry of plants cell walls. Chapman and Hall. London, UK. pp 1-3.
- Carpita, N.C.** (1993). Structural models of primary cells walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*. **3**: 1-30.
- Carpita, N.C.** (1996). The plant extracellular Matrix: News from the cell's frontier. *The Plant Cell*. **8**: 1451-1463.
- Carpita, N.C.** (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. En: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Jones, R. L. and Somerville, C. R. (eds). Palo Alto, California, USA. Annuals Reviews. **47**: pp 445-476.
- Cassab, G.I.** (1998). Plant cell wall proteins. En: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Jones, R. L. and Somerville, C. R. (eds). Palo Alto, California, USA. Annuals Reviews. **49**: pp 281-309.

- Chandler, P.M. and Masumi, R.** (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and relation to estress tolarence. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 113-141.
- Church, G.M. and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academic of Sciences.* **81**: 1991-1995.
- Colmenero-Flores, J.M., Campos, F., Garcíarrubio, A. and Covarrubias, A.** (1997). Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology.* **35**: 393-405.
- Corbin, D.R., Sauer, N. and Lamb, C.J.** (1987). Differential Regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Molecular and Cellular Biology.* **7**: 4337-4344.
- Cosgrove, D.J.** (1997). *Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants.* En: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. Jones, R. L. and Somerville, C. R. (eds). Palo Alto, California, USA. Annuals Reviews. **13**: pp 171-201.
- Covarrubias, A.A.** (1994). Molecular characterization of the response to water deficit in *Phaseolus vulgaris* L. En: *Phaseolus beans advanced biotechnology research networt.* Roca, W. M., Maver, J. E., Pastor-Corrales and Tohme, J. (eds). Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical , (CIAT). pp 341-350.
- Covarrubias, A.A., Ayala, J.W., Reyes, J.L., Hernandez, M. and Garcíarrubio, A.** (1995). Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiology.* **107**: 1119-1128.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.** (1991). Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of diferentially expressed cDNAs, a new β -Tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Molecular Biology.* **17**: 591-608.
- Cruz, N.T., Jordan, W.R. and Drew, M.C.** (1992). Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L. followin exposure to water deficit. *Plant Physiology.* **99**: 203-213.
- Davis, L.G., Dibner, M.D. and Batteey, J.F.** (1986). *Basic methods in molecular biology.* Elserviers. pp 143-146.
- De Vries, S., Hoge, H. and Bisseling, T.** (1988). Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. En: *Plant molecular biology manual.* Gelvin, S. B. and Schilperoort, R. A. (eds). Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp 1-13.

- Deutch, C.E. and Winicov, I.** (1995). Post-transcriptional regulation of a salt-inducible alfalfa gene encoding a putative chimeric proline-rich cell wall protein. *Plant Molecular Biology*. **27**: 411-418.
- Esaka, M., Hayakawa, H., Hashimoto, M. and Matsubara, N.** (1992). Specific and abundant secretion of a novel hydroxyproline-rich glycoprotein from salt-adapted winged bean cells. *Plant Physiology*. **100**: 1339-1345.
- Espartero, J., Pintor-Toro, J.A. and Pardo, J.M.** (1994). Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Molecular Biology*. **25**: 217-227.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem*. **132**: 6-13.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.** (1984). Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem*. **137**: 266-267.
- Gamas, P., Niebel, F.d.C., Lescure, N. and Cullimore, J.V.** (1996). Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Molecular Plant Microbe Interaction*. **9**: 233-242.
- Giraudat, J.** (1995). Abscisic acid signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. **7**: 232-238.
- Goormachtig, S., Valerio-Lepiniec, M., Szczyglowski, K., Van Montagu, M., Holsters, M. and de Bruijn, F.** (1995). Use of differential display to identify novel *Sesbania rostrata* genes enhanced by *Azorhizobium caulinodans* infection. *Molecular Plant and Microbe Interactions*. **8**: 816-824.
- Gowri, G., Bugos, R.G., Campbell, W.H., Maxwell, C.A. and Dixon, R.A.** (1991). Molecular cloning and expression of S-adenosyl-L-methionine:caffeic acid 3-O-methyltransferase, a key enzyme in lignin biosynthesis. *Plant Physiology*. **97**: 7-14.
- Grunstein, M. and Hogness, D.S.** (1975). Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. **72**: 3961.
- Hable, W.E., Bisgrove, S.R. and Kropf, D.L.** (1999). To shape a plant-The cytoskeleton in plant morphogenesis. *The Plant Cell*. **10**: 1172-1774.
- Hanahan, D.** (1986). *Techniques for transformation of E.coli*. En: DNA Cloning. Glover, D. M. (eds). USA. IRL Press, Oxford. 1: pp 109-135.
- Holmberg, N. and Bülow, L.** (1998). Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science*. **3**: 61-66.

- Hong, C.J., Nagao, R.T. and Key, J.L.** (1987). Characterization and sequence analysis of developmentally regulated putative cell wall protein gene isolated from soybean. *The Journal of Biological Chemistry*. **262**: 8367-8376.
- Hong, C.J., Nagao, R.T. and Key, J.L.** (1990). Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean. *The Journal of Biological Chemistry*. **265**: 2470-2475.
- Hong, J.C., Cheong, Y.H., Nagao, R.T., Bahk, J.D., Cho, M.J. and Key, J.L.** (1994). Isolation and characterization of three soybean extensin cDNAs. *Plant Physiology*. **104**: 793-796.
- Horwitz, J.P., Chua, J., Curby, R.J., Tomson, A.J., DaRooge, M.A., Fisher, B.E., Mauricio, J. and Klundt, I.** (1964). Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- β -D-glycopyranosides. *Med.Chem.* **7**: 574.
- Imgram, J. and Bartels, D.** (1996). The molecular bases of dehydration tolerance in plants. En: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Jones, R. L. and Somerville, C. R. (eds). Palo Alto, California, USA. Annuals Reviews. **47**: pp 377-403.
- Jones, J.T. and Mullet, J.E.** (1995). A salt- and dehydration-inducible pea gene, Cyp15a, encodes a cell wall protein with sequence similarity to cysteine proteases. *Plant Molecular Biology*. **28**: 1055-1065.
- Keller, B.** (1993). Structural cell wall proteins. *Plant Physiology*. **101**: 1127-1130.
- Kempter, B., Lupp, P. and Neumeier, D.** (1991). A short procedure for Southern blotting on neutral and anionic membranes. *Trends in Genetics*. **7**: 109-110.
- Kenrick, P. and Crane, P.R.** (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature*. **389**: 33-39.
- Khandjian, P.S.** (1980). Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes. *Bio/Technology*. **5**: 165-167.
- Kieliszewski, M.J. and Lamport, D.T.A.** (1994). Extensin: Repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *The Plant Journal*. **5**: 157-172.
- Lamport, D.T.A.** (1965). Cell walls proteins. *Adv. Bot. Res.* **2**: 218-251.
- Lehrach, H., Diamond, D., M, W.J. and Boedtker, H.** (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: A critical reexamination. *Biochemistry*. **16**: 4743-4751.
- Leung, J. and Giraudat, J.** (1998). Abscisic acid signal transduction. En: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Jones, R. L. and Somerville, C. R. (eds). Palo Alto, California, USA. Annuals Reviews. **49**: pp 199-222.

- Lewin, B.** (1994). *Genes*. Oxford University Press Inc. New York, USA. pp 525-552.
- Lucas, W.J.** (1995). Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Current Opinion in Cell Biology*. **7**: 673-680.
- Ludlow, M.M.** (1993). Physiological mechanisms of drought resistance. En: *Biotechnology for arid plants*. Mabry, T. L. (eds). Austin, Texas, USA. pp 11-34.
- Mahalingam, R. and Knap, H.T.** (1998). Núm. Acceso **AF047052**.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.** (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. pp
- Marcus, A., Greenberg, J. and Averyhart-Fullard.** (1991). Repetitive proline-rich proteins in the extracellular matrix of the plant cell. *Physiologia plantarum*. **81**: 237-279.
- Momonoki, Y.S.** (1997). Asymmetric distribution of acetylcholinesterase in gravi-stimulated maize seedlings. *Plant Physiology*. **114**: 47-53.
- Nilsen, E.T.** (1996). *The physiology of plants under estress*. John Willey and Sons, INC. New York, USA. pp 1-12.
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J.** (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. **85**: 2444-2448.
- Peleman, J., Boerjan, W., Gilbert, E., Seurinck, J., Botterman, J., Alliotte, T., Van Montagu, M. and Inzé, D.** (1989). Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding S-adenosylmethionine synteatse. *The Plant Cell*. **1**: 81-93.
- Peleman, J., Saito, H., Cottyn, B., Engler, G., Seurink, J., Botterman, J., Alliotte, T., Van Montagu, M. and Inze, D.** (1989). Structure and expression analyses of the S-adenosylmethionine synthetase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. **84**: 359-369.
- Qui, Y.-L. and Palmer, J.D.** (1999). Phylogeny of early land plants: insights from genes and genomes. *Trends in Plant Science*. **4**: 26-30.
- Radloff, R., Bauer, W. and Vinograd, J.** (1967). A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in HeLa cell. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. **57**: 1514-1521.
- Raven, P.H.** (1992). *Biology of plants*. Worth Publishers. New York, USA. pp 33-37.
- Reiter, W.-D.** (1998). The molecular analysis of cell wall components. *Trends in Plant Science*. **3**: 27-32.
- Sachs, M.M. and Tuan-Hua, H.D.** (1986). Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol*. **37**: 363-376.

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. **80**: 3963-3965.
- Sauer, N., Corbin, D.R., Keller, B. and Lamb, C.S.** (1990). Cloning and characterization of a wound-specific hydroxy-proline-rich glycoprotein in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Environ.* **13**: 257-266.
- Scagel, E.R., Bandoni, R.J., Rouse, G.E., Schofield, W.B., Stein, J.R. and Taylor, T.M.C.** (1984). *El reino vegetal*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. pp
- Schmalstig, J.G. and Cosgrove, D.J.** (1990). Coupling of solute transport and cell expansion in pea stems. *Plant Physiology*. **94**: 1625-1633.
- Schröder, G., Eichel, J., Breinig, S. and Schröder, J.** (1997). Three differentially expressed S-adenosylmethionine synthetases from *Catharanthus roseus*: molecular and functional characterization. *Plant Molecular Biology*. **33**: 211-222.
- Sheiness, D. and Sullivan, D.** (1986). Staining of RNA in formaldehyde gels. *Focus*. **8**: 11.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki.** (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*. **115**: 327-334.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology*. **7**: 161-167.
- Showalter, A.M.** (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*. **5**: 9-23.
- Showalter, A.M., Butt, A.D. and Kim, S.** (1992). Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. *Plant Molecular Biology*. **19**: 205-215.
- Showalter, A.M., Zhou, J., Rumeau, D., Worts, S.G. and Varner, J.E.** (1991). Tomato extensin and extensin-like cDNAs: structure and expression in response to wounding. *Plant Molecular Biology*. **16**: 547-565.
- Silk, W.K., Walker, R.C. and Labavitch, J.** (1984). Urodine deposition rates in the primary root of *Zea mays*. *Plant Physiology*. **74**: 721-726.
- Smirnov, N.** (1998). Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*. **9**: 214-219.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal Molecular Biology*. **98**: 503-517.
- Stebbins, J.P. and Staehlin, L.A.** (1992). Comparative aspects of plant morphogenesis : a cellular molecular and evolutionary approach. *American Journal of Botany*. **79**: 589-598.

- Tabaeizadeh, Z.** (1998). Drought-induced responses in plant cells. *International Review of Cytology*. **182**: 191-247.
- Taiz, L.** (1991). *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California, USA. pp 22-27.
- Ullmann, A., Jacob, F. and Monod, J.** (1967). Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal Molecular Biology*. **24**: 339-343.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D.** (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarosa. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. **76**: 615-624.
- Wilson, R.C., Faxin, L., M, M.E. and Cooper, J.B.** (1994). A new proline-rich early nodulin from *Medicago truncatula* is highly expressed in nodule meristematic cells. *The Plant Cell*. **6**: 1265-1275.
- Zhou, J., Rumeau, D. and Showalter, A.M.** (1993). Isolation and characterization of two wound-regulated tomato extensin genes. *Plant Molecular Biology*. **20**: 5-17.
- Zhu, J.-K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A.** (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **16**: 253-277.