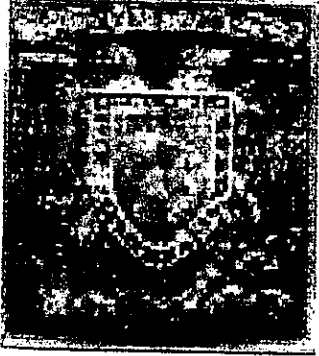


03088

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO 2

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



2000 JUN 20

TESIS DOCTORAL

"EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINA
DURANTE LA GERMINACIÓN DE PLANTAS
MONO Y DICOTILEDÓNEAS"

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA
EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

M. EN B. CLAUDIA DÍAZ CAMINO.

280534

Junio del 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.

La fase experimental de este trabajo fue llevado a cabo en el laboratorio del **Dr. Marco A. Villanueva Méndez**, bajo la supervisión del Comité Tutorial integrado por el **Dr. Marco A. Villanueva Méndez**, como tutor principal, y los **Dres. Federico Sánchez Rodríguez, Lorenzo Segovia Forcella y Jorge Vázquez Ramos** como co-tutores.

El trabajo de tesis fue asesorado por la **Dra. Alejandra Bravo de la Parra** y por los **Dres. Federico Sánchez Rodríguez, Marco A. Villanueva Méndez, Juan Carlos Almagro Domínguez, Miguel A. Cevallos Gaos, Mario Rocha Sosa y Alejandro Alagón Cano**.

Los donativos proporcionados por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) **IN-201696 e IN-230399**; así como la **Beca Completa** para llevar a cabo Estudios de Doctorado que me fue otorgada por la DGAPA y los donativos del Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado **202339 y 103312** concedidos durante los últimos tres años, permitieron que este trabajo fuera posible.

ÍNDICE

RESUMEN..... i

ABSTRACT..... ii

INTRODUCCIÓN.

I. REVISIÓN GENERAL DE LITERATURA SOBRE ACTINA.

Características biológicas y funcionales de la molécula de actina.....	4
Aspectos evolutivos de la molécula de actina.....	8
La familia génica de actina en animales.....	9
Proteínas de unión a actina en animales.....	10
El citoesqueleto de actina en plantas vasculares.....	12
La familia génica de actina en plantas vasculares.....	14
Proteínas de unión a actina en plantas vasculares.....	16
Importancia sobre el estudio del citoesqueleto en plantas vasculares.....	17

II. EXPRESIÓN DE ACTINA EN ANGIOSPERMAS.

Las angiospermas.....	19
La semilla en angiospermas.....	20
Embriogénesis y germinación en angiospermas.....	21
El papel del citoesqueleto durante el evento de germinación y el desarrollo de la plántula.....	26

OBJETIVO DEL TRABAJO E HIPÓTESIS EXPERIMENTAL..... 36

RESULTADOS:

Purification of multiple functional leaf-actin isoforms from *Phaseolus vulgaris* L. Claudia Díaz-Camino and Marco A. Villanueva. *Biochemical Journal* (1999) 343: 597-602..... 38

Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. Marco A. Villanueva, Francisco Campos, Claudia Díaz, José M. Colmenero-Flores, Edgar Dantán, Federico Sánchez, Alejandra A. Covarrubias. *Planta* (1999) 207: 582-589..... 44

Complex actin isoform expression in germinating seeds of *Zea mays*. Claudia Díaz-Camino and Marco A. Villanueva. Manuscrito..... 52

DISCUSIÓN..... 78

LITERATURA CITADA NO INCLUIDA EN LOS ARTÍCULOS O EN EL MANUSCRITO..... 87

RESUMEN

La secuencia de aminoácidos deducida a partir de numerosos genes de actina en angiospermas, señala que esta proteína se encuentra conservada con respecto a las actinas de otros reinos. Sin embargo, la comparación de las secuencias de actina que comprenden a una familia génica en una sola especie vegetal, indica que la diversidad de sus miembros es mucho mayor si se compara con la diversidad existente entre especies altamente divergentes en animales. Las funciones precisas de las diferentes isoformas de actina en angiospermas a nivel bioquímico aún no se han determinado, lo cual se debe tanto a las dificultades generales que presenta el tejido vegetal para el aislamiento de proteínas (por ejemplo, la presencia de la pared celular y la alta actividad proteolítica) como a la baja concentración de la actina en el mismo. Por ello, uno de los objetivos planteados en este estudio fue la adaptación de un esquema de purificación por afinidad que nos permitiera aislar a la actina a partir del tejido foliar de *Phaseolus vulgaris* L. Mediante esta estrategia experimental, fuimos capaces de aislar múltiples isovariantes de actina en estado funcional, lo cual se corroboró mediante ensayos de unión homólogos y heterólogos a profilina, a faloidina y a DNasa I, así como por su capacidad de co-polimerizar en filamentos.

Asimismo, estudiamos el comportamiento de la actina durante la germinación en semillas de *P. vulgaris* y de *Zea mays*, particularmente, analizando su distribución en los distintos tejidos de la semilla, la expresión de esta proteína durante el evento germinativo y la composición a nivel de isoformas durante este período. Los resultados obtenidos en *P. vulgaris* indican que la actina se presenta a niveles indetectables en los cotiledones y se encuentra concentrada fundamentalmente en el embrión. Tras la imbibición, la expresión de la actina se quintuplica y se detectan un máximo de cuatro isovariantes, de las cuales, dos de ellas son mayoritarias. Por otro lado, el análisis de la localización de la actina en *Z. mays* muestra que si bien la mayor parte de ésta se concentra en el embrión, niveles menores son igualmente detectados en el resto de los componentes de la semilla. La expresión de la actina se induce durante la germinación, lo cual pudo corroborarse a nivel de proteína y de mRNA. Sin embargo, dicho incremento no es tan dramático como en el caso de *P. vulgaris*. Aunado a esto, la composición de la actina indica un complejo patrón constituido por ocho isoformas.

En este trabajo, discutimos las implicaciones de estos resultados en términos del posible papel de la actina durante la germinación de *P. vulgaris* y de *Z. mays* y cómo esta proteína difiere entre ambos modelos experimentales.

ABSTRACT

Plant actins show diversity in their gene sequences, protein isovariants and tissue distribution like other eukaryotes. However, single plant species have more divergent actin genes than individual animal species. It has been proposed that plants may have individual isovariants of actin that are specialized for particular functions and/or expression in certain cell types. Nevertheless, the faithful biochemical role of the actin isovariants in higher plants remains to be elucidated. Besides general difficulties with the isolation of proteins from plant material (i.e. the presence of a cell wall and high proteolytic activity), the actin concentration in any vegetative plant tissue is much lower than in cytoplasmic animal tissues. For these reasons, one of the aims of this study was adapted a deoxyribonuclease I-Sepharose affinity purification scheme. Using this approach, we were able to isolate multiple functional plant actin isovariants from leaves of *Phaseolus vulgaris* L. The purified actin was able to bind leaf and rabbit muscle profilin, phalloidin and DNase I. Moreover, the protein could polymerize into filaments that contained the main isoforms eluted from the column.

In addition, we also analyzed in *P. vulgaris* (or common bean) and in *Zea mays* (or maize) seedlings the actin content in different parts of the seed, the time-course of actin expression, and its isoform composition during germination period. The results obtained in *P. vulgaris* showed that actin was present at very low levels in cotyledons and is concentrated mostly in the embryo. Upon imbibition, actin expression increased five-fold and a maximum of four actin isoforms were expressed with two of them as the major ones expressed. On the other hand, the analysis of the actin expression in *Z. mays* showed that a certain baseline amount of actin is mainly concentrated in the embryo axis, and to a less extent, it is also present in all the seed components. Nonetheless, the expression of actin is also induced during imbibition at both the protein and mRNA level but the increase is not as dramatic as in the case of *P. vulgaris*. The isoform distribution showed a complex pattern of at least

eight isovariants. These data indicate that: a) actin mRNA and protein in *Z. mays* are initially present in other seed components besides the embryo, as opposed to *P. vulgaris*; b) the expression is moderately induced upon imbibition at times similar to those found in *P. vulgaris*; and c) the isoform pattern is more complex indicating a more complex regulation and perhaps more specific isoform functions.

We discuss the implications of these data in terms of the possible role of actin during germination in *Z. mays* and how it differs from what has been observed for a similar process in *P. vulgaris*.

*El lamento no es el dolor.
El canto no es el pájaro.
El libro no soy yo, ni es mi hijo,
ni es la sombra de mi hijo.
El libro es sólo el tiempo,
un tiempo mío entre todos mis tiempos,
un grano en la mazorca,
un pedazo de hidra.*

Jaime Sabines.

INTRODUCCIÓN

I. REVISIÓN GENERAL DE LITERATURA SOBRE ACTINA

La capacidad de las células eucarióticas para adoptar una gran variedad de formas y de llevar a cabo movimientos coordinados y dirigidos dependen del citoesqueleto, una compleja red de filamentos que se extienden a través del citoplasma celular. El citoesqueleto aparentemente se encuentra ausente en organismos procariontes y éste puede haber sido un factor crucial durante la evolución de organismos eucariontes desde sus formas unicelulares hasta las formas pluricelulares. De hecho, el citoesqueleto de una célula puede influenciar al de células vecinas a través de uniones intercelulares, o por su efecto sobre la matriz extracelular. De esta manera los cambios en la forma y en la polaridad celular se coordinan intra e intercelularmente durante el desarrollo de órganos y tejidos en organismos multicelulares (Alberts *et al.*, 1989).

Las diversas funciones del citoesqueleto dependen principalmente de tres clases de filamentos constituídos por proteínas: microfilamentos o filamentos de actina, microtúbulos o filamentos de tubulina y filamentos intermedios, compuestos por proteínas fibrosas que son específicas al tipo celular. Cada filamento se construye a partir de un monómero proteínico distinto y, en combinación con proteínas específicas asociadas a cada uno de ellos, son capaces de construir una gran variedad de estructuras celulares.

Los microfilamentos o filamentos de actina están directamente involucrados en distintos tipos de movilidad celular (en el que se incluye la contracción muscular), en la citocinesis, las interacciones célula-célula y célula-substrato, la localización de componentes celulares, el transporte de organelos y de vesículas y el establecimiento

de la morfología celular (Puius *et al.*, 1998). Las estructuras formadas a partir de este tipo de filamentos poseen características bioquímicas y biofísicas únicas cuya regulación se encuentra finamente controlada tanto temporal como espacialmente.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y FUNCIONALES DE LA MOLÉCULA DE ACTINA.

La actina monomérica (llamada actina G o actina globular) consiste en una cadena polipeptídica de aproximadamente 375 residuos de aminoácidos. Cada monómero, bajo condiciones fisiológicas (esto es, de 50 a 100 mM de KCl, pH 7.0 a 7.1 y 1 mM de Mg^{2+} libre), se encuentra unido tanto a una molécula de ATP como a un ión de Mg^{2+} en sitios altamente específicos (FIGURA 1) (Sheterline and Sparrow, 1994).



FIGURA 1. LA MOLÉCULA DE ACTINA. Representación de la estructura de una molécula de actina en la que se indica el surco de unión a ATP y el sitio de interacción con el catión divalente.

La actina se ensambla entre sí a través de interacciones no covalentes para formar polímeros (llamados actina F, filamentos de actina o microfilamentos), los cuales son considerados la forma funcional de la actina en la célula (FIGURA 2). Distintos elementos contráctiles y estructurales contienen arreglos de filamentos de actina cuyo ensamblaje se dirige durante procesos de desarrollo y de diferenciación celular (Sheterline and Sparrow, 1994). La naturaleza del citoesqueleto de actina dentro de una célula se modula por varios factores que incluyen diferencias en el pH, en la concentración de sales o de iones, así como por la presencia de un amplio rango de proteínas asociadas a éste capaces de entrecruzar a los microfilamentos en paquetes apretados o en redes laxas, de proteger sus extremos, y de fraccionarlos parcial o completamente (Pollard and Cooper, 1986; Hartwing and Kwiatkowski, 1991).

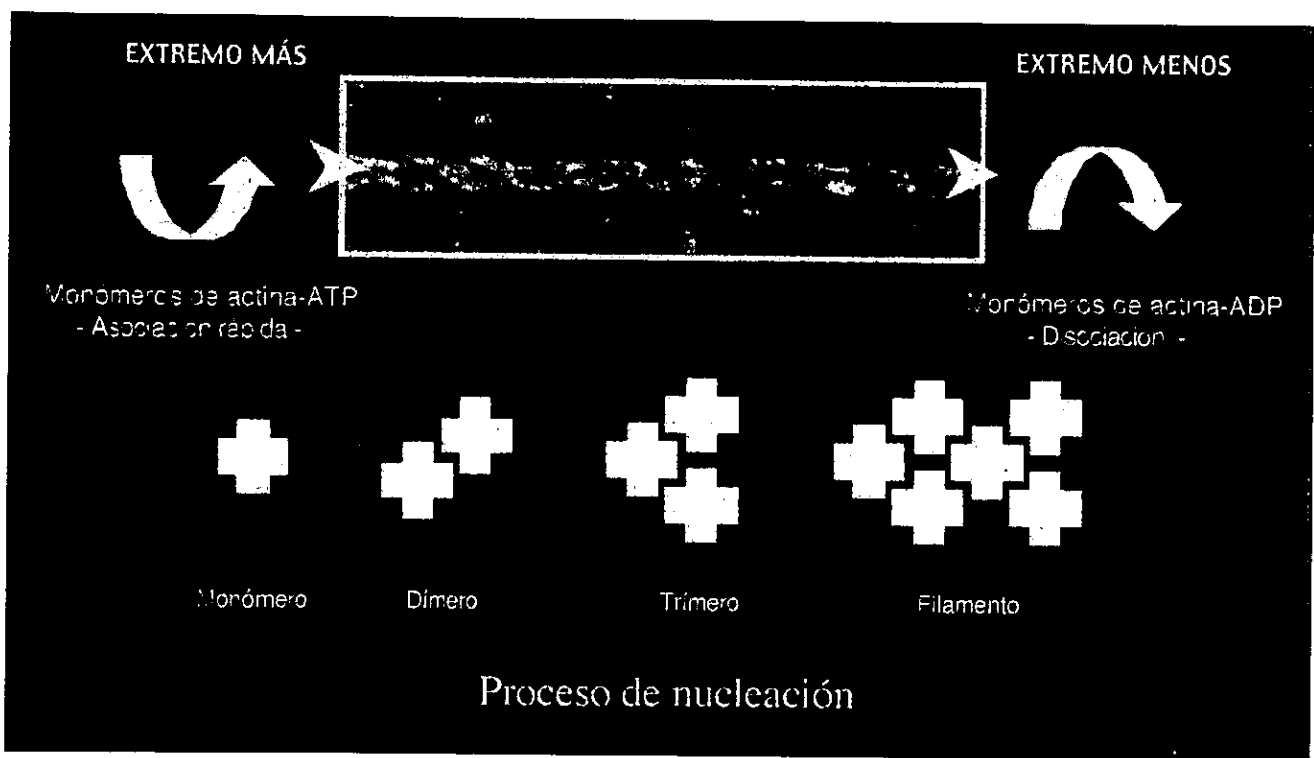


FIGURA 2. POLIMERIZACIÓN DE FILAMENTOS DE ACTINA. En el panel superior (a) se muestra la polaridad de esta estructura que determina las propiedades cinéticas de los dos extremos del filamento. El panel inferior (b) ilustra a grandes rasgos el proceso de nucleación.

El ensamblaje de los microfilamentos se inicia por una reacción favorable de nucleación y se propaga por la adición de subunidades a los extremos del filamento en crecimiento a manera de una hélice lineal, lo que genera una polaridad en la estructura. El proceso de nucleación es limitante, ya que los dímeros de actina no son estables a menos de que se adicione un tercer monómero. De hecho, el tamaño del núcleo crítico parece ser justamente el trímero de actina (FIGURA 2) (Mannherz, 1992; Zigmond, 1998).

El número de subunidades que se adicionan al polímero por segundo tras el evento de nucleación, es proporcional a la concentración de las subunidades libres ($K_{on}[C]$), aunque las subunidades son capaces de abandonar el extremo del polímero a una velocidad constante (K_{off}) que no depende de la concentración total (C). Conforme el polímero crece, la concentración de subunidades libres en el entorno inmediato disminuye hasta alcanzar un valor constante, llamado concentración crítica (C_c), en la cual, la velocidad de adición de subunidades se iguala a la velocidad de pérdida de subunidades. Por lo tanto, el punto de equilibrio de dicha reacción se describe por la siguiente ecuación:

$$K_{on}[C_c] = K_{off}$$

por lo que:

$$\text{Concentración crítica} = C_c = \frac{K_{off}}{K_{on}} = \frac{1}{K}$$

Donde **K** es la constante de equilibrio para la adición de subunidades.

(en Albertset *al.*, 1989).

Existe una desigualdad en la C_c a los extremos del filamento debido a las diferentes velocidades relativas del intercambio de monómeros. Es por ello que son llamados extremo "más" y extremo "menos". Las velocidades son, aproximadamente, de 12 a 20 veces mayores en el extremo "más" con respecto al extremo "menos" (Pollard, 1986; Mannherz, 1992). Esta característica se encuentra determinada tanto por la polaridad estructural del filamento de actina, de la que ya hemos hablado, como por la hidrólisis del ATP en ADP + Pi que se encuentra unido al monómero de actina y que se efectúa una vez que la subunidad se ha incorporado al microfilamento.

La hidrólisis del ATP provoca un cambio conformacional en la subunidad de reciente adición, reduciendo la afinidad de unión de ésta por las subunidades vecinas y favoreciendo con ello la disociación o el desensamblaje de los monómeros de actina a partir de los extremos del filamento. Ya que el extremo "menos" presenta una velocidad de adición menor, la posibilidad de que la hidrólisis del ATP en el monómero terminal se efectúe antes de que una segunda subunidad se adicione a éste es mayor que en el extremo "más". Por lo anterior, el extremo "menos" presentará un monómero terminal unido a ADP, mientras que el extremo "más" una molécula de ATP. Esta diferencia química establecida entre los extremos opuestos del microfilamento, que resulta de las diferencias en las velocidades de intercambio de los monómeros de actina, se traduce como un cambio en las constantes de equilibrio para cada uno de los extremos del filamento, creándose así una adición preferencial al extremo "más" (Sheterline and Sparrow, 1994).

Ya sea como una molécula monomérica o como un polímero filamentoso, la actina en la célula se localiza predominantemente en el citoplasma, aunque también se ha detectado su presencia en el núcleo (Sheterline and Sparrow, 1994).

ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LA MOLÉCULA DE ACTINA.

La secuencia de aminoácidos y las propiedades bioquímicas de la actina se encuentran conservadas a lo largo de la evolución de organismos eucariontes (Kabsch and Vandekerckhove, 1992). En organismos multicelulares como las plantas y los animales, la actina generalmente se presenta como una familia génica compleja, y como copias únicas en muchos protistas (Sook *et al.*, 1999).

La actina comparte una historia evolutiva común con proteínas relacionadas a actina (ó ARPs por sus siglas en inglés). Algunas de estas proteínas se han identificado en diversos *phyla* en los eucariontes, lo que indica que se generaron por eventos de duplicación génica que se produjeron en un punto próximo a la divergencia entre procariontes y eucariontes. Las relaciones evolutivas entre las ARPs y la actina no son claras. Sin embargo, los análisis filogenéticos llevados a cabo, indican que tanto las ARPs como la actina divergieron a partir de un ancestro común antes de la separación de los principales grupos de eucariontes, y que las características comunes en cada una de ellas se han retenido (Mullins *et al.*, 1996).

De igual forma, los datos obtenidos a partir de la resolución a nivel de cristal de la estructura tridimensional de la actina, la hexocinasa y el dominio amino terminal de la proteína de choque térmico Hsc70, revelaron que estas proteínas comparten un plegamiento estructural común y un sitio de unión a ATP (Mullins *et al.*, 1996). Se ha propuesto que estas proteínas se generaron por divergencia evolutiva a partir del mismo ancestro común que las ARPs; aunque otras alternativas, como la convergencia evolutiva, son igualmente posibles. Si la divergencia fuese la interpretación correcta, sería posible la existencia de miembros ancestrales incluso en procariontes. De hecho, en la última década, este ha sido un campo intensamente estudiado (Bork *et al.*, 1992), aunque los resultados obtenidos hasta la fecha actual no son concluyentes.

LA FAMILIA GÉNICA DE ACTINA EN ANIMALES.

En animales, la actina se encuentra codificada por una familia génica constituida de 6 a 10 genes (Kislauskis *et al.*, 1993). De esta manera, la familia génica de actina codifica para distintas isovariantes cuya regulación se encuentra bajo control transcripcional (Lloyd and Gunning, 1993) y traduccional (Aktories and Wegner, 1992; Howard *et al.*, 1993; Jungbluth *et al.*, 1995). Las isovariantes de actina son bioquímicamente similares entre sí. Las sustituciones a nivel de nucleótidos que resultan en cambios de aminoácidos varían del 3 al 7% entre las distintas actinas de origen animal (Hightower and Meagher, 1986). Muchas de las isovariantes fueron originalmente descubiertas por ensayos de enfoque isoeléctrico: dos tipos de α -actinas, una presente en el sarcómero del músculo cardíaco y esquelético, y otra en el músculo liso vascular; la β -actina, localizada en el citoplasma celular y la γ -actina, propia tanto del citoplasma como del músculo liso entérico (Mannherz, 1992).

La evidencia obtenida por experimentos llevados a cabo *in vitro* sugiere que los distintos tipos de actina pueden substituirse unos por otros en estructuras celulares (Gunning *et al.*, 1984; McKenna *et al.*, 1985). Sin embargo, la localización *in vivo* en periciclos retinales demuestra que las actinas de tipo musculares y las citoplásmicas se localizan diferencialmente en distintas estructuras subcelulares dentro de un solo tipo celular (De Nofrio *et al.*, 1989). De hecho, mediante la construcción de proteínas quiméricas, Fyrberg *et al.* (1998) demostraron que los seis genes que codifican para actinas convencionales en *Drosophila melanogaster* no son intercambiables entre sí. Los datos anteriormente mencionados apoyan la hipótesis que propone que los múltiples genes de actina codifican para proteínas que llevan a cabo diferentes funciones específicas dentro de la célula.

PROTEÍNAS DE UNIÓN A ACTINA EN ANIMALES.

La polimerización o el ensamblaje de los monómeros de actina en filamentos *in vivo* se encuentra regulada tanto en el tiempo como en el espacio. Las células mantienen una gran reserva de actina no polimerizada a una concentración mucho mayor que la concentración crítica requerida para la polimerización *in vitro*. La localización, longitud, polaridad y tiempo de ensamblaje de los microfilamentos se regula no solo por cambios en el pH celular, por sales o por ATP, sino por un grupo de proteínas capaces de asociarse tanto a la actina F como a la actina G (ó ABPs por sus siglas en inglés) (Pollard and Cooper, 1986; Sheterline and Sparrow, 1994).

Las principales categorías con base en su función incluyen a las proteínas motoras, a las proteínas que estabilizan al filamento, a las que lo desestabilizan, a las que son capaces de entrecruzar a varios de ellos de manera paralela, anti-paralela o desordenada, a las proteínas que favorecen el proceso de nucleación, a las que fraccionan al filamento y a las proteínas que interactúan con el monómero de actina ya sea secuestrándolo o regulándolo (FIGURA 3) (Sheterline and Sparrow, 1994). Las proteínas que forman parte de estos grupos han sido descritas fundamentalmente a partir de estudios llevados a cabo en sistemas animales. El complejo que forma su interacción con actina es capaz de generar estructuras únicas que realizan funciones específicas en los distintos tipos celulares (Pollard, 1986). Algunas de estas proteínas, así como sus funciones, se describen en la TABLA I. Existen distintas estrategias de diseño modular para las familias de proteínas que regulan al citoesqueleto de actina. Las proteínas que entrecruzan a los filamentos utilizan un dominio conservado de unión a actina F, que se combina con otros módulos conservados para especificar el tipo de entrecruzamiento e introducir características regulatorias al sistema. En contraste, las proteínas que fragmentan al filamento utilizan un solo módulo conservado para el reconocimiento de la actina G o de la actina F, así como para la incorporación de sitios de unión a calcio o a fosfoinosítidos. Finalmente, las proteínas que son capaces de interactuar con la actina G han adoptado como estrategia un tipo

de mimetismo funcional, que puede dirigir el ensamblaje de los monómeros de actina e incluso, proveer de una conexión con vías de señalización celular. Aunque estas estrategias modulares son fundamentalmente distintas, todas ellas proporcionan un mecanismo para incrementar la diversidad funcional de las proteínas que regulan el comportamiento de la actina (Puius *et al.*, 1998).

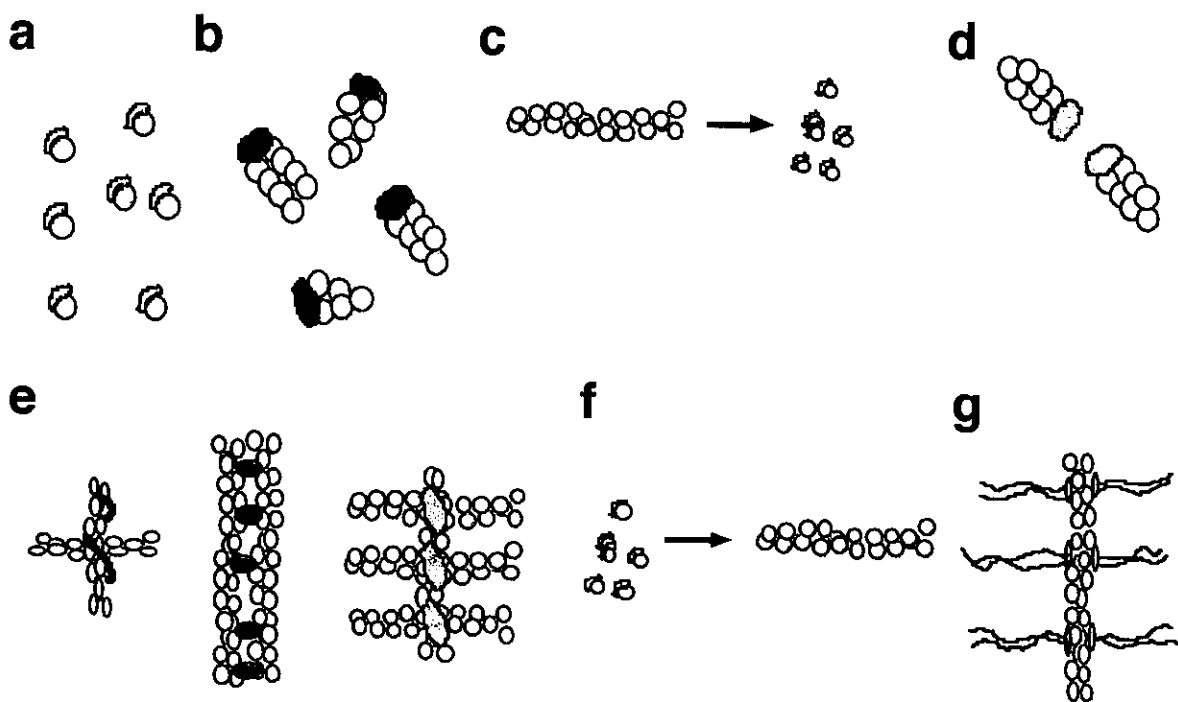


FIGURA 3. ESQUEMA GENERAL DE FUNCIONES DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A ACTINA. a) Proteínas que sequestran al monómero de actina; b) Proteínas que se unen a los extremos del filamento; c) Proteínas que lo despolimerizan; d) Proteínas que lo fragmentan; e) Proteínas que entrecruzan filamentos; f) Proteínas que favorecen la polimerización de monómeros de actina; y g) Proteínas que permiten el anclaje de microfilamentos a membranas biológicas.

El recambio de los microfilamentos y las propiedades particulares de las proteínas de unión a actina que determinan la arquitectura del citoesqueleto de actina, a su vez se encuentran modulados tanto por señales externas tales como hormonas, factores de crecimiento y receptores de la matriz extracelular, así como por señales de diferenciación internas (Sheterline and Sparrow, 1994). En sistemas animales, los principales agentes de señalización que inician cambios en la red de actina son los iones de calcio y lípidos como polifosfoinosítidos y lisofosfolípidos. Pareciera que al menos uno de los blancos de estas vías de señalización son algunas proteínas de unión a actina o a través de alteraciones en el grado de fosforilación mediado por calmodulina, cinasas y fosfatasas (Grabski *et al.*, 1998; Guillén *et al.*, 1999).

EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN PLANTAS VASCULARES.

Si bien es cierto que la mayoría de los datos sobre la función y la regulación del citoesqueleto se han obtenido a partir de estudios llevados a cabo en eucariontes pertenecientes al reino animal, en las células vegetales igualmente se presentan los principales componentes proteínicos que constituyen a este organelo, esto es, actina (Vahey and Scordilis, 1980; McLean *et al.*, 1990a; Villanueva *et al.*, 1990; Liu and Yen, 1992), tubulina (Lloyd *et al.*, 1979; Yadav and Filner, 1983) y proteínas similares a las que constituyen a los filamentos intermedios en células animales (Beven *et al.*, 1991; McNulty and Saunders, 1992; Minguez and Moreno, 1993; Yu and Moreno, 1999).

En distintos sistemas vegetales, se ha demostrado que la actina participa en el movimiento citoplásmico, en el movimiento de cloroplastos, en la forma y en la determinación del plano de división celular, en la gravipercepción en estatocitos, en el crecimiento de extremos; por ejemplo, en la germinación de tubos polínicos, en la formación del fragmoplasto citocinético y en la citocinesis, en el mantenimiento de la arquitectura celular, en la deposición y el engrosamiento diferencial de la pared

celular como ocurre en los elementos de las traqueidas, en el transporte y en el movimiento de organelos (FIGURA 4) (Meagher, 1991). La actina también participa activamente en el movimiento flagelar en las algas verdes y podría estar involucrada en el movimiento flagelar de células germinales en plantas vasculares primitivas (Meagher, 1991).

El gran número de funciones celulares distintas llevadas a cabo por la actina en células vegetales sugiere la existencia de diversos mecanismos de control, algunos ejemplos son: la expresión diferencial de isoformas durante el desarrollo del nódulo en *Phaseolus vulgaris* (Pérez *et al.*, 1994), la distribución preferencial de las isoformas κ , λ y μ en el primordio y el protodermo de raíces apicales y laterales (McLean *et al.*, 1990a) en *Glycine max* y la modulación por iones de calcio y moléculas de señalización de naturaleza lipídica en pelos radiculares de *P. vulgaris* que pudieran actuar sobre distintas proteínas de unión a actina (Braun *et al.*, 1999; Cárdenas *et al.*, 1999), entre otros.

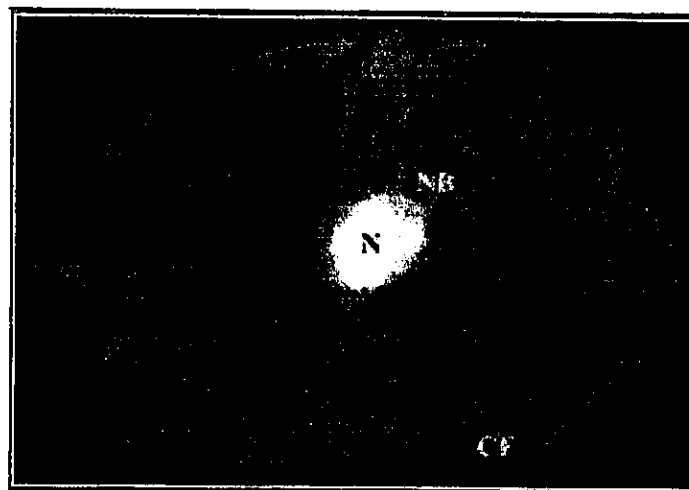


FIGURA 4. EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN PLANTAS VASCULARES. Célula de *Arabidopsis* en suspensión en la que se muestra la compleja red de filamentos de actina distribuida en el citoplasma. Tomada de Meagher *et al.*, 1999.

PROTEÍNAS DE UNIÓN A ACTINA	FUNCIONES
Miosina, Minimosina.	Proteínas motoras que interactúan con filamentos de actina.
Tropomiosina.	Estabiliza al filamento de actina.
Factor despolimerizante (ADF), Cofilina, Destrina, Actoforina, Depactina; entre otras.	Interaccionan con el monómero o con los filamentos de actina. Inducen la despolimerización de microfilamentos.
Fimbrina, α -actinina, filamina; entre otras.	Entrecruzan microfilamentos en distintos arreglos.
Profilina.	Favorece el proceso de nucleación.
Gelsolina, Villina, Fragmina, Severina, Adseverina, Brevina, cap42a, gCap39; entre otras.	Fraccionan al filamento de actina y se unen al extremo más, impidiendo de esta forma la adición consecutiva de monómeros en esta dirección.
DNasa I, β -actinina, Cap100, CapZ, cap32, cap34, cap37, Banda 4.1, Ezrina, Radixina; entre otras.	Se unen a los extremos del filamento, bloqueando la adición de monómeros de actina.
Profilina, Timosina β -4 y β -10, ASP-56, Actoforina; entre otras.	Secuestran al monómero de actina, impidiendo su adición al filamento.

TABLA I. PROTEÍNAS DE UNIÓN A ACTINA. Relación de algunas proteínas de unión a actina así como sus funciones biológicas. Adaptada a partir de Sheterline and Sparrow, 1994; McLaughlin, 1995; Rozycki *et al.*, 1994.

LA FAMILIA GÉNICA DE ACTINA EN PLANTAS VASCULARES.

La actina en plantas vasculares, al igual que en organismos animales, se encuentra codificada por familias multigénicas. El número mínimo de las secuencias génicas entre las familias parece ser mayor de 10 (Meagher and McLean, 1990). La secuencia

de aminoácidos deducida a partir de numerosos genes de actina en angiospermas, señala que esta proteína se encuentra conservada con respecto a las actinas de otros reinos (animales, hongos o protistas) resultando ser 83% idénticas. Lo anterior se refleja en los perfiles hidropáticos comparados entre actinas pertenecientes a distintos grupos filogenéticos que resultan prácticamente indistinguibles (FIGURA 5) (Hightower and Meagher, 1986). Sin embargo, la comparación de las secuencias de actina que comprenden a una familia génica en plantas vasculares indica que la diversidad de sus miembros es mucho mayor si se compara con la diversidad existente entre especies altamente divergentes en animales (McCurdy and Williamson, 1991). Por ejemplo, en soya (*Glycine max*), entre las tres clases de actina identificadas (esto es, κ , λ y μ) se presentan de 8 a 14 diferencias en residuos cargados, mientras que en las secuencias que codifican para la actina en organismos animales no hay más de 3 substituciones (Meagher, 1991). Aunque las funciones precisas de las diferentes isoformas de actina en angiospermas no se han determinado, se propone que estas variantes juegan papeles específicos dentro de la célula e interactúan con distintos componentes del citoesqueleto vegetal.

Distintos estudios han demostrado que la expresión de algunos de los genes que codifican para las diversas isovariantes de actina en plantas vasculares presentan patrones temporales y espaciales específicos (An *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996a; McDowell *et al.*, 1996 a y b; Huang *et al.*, 1997). Sin embargo, la expresión de muchos de ellos se traslapa considerablemente (Meagher *et al.*, 1999). Se propone que la combinación de distintos tipos de actinas co-expresados en el mismo tipo celular intervienen en procesos que son necesarios para la rápida respuesta de las células vegetales a señales internas y externas (Meagher *et al.*, 1999).

PROTEÍNAS DE UNIÓN A ACTINA EN PLANTAS VASCULARES.

Como ya hemos mencionado, tanto la actina G como la actina F son capaces de interactuar con una miríada de proteínas que, en conjunto, modulan el comportamiento del citoesqueleto de actina, provocando cambios en la arquitectura celular. Lo anterior igualmente se aplica a sistemas vegetales.

El alineamiento de diversas secuencias que codifican para actina en angiospermas revela la presencia de regiones de aminoácidos conservados entre plantas y animales. Dichas regiones frecuentemente coinciden con aquellas propuestas como sitios de interacción actina:actina o bien, con sitios de interacción actina:ABPs (FIGURA 6) (McElroy *et al.*, 1990).

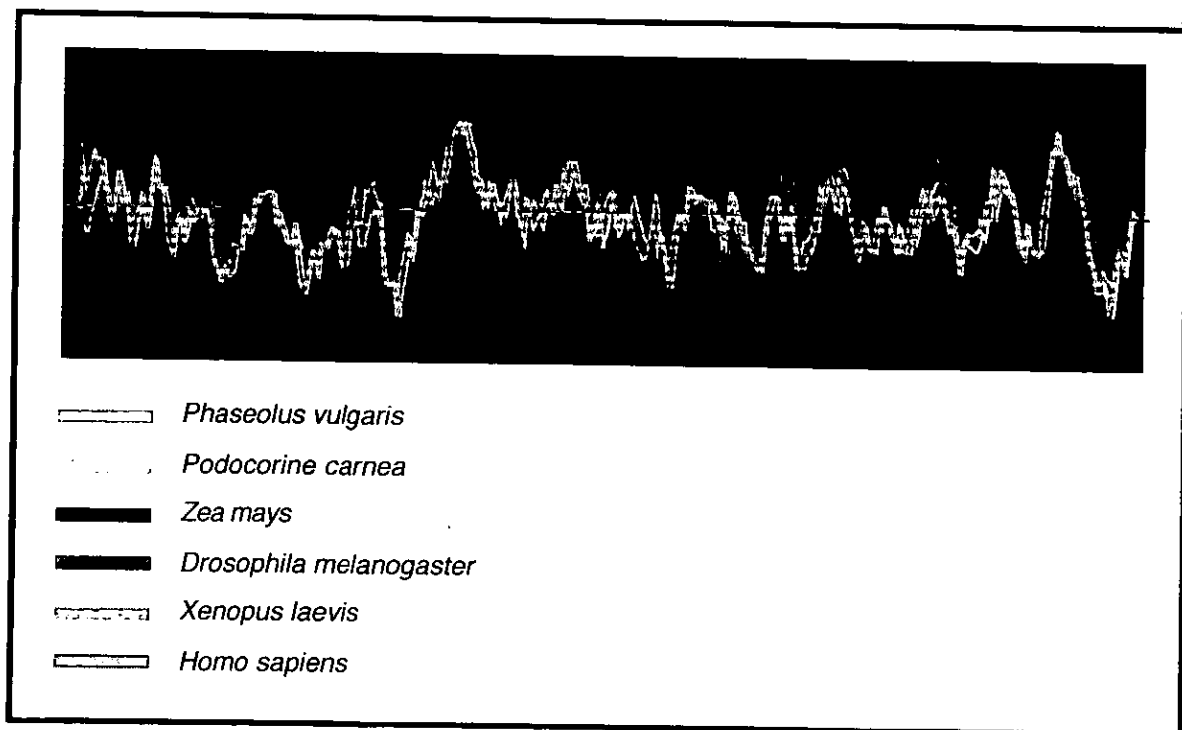


FIGURA 5. PERFILES HIDROPÁTICOS SOBREPUESTOS DE ACTINAS DE DIVERSOS ORIGENES. En la zona superior de esta figura se comparan los perfiles hidropáticos de las diversas actinas seleccionadas. En la zona inferior se indica el origen de estas.

La mayoría de los estudios llevados a cabo sobre la caracterización de proteínas de unión a actina en angiospermas a nivel bioquímico y molecular se han enfocado a la profilina y al factor despolimerizante de actina (ó ADF). En ambos casos, se ha demostrado que dichas proteínas funcionan *in vitro* de una manera similar a sus contrapartes en hongos y animales (Gibbon *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997 *a y b*; Staiger *et al.*, 1997; Theriot, 1997; Ballweber *et al.*, 1998; Didry *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1998). Sin embargo, la complejidad de la familia génica que codifica ya sea para profilina o para ADF, al igual que la familia génica de actina en plantas vasculares, supera el número de miembros con respecto a organismos animales (Gibbon *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1996*b*; Staiger *et al.*, 1997; Gibbon *et al.*, 1998). Este hecho, aunado a las diferencias bioquímicas existentes entre las distintas isoformas y al patrón de expresión diferencial específico de tejido (Staiger *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996*b*; Gibbon *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997*a y b*; Staiger *et al.*, 1997; Didry *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1998; Guillén *et al.*, 1999; Meagher *et al.*, 1999), han llevado a proponer que la expresión simultánea de isovariantes de actina y de ABPs pudiera resultar en un complejo eficiente que favorece la rápida respuesta del sistema ante una gran variedad de estímulos ambientales (Meagher *et al.*, 1999).

IMPORTANCIA SOBRE EL ESTUDIO DEL CITOESQUELETO EN PLANTAS VASCULARES.

Como respuesta a una gran variedad de estímulos tanto internos como externos, la dinámica red conformada por distintos elementos del citoesqueleto en células eucariontes reconstruye continuamente la arquitectura citoplásmica. En párrafos anteriores se ha mencionado el papel de la actina en el establecimiento de la polaridad, en la determinación del plano de división, en la elongación y la deposición de la pared celular, entre otros. Ya que las plantas vasculares son sésiles, éstos procesos resultan críticos en prácticamente todos los aspectos del desarrollo y de la

morfología vegetal, por lo que los estudios sobre la composición y la regulación del citoesqueleto de actina en plantas vasculares han adquirido día con día mayor relevancia.

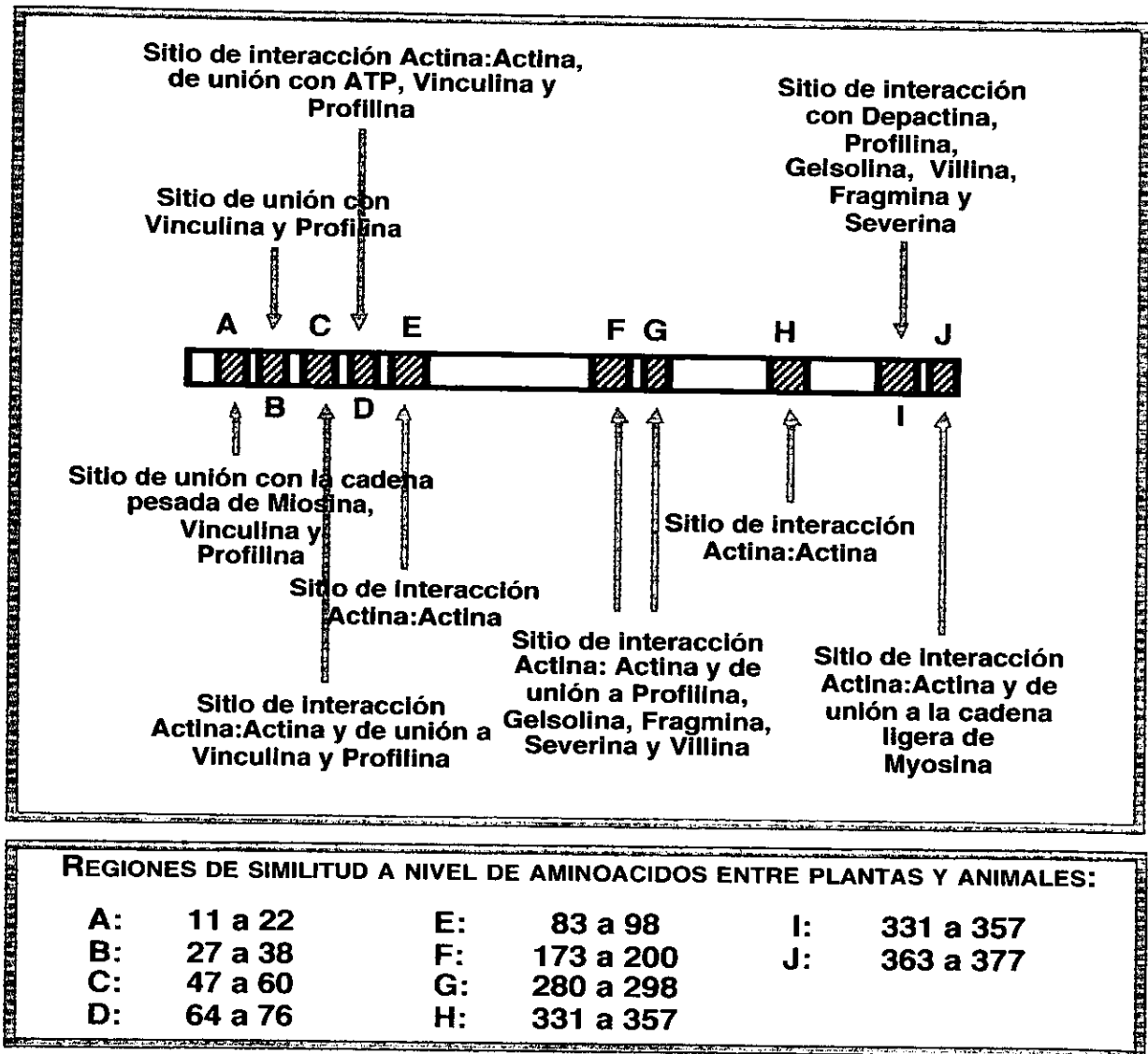


FIGURA 6. Representación gráfica que indica la posición de regiones de aminoácidos conservados entre actinas vegetales y animales. Los sitios de interacción actina:actina y de actina:ABPs se encuentran señalados por flechas verticales. Tomada de McElroy *et al.*, 1990.

Actualmente, sabemos que la familia de actina en plantas vasculares la constituyen distintos genes ancestrales que divergen entre sí, que la expresión de dichos genes se regula transcripcional y traduccionalmente, que distintas isoformas de actina coexisten en el mismo tipo celular y que la localización y número de isoformas es característica del tejido y del estado de desarrollo del mismo. Sin embargo, desconocemos aún los mecanismos bioquímicos que modulan al monómero de actina vegetal y su ensamblaje en polímeros, cómo dicho ensamblaje correlaciona con las distintas actividades en las que el citoesqueleto de actina se encuentra involucrado, cuántos actores participan en cada proceso y cuál es su naturaleza y función específica dentro de éste.

II. EXPRESIÓN DE ACTINA EN ANGIOSPERMAS

LAS ANGIOSPERMAS.

Las angiospermas son las plantas más exitosas que existen sobre la tierra desde el punto de vista de su abundancia y diversidad. Las estructuras comunes de este tipo de plantas son las flores y las semillas contenidas en frutos. Tanto paleobotánicos como taxónomos proponen que la transición de gimnospermas a angiospermas se llevó a cabo durante los períodos Jurásico y Cretácico tardío de la Era Mesozoica. El evento evolutivo más significativo en las plantas angiospermas fue justamente el desarrollo de la estructura floral. Poco después de su origen, las plantas con flores siguieron dos líneas de evolución distintas y, actualmente, se clasifican en dos clases principales, la Liliopsida o monocotiledónea y la Magnoliopsida o dicotiledónea. Las principales diferencias estructurales entre ambas clases se señalan en la TABLA II (Mauseth, 1998; Moore *et al.*, 1998).

A partir del análisis de representantes fósiles, se propone que la diversificación de las plantas dicotiledóneas se llevó a cabo durante el período Cretácico tardío, mientras que los análisis moleculares, morfológicos y fósiles sugieren que las plantas monocotiledóneas, originadas a partir de una rama relativamente primitiva de las plantas dicotiledóneas, se diversificaron durante el período Cretácico Superior, esto es, aproximadamente 90 millones de años previos a la Era actual (Gandolfo *et al.*, 1998).

LA SEMILLA EN ANGIOSPERMAS.

La aparición de la semilla como un intermediario en la reproducción vegetal fue uno de los eventos más significativos en la evolución de las plantas vasculares. El registro fósil más antiguo proviene del período Devónico tardío, cerca de 360 millones de años atrás (Moore *et al.*, 1998). Esta estructura se encuentra presente en plantas gimnospermas y angiospermas y se propone que ha determinado su dominancia sobre las plantas productoras de esporas durante tiempos geológicos recientes (Esau, 1977).

Una semilla madura es morfológicamente compleja y presenta tejidos de distinta composición genética. El embrión generalmente es diploide como lo es la cubierta de la semilla que se conforma por la testa y el pericarpio. En algunas semillas, el embrión se encuentra rodeado por un tejido nutritivo llamado endospermo cuya naturaleza es triploide. Las sustancias de reserva tales como los azúcares complejos y las proteínas son almacenadas *in situ*, excepto por pequeñas cantidades de azúcares solubles y de grasas que se almacenan en el eje embrionario o embrión. En ciertas semillas de plantas monocotiledóneas (por ejemplo en *Zea mays*), el embrión se encuentra rodeado por el endospermo y el cotiledón recibe un nombre especial, el escutelo. Este tejido ha sido eficientemente diseñado para la secreción de enzimas digestivas al endospermo y para la absorción de nutrientes a partir del

mismo durante el proceso de germinación (Berrie, 1985; Moore *et al.*, 1998). En las semillas maduras de plantas leguminosas (por ejemplo en *Phaseolus vulgaris*) generalmente el endospermo se consume durante la formación del eje embrionario y de los cotiledones y las reservas de nutrientes se almacenan en estos últimos (Moore *et al.*, 1998) (FIGURA 7).

CARACTERÍSTICAS	MONOCOTILEDÓNEAS	DICOTILEDÓNEAS
Hojas embrionarias o cotiledones,	Un cotiledón.	Dos cotiledones.
Partes florales,	Usualmente en múltiplos de tres.	Usualmente en múltiplos de cuatro o cinco.
Polen,	Generalmente presenta un solo poro.	Generalmente presenta tres poros.
Venación de la hoja,	Comúnmente paralela.	Comúnmente reticulada.
Distribución de los haces vasculares primarios en el tallo,	Se presenta de manera desordenada.	Se ordena de manera anillada.
Crecimiento secundario verdadero, con <i>cambium</i> ,	Ausente.	Usualmente presente.

TABLA I. PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE PLANTAS MONOCOTILEDÓNEAS Y DICOTILEDÓNEAS. Adaptada a partir de Moore *et al.*, 1998.

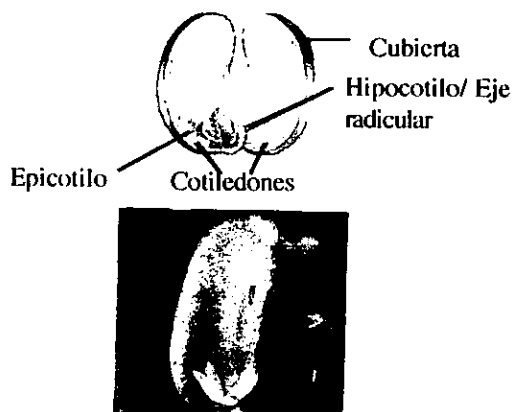
EMBRIOGÉNESIS Y GERMINACIÓN EN ANGIOSPERMAS.

La semilla se desarrolla a partir del óvulo fecundado (o cigoto) que es el producto de dos eventos de fusión nucleares previos. Este proceso es exclusivo de plantas angiospermas y se denomina "doble fertilización" (Mauseth, 1998). Posteriormente se

lleva a cabo un desarrollo incipiente del embrión que incluye procesos intensos de división celular y de morfogénesis seguidos por la fase de maduración de la semilla. Durante esta última, se establece la acumulación de productos de almacenamiento, se suprime la germinación, se adquiere tolerancia a la sequía, se pierde agua y se induce el período de dormancia (Wobus and Weber, 1999).

La mayoría de la evidencia obtenida que vincula la influencia de reguladores del crecimiento con el desarrollo de la semilla proviene de correlaciones entre el contenido del regulador y el crecimiento del embrión. Los resultados de distintos estudios llevados a cabo sugieren que la presencia de ácido giberélico (o GA por sus siglas en inglés) es esencial para el desarrollo apropiado de la semilla y del embrión.

Frijol



Maíz

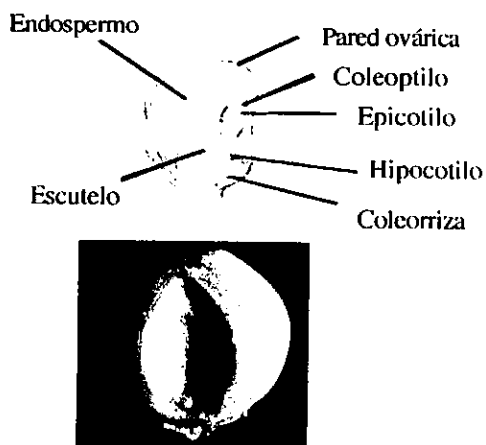


FIGURA 7. ESTRUCTURA DE SEMILLAS EN MAÍZ Y FRIJOL. En frijol (*Phaseolus vulgaris*), los dos cotiledones absorben al endospermo durante la embriogénesis. En maíz (*Zea mays*), el cotiledón (o escutelo) se ha modificado en una estructura que absorbe nutrientes a partir del endospermo. Adaptada a partir de Moore *et al.*, 1998.

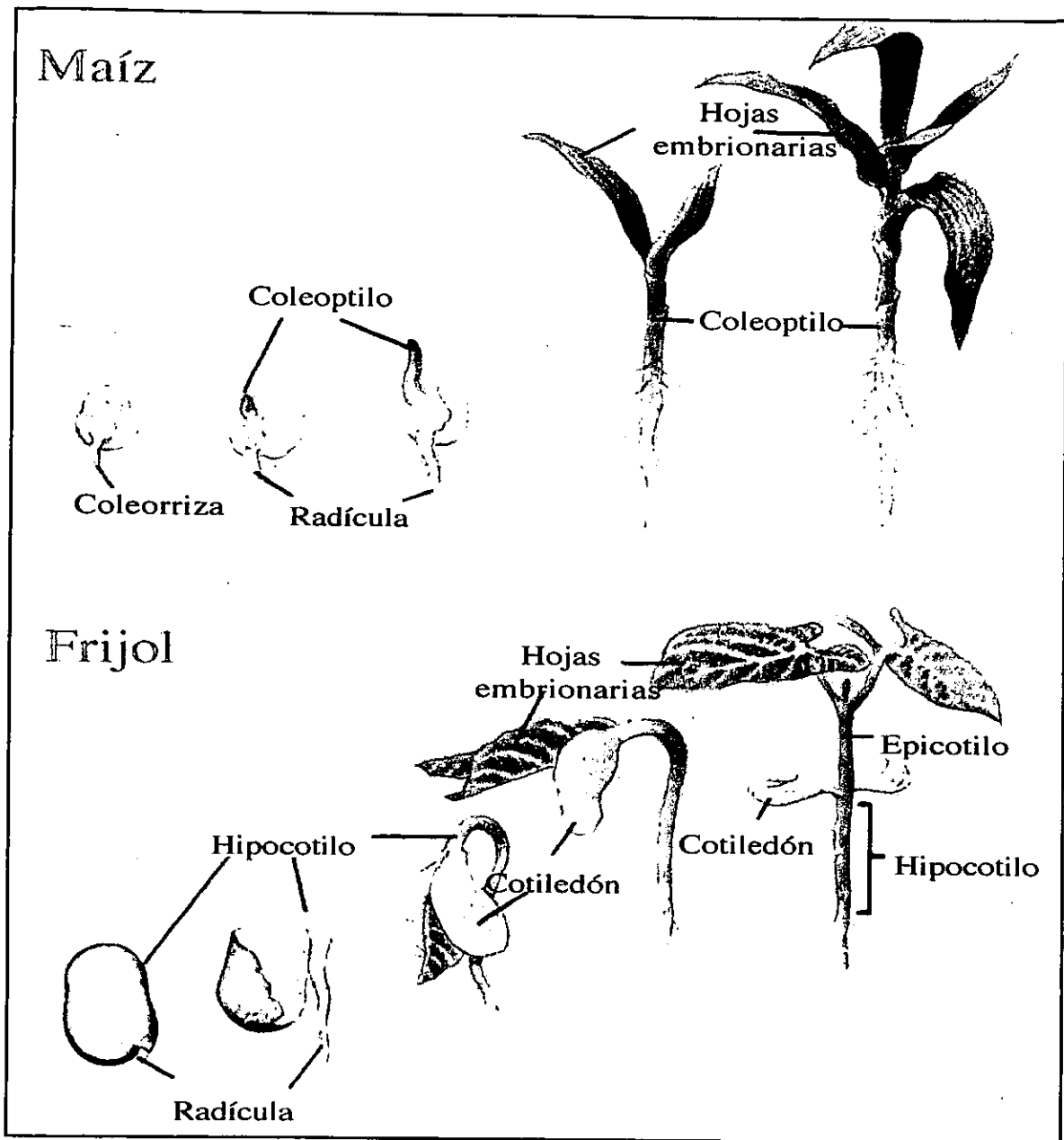


FIGURA 8. LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA. En maíz (*Zea mays*), el ápice del tallo emerge a través del coleoptilo mientras que el ápice de la raíz se desarrolla a partir de la coleoriza. En frijol (*Phaseolus vulgaris*), el desarrollo del hipocotilo fuerza al ápice del tallo y a los cotiledones a emerger sobre la superficie del suelo. Adaptada a partir de Moore *et al.*, 1998.

Asimismo, se propone que las citocininas estimulan la división celular y la elongación tanto en el embrión como en el endospermo y participan de manera importante en la regulación de la asimilación de nutrientes por este tejido. Por otra parte, el ácido abscísico (o ABA por sus siglas en inglés) a concentraciones elevadas suprime la germinación y el crecimiento y, por lo tanto, es uno de los factores principales que determinan el período de dormancia. También se ha planteado la participación de ABA en la regulación de la síntesis de proteínas, azúcares y grasas (en especial de tri-acil glicéridos) de reserva y en la adquisición de la tolerancia a la desecación (Bewley and Black, 1994).

El incremento de la pulpa del fruto se relaciona en muchos casos con la progresión de las semillas. Se propone que tanto auxinas como GA, producidos por las semillas en desarrollo, controlan el crecimiento de la pared del ovario y de esta forma, el desarrollo adecuado del fruto (Bewley and Black, 1994).

Para cumplir su papel como un intermediario en la reproducción vegetal, la semilla debe continuar con el desarrollo del embrión durante el proceso de germinación. Distintos estímulos internos y externos favorecen la ruptura del estado de dormancia. Los factores internos más comunes incluyen cambios en la concentración de fitohormonas o la degradación de otros compuestos químicos inhibitorios producidos por la semilla que generalmente se localizan en la cubierta de la misma, como ácidos fenólicos, terpénicos o cumarina, entre otros. Los estímulos externos generales son la disponibilidad de agua, la temperatura óptima, la ausencia de luz y la presencia de ciertos compuestos químicos, por ejemplo, nitratos (Bewley and Black, 1994; Moore *et al.*, 1998).

Distintos fisiólogos consideran que la germinación como tal concluye una vez que la radícula emerge a través de la cubierta externa de la semilla. Sin embargo, otros autores usualmente incluyen procesos que toman parte hasta el establecimiento de la plántula (Berrie, 1985). En el presente trabajo consideraremos tanto a la fase I de

germinación, que se refiere al período que finaliza con la emergencia de la radícula, como a la fase II, que incluye a eventos subsecuentes que se relacionan con el crecimiento de la plántula y que dependen de las reservas de nutrientes acumulados en la semilla. Estas dos fases se separan fisiológicamente debido a que en la fase I la semilla puede desecarse y pese a ello sobrevivir; en la fase II el proceso es irreversible (Berrie, 1985).

Mientras que durante la formación de la semilla o embriogénesis los tejidos que se localizan fuera del embrión y el embrión en sí mismo sintetizan y almacenan grandes cantidades de nutrientes, durante la germinación de la semilla se lleva a cabo el proceso metabólico inverso; esto es, la hidrólisis de las reservas de alto peso molecular almacenadas en el endospermo o en los cotiledones seguida por su transporte a órganos demandantes que se encuentran en crecimiento y en metabolismo dinámico (Esau, 1977; Bewley and Black, 1994). De esta forma, el proceso de germinación se caracteriza por la asimilación de agua que provoca la expansión celular, por variaciones en el metabolismo respiratorio, en la carga energética y en el metabolismo de fosfato y por la degradación y activación o síntesis *de novo* de carbohidratos, proteínas, grasas y ácidos nucleicos (Bewley and Black, 1994). El control de la movilización de los nutrientes de reserva se adjudica parcialmente al efecto del GA, citocininas y, en eventos posteriores, a auxinas (Bewley and Black, 1994). Los cambios morfológicos que acompañan a este período son el aumento en el volumen de la semilla y en la talla del eje embrionario, el alargamiento del cotiledón y el inicio del desarrollo de la plántula (FIGURA 7). La liberación y el transporte de las reservas de nutrientes disminuye conforme la plántula emerge y ésta llega a ser un organismo fotosintéticamente activo (Berrie, 1985).

EL PAPEL DEL CITOESQUELETO DURANTE EL EVENTO DE GERMINACIÓN Y EL DESARROLLO DE LA PLÁNTULA.

COMUNICACIÓN CELULAR.

Los cambios celulares y sub-celulares que, paralelos a los cambios morfológicos, se llevan a cabo durante el proceso de germinación de la semilla se asocian inicialmente con la conversión, movilización, transporte y redistribución de los nutrientes almacenados. Durante el proceso germinativo, el transporte de reservas se efectúa por medio de comunicaciones establecidas entre las células y por mecanismos de difusión (Berrie, 1985).

El citoplasma de extensos grupos de células se encuentra comunicado entre sí por los *plasmodesmata*, que forman un dominio simplástico continuo mediante el cual difunden pequeñas moléculas. Por otra parte, el transporte de macromoléculas se encuentra bajo estricta y precisa regulación de señales específicas. Tanto la actina como la miosina han sido inmunolocalizadas en el *plasmodesmata* de células vegetales (Radford and White, 1998) y se postula que contribuyen en el bloqueo de la difusión libre de macromoléculas controlando la apertura del poro comunicante entre las células (Kost *et al.*, 1999).

Una segunda estrategia de movilización de reservas probablemente se encuentre mediada por el sistema endomembranal. Clore *et al.* (1996) demostraron que en la región del endospermo de la semilla de maíz el factor de elongación eF-1 α y los microfilamentos se encuentran asociados entre sí. Dichos autores proponen que este arreglo permite el ensamblaje del cuerpo proteínico que deposita proteínas de almacenamiento durante la formación de la semilla. Las proteínas de almacenamiento proveen de nitrógeno y de aminoácidos al embrión en desarrollo (Moore *et al.*, 1998), por lo que deben moverse durante la germinación hacia este

último. Es posible que en este evento el citoesqueleto de actina también tenga participación activa.

Otro proceso que debe jugar un papel importante durante la germinación es el tráfico de membranas. En células vegetales y animales se ha demostrado que la organización espacial y de transporte entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi (AG) dependen del citoesqueleto (Boevink *et al.*, 1998). La exocitosis, esto es, la fusión de vesículas a la membrana plasmática que conduce a la secreción de sustancias fuera de la célula, parte justamente del aparato de Golgi a la región de fusión en la membrana vía filamentos de actina y motores de miosina. La función de los microfilamentos consiste en proveer el mecanismo para la liberación de la vesícula y se propone que incluso participa en la determinación del sitio de fusión (Battey *et al.*, 1999; Hawes *et al.*, 1999).

La exocitosis es tan sólo una de las vías del tráfico de vesículas del sistema endomembranal. Además del RE y del AG, este sistema se compone por una gran diversidad de vacuolas y por la membrana plasmática (MP). En células vegetales se ha demostrado que las vesículas pueden ser liberadas directamente del RE al AG, a vacuolas de almacenamiento y probablemente a la MP. Asimismo, las vesículas liberadas a partir del AG pueden ser dirigidas al RE, a vacuolas de almacenamiento o de degradación y a la MP. La localización, la interacción entre los distintos compartimentos y la dinámica de endomembranas celulares están determinadas por el citoesqueleto (Hawes *et al.*, 1999).

EL PROGRESO DE LA GERMINACIÓN.

El desarrollo del proceso germinativo incluye fases dinámicas de extensión, de división y de diferenciación celular. La expansión de la radícula dentro de la semilla y su emergencia a través de la cubierta se lleva a cabo por procesos de extensión

celular fundamentalmente durante la fase I de germinación. Eventos de división y de diferenciación celular son característicos de la fase II de germinación y se relacionan con el desarrollo del embrión y el establecimiento de la plántula (Bewley and Black, 1994).

Extensión celular.

En la literatura se han descrito dos tipos distintos de extensión celular llamados "difuso" y "de punta" (FIGURA 9). En ambos, el desarrollo se encuentra mediado por arreglos únicos del citoesqueleto que controlan la orientación y la deposición de membranas y de materiales de la pared celular (PC) en la superficie de la célula. El crecimiento "difuso" y el "de punta" dependen del sistema endomembranal, cuyas características principales han sido descritas previamente.

El crecimiento "difuso" o "polar" es la forma más común de extensión celular en plantas superiores y se refiere a la expansión que se dispersa sobre la superficie celular con una dirección preferente como consecuencia de la presión de turgor. La presión de turgor es inversamente proporcional al potencial osmótico establecido en el interior de las células. Se propone que entre otros factores, la orientación de los microtúbulos y la organización de los microfilamentos determinan la deposición de celulosa y de esta forma, la polaridad celular. Asimismo, se ha implicado la acción de giberelinas y de etileno en la regulación de la orientación de los microtúbulos corticales (Kropf *et al.*, 1998; Kost *et al.*, 1999).

La identidad de las células se encuentra influenciada por su posición durante la morfogénesis en tejidos vegetales. Más aún, la orientación y el grado de extensión deben sincronizarse con las células vecinas para evitar que las paredes celulares limiten el desarrollo (Braam, 1999).

Se ha sugerido la participación de moléculas de distinta naturaleza como mensajeros de la señal que llevan al crecimiento sincronizado. La teoría del crecimiento ácido establece que tras la exposición de auxina, las células susceptibles secretan protones a la PC, lo que resulta en la acidificación de la zona. Este cambio en el potencial de hidrogeniones (pH) activa procesos de pérdida de pared, disminuyendo la tensión de ésta y llevando a la expansión celular dirigida. Se propone que la auxina regula además otros eventos asociados con el crecimiento celular tales como la osmoregulación y la síntesis de pared (Rayle and Cleland, 1992).

Los proteoglicanos arabino-galactanos así como distintos fragmentos de la PC también se han implicado en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular. La PC resulta esencial para mantener la integridad y para controlar la expansión en

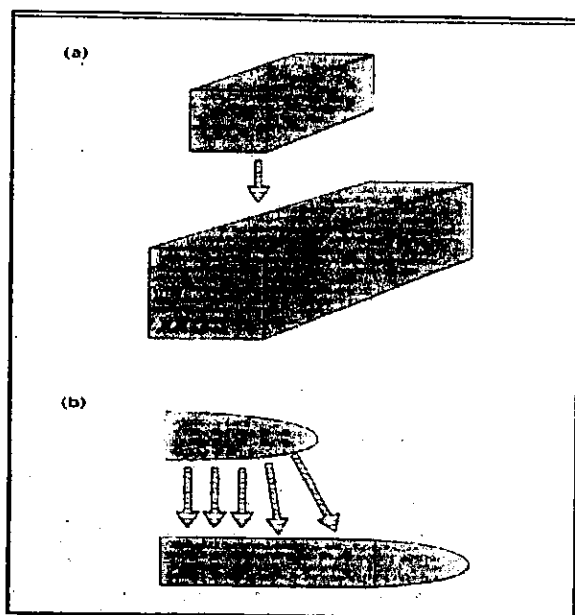


FIGURA 9. CRECIMIENTO POLAR Y "DE PUNTA". a) Durante el desarrollo polar, la dirección de la expansión (O) ocurre sobre la superficie total de la célula. Sin embargo, ésta tiende a elongarse más que a ensancharse. b) Durante el desarrollo "de punta", los materiales que forman parte de la pared celular y de la membrana plasmática se insertan de manera preferente en uno de los extremos de la célula. Adaptada a partir de Kropf *et al.*, 1998.

células vegetales. Se propone que los cambios en la tensión de esta estructura (provocados por fluctuaciones en el gradiente osmótico o por daño mecánico) se detectan por medio de las deformaciones que sufren las conexiones establecidas con la MP. Es posible que este evento se lleve a cabo a través de la identificación de ciertas moléculas liberadas a partir de la PC. Lo anterior genera una señal cuyo objetivo final es el restablecimiento de la homeostasis, lo que conduce a la restitución de la organización estructural entre la MP y la PC (Braam, 1999). Distintos investigadores han demostrado la reorganización del citoesqueleto tras la aplicación de fuerzas mecánicas a tejidos vegetales que provocan alteraciones en la dirección de la expansión celular, en el plano de división y en el patrón de desarrollo original (Hernández and Green, 1994; Lynch and Lintilhac, 1997; Fischer and Schopfer, 1998). Sin embargo, aún no se ha determinado el nivel específico de participación del citoesqueleto en este evento.

El crecimiento "de punta" es una forma extrema de expansión polar que se caracteriza por la distribución asimétrica de las estructuras subcelulares y de moléculas en la célula. El modelo propuesto para el desarrollo "de punta" sugiere que éste se inicia con la selección y el establecimiento de un sitio cortical en la célula al cual se fusionarán las vesículas secretadas por el AG. Este tipo de crecimiento es más común en levaduras, hongos y algas, pero también se presenta en tubos polínicos y pelos radiculares de plantas vasculares (Kropf *et al.*, 1998). La formación de pelos radiculares se inicia durante la fase II de germinación. Los pelos radiculares son células diferenciadas que emergen a partir del extremo apical de las células epidérmicas de la raíz, cuya función principal es incrementar la superficie total de absorción y de secreción de este órgano. Para mantener la expansión celular, las vesículas deben ser continuamente transportadas al sitio de fusión vía el citoesqueleto de actina. Los microtúbulos aparentemente están involucrados en el mantenimiento de la polaridad citoplásmica. Evidentemente, la regulación de la dinámica de los microfilamentos y de los microtúbulos necesariamente se encuentra acoplada a eventos de señalización internos y externos que modulan tanto el sitio y la

dirección del crecimiento como la velocidad del mismo (Yang, 1998).

Una de las señales involucradas en el crecimiento "de punta" es el Ca^{2+} . Este catión se acumula en el sitio cortical de expansión celular. El Ca^{2+} parece actuar como un regulador positivo clave de la exocitosis en células animales y vegetales (Battey *et al.*, 1999) y su acumulación localizada en el sitio cortical de desarrollo se ha demostrado en varios sistemas que incluyen a tubos polínicos, a pelos radiculares, a cigotos del alga *Fucus* e hifas de ciertos hongos. Se propone que el incremento localizado del Ca^{2+} se debe a la actividad de canales específicos para este catión (Yang, 1998). Este tipo de canales aparentemente se activa por proteínas G y se regula por elementos del citoesqueleto (Thuleau *et al.*, 1998). Los niveles intracelulares de Ca^{2+} también afectan la organización de los filamentos de actina (Cárdenas *et al.*, 1999). Recientemente se demostró que la asociación entre la miosina y la calmodulina se inhibe bajo altas concentraciones de Ca^{2+} . Se sugiere que los incrementos en la concentración de Ca^{2+} provocan la estimulación de una cinasa dependiente de calmodulina o de Ca^{2+} que modula la tensión y la organización del citoesqueleto de actina (Franklin-Tong, 1999).

La profilina y el factor despolimerizante de actina son proteínas de unión a actina que han sido implicadas en la regulación de la dinámica de actina durante el desarrollo de distintos tipos celulares y en eventos de señalización (Staiger *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la profilina co-localiza con la actina en la zona de crecimiento de pelos radiculares y se propone que dicho arreglo pudiera simultáneamente fomentar la polimerización de filamentos de actina y su interacción con la membrana plasmática, facilitando de esta manera la exocitosis apical de las vesículas de secreción (Braun *et al.*, 1999). Incluso se ha insinuado que la profilina pudiera controlar el crecimiento del tubo polínico mediante la modulación de la actividad de la cinasa dependiente de calmodulina o de Ca^{2+} (Franklin-Tong, 1999).

Otro elemento de control recientemente identificado en la región de expansión del tubo polínico es la proteína Rop, una GTPasa específica de plantas que pertenece a la familia Rho. La familia de las proteínas Rho son reguladores claves de la organización del citoesqueleto de actina (Li *et al.*, 1999). Se postula que Rop modula el establecimiento de la polaridad celular, la acumulación localizada del Ca^{2+} y el crecimiento “de punta” (Yang, 1998; Franklin-Tong, 1999; Li *et al.*, 1999).

División y diferenciación celular.

El ciclo celular completo se lleva a cabo únicamente en las células que son capaces de dividirse. La primera célula en la historia biológica de una planta angiosperma es el cigoto, que da origen al embrión. El embrión presenta regiones especializadas llamadas meristemas que sufren de división celular continua. Conforme la semilla germina, las células meristemáticas del tallo y la raíz se dividen constantemente. En contraste, las células de las hojas y de ciertos tejidos del tallo y de la raíz detienen el proceso de división y se tornan en células especializadas (Moore *et al.*, 1998).

Los dos estados principales del ciclo celular son el crecimiento y la división celular. Las fases que integran el crecimiento celular son colectivamente llamadas interfase, mientras que las fases de la división celular son llamadas mitosis y citocinesis (Moore *et al.*, 1998).

La mitosis se refiere a la duplicación y división del material genético y es el tipo más común de división nuclear. Este proceso se compone por cuatro fases distintas llamadas profase, metafase, anafase y teleofase. Durante ellas, los genes nucleares, organizados en cromosomas, son inicialmente copiados, un grupo de ellos es separado del otro y posteriormente son empacados independientemente en su propio núcleo. Cada núcleo “hijo” es básicamente idéntico al original (Mauseth, 1998).

En estados previos a la profase, los microtúbulos corticales se reorganizan en un anillo de paquetes paralelos llamado "banda de pre-profase" alrededor del núcleo original (o PPB por sus siglas en inglés). Los microfilamentos también se localizan en la PPB y su función es necesaria para la contracción de la estructura anillada (Kost *et al.*, 1999). Al inicio de la mitosis, durante la condensación de los cromosomas, los microtúbulos desaparecen, pero los microfilamentos se encargan de proveer una red de soporte entre el núcleo en división y la membrana plasmática. Al término de la mitosis, la red de microfilamentos conduce la deposición de precursores de la nueva pared celular. Durante la metafase se evidencia el "huso mitótico" que está construido por microtúbulos. Su función consiste en separar y re-localizar a los cromosomas hermanos en polos celulares opuestos. Este evento se efectúa en la anafase. Al término de esta fase, los cromosomas han sido separados en dos núcleos genéticamente idénticos. Durante la telofase el huso mitótico desaparece, se forma la cubierta nuclear alrededor de cada grupo de cromosomas y éstos últimos se elongan y difunden (Moore *et al.*, 1998).

En células animales, la citocinesis involucra la contracción de la membrana plasmática entre el núcleo de la célula descendiente. En la mayoría de las células de plantas angiospermas, la citocinesis se lleva a cabo a través de la construcción de una nueva PC dentro de la célula en división. Este proceso lleva a la separación de dos células hijas una vez que se ha efectuado la división nuclear. La nueva PC en formación es llamada "placa celular" y se construye a partir del material liberado por las vesículas de secreción. La posición de esta estructura es determinante durante la morfogénesis vegetal y se encuentra controlada por microtúbulos y microfilamentos. Tras la división celular, las células recién formadas se expanden perpendicularmente con respecto a la placa celular, lo que resulta en la extensión dirigida y controlada de los órganos vegetales en desarrollo (Smith, 1999).

La PPB determina el sitio al cual se fusionará la placa celular en maduración con la PC original. La observación de la extensión de los filamentos de actina desde la placa

celular en formación hasta el sitio de fusión, aunada a la demostración del ensamblaje de actina en los extremos de la placa celular en gestación, sugiere que el citoesqueleto de actina pudiera guiar a la placa celular (Kost *et al.*, 1999).

Las células vegetales normalmente forman dos células hijas idénticas tras la división celular. Sin embargo, algunos tipos celulares tales como cigotos, micro-esporas, ciertas células meristemáticas y células guarda, sufren de división celular asimétrica y, en consecuencia, se producen dos células hijas que difieren en tamaño, en el contenido citoplásmico y en función (Kost *et al.*, 1999). La posición de la placa celular en divisiones celulares asimétricas parece establecerse por mecanismos similares a los antes descritos. Sin embargo, la formación de la PPB es precedida por la relocalización del núcleo en un polo celular. Este último evento es mediado por estructuras filamentosas de actina que conectan al núcleo con la corteza celular.

El análisis de mutantes es una herramienta útil que ha permitido la complementación de estudios sobre la función del citoesqueleto durante el desarrollo en diversos sistemas celulares. Por ejemplo, las mutantes *Fass/Ton* aisladas en *Arabidopsis thaliana* son incapaces de establecer correctamente tanto el arreglo de microtúbulos corticales como la PPB durante la mitosis, aunque otras estructuras, como el huso mitótico y el fragmoplasto no se afectan. En consecuencia, este tipo de células no controlan la posición de la placa celular ni la dirección de la expansión celular (Traas *et al.*, 1995). Asimismo, la interrupción del gen *Tangled1* en maíz provoca la desregulación de la orientación de los planos de división en hojas en desarrollo. Este efecto aparentemente lo causa la posición irregular de la PPB y, por lo tanto, de la placa celular durante la citocinesis. Aunque la organización celular en las hojas de mutantes *Tan1* es anómalo, la apariencia de las hojas es morfológicamente normal (Cleary and Smith, 1998).

Las mutantes descritas en el párrafo anterior, señalan que la morfogénesis en plantas vasculares no está únicamente gobernada por la autonomía celular. En su lugar, las

células que integran un tejido en desarrollo aparentemente se encuentran en comunicación constante, evaluando su posición con respecto al órgano en gestación al cual pertenecen y ajustando su comportamiento de acuerdo al plan morfogénico global (Kost *et al.*, 1999).

En párrafos anteriores se ha sugerido el posible papel de actina en eventos tales como el transporte de nutrientes, la expansión, la división y la diferenciación celular. Durante la germinación se establecen procesos similares que permiten el desarrollo del embrión y su establecimiento como un organismo independiente. El estudio del comportamiento de actina durante la germinación en angiospermas contribuirá a la descripción integrada de este proceso.

OBJETIVOS

El presente trabajo está enmarcado en el contexto del análisis del citoesqueleto en plantas vasculares. Con anterioridad se ha mencionado que la actina en angiospermas se encuentra codificada por una familia génica cuya expresión se encuentra regulada espacial y temporalmente; por lo que se propone que las distintas isoformas de actina pudieran llevar a cabo funciones celulares específicas. La mayoría de los datos obtenidos sobre la expresión de actina en plantas vasculares se limitan a la identificación de la familia génica y a la expresión de cada uno de sus miembros a nivel de mRNA en distintos tejidos vegetales o en diversos estados del desarrollo. La principal restricción para llevar a cabo análisis bioquímicos y de regulación por ABPs *in vitro* radica, fundamentalmente, en las dificultades existentes para aislar a la actina a partir de tejidos vegetales.

Por otro lado, existen pocos estudios en plantas vasculares que relacionan el desarrollo de tejidos con la expresión de proteínas específicas. El crecimiento de una plántula a partir del embrión contenido en la semilla es un proceso dinámico en el cual el citoesqueleto de actina se encuentra forzosamente involucrado. El análisis de la expresión de esta proteína durante la germinación, permitirá generar ideas sobre la relación existente entre el número de genes que codifican para la actina en angiospermas, su posible función en diversos eventos celulares y su relación morfológica.

Por lo anterior, en este trabajo experimental nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Desarrollar una estrategia de purificación de actina vegetal que permita el aislamiento y la recuperación de isoformas de actina en estado funcional.

2. Analizar la expresión de actina en angiospermas durante el proceso de germinación. Para ello, seleccionamos como modelo de estudio a *Zea mays*, una planta monocotiledónea, y a *Phaseolus vulgaris*, una planta dicotiledónea, durante el proceso de germinación de la semilla.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuirán a la descripción integrada de los diversos procesos celulares en los cuales la molécula de actina se encuentra involucrada.

Purification of multiple functional leaf-actin isoforms from *Phaseolus vulgaris* L.

Claudia DÍAZ-CAMINO and Marco A. VILLANUEVA¹

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, U.N.A.M., Apartado Postal 510–3, Cuernavaca, Morelos 62250, México

Plant actins show diversity in their gene sequences, protein isovariants and tissue distribution in eukaryotes. Besides general difficulties with the isolation of proteins from plant material (i.e. the presence of a cell wall and high proteolytic activity), the actin concentration in any vegetative plant tissue is much lower than in cytoplasmic animal tissues. In this study, we adapted a deoxyribonuclease I-Sepharose affinity purification scheme and we were able to enrich and isolate multiple functional plant actin isovariants from common bean leaves (*Phaseolus vulgaris*). Urea (4 M) elution proved that the DNase I column was able to bind at least eight actin isoforms with pI values ranging from 5.5 to 5.9, as observed by two-dimensional Western blots. Three of the

most acidic actin isoforms, with pI values of ≈ 5.6 – 5.7 , were eluted partially with 0.75 M urea. The purified actin was also able to bind leaf and rabbit muscle profilin, phalloidin and DNase I. Moreover, the protein could polymerize into filaments that contained the main isoforms eluted from the column. The average actin recovery using this procedure was ≈ 4 – $8 \mu\text{g}$ from 20 g of fresh tissue, of which at least 80% was able to form filaments. This is the first report of the purification of multiple plant-actin isoforms that are functional by the criteria of both binding to other ligands and polymerization.

Key words: DNase I-Sepharose, isovariants, phalloidin.

INTRODUCTION

Actin is a key cellular protein that is capable of self-assembly into dynamic filamentous structures. These microfilaments are fundamental for eukaryotic function and, due to their importance, are tightly regulated within these cells. The presence of cytoplasmic actin has been established in most major plant cell types [1] and it is now generally accepted that filamentous actin (F-actin) participates in cytoplasmic streaming, organelle and nuclear positioning, cellular morphogenesis and cell division. Reorganization of the actin cytoskeleton in eukaryotic cells is regulated at various levels and by a number of physiological parameters including salts, pH and a wide variety of actin-binding proteins (ABPs) that modulate the behaviour of both F-actin and globular actin (G-actin). In animal cells, different ABPs have been identified that have the ability to cross-link into tight bundles or loose networks, cap ends, and sever and even depolymerize filaments [2]. However, only a few ABPs have been identified in higher plants, and little is known about the regulation of actin dynamics in plant cells.

Like animal actins, plant actins display individual isovariants that may have particular functions and/or expression in certain cell types [3,4]. Plant actins are also encoded by multigene families and, although single plant species have more divergent actin genes than do individual animal species, the sites for actin interaction with itself and other regulatory proteins appear to be highly conserved among all eukaryotes [4,5].

Most physicochemical studies of the few plant ABPs so far described have used heterologous components and provide compelling evidence that plant ABPs are indeed functional [6–8]. However, minor variations in the sequences of the interactive sites of heterologous ligands may give rise to misinterpretation of the results. Thus further understanding of plant actin function *in vivo* and *in vitro* and its functional similarities with other eukaryotic microfilament systems will require a detailed analysis

of ABP-actin interactions with homologous components [9]. Hence, the importance of the availability of functional plant actin. Native actin can be purified from eukaryotic cells by various combinations of methods that include cycles of assembly/disassembly, anion exchange, gel filtration and DNase I or profilin affinity chromatography [5,10]. However, the concentration of actin in any given vegetative plant tissue is significantly lower than in animal cytoplasmic tissues and traditional methods of polymerization/depolymerization cycles have been unsuccessful. Therefore, studies reporting actin isolation from plants are limited [11] and most have used alternative methods based precisely on the assumption that conserved actin-binding sites exist on the molecule for interaction with other proteins. Some of these studies have included DNase I and profilin affinity chromatography [9,12,13], and most have been only partially successful. This is mostly due to the fact that very few have shown activity of the isolated actin and none have reported the number of isoforms obtained in the preparation. In this work we have used both actin-binding assays and phalloidin-induced polymerization to demonstrate that at least eight actin isoforms can be isolated from the *Phaseolus vulgaris* leaf. This purified actin was capable of interacting with *P. vulgaris* profilin, bovine DNase I and phalloidin, and also of polymerizing into microfilaments. These microfilaments contained all the actin isoforms from the common bean originally eluted from the DNase I column.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DNase I from bovine pancreas was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, U.S.A.) and rabbit skeletal-muscle actin was purchased from Cytoskeleton (Denver, CO, U.S.A.). EDTA-free protease-inhibitor-cocktail tablets (Complete[®]) and EGTA were

Abbreviations used: ABP, actin-binding protein; DTT, dithiothreitol; F-actin, filamentous actin; G-actin, globular actin; PLP, poly-L-proline; 2D, two-dimensional.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail marco@ibt.unam.mx).

Confocal microscopy of purified and plant actin polymerized *in vitro*

Purified leaf actin at 4–8 $\mu\text{g/ml}$ was polymerized in buffer F for 24 h at 4 °C and then incubated overnight with 0.13 μM Alexa-594 phalloidin (final concentration). Polymerized actin was collected by centrifugation at 150 000 g at 4 °C for 1 h. The supernatant and the pellet were examined using a Zeiss Axiovert 100 microscope with a Bio-Rad laser-scanning confocal attachment. The images were captured on a computer and printed on Kodacolor Gold 100 ASA film from either single optical sections or compositions of extended Z-series optical sections, added (and interpolated) together using software provided by the microscope manufacturer.

RESULTS

Purification of leaf actin from a DNase I-affinity column

Using a DNase I-affinity column, we adapted a strategy for actin enrichment and purification from plant tissues in which this protein is present at low concentrations. We wanted to test our procedure with leaf tissue from *P. vulgaris* because we have observed that it contains high proteolytic activity (results not shown), and this has been a difficult problem to overcome when actin isolation from plant tissue is attempted. This material is also readily available in our greenhouse. A total leaf homogenate was passed through the DNase I-Sepharose column and the proteins adsorbed on to the column were eluted as described in

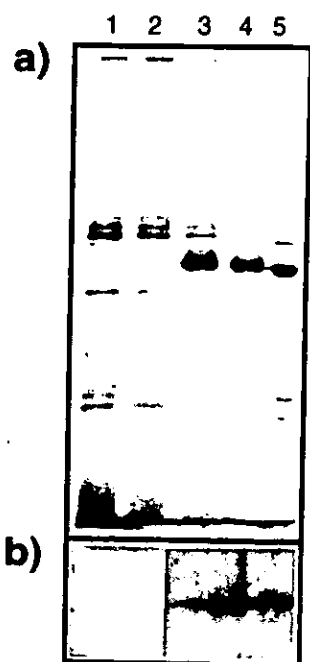


Figure 1 Purification of leaf actin from a DNase I-affinity column

(a) Silver-stained gel of a representative actin purification experiment. Lane 1, fraction eluted with the high-ionic-strength buffer B; lane 2, fraction eluted with EGTA-containing buffer C; lane 3, fraction eluted with 0.75 M urea in buffer G; and lane 4, as lane 3 but with 4 M urea. Rabbit skeletal-muscle actin (lane 5) was included as a molecular-mass marker. (b) Immunoblot of an equivalent gel probed with anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies. The blot shows the presence of actin in lanes 3 and 4, which correspond to the fractions eluted with 0.75 and 4 M urea, respectively. The positive control of the immunoblotted 42-kDa polypeptide corresponding to rabbit skeletal-muscle actin (lane 5) is also shown.

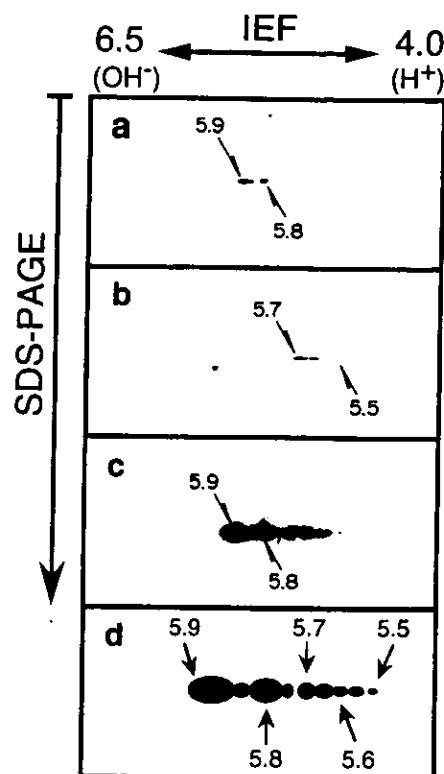


Figure 2 Identification of several leaf-actin isoforms

The presence of leaf actin was analysed on a 2D-PAGE gel followed by Western immunoblotting using anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies. (a) Total leaf homogenate, (b) 0.75 M urea wash, (c) 4 M urea-eluted fractions and (d) an interpretative diagram that includes the spot shape, size and pI values of the corresponding isoforms. The arrows in (a) and (c) point towards the main isoforms (pI \approx 5.8 and 5.9). The arrows in (b) indicate the positions of pI \approx 5.6 and 5.7. The arrows in (d) indicate points of real pH values measured from an isoelectric focusing (IEF) gel run in parallel in the same experiment.

the Materials and methods section. The protein composition of the various fractions obtained from the column was analysed by SDS/PAGE (Figure 1a). The same fractions were analysed in parallel by Western immunoblotting with anti-(calf thymus actin) antibodies (Figure 1b). Many polypeptides were released from the column when a wash with a high ionic-strength solution (buffer B) was applied (Figure 1a, lane 1). The following wash with a buffer containing EGTA (buffer C) released most of the remaining proteins from the column, except actin (Figures 1a and 1b, lanes 2). The protein composition from this fraction was similar to the one obtained previously with buffer B. The major contaminating proteins in these fractions had molecular masses of 55, 50 and 40 kDa. The 55- and 50-kDa polypeptides have been shown to be, respectively, the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase, and a putative proteolytic fragment derived from it, some of which, due to its high abundance, always remains in the column (C. Díaz-Camino, unpublished work). The other 40-kDa protein might be an ABP but we have failed to demonstrate this fact in many different assays, and it thus remains to be determined. A small amount of actin along with other protein contaminants were released from the column by the subsequent wash with 0.75 M urea (Figures 1a and 1b, lanes 3). When the column was eluted further with a solution containing 4 M urea, this wash resulted in the elution of most of the actin (Figures 1a and 1b, lanes 4), as seen in other procedures

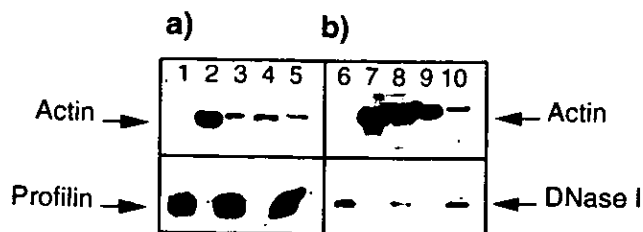


Figure 3 Leaf profilin and bovine DNase I binding to purified leaf actin

The presence of actin, profilin or DNase I bound to the beads was assessed by Western immunoblotting with anti-(calf thymus actin) (Actin), anti-profilin (Profilin) or anti-DNase I (DNase I) antibodies. (a) Actin–profilin interactions. After passing the leaf homogenate to PLP–Sepharose beads in buffer G followed by immunostaining with anti-profilin antibodies, leaf profilin (lane 1) but not actin (lane 1), was detected bound to the beads. The profilin-bound beads were able to bind actin from leaf (lane 3) and rabbit actin (lane 5), as observed by Western immunoblotting with anti-(calf thymus actin) antibodies. (b) Actin–DNase I interactions. The presence of DNase I bound to the Sepharose beads (lanes 6, 8 and 10) was observed by Western immunoblotting with anti-DNase I antibodies. The DNase I beads were able to bind DNase I-affinity isolated actin from leaf (lane 10) and rabbit muscle actin (lane 8) also detected by Western immunoblotting with anti-(calf thymus actin) antibodies. Positive controls of rabbit muscle (lanes 2 and 7) and leaf actin (lanes 4 and 9) were run in parallel and detected with anti-(calf thymus actin) antibodies as well.

involving DNase I-affinity chromatography [10,12,13,16]. Purified leaf actin co-migrated with rabbit skeletal-muscle actin (Figures 1a and 1b, lanes 5) and had a molecular mass of 42 kDa based on molecular-mass markers. The yield was 4–8 $\mu\text{g}/20\text{ g}$ of fresh tissue, obtained from approximate measurements on scanned gels. Since we know that actin occurs as several isoforms in common bean embryos [15] and in the closely related species soya bean [21], we wanted to check the isoform composition of the purified leaf-actin fraction.

Leaf-actin isoforms

To analyse in more detail the characteristics of actin in the various fractions eluted from the column, we carried out a 2D-PAGE analysis of the total leaf homogenate, the 0.75 and 4 M urea-eluted fractions, followed by Western immunoblotting using polyclonal antibodies against calf thymus actin [13,15]. We observed the presence of two main isoforms in the leaf homogenate with a similar 'spot' shape corresponding to those found in the 4 M urea fraction (Figures 2a and 2c, arrows). These isoforms corresponded to pI values of 5.8 and 5.9. However, we could not obtain a well-resolved isoform pattern, even with the highest amount of protein that we could load in the gels from these crude extracts. Nevertheless, in the fraction eluted with 4 M urea we could detect at least eight isoforms present in leaf tissue, with pI values ranging from 5.5 to 5.9 (Figures 2c and 2d). Interestingly, the wash with 0.75 M urea resulted in a selective and partial elution of three of the most acidic isoforms of leaf actin (pI \approx 5.5–5.7; Figure 2b). Similar results were obtained with the Amersham N350 monoclonal antibody (results not shown). These data showed for the first time that DNase I-affinity column chromatography was an appropriate procedure to purify all the actin isoforms present in leaves of *P. vulgaris* and furthermore that it helped isolate some of them selectively.

Binding of purified leaf actin to leaf profilin and bovine DNase I

The purified leaf actin was evaluated for its ability to interact with other proteins *in vitro*. Actin-binding proteins have been

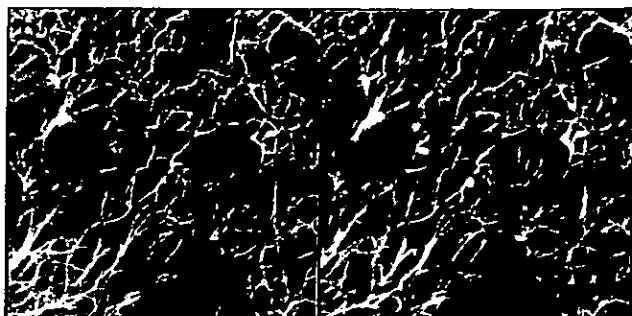


Figure 4 Purified leaf actin retains its ability to polymerize into filaments

A 150000-*g* pellet stained with Alexa-594 phalloidin was placed on microscope slides and viewed by confocal laser microscopy. (a) An optical section from a sample containing sedimented microfilaments. (b) An image from a similar sample but composed of seven optical sections in an extended Z-series that have been added and interpolated. Scale bar, 100 μm .

shown to behave differently with heterologous sources of actin [4,22]. Since we had a homologous source of the protein we decided to test the interaction between profilin and G-actin from leaves of *P. vulgaris*. Incubation of rabbit and leaf actin on PLP–Sepharose beads that had bound leaf profilin previously showed that leaf actin (Figure 3a, lane 5) was as capable as rabbit skeletal muscle actin (Figure 3a, lane 3) of binding to leaf profilin. The presence of leaf profilin bound to the PLP–Sepharose column was confirmed by immunoblotting (Figure 3a, lanes 1, 3 and 5). Similar results were obtained when leaf actin or rabbit actin were incubated with a DNase I-affinity column (Figure 3b, lanes 8 and 10, respectively). The presence of DNase I covalently bound to the column was assessed by Western immunoblotting with anti-DNase I antibodies produced in our laboratory (Figure 3b, lanes 6, 8 and 10). These results showed that at least some of the purified leaf actin had the ability to renature in areas of the molecule responsible for the interaction with these ABPs in assays *in vitro*.

Microfilament assembly from DNase I affinity-purified leaf actin

DNase I affinity-purified leaf actin was placed in a polymerization buffer (buffer F) and, after a 24-h incubation period at 4 $^{\circ}\text{C}$, and further incubation with Alexa-594 phalloidin for 12 h at 4 $^{\circ}\text{C}$, its ability to polymerize was tested. After this period, putative polymers formed were sedimented at 150000 *g* at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 1.5 h and the pellet was resuspended in buffer F. Aliquots placed on microscope slides and analysed by confocal microscopy showed a highly enriched fluorescent microfilament network (Figure 4), whereas the supernatant did not show any fluorescent signal (results not shown). Figure 4(a) shows a representative optical section and Figure 4(b) shows the composition from an extended Z-series of seven optical sections that were integrated using software provided by the microscope manufacturer. The polymerized material, as observed from SDS/PAGE analysis of the pellet, was approx. 80% of the total fraction prior to polymerization.

The polymerized leaf actin analysed by 2D PAGE showed a 'spot' shape that appeared to include the main basic isoforms and a 'tail' with some of the acidic isoforms (Figure 5a). The measured pI values of this focused zone ranged from 5.5 to 5.9 (Figure 5b), which suggests that all of the originally isolated isoforms were present in the microfilaments. These results showed that most, if not all, of the isolated isoforms, and the two main

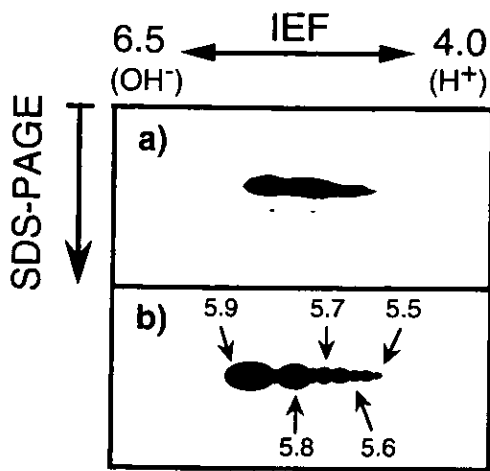


Figure 5 Isoform composition of actin microfilaments

The leaf-actin isoforms in the filaments from a 150000-g pellet were analysed by 2D PAGE and detected by Western immunoblotting using anti-(call thymus actin) polyclonal antibodies (a). An interpretative diagram (b), which includes the spot shape, size and pI values of the corresponding isoforms, is also shown. IEF, isoelectric focusing.

purified leaf-actin isoforms from bean, were functional and had retained their capacity to interact with phalloidin and polymerize into microfilaments.

DISCUSSION

Microfilaments are recognized as cytoskeletal and contractile elements found in virtually all types of cells. Indeed, actin, the major protein component of these filamentous structures, has been isolated from a variety of animal and non-animal cells [5]. The most widely used approaches for purification are those based on the method of Feuer developed in the late 1940s [5]. Actin can also be purified by directly exploiting its affinity for DNase I [10,23] or by indirectly exploiting its affinity for profilin [5,9]. DNase I forms a high-affinity 1:1 complex with monomeric actin [23] and, when it is covalently linked to a chromatographic support, is extremely practical for the isolation of actin from a variety of eukaryotic tissues [10,12,13,16]. The formation of the strong DNase I-actin complex allows a rapid, single-step isolation of actin from crude extracts that avoids a prolonged exposure to the proteases commonly present in plant tissues.

Although Garrels and Gibson [10] reported the isolation of all three isoforms of animal actin using a DNase I column, the reports on the isolation of plant actin using this approach have not documented the number of isoforms obtainable in this manner. In the only report where O'Farrell's [19] isoelectric focusing technique was used to analyse DNase I-purified plant actin from soya bean suspension cultures, only one isoform was observed [13]. Since actin occurs as several isoforms in soya bean plants and common bean seedlings [15,21], there are several possibilities that might explain this result: (i) the elution with 2 M urea used in that report was insufficient to elute all of the isoforms originally bound to the column; (ii) minor isoforms could not be detected with the particular method used; (iii) expression of only one isoform of actin occurs under conditions of a suspension culture. Although we cannot rule out this last possibility, some of our results support a combination of the first two hypotheses. First, 0.75 M urea could only elute a portion of the more acidic leaf-actin isoforms from the whole population

originally bound to the DNase I column (Figure 2b). Second, we detected only four isoforms of the isolated leaf actin from the 4 M urea elution when alkaline-phosphatase-conjugated secondary antibodies were used (results not shown); however, when enhanced chemiluminescence was used, we were able to observe at least eight distinct isoforms present on the same blotted membrane (Figure 2a). Ren et al. [9] developed a strategy for purification of functional maize pollen actin that involved the formation of a high-affinity profilin-actin complex bound to a PLP-Sepharose column. They detected a single band on a one-dimensional isoelectric focusing gel, which represented a major actin isoform with a pI of 5.4, and several minor bands that they could not distinguish between being isoforms or degradation products. In this study, using a DNase I-affinity column, we were able to enrich and isolate, for the first time, all functional plant-actin isoforms originally present in *P. vulgaris* leaves confirmed by 2D PAGE and Western immunoblotting (Figures 2a and 2c), and we observed no degradation products in our 2D blots. The ability of DNase I to bind many actin isoforms as observed in this affinity procedure has several important implications. First, it permits a significant increase in the detection of the isoform composition. Second, provided that common bean leaves contain high proteolytic activity when the compartmentalization is lost, even in the presence of protease inhibitors, this method also proves useful to minimize proteolysis by minimizing the time of exposure of the actin to the proteases in the total homogenate. Finally, the DNase I-binding site on actin appears to be highly conserved [10]. This is further supported by the fact that DNase I is able to bind to a wide range of actin isoforms ([5,10] and this study), and so this method could be useful for increasing the detection level of the isoform composition in total homogenates from other species.

Although plant-actin isoforms have similar pI values, they have a much wider pI range than animal-actin isoforms in a single species [4,10,21]. In homogenates from soya bean, several major actin isoforms and a few minor isoforms with pI values ranging from 5.1 to 5.8 have been identified [21]. Similar results were obtained when crude extracts from *P. vulgaris* hypocotyls [15], *Petunia* leaf, *Arabidopsis* leaf or maize leaf and root were analysed [21]. In this study, the bean-actin isoforms detected from the purified leaf-actin fraction fell within the reported range (pI 5.5–5.9).

It has been proposed previously that the diverse actin gene types present today in vascular angiosperms arose concomitantly with their numerous cell types, and that they have been conserved throughout evolution because they have unique patterns of gene regulation or encode proteins with unique functions [4,24]. There are at least 5–6 actin genes present in the *P. vulgaris* genome (E. Dantán and F. Sánchez, personal communication). This gene number is consistent with the four actin isoforms previously detected in common bean hypocotyls [15]; however, since we detected at least eight actin isoforms from leaf, it is possible that some of the isoforms from this tissue could have arisen via post-translational modifications. Such modifications on actin have been reported in other systems; for example, actin in *Dictyostelium discoideum* is tyrosine-phosphorylated by stress conditions [25]. In dormant spores, half of the actin is tyrosine-phosphorylated and this seems to be required for maintaining dormancy [26]. In addition to actin, profilin, which has been shown to have the dual function of promoting actin depolymerization [27] and the exchange of ADP-actin to ATP-actin to enhance polymerization [4], can also undergo post-translational modifications on tyrosine residues [28]. Thus post-translational modifications may add versatility to cytoskeletal components and their interactions.

With the method developed here we obtained a relatively low yield, but we also used a small-scale purification scheme (10 ml bed vol. column/run) that could be scaled up. Purified leaf actin was able to interact with leaf profilin, bovine DNase I and phalloidin (Figures 3 and 4). These data proved the functionality and capacity of DNase I affinity-purified leaf actin, to carry out protein-protein interactions and polymerize into filaments (Figure 4). The polymerized microfilaments were essentially identical to those obtained from rabbit muscle actin and stained with fluorescent phalloidin in previous reports [29].

In higher plants, profilins, actin-depolymerization factors and annexins p34 and p35 have been shown to function *in vitro* in a manner similar to their animal and fungal counterparts [6–8]. These reports have contributed significantly to our present understanding of actin interactions with other proteins in plants. Nevertheless, since most of these studies have used the rabbit skeletal muscle α -actin isoform and bacterially expressed plant ABPs [6,8,30], the availability of homologous actin would be an added advantage to the further study of these interactions.

This study was supported by grant IN-201696 from DGAPA-UNAM (Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México). C.D.-C. was supported by a scholarship from DGAPA-UNAM. We thank Dr. Federico Sánchez for providing some of the reagents used in this study. The Microscopy Facility of the Instituto de Biotecnología and assistance of Xóchitl Alvarado, and the photographic work of Sergio Trujillo are also acknowledged.

REFERENCES

- Parthasarathy, M. V., Perdue, T. D., Witzmun, A. and Alvernaz, J. (1985) *Am. J. Bot.* **72**, 1318–1323
- Pollard, T. D. and Cooper, J. A. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 987–1035
- Meagher, R. B. and McLean, B. G. (1990) *Cell Motil. Cytoskeleton* **16**, 164–166
- Meagher, R. B., McKinney, E. C. and Kandasamy, M. K. (1999) *Plant Cell* **11**, 995–1005
- Sheterline, P., Clayton, J. and Sparrow, J. C. (1995) *Protein Profile* **2**, 1–103
- Ballweber, E., Giehl, K., Hannappel, E., Huft, T., Jockusch, B. M. and Mannherz, H. G. (1998) *FEBS Lett.* **425**, 251–255
- Calvert, C. M., Gant, S. J. and Bowles, D. J. (1996) *Plant Cell* **8**, 333–342
- Jiang, C.-J., Weeds, A. G., Khan, S. and Hussey, P. J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9973–9978
- Ren, H., Gibbon, B. C., Ashworth, S. L., Sherman, D. M., Yuan, M. and Staiger, C. J. (1997) *Plant Cell* **9**, 1445–1457
- Garrels, J. I. and Gibson, W. (1976) *Cell* **9**, 793–805
- Meagher, R. B. and Williamson, R. E. (1994) in *Arabidopsis* (Meyerowitz, E. and Somerville, C., eds.), pp. 1049–1084, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor
- Andersland, J. M. and Parthasarathy, M. V. (1993) *J. Cell Sci.* **104**, 1273–1279
- Villanueva, M. A., Ho, S.-C. and Wang, J. L. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 35–41
- Schafer, D. A., Jennings, P. B. and Cooper, J. A. (1998) *Cell Motil. Cytoskeleton* **39**, 166–171
- Villanueva, M. A., Campos, F., Díaz, C., Colmenero-Flores, J. M., Dantán, E., Sánchez, F. and Covarrubias, A. A. (1999) *Planta* **207**, 582–589
- Maekawa, S., Nishida, E., Ohta, Y. and Sakai, H. (1984) *J. Biochem.* **95**, 377–385
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680–685
- Towbin, J., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350–4354
- O'Farrell, P. M. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021
- Sinclair, J. and Rickwood, D. (1981) in *Gel Electrophoresis of Proteins* (Hames, B. D. and Rickwood, D., eds.), pp. 189–218, IRL Press, Washington DC
- McLean, B. G., Huang, S., McKinney, E. C. and Meagher, R. B. (1990) *Cell Motil. Cytoskeleton* **17**, 276–290
- Rubenstein, P. A. (1990) *BioEssays* **12**, 309–315
- Lazarides, E. and Lindberg, U. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 4742–4746
- Meagher, R. B. (1991) *Int. Rev. Cytol.* **125**, 139–163
- Jungbluth, A., Eckerskon, C., Gerish, G., Lottpeich, F., Stocker, S. and Schweiger, A. (1995) *FEBS Lett.* **375**, 87–90
- Kishi, Y., Clements, C., Mahadeo, D. C., Cotter, D. A. and Sameshima, M. (1998) *J. Cell Sci.* **111**, 2923–2932
- Staiger, C. J., Yuang, M., Valenta, R., Shaw, P. J., Warn, R. M. and Lloyd, C. W. (1994) *Curr. Biol.* **4**, 215–219
- Guillén, G., Valdés-Lpez, V., Noguez, R., Olivares, J., Rodríguez-Zapata, L. C., Pérez, H., Vidali, L., Villanueva, M. A. and Sánchez, F. (1999) *Plant J.* **19**, 497–508
- Grabski, S., Arnoys, E., Busch, B. and Schindler, M. (1988) *Plant Physiol.* **116**, 279–290
- Giehl, K., Valenta, R., Rothkegel, M., Ronsiek, M., Mannherz, H.-G. and Jockusch, B. M. (1994) *Eur. J. Biochem.* **226**, 681–689

Received 14 May 1999/12 July 1999; accepted 11 August 1999

Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L.

Marco A. Villanueva, Francisco Campos, Claudia Díaz, José M. Colmenero-Flores, Edgar Dantán, Federico Sánchez, Alejandra A. Covarrubias

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, U.N.A.M., Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México

Received: 21 July 1998 Accepted: 1 September 1998

Abstract. Actin was present at very low levels in the seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) compared with those from other species, and was observed mostly in the embryo. A time-course of actin expression in germinating bean seeds revealed an induced expression of both the mRNA and protein. Initially, the actin mRNA in seeds was barely detectable by northern blot analysis. However, there was a substantial increase in the expression of the actin mRNA at 24, 48 and 72 h after imbibition, compared with an internal control consisting of a late-embryogenesis-abundant (LEA) type IV gene from *P. vulgaris*. An increase in the amount of actin in total seed extracts that paralleled that of the mRNA was detected by western blotting starting at 24 h after imbibition. This increase was more apparent when the embryo alone was analyzed. Two-dimensional western blots initially revealed three actin isoforms with isoelectric points (pIs) of approximately 5.6, 5.7 and 5.8, the amounts of which increased within a 48-h period, when a new minor isoform of pI approximately 5.5 appeared; however, after 72 h, the pI-5.8 isoform had almost disappeared and the pI-5.5 isoform had disappeared completely, indicating that these two minor isoforms are expressed transiently. These results indicate that actin is at very low levels in the dry seed but undergoes an increased and differential expression during imbibition, an event probably required to carry out all the necessary functions for germination.

Key words: Actin – Cytoskeleton – Gene expression (actin) – Germination – Imbibition – *Phaseolus* (seed actin)

Introduction

The cytoskeleton is a fundamental organelle that is involved in most essential cellular functions of eukaryotes. One of its components, actin is a ubiquitous protein that is highly regulated at various levels, including transcriptionally (Lloyd and Gunning 1993) and post-translationally (Aktories and Wegner 1992; Howard et al. 1993; Jungbluth et al. 1995). In addition, actin can self-assemble into microfilaments, and the equilibrium between polymeric and monomeric actin is also under tight cellular control by pH, salts, and a subset of proteins that can interact with both the polymer and the monomer (Pollard and Cooper 1986; Shterline and Sparrow 1994). All these control points are necessary since small variations in the actin monomer/polymer equilibrium can dramatically alter cell shape and function. For example, the capability of actin to polymerize can be affected by specific phosphorylation at tyrosine residues in *Dictyostelium discoideum* cells as a response to stress (Jungbluth et al. 1995). Consequently, this increased actin phosphorylation causes pseudopodium loss, rounding-up and reduced adhesion of *D. discoideum* cells to the substratum (Howard et al. 1993). Similarly, over-expression of an actin-binding protein such as profilin, which is presumed to induce actin depolymerization, produces slow growth, swelling and lysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells, as well as an altered actin and chitin distribution compared with the wild type (Haarer et al. 1990).

While most of the data on cytoskeletal function and regulation have been obtained from studies on eukaryotes from the animal kingdom, the cytoskeleton in plant cells has also been reported to contain the main primary protein components such as actin (Vahey and Scordilis 1980; McLean et al. 1990b; Villanueva et al. 1990; Liu and Yen 1992), tubulin (Lloyd et al. 1979; Yadav and Filner 1983) and intermediate filament-like proteins (Beven et al. 1991). Among these proteins, tubulin (Yadav and Filner 1983) and actin (Andersland et al. 1992; Liu and Yen 1992; Ren et al. 1997) have been shown to self-associate, in vitro, into microtubules and

Abbreviations: 2-D = two-dimensional; LEA = late-embryogenesis-abundant; RT-PCR = reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Correspondence to: M.A. Villanueva;

E-mail: marco@ibt.unam.mx;

Fax: 52 (73) 13 99 88; Tel.: 52 (73) 29 16 58

microfilaments, respectively. Although there is a notable lack of information on the particular roles and regulation of actin in plants, there is increasing substantial evidence on the involvement of actin in many plant cellular functions. Plant actin has been observed to be an important component that works in concert with tubulin during cell division (Schmit and Lambert 1990), and the disruption of the actin network leads to a number of effects including cessation of cytoplasmic streaming, cell division, organelle movement and tip growth (McCurdy and Williamson 1991). In addition, microinjection of the actin-binding protein profilin into *Tradescantia* stamen hair cells disrupts microfilament organization and the cells stop cytoplasmic streaming (Staiger et al. 1994). Thus, actin is a fundamental protein in the plant kingdom as well.

Due to the variety of roles of actin in many different plant cellular functions, it is also expected that plant actin is tightly regulated wherever cytoskeletal function occurs. For example, it has been reported that actin displayed a differential expression of isoforms during nodule ontogeny in *P. vulgaris* (Pérez et al. 1994). This differential expression of isoforms might be induced as early in nodule ontogeny as the initial infection steps, during the rearrangement of the actin network of *P. vulgaris* root hair cells that is induced by Nod factors derived from *Rhizobium etli* (Cárdenas et al. 1998). In soybean, actin was reported to consist of highly divergent isoforms with possible roles in the differential regulation necessary for the plasticity of cytoskeletal function (McLean et al. 1990b). Furthermore, antibodies generated against the specific λ -, κ -, and μ -actin isoforms, showed a preferential distribution of the λ -isoform in protoderm from apical and lateral roots and root primordia, suggesting a specificity of function for certain isoforms (McLean et al. 1990a). While germination is an intensive cell division and elongation developmental process, there are no studies on the expression and possible regulation of actin. In our laboratory, we are interested in the study of cytoskeletal components during germination and thus we analyzed the expression of actin from the dry seed of *Phaseolus vulgaris* through different times after seed imbibition. We observed, to our surprise, that actin is greatly diminished in the seed but its expression increases dramatically after 24 h both at the protein and mRNA levels. We show that the increase in the protein is due to an increase in two major protein isoforms, rather than to a shift in the isoforms themselves. These studies also indicate that the expression of actin is not as constitutive as previously thought in all eukaryotic organisms.

Materials and methods

Plant material. Seeds from *Phaseolus vulgaris* L. were used at all times and were obtained from the local supermarket. Seeds were surface-sterilized in 10% (v/v) commercial bleach, rinsed in running tap water, sown on water-saturated towels and germinated in the dark at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and 100% relative humidity. Whole seedlings and embryo axes were harvested at different times as indicated and stored at -70°C until used.

Antibodies and chemicals. Anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies were a kind gift from Dr. John L. Wang, Michigan State University (East Lansing, USA) and have been shown to cross-react with plant actin (Villanueva et al. 1990). Monoclonal anti-actin antibody N350 was purchased from Amersham (Arlington Heights, Ill., USA) and has also been shown to cross-react with plant actin (McLean et al. 1990b). Alkaline-phosphatase-conjugated anti-rabbit antibodies and substrates were from Boehringer-Mannheim (Indianapolis, Ind., USA). Ampholytes were purchased from Sigma (St. Louis, Mo., USA). All other chemicals were reagent grade.

Preparation of material for protein and RNA extracts. The surface-sterile seeds and embryo axes were used to prepare a powder by grinding them in liquid nitrogen with a mortar and pestle. The frozen powders were kept at -80°C until further analysis. Alternatively, a flour was also prepared by grinding the dry clean seeds or the cotyledons and embryo axes separated from them in a coffee mill.

Extraction of RNA northern blot analysis and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was prepared from the frozen powdered material by the hot-phenol method, following the procedure of de Vries et al. (1991). A 5- μg sample of total RNA was electrophoresed on a 1% agarose gel in the presence of 2.2 M formaldehyde and transferred onto nylon membranes (Sambrook et al. 1989). Blots were hybridized with *P. vulgaris* late-embryogenesis-abundant (LEA) class-IV (lea4-25) cDNA (Colmenero-Flores et al. 1997) and actin cDNA from leaves (*PLACT-6*; unpublished). Hybridization and washes were done at high stringency (Church and Gilbert 1984) and subjected to autoradiography. The RNA load was standardized by visualizing the ribosomal RNA in the gels after ethidium bromide staining. For RT-PCR, we used actin universal oligonucleotides from the carboxy terminus which is highly conserved (Sheterline and Sparrow 1994). The 5' oligonucleotide encoding an adaptor sequence and a 5' region (5' GGAATTCAGTGTCTGGA-TTGGTGG 3'), and the 3' oligonucleotide (5' GAAGCATT-CCTGTGA ACTATTGATGGCCAG 3') were incubated in the presence of total cDNA synthesized by reverse transcriptase from total RNA extracted from different parts of the plant. The reaction was carried out using the Superscript II kit according to the instructions of the manufacturer (Gibco BRL, Gaithersburg, Md., USA) from 0 to 25 cycles, and the amplified cDNA was analyzed on 2% agarose gels. In some cases, the amplified DNA bands were quantified by densitometry by the same method used for protein bands (see below).

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), two-dimensional SDS-PAGE (2-D PAGE) and immunoblotting. For whole-seed flour, the powdered material was suspended in 1% SDS and boiled immediately for 8 min. Alternatively, the same material was suspended in Laemmli's sample buffer and processed the same way. The supernatants were recovered by centrifugation at 14,000 *g* and analyzed by SDS-PAGE according to Laemmli (1970). Similarly, 0.1 g of frozen powdered embryos was resuspended in Laemmli's sample buffer and boiled immediately for 8 min. For analysis by 2-D PAGE, the embryo extracts in Laemmli's sample buffer were diluted at a 1:1 ratio in O'Farrell's (O'Farrell 1975) lysis buffer (9.5 M urea, 5% β -mercaptoethanol, 2% nonidet P-40, 1.6% ampholytes pH 5-7, and 0.4% ampholytes pH 3.5-10) (Sinclair and Rickwood 1981). The samples were then analyzed by isoelectric focusing in the first dimension and SDS-PAGE in the second dimension according to O'Farrell (1975). For immunoblotting, the gels were electrotransferred to nitrocellulose at 400 mA overnight (Towbin et al. 1979) and blocked with 3% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline (PBS: 10 mM Na-phosphate; 150 mM NaCl, pH 7.4) for 1 h at 50°C . The membranes were then incubated overnight at 4°C in either a 1/1000 dilution of monoclonal anti-actin antibodies, or a 1/2000 dilution of an anti-(calf thymus actin) polyclonal antibody in

0.05% Triton X-100 in PBS (PBST). After three washes of 15 min in PBST, the membranes were incubated with a 1:5000 dilution of the appropriate peroxidase- or alkaline-phosphatase-conjugated secondary antibodies for 1 h at 25 °C. The membranes were then washed three times for 15 min with PBST, rinsed briefly in PBS and the proteins were visualized by chemiluminescence or by incubating in a solution of nitro-blue tetrazolium and bromo-chloro indolyl phosphate according to the manufacturer (Boehringer-Mannheim).

Protein quantification and densitometry. The uniformity of protein loading in the gels was normalized by previously running the various extracts and staining with Coomassie blue. An approximation of the amount of protein loaded was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

For densitometric scans, the images of the western blots or photographic films were captured by an Apple Color One Scanner using Adobe Photoshop software and the bands quantified according to their pixel value using NIH-Image software.

Results

Actin is present at low levels in *P. vulgaris* seeds and predominantly in the embryo. The presence of actin was detected by western blotting using an antibody to calf thymus actin that is known to cross-react with plant actin (Villanueva et al. 1990). When 40 µg of protein from several extracts from different dry seeds was analyzed, even with a 2-fold higher protein load for *P. vulgaris* extracts, the actin could not be detected (Fig. 1B, lane 1), whereas the 42-kDa band was readily detected in maize and oat seed extracts (Fig. 1B, lanes 2 and 3, respectively). Possible actin degradation products were also detected in a rice extract (Fig. 1B, lane 4). The facts that: (i) the amount of protein loaded was equivalent in lanes 2–4 (Fig. 1A); (ii) lane 1 where actin was not observed was actually about 2-fold overloaded with respect to the lanes where actin was detected (Fig. 1A); and (iii) we were unable to detect proteolytic activity using gelatin as substrate in seed extracts (not shown), indicated that actin in *P. vulgaris* seeds is present at very low levels and that this finding was not due to a differential extraction caused by omitting the β-mercaptoethanol. Tris and glycerol from the extraction buffer. In fact, an identical reaction was observed in lanes loaded with the same amount of protein extracted with either 1% SDS alone (Fig. 2A, lane 2) or Laemmli's sample buffer (Fig. 2A, lane 3). In addition, the only way to observe the actin band in the *P. vulgaris* extracts was by overdeveloping the blot (Fig. 2A, lanes 2, 3; Fig. 3), but this caused a high background in the rest of the membrane (Fig. 3). A more detailed analysis of the different parts of the seed by western blotting using equal amounts of protein in each lane and after overdeveloping the blot, revealed that actin in *P. vulgaris* seeds is present mostly in the embryo (Fig. 2B, lane 2) since the equivalent extract from total seed (Fig. 2B, lane 1) or cotyledon (Fig. 2B, lane 3) showed a very faint reaction. These data indicated that most of the actin during germination arises from the embryo, and prompted us to check the time-course of its expression in both total seeds and embryo axes.

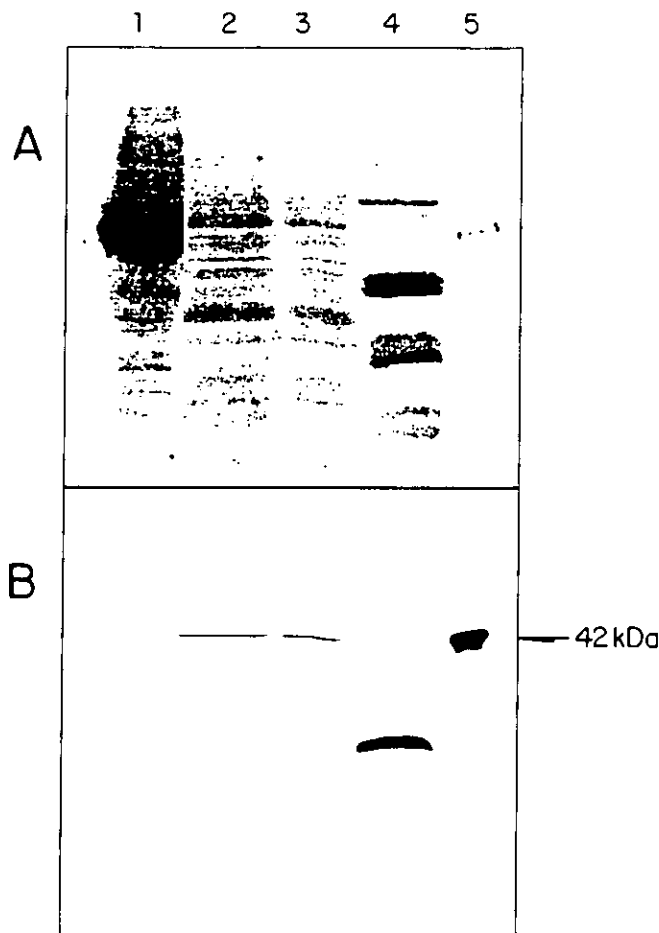


Fig. 1A,B. Immunodetection of actin in seeds from several species by western immunoblotting with anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies. The corresponding seeds were powdered and extracted with SDS-PAGE sample buffer, the supernatants from maize, oats and rice were loaded in equivalent amounts in each lane ($\approx 40 \mu\text{g}$), and the common bean extract load was doubled ($\approx 80 \mu\text{g}$) on a 10% polyacrylamide gel followed by electrotransfer and immunoblotting. The proteins stained with ponceau S (A) show the protein load for each extract. The immunoblot (B) detected the 42-kDa actin band only in the positive chicken-muscle control (lane 5), maize (lane 2) and oat (lane 3) extracts; possible degraded actin polypeptides were detected in rice extracts (lane 4), and no band in *P. vulgaris* extracts (lane 1)

The actin product shows a substantial increase during imbibition. Western blot analysis and overdeveloping the blot for a longer time than used previously (Fig. 1) for whole seed extracts revealed that, initially, actin was hardly detectable (Fig. 3, 0 h) and that its level remained essentially unchanged during the first 24 h of imbibition (Fig. 3, 0–24 h). A substantial amount of the protein product was only detected after 48 h and prevailed from then until 72 h after imbibition (Fig. 3, 48–72 h).

The results confirmed our expectation that the majority of the actin was found in the embryo (Fig. 2B), since it is the seed part that elongates during germination to become a new plant. Therefore, we repeated the time-course of induction but analyzing only the embryo axis. The analysis was carried out with both a polyclonal (Villanueva et al. 1990), and a monoclonal anti-actin

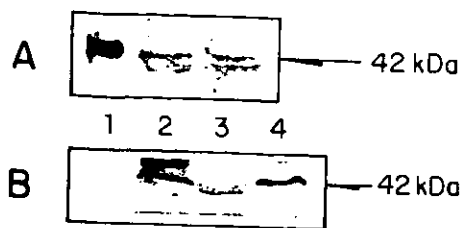


Fig. 2. **A** Western blot analysis with anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies of whole *P. vulgaris* seeds. The seeds were extracted with 1% SDS (lane 2) or sample buffer (lane 3) and equivalent amounts of protein were loaded in lanes 2 and 3 ($\approx 50 \mu\text{g}$). The actin polypeptide was barely detectable even after overdeveloping the blot (lanes 2, 3); however, the chicken-muscle actin control was readily detected (lane 1). **B** Western blot analysis with anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies of different components of *P. vulgaris* seeds extracted with sample buffer. The seeds were separated into embryos and cotyledons, and extracts from each were made as for the whole seed. Equivalent amounts of protein ($\approx 40 \mu\text{g}$) were loaded in lanes 1–3. The 42-kDa actin band was not detected in whole seeds (lane 1) or cotyledons (lane 3) but it was readily detectable in embryos (lane 2) and the positive chicken-muscle control (lane 4). In both cases (A and B), the immunoblot had to be overdeveloped in order to visualize the 42-kDa polypeptide (arrows) in whole-seed and cotyledon extracts

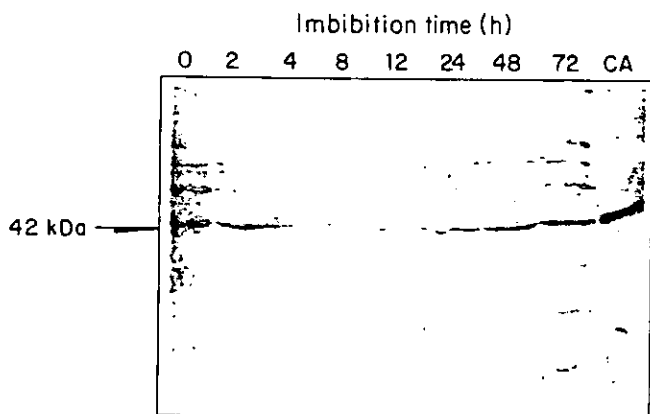


Fig. 3. Time-course analysis of actin during germination of whole seeds of *P. vulgaris* as shown by western immunoblotting using anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies. The powdered material from seeds and seedlings at different time points was extracted with SDS-PAGE sample buffer and the supernatants loaded in equivalent amounts ($\approx 50 \mu\text{g}$) directly onto 10% polyacrylamide gels, followed by electrotransfer and immunoblotting. The blot shows actin in the dry seed at 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h after imbibition. The positive chicken muscle-actin control (CA) is also shown

(McLean et al. 1990b) antibody and the corresponding blots were analyzed by densitometry (see *Materials and methods*) to assess the relative increase in actin. In the case of the polyclonal antibody, we observed a certain amount of actin in the dry embryo (Fig. 4, 0 h), which increased about 2-fold after 6 h of imbibition (Fig. 4, 6 h). This level of actin remained virtually unchanged during the first 6–24 h of imbibition (Fig. 4, 6–24 h). However, at 48 h after imbibition, about a 5-fold increase in the amount of actin was detected (Fig. 4, 48 h) and it remained constant for up to 72 h (Fig. 4, 72 h). The monoclonal antibody yielded similar results

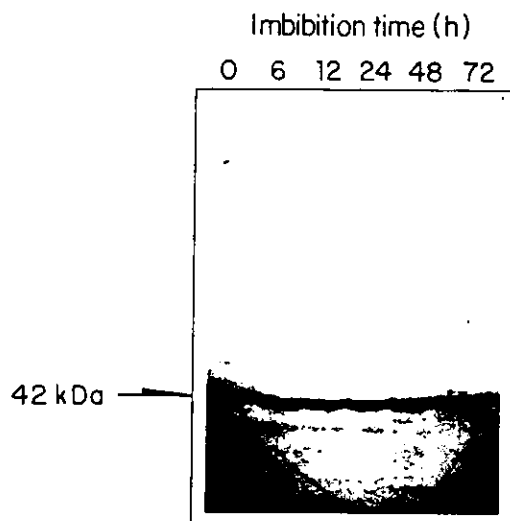


Fig. 4. Time-course analysis of actin during germination of embryo axes of *P. vulgaris* as shown by western immunoblotting using anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies. The powdered material from embryo axes at different time points was extracted with sample buffer and the supernatants loaded in equivalent amounts ($\approx 45 \mu\text{g}$) onto 10% polyacrylamide gels followed by electrotransfer and immunoblotting. The blot shows the presence of actin at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h after imbibition

(data not shown). These data indicate that actin is at low levels in the embryo axis of dry seeds and the polypeptide increases substantially after the first 24 h of germination. This is the reason for detecting the protein only after 48 h of germination in whole seeds.

The actin mRNA is induced during germination in seeds of P. vulgaris. Initially, when we analyzed 5 μg of total mRNA, we were surprised that actin mRNA could not be detected in dry seeds of common bean on northern blots probed with a *P. vulgaris* leaf cDNA (*PLACT-6*) (Fig. 5A, 0 h). Therefore, we carried out an analysis of the actin mRNA using the *P. vulgaris* leaf cDNA (*PLACT-6*) in whole seeds at various time points after imbibition. The actin mRNA was not detected during the first 0–12 h (Fig. 5A, *PLACT-6*, 0–12 h). The message was barely detectable even after 24 h of imbibition (Fig. 5A, *PLACT-6*, 24 h); however, its expression increased substantially after 48 h (Fig. 5A, *PLACT-6*, 48 h). In contrast, the message for a seed-specific gene, *LEA-IV* showed an initial high expression and then a decrease as the time of imbibition proceeded (Fig. 5A, *lea4-25*). In addition, analysis of the actin mRNA in embryo axes revealed an increase in the expression similar to that encountered in the whole seeds (Fig. 5B, *PLACT-6*). In the first hours of imbibition, no message was detected from 0 to 12 h (Fig. 5B, *PLACT-6*, 0–12 h). At 24 h, the hybridization signal was barely detectable (Fig. 5B, *PLACT-6*, 24 h) but at 48 and 72 h, a strong signal was observed indicating a higher level of expression (Fig. 5B, *PLACT-6*, 48, 72 h). In this tissue, expression of *LEA-IV* is similar to that observed in whole seeds (Fig. 5B, *lea4-25*). Finally, to ensure that the difference in detection of the various RNAs was not

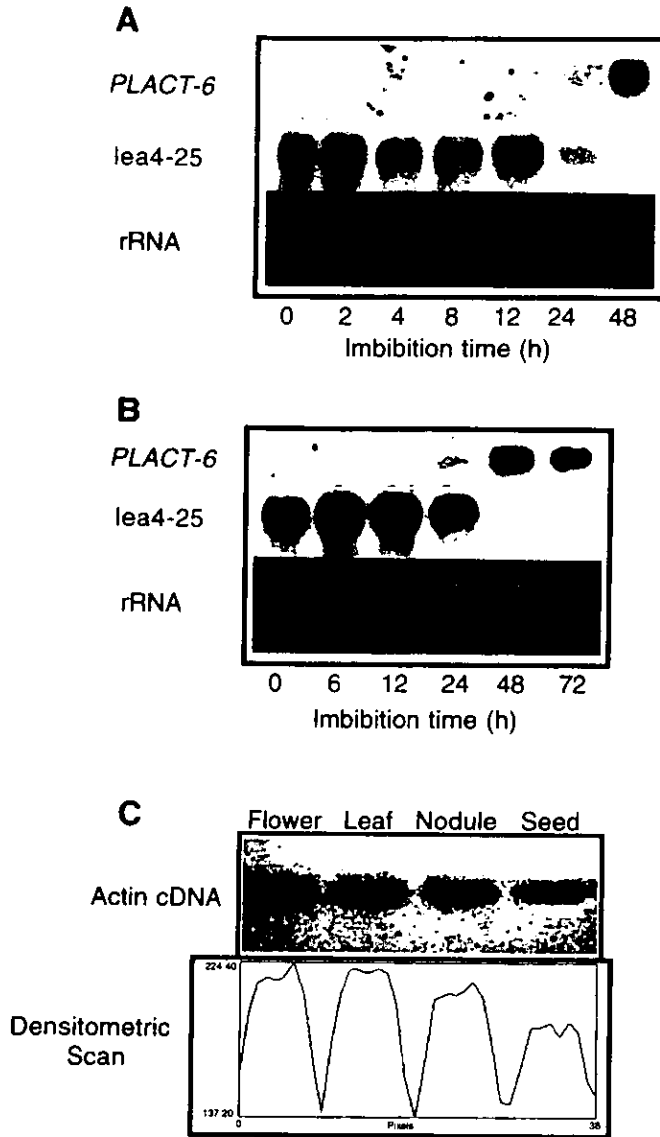


Fig. 5A-C. Northern blot analysis of whole seeds (A) and embryo axes (B), and RT-PCR of flower, leaf, nodule and seed mRNA (C) from *P. vulgaris* in order to detect the actin mRNA. For northern blots, total RNA was prepared from the frozen powdered material by the hot-phenol method, following the procedure of de Vries et al. (1991). Five micrograms of total RNA were run in each lane. Blots were hybridized with *P. vulgaris* LEA class-I (*lea4-25*) cDNA (Colmenero-Flores et al. 1997) and actin cDNA from leaves (*PLACT-6*), at 0, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h after imbibition for whole seeds (A), and at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h after imbibition for embryo axes (B). In both whole seeds and embryo axes, equal loading of RNA per lane was checked by ethidium bromide staining of the ribosomal RNAs. The RT-PCR reaction was carried out from 0 to 25 cycles. The actin cDNA from various plant organs and parts was present after 25 cycles; however, the seed cDNA was present in lower amounts as detected by densitometry (C. *seed* and *Densitometric Scan*). The y-axis of the graph in C represents the pixel value

due to differential loading of the gel, the RNA amount loaded in all lanes was standardized using the ribosomal RNAs as a reference (Fig. 5A,B. *rRNA*).

The dry-seed actin mRNA could not be detected by northern blot analysis; however, we were able to observe the presence of seed actin mRNA by RT-PCR with 5'

and 3' conserved actin oligonucleotides from the carboxy region, after 25 cycles of amplification (Fig. 5C, seed). The results were consistent with the fact that the actin mRNA in seeds is present in low amounts since the amount detected in this tissue after 25 cycles of amplification was about one-half lower than that of flowers, leaves and nodules (Fig. 5C, densitometric scan). This indicated that the initial amount of seed actin mRNA is not enough to be observed by a regular northern blot analysis under our current detection parameters. These data also suggest that the increase in protein detected in whole seeds during germination is most likely due to an increase in the expression of the actin mRNA that takes place in the embryo.

The induction of the protein is due to an increase in the amount of the two main actin isoforms. To analyze with more detail the characteristics of the actin induction we ran the embryo extracts on 2-D PAGE gels followed by western immunoblotting to detect the isoforms. To ensure that both monoclonal and polyclonal antibodies recognized the same isoforms, the blots initially probed with the monoclonal antibody (Fig. 6A) were washed with SDS-urea to strip off the bound antibodies, re-probed with the immunopurified polyclonal anti-actin antibody and developed by chemiluminescence (Fig. 6B). The results obtained with either antibody were identical (Fig. 6A,B), indicating that both antibodies recognize the same actin isoforms. We observed that in the dry embryo three isoforms of actin already exist, two major isoforms migrate at isoelectric point (pI) of approx. 5.6 and 5.7, respectively, and a minor isoform at a pI \approx 5.8 (Fig. 6, 0 h). The two major isoforms increase in amount as detected after 24, 48 and 72 h of imbibition (Fig. 6, 24–72 h). Additionally, a new minor isoform of pI \approx 5.5 appears after 48 h (Fig. 6, 48 h); however, after 72 h of imbibition this new actin isoform is no longer detected (Fig. 6, 72 h). There was some variability in the stretch of the isoelectric focusing gel on which the isoforms migrated; however, the monoclonal antibody cross-reacts with a higher-molecular-weight spot (Fig. 6A, arrow) which has also been observed in soybean (McLean et al. 1990a). This spot was used as an internal reference which allowed us to identify the two major actin isoforms since it was always observed above and between the area where these two major isoforms were focused (Fig. 6A, arrow).

Discussion

When we tried to detect actin in dry seed extracts of *P. vulgaris*, we were unable to obtain a detectable signal; in contrast, profilin can be readily detected in whole-seed extracts (data not shown). When we compared extracts from different seeds, we observed that the 42-kDa polypeptide corresponding to actin was readily detectable in maize and oats, and possible degradation products from it in rice, but at the same or a higher protein concentration, common-bean actin was still undetectable (Fig. 1). The absence of actin was not

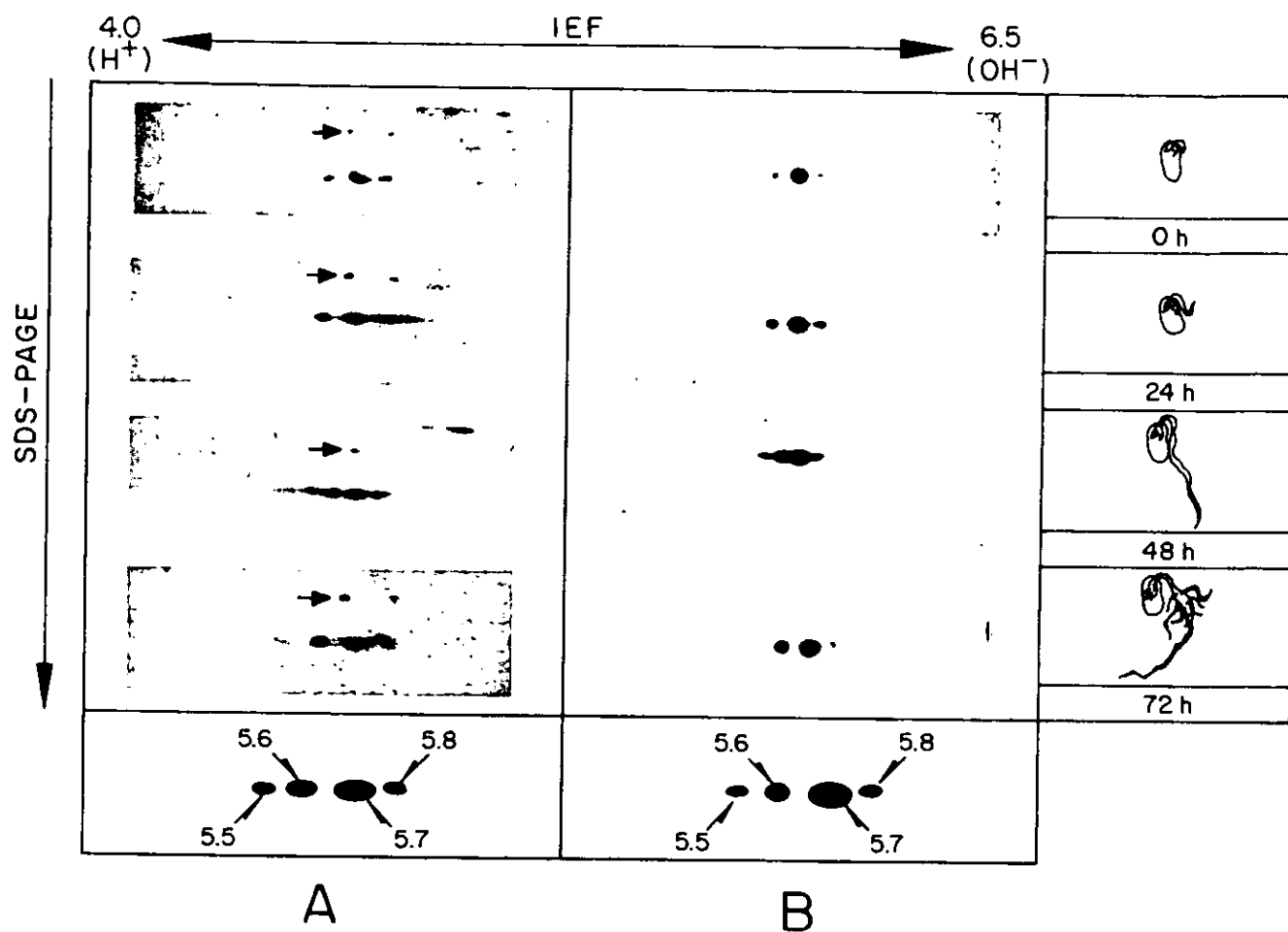


Fig. 6A,B. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of actin isoform expression at different time points after imbibition of *P. vulgaris* seeds. Embryo axes were excised and extracted in SDS-PAGE sample buffer and analyzed by 2D-PAGE according to O'Farrell (1975). Equal amounts of protein for all time points ($\approx 40 \mu\text{g}$) were loaded in the first dimension. **A** Immunodetection of the actin isoforms with Amersham N350 monoclonal antibody and alkaline-phosphatase-conjugated secondary antibodies at 0, 24, 48 and 72 h after imbibition. The *arrow* points toward a cross-reactive protein that was used as a reference point. **B** The bound antibodies were stripped off the blots and re-probed with immunopurified anti-calf thymus actin polyclonal antibodies followed by peroxidase-labeled secondary antibodies, and developed by chemiluminescence. The pI values of the corresponding isoforms are shown in the bottom panels. The developmental stage of the seedling is schematized along with the time point at the right of the figure

due to degradation during the extraction since common-bean seeds have no detectable proteolytic activity (not shown). Further analysis of separate components of the seed revealed that a 42-kDa polypeptide corresponding to actin was indeed present in the dry seed but it predominated in the embryo (Fig. 2B) and it could be observed in whole seeds only after developing the western blot for a long time (Fig. 3). These data are noteworthy in the context that the embryo is the part of the seed that will become a new plant and it requires the necessary machinery for the dynamic processes that will occur at the onset of germination. The cytoskeleton is certainly an essential component that will be required during this process. Consistent with these data is the fact that profilin is also present predominantly in the embryo from *P. vulgaris* seeds (data not shown).

Actin has been previously used as an internal control for constitutive genes (Cook et al. 1995). In vegetative tissues this may work properly as a control for baseline

gene expression but it may ultimately depend on the particular specificity of the probe and the tissue tested. In fact, it was recently reported that an *Arabidopsis* actin gene, *ACT7*, has a preferential expression in rapidly growing zones of this plant (McDowell et al. 1996). The finding of extremely low levels of actin in the dry seed of *P. vulgaris* suggested the possibility that, in common bean, there was also a differential actin expression during the germination process. When we performed the analysis of protein expression at different time points of germination, we found that the protein was indeed induced slowly at first (0–24 h) and then more strongly after 48 h of imbibition (Fig. 3). We found a 2- to 5-fold increase in the amount of the protein which was consistent with the level of expression of the corresponding mRNA. The times of induction were essentially the same when either the whole seed or the embryo axes alone were analyzed. Although the actin mRNA could not be detected at time = 0 of imbibition (whole

dry seed) by northern blot analysis, we were able to amplify actin cDNA from seed mRNA by RT-PCR, indicating that the message is nevertheless present in the dry seed. The amount of the amplified cDNA detected in this plant component after 25 cycles was approximately 50% less than that obtained from flower, leaf and nodule mRNA (Fig. 5C), which supports the fact that initial actin mRNA in the seed is present in low quantity.

One possibility to account for the increase in the expression of actin was that new genes were being induced or their products modified during the process. Analysis of the extracts at the different time points by 2D-PAGE indicated that: (i) actin is present in the embryo of the common-bean seed as one minor and two major isoforms; (ii) that as many as four isoforms are detected after 48 h of imbibition but the appearance of the new minor isoform seems to be transient; and (iii) the increase in the protein product is mostly due to the increase in the quantity of the two main isoforms initially present in the embryo instead of a shift of isoform expression (Fig. 6). It is also noteworthy that the pIs determined for the actin isoforms in the common bean correspond closely to actin isoforms already reported from soybean (McLean et al. 1990b), which would suggest an equivalent expression in both species during the vegetative stage. We have determined that there are five to six actin genes present in the *P. vulgaris* genome (data not shown) so that each one of the proteins detected could account for one particular gene product. There is a possibility though, that they could arise from a few genes and be modified post-translationally. Such post-translational modifications of actin have been documented in the literature previously (Aktories and Wegner 1992). As was expected from the protein data, the lack of detection of the actin mRNA in the primary stages of germination did not mean that it was not present; indeed, RT-PCR analysis using universal and plant-actin-specific oligonucleotides showed that the seed actin mRNA could be amplified to a detectable level (Fig. 5C, seed).

It is clear that actin is not always a constitutively expressed protein as previously thought. High levels of regulation of actin have now been encountered at the transcriptional (Lloyd and Gunning 1993), translational and post-translational (Aktories and Wegner 1992; Howard et al. 1993) levels. It remains to be determined if one or both of the main actin isoforms that increase during germination in common bean are products arising from a homolog of the *ACT7* gene (McDowell et al. 1996). This gene was observed to be highly expressed in rapidly expanding tissues of *Arabidopsis*, including a strong expression in the seedlings immediately after imbibition. Its expression was also observed to increase upon treatment with external stimuli such as auxin, light and wounding (McDowell et al. 1996). Thus, it would not be surprising to find an analogy in the expression of actin genes during the germinative process of common bean.

Finally, we could envision two possible scenarios for the existence of such a small amount of actin in cotyledons and the majority of the actin in the embryo.

One would be that actin is not required for the initial triggering of germination. The other possibility is that the basal-level amount of actin present in the seed is enough to allow the embryo to carry out the baseline functions required to trigger the germination event. Once this has occurred, actin expression is induced to continue with the development of the new plant.

This work was supported in part by grants 4733-N and 00131-PN from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), and grants IN-201696 and IN-202895 from DGAPA-UNAM. We also acknowledge Sergio Trujillo, Alejo Pichardo and Pedro Saucedo for their photographic and art work.

References

- Aktories K, Wegner A (1992) Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins. *Mol Microbiol* 6: 2905-2908
- Andersland JM, Jagendorf AT, Parthasarathy MV (1992) The isolation of actin from pea roots by DNase I affinity chromatography. *Plant Physiol* 100: 1716-1723
- Beven A, Guan Y, Peart J, Cooper C, Shaw P (1991) Monoclonal antibodies to plant nuclear matrix reveal intermediate filament-related components within the nucleus. *J Cell Sci* 98: 293-302
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 22: 248-254
- Cárdenas L, Vidali L, Domínguez J, Pérez H, Sánchez F, Hepler PK, Quinto C (1998) Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol* 116: 871-877
- Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995
- Colmenero-Flores JM, Campos F, Garcíarrubio A, Covarrubias A (1997) Characterization of genes responsive to water deficit in *Phaseolus vulgaris*. Characterization of a novel LEA-like protein. *Plant Mol Biol* 35: 393-405
- Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, Vandenbosch K (1995) Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* 6: 43-55
- de Vries S, Hoge H, Bisseling T (1991) Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. In: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (eds) *Plant molecular biology manual*, vol 86. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 1-13
- Haarer BK, Lillie SH, Adams AEM, Magdolen V, Bandlow W, Brown SS (1990) Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol* 110: 105-114
- Howard PK, Sefton BM, Firtel RA (1993) Tyrosine phosphorylation of actin in *Dictyostelium* associated with cell-shape changes. *Science* 259: 241-244
- Jungbluth A, Eckerskorn C, Gerisch G, Lottspeich F, Stocker S, Schweiger A (1995) Stress-induced tyrosine phosphorylation of actin in *Dictyostelium* cells and localization of the phosphorylation site to tyrosine-53 adjacent to the DNase I binding loop. *FEBS Lett* 375: 87-90
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Liu X, Yen L-F (1992) Purification and characterization of actin from maize pollen. *Plant Physiol* 99: 1151-1155
- Lloyd C, Gunning P (1993) Noncoding regions of the G-actin gene influence the impact of the gene on myoblast morphology. *J Cell Biol* 121: 73-82
- Lloyd CW, Slabas AR, Powell AJ, MacDonald G, Badley RA (1979) Cytoplasmic microtubules of higher plants visualised with anti-tubulin antibodies. *Nature* 279: 239-241

- McCurdy DW, Williamson RE (1991) Actin and actin-associated proteins. In: Lloyd CW (ed) The cytoskeletal basis of plant growth and form. Academic Press, New York, pp 3-14
- McDowell JM, An Y-Q, Huang S, McKinney EC, Meagher RB (1996) The *Arabidopsis ACT7* gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiol* 111: 699-711
- McLean BG, Eubanks S, Meagher RB (1990a) Tissue-specific expression of divergent actins in soybean root. *Plant Cell* 2: 335-344
- McLean BG, Huang S, McKinney EC, Meagher RB (1990b) Plants contain highly divergent actin isoforms. *Cell Motil Cytoskel* 17: 276-290
- O'Farrell PM (1975) High resolution two dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* 250: 4007-4021
- Pérez HE, Sánchez N, Vidali L, Hernández JM, Lara M, Sánchez F (1994) Actin isoforms in non-infected roots and symbiotic root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 193: 51-56
- Pollard TD, Cooper JA (1986) Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* 55: 987-1035
- Ren H, Gibbon BC, Ashworth SL, Sherman DM, Yuan M, Staiger CJ (1997) Actin purified from maize pollen functions in living plant cells. *Plant Cell* 9: 1445-1457
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Schmit A-C, Lambert A-M (1990) Microinjected fluorescent phalloidin in vivo reveals the F-actin dynamics and assembly in higher plant mitotic cells. *Plant Cell* 2: 129-138
- Sheterline P, Sparrow JC (1994) Actin. *Protein Profile* 1: 1-121
- Sinclair J, Rickwood D (1981) Two-dimensional gel electrophoresis. In: Hames BD, Rickwood D (eds) Gel electrophoresis of proteins. IRL Press, Washington DC, pp 189-218
- Staiger CJ, Yuang M, Valenta R, Shaw PJ, Warn RM, Lloyd CW (1994) Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Curr Biol* 4: 215-219
- Towbin J, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354
- Vahey M, Scordilis SP (1980) Contractile proteins from tomato. *Can J Bot* 58: 797-801
- Villanueva MA, Ho S-Ch, Wang JL (1990) Isolation and characterization of one isoform of actin from cultured soybean cells. *Arch Biochem Biophys* 277: 35-41
- Yadav NS, Filner P (1983) Tubulin from cultured tobacco cells: isolation and identification based on similarities to brain tubulin. *Planta* 157: 46-52

Complex actin isoform expression in germinating seeds of *Zea mays*.

Claudia Díaz-Camino and Marco A. Villanueva*.

Departamento de Biología Molecular de Plantas

Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.

Apartado Postal 510-3

Cuernavaca, Morelos 62250,

México.

* Corresponding author:

Marco A. Villanueva.

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.

P.O. Box 510-3 Cuernavaca, Morelos 62250, México.

Phone: (52) (73) 29-16-58.

Fax: (52) (73) 13-99-88.

e-mail: marco@ibt.unam.mx

Running title: Actin expression in *Z. mays*.

Contents category: Development.

Abstract. Previous analysis of actin in a dicotyledonous plant, *Phaseolus vulgaris* (or common bean), showed that actin was present at very low levels in cotyledons and concentrated in the embryo. Upon imbibition, actin expression increased five-fold and a maximum of four actin isoforms were expressed with two of them as the major ones expressed (Villanueva *et al.* 1999, *Planta* 207: 582-589). In this work, analysis of the actin expression in a monocotyledonous plant, *Zea mays* (or maize) showed that a certain baseline amount of actin is mainly concentrated in the embryo axis, and to a less extent, it is also present in all the seed components. Nonetheless, the expression of actin is also induced during imbibition at both the protein and mRNA level but the increase is not as dramatic as in the case of common bean. The isoform distribution showed a complex pattern of at least eight isovariants. These data indicate that: a) actin mRNA and protein in maize are initially present in other seed components besides the embryo, as opposed to common bean; b) the expression is moderately induced upon imbibition at times similar to those found in common bean; and c) the isoform pattern is more complex indicating a more complex regulation and perhaps more specific isoform functions.

Key words: actin, germination, imbibition, isovariants, *Z. mays*.

Introduction

Germination in plants could be described as the becoming of a new organism from a preexisting embryo in the seed, and implies a number of dynamic processes triggered by the hydration signals which then relay to other signal-transduction mechanisms to drive elongation, active cell division, and a copious vesicle transport to the sites of newly synthesized cell walls (McCurdy and Williamson, 1991). In these processes, cytoskeletal elements are very likely involved to produce vesicle movement via molecular motors on filamentous cables. Actin is a key cytoplasmic protein that is capable of self-assembly into dynamic filamentous structures. These microfilaments are fundamental for eukaryotic function and due to their importance, are tightly regulated within these cells. In plants, actin filaments are presumed to play essential roles in many important processes including cell division, cell elongation, establishment of cytoplasmic organization, cytoplasmic streaming, pathogen response, tropisms, and pollen tube growth. Some of these processes are believed to occur via actomyosin-based movements. Although the presence of cytoplasmic actin has been established in most major plant cell types (Villanueva et al. 1990; Zhang et al. 1993; Cleary, 1995; Kim et al. 1995; Kost et al. 1998), the other essential component, myosin is still fairly uncharacterized.

Plant actins, like animal actins, are encoded by multigene families and single plant species have more divergent actin genes than do individual animal species (Meagher, 1999). Therefore, different isoforms are likely to be expressed at particular times depending on the cell physiological status. Thus, it has been proposed

that plants may have individual isoforms of actin that are specialized for particular functions and/or expression in certain cell types (Meagher et al. 1999). Furthermore, different myosin isoforms may interact differentially with the various actin isoforms. This versatility is needed when the exquisite regulation in time and space is needed during a process such as germination. Most studies on active dynamic elongation processes have been carried out on growing pollen tubes and although they are substantially different from a germinating seed, they must possess similar mechanisms for the signal-transduction and cytoskeletal function. For example, it is known that tip-growing cells such as those of pollen tubes contain a vesicle-rich apex. In these cells, a close coordination between cytoskeletal dynamics and signal-transduction events are needed in order to modulate growth direction (reviewed in Yang, 1998). In addition, GTPases of the Rop family have been localized on the tip of growing pollen tubes (Li et al. 1999); these GTPases are known to be key regulators of actin cytoskeletal organization (reviewed in Yang, 1998). Therefore, similarities that parallel germination events and tip-growth mechanisms might be encountered.

We have analyzed in *Phaseolus vulgaris* seedlings the actin content in different parts of the seed, the time-course of actin expression, and its isoform composition during this period (Villanueva et al. 1999). We observed that actin is present at very low levels in these seeds and that it was mostly concentrated in the embryo. During the germination process, actin expression increased five-fold at the protein and mRNA level. Furthermore, at 48 h post-imbibition we observed that certain isoforms increased in quantity but others appeared to be expressed transiently. In this work, we extend our previous analysis to follow the time-course of actin expression in a germinating

monocot, maize, and observed that the protein and mRNA were present at all times in all components of the seed prior to imbibition; at later times post-imbibition, a moderate increase in the mRNA and protein expression level was observed and a complex isoform expression pattern was displayed by the seedlings which, although numerous (at least 8 isoforms), may be consistent with the number of actin genes in maize. We discuss the implications of these data in terms of the possible role of actin during germination in maize and how it differs from what has been observed for a similar process in common bean.

Materials and methods

Plant material. Seeds from *Zea mays* were used at all times. Seeds were surface-sterilized in 10% commercial bleach with stirring for 10 min followed by extensive wash in sterile-distilled water. The seeds were air dried and placed on sterile trays lined with wet paper towels for germination in the dark at $24^{\circ}\text{C} \pm 1$. Maize seed or seedling tissues were dissected at various stages of germination, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further use.

Antibodies, Actin cDNA clone and Chemicals. Anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies were a kind gift of Dr. John L. Wang (Michigan State University, East Lansing, MI, USA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies were purchased from Zymed (San Francisco, CA, USA) and substrates for chemiluminescence (ECL) were purchased from Amersham (Arlington Heights, IL, USA). Maize actin cDNA from clone 5C01H03 was kindly provided by Ms. Theresa A. Musket (University of Missouri, Columbia, USA). Ampholytes were purchased from Sigma (St. Louis, Mo., USA). All other chemicals were reagent grade.

Protein Extraction. Total protein extracts were prepared by grinding the tissue in a mortar with liquid nitrogen followed by an aqueous buffer [0.7 M sucrose, 0.5 M tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS), 0.1 M KCl, 30 mM HCl, 50 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 2% β -mercaptoethanol, 12 mg/mL polyvinylpoly-pyrrolidone (PVPP)]. The samples were incubated 10 min at 4°C and

one volume of phenol was added, incubated 10 min and centrifuged at 6,000 x g. The phenolic phases were recovered and the protein content was precipitated with five volumes of 0.1 M ammonium acetate in methanol (precipitation solution) overnight at 20°C. The samples were pelleted by centrifugation at 6,000 x g for 15 min, washed 3 times with precipitation solution followed by a wash in 80% acetone. The final pellets obtained were air-dried, resuspended in Laemmli's sample buffer (Laemmli, 1970) and boiled for 10 min. The supernatants were recovered by centrifugation at 14,000 x g and the protein concentration from the obtained fractions was determined using the modified Bradford assay with IgG as a standard.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), two-dimensional SDS-PAGE (2-D PAGE) and immunoblotting. A protein load of 30-50 µg was used for standard one-dimensional SDS-PAGE gels (Laemmli, 1970). The protein from the gel was then transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting (Towbin et al. 1979). Equal protein loading was confirmed by staining replicate gels with Coomassie Brilliant Blue. For analysis by 2D PAGE, the samples in Laemmli's sample buffer were diluted at 1:1 ratio in O'Farrell's (O'Farrell 1975) lysis buffer (9.5 M urea, 5% β-mercaptoethanol, 2% Nonidet P-40, 1.6% ampholytes pH 4.5-6.5 and 0.4% ampholytes pH 3.5-10) (Sinclair and Rickwood 1981). The samples were then run by isoelectric focusing on the first dimension followed by SDS-PAGE on the second dimension according to O'Farrell (1975) and transferred to nitrocellulose (Towbin et al. 1979). For immunoblotting, the nitrocellulose membranes were blocked for 1 h at 50°C in 5% non-fat dry milk in PBST (10 mM Na-phosphate, 150 mM NaCl,

pH 7.4, 0.05% Triton X-100) followed by incubation overnight at 4°C with anti-(cali thymus actin) antibodies diluted 1:2000 in PBST with 1% milk. The blots were then washed twice with PBST and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1:5000 in PBST with 1% milk for 3 h at 25°C. The membranes were washed twice with PBST, rinsed briefly in PBS (10 mM Na-phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4) and the antigen-antibody complex was detected by chemiluminescence using the ECL® kit.

RNA Extraction and northern blot analysis. Some of the original embryo and seedling powder was used for total RNA extraction according to the method of de Vries et al. (1991). A 8-µg sample of total RNA was electrophoresed on a 1% agarose gel in the presence of 2.2 M formaldehyde and transferred onto nylon membranes (Sambrook et al. 1989). The blot was then hybridized with *Z. mays* actin cDNA from clone 5C01H03. Hybridization and washes were done under light stringency conditions (Church and Gilbert 1984) and subjected to autoradiography. An equal load of total RNA was standardized and monitored by pre-staining the ribosomal RNA on the membranes with ethidium bromide.

Results

Analysis of actin in different parts of the seeds of Zea mays. The presence of actin was detected by western blotting using an antibody to calf thymus actin that is known to cross-react with plant actin (Villanueva, et al. 1990 and 1999). When 50 µg of total protein from embryos and storage-tissues from maize and common bean seeds were analyzed (Fig. 1A and 1B), the presence of actin was readily detected preferentially in embryos in both cases (Fig. 1B, lanes 3 and 5, respectively). However, actin was still detected in extracts from maize endosperm (Fig. 1B, lane 2) though at very low levels. As found previously, we were unable to detect the presence of actin in cotyledons of *P. vulgaris* (Fig. 1B, lane 4) even with this high sensitivity detection method. A more detailed analysis of the different parts of the maize seed by western blotting using equal loading of protein in each lane (Fig. 2), confirmed that actin is present mostly in the embryo (Fig. 2, lane 2), followed in lower quantity by the scutellum (Fig. 2, lane 3) and the least amount in the endosperm (Fig. 2, lane 4). These data indicated that, as observed in common bean, most of the actin during germination arises from the embryo. Therefore we sought to analyze the time-course of its expression in embryo axes during germination.

Time-course analysis of actin expression at the protein level. Maize seeds were induced to germinate and analysis of their actin content was carried out at various post-imbibition times. The concentration of protein was determined for each extract as described previously (see materials and methods) and the equal loading of protein on

SDS-gel was confirmed by protein staining with Coomassie Brilliant Blue (Fig. 3A, lanes 3-7). Western blot analysis revealed the presence of actin from low levels at 0 h to maximum levels at 96 h post-imbibition (Fig. 3B, lanes 3-7). In contrast with actin expression during germination in common bean (Villanueva et al. 1999), the actin increases steadily in maize, with no dramatic changes between the time points after imbibition. These data indicated that actin is at low levels in the embryo axis of dry seeds and a steady increased expression of the polypeptide occurs starting at 24 h post-imbibition during germination.

Time-course analysis of actin expression at the RNA level. Analysis of the actin mRNA in embryo axes revealed a moderate increase in expression contrary to that encountered at the protein level (Fig. 4A, 0-96 h post-imbibition). Contrary to common bean, we were able to detect maize actin mRNA at 0 h which then increased moderately throughout the germination process. To ensure that the difference in detection of the various RNAs was not due to differential loading of the gel, the RNA amount loaded in all lanes was standardized using the ribosomal RNAs as a reference (Fig. 4B). These data suggested that the increase in actin detected in embryo axes during germination (Fig. 3B, lanes 3-7) was most likely due to an increase in the expression of the actin mRNA that takes place in the embryo.

Analysis of actin isoforms expressed at different post-imbibition times. To analyze the characteristics of the actin induction with more detail, we ran the embryo extracts on 2-D PAGE gels followed by western immunoblotting to detect the isoforms. Similar

protein amounts were loaded on the gels. Four actin polypeptides were detected initially (Fig. 5 A-A') followed by an increase in the expression of these isoforms and the appearance of either newly expressed ones or an increase of previously undetectable ones. Thus, at least seven isoforms were detected at the end of 48 h (Fig. 5 B-B' and C-C'). At 72 h post-imbibition, a significant shift in the actin isoform expression was detected and this pattern was sustained until the last time point analyzed (Fig. 5 D-D' and E-E') but an overall increase was still observed. This behavior could be related to the morphological changes in maize seedlings such as active root expansion which is known to be concomitant with cell division and morphogenetic processes at those later stages of germination (Bewley and Black, 1994).

Discussion

The seed has different tissues that will provide different functions once germination is initiated. For example, the reserve tissue will be degraded during germination and most of its contents will be used by the embryo for growth. The embryo on the other hand, will utilize the nutrients coming from this pool, in order to grow and develop the photosynthetic machinery that will allow it to reach autotrophy, and thus, become a new plant. The analysis of the total amount of actin in different seed tissues reflected to some extent the dynamics that the particular tissue undergoes during germination. The amount of actin in extracts from different parts of *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris* (Fig. 1A and 1B) was different depending on tissue type and species. The reserve tissue showed the most distinctive features (Fig. 1B, lanes 2 and 4). We were unable to detect the presence of actin in cotyledons of *P. vulgaris* even when a high sensitivity method such as chemiluminescence was used (Fig. 1B, lane 4). At similar protein amounts loaded on the gels, actin, although not very abundant, was detectable in all the seed reserve tissues of maize (Fig. 1B, lane 2 and Fig. 2, lanes 3 and 4). The presence of actin in these maize reserve tissues may be necessary for the assembly of the reserve stores. Clore et al. (1996) showed that in the endosperm of *opaque-2* maize, there are actin microfilaments that co-localize with eF1 α . They propose that this array allows the assembly of the protein bodies during seed maturation.

The scutellum showed more actin than the endosperm but much less than the embryo (Fig. 2, lanes 2-4). This tissue represents a modified cotyledon with specific functions of enzyme secretion and nutrient transport that travels from the reserve tissue

to the growing embryo (Bewley and Black, 1994). It is conceivable that cytoskeletal components are necessary for active plasmodesmatal and/or exocytotic transport that might occur during these events (Bewley and Black, 1994; Boevink et al., 1998; Radford and White, 1998; Battey et al., 1999; Hawes et al., 1999; Kost et al., 1999). On the other hand, when the embryo axis tissue was analyzed in *P. vulgaris* and *Z. mays*, actin was readily detectable in both seed species (Fig. 1, lanes 3 and 5). This data was consistent with the view that the embryo will require highly dynamic processes in which actin has fundamental roles once germination is triggered.

We observed a dramatic increase of actin expression at the protein and mRNA levels in common bean which occurred after 48 h post-imbibition (Villanueva et al. 1999). On the contrary, the time-course analysis of the expression of actin in the maize embryo axis showed that there is a moderate but steady induction of this expression at the protein level that occurs at 24 h post-imbibition (Fig. 3, lanes 3-7). At the mRNA level there is a moderate increase at 48 h post-imbibition (Fig. 4, 0-96 h post-imbibition), but the maize actin mRNA was present at well detectable amounts in the dry seed embryo (Fig. 4, 0 h). In addition, there appears to be a second increase after 96 h (Fig. 4, 72-96 h). The first increase might reflect the requirement for newly synthesized actin isoforms after most of the initial actin and mRNA for the early stages of germination has been used. The second increase may reflect more the onset of a differential expression required when differentiation of plant tissues has begun. This is consistent with the shift in the isoform pattern observed at 72 h post-imbibition (Fig. 5 C-C' and D-D'), just previous to this time point (see below).

The two-dimensional analysis of the actin isovariant composition (Fig. 5) at

several time points post-imbibition indicate that: (a) only four actin isoforms are initially detected in the dry maize embryo; (b) after 24-48 h post-imbibition, there is an increase in the expression of these isoforms which results in the appearance of either newly expressed ones, or an increase of previously undetectable ones. At least seven isoforms are detected at the end of this time point; (c) after 72 h there appears to be a different isoform pattern with eight isoforms which may reflect either differential expression at this time, or the decrease in the expression of particular ones; and (d) at the end of a 96 h period post-imbibition, the eight isoforms are still detected but an overall increase compared to the earlier time points is evident. A comparison of this expression pattern with our previously reported data (Villanueva et al., 1999) revealed that, unlike *P. vulgaris* where the increase in the actin expression was the consequence of two main isoforms, the increase in maize appears to be due to both number and quantity of all the expressed isoforms. In addition, the pI range of the maize actin isoforms was similar to those previously reported for common bean (Villanueva et al., 1999) and soybean (McLean et al., 1990). The complex actin isoform pattern encountered in maize may reflect the versatile functions of the actin cytoskeleton at those later stages of germination in this monocot. The occurrence of at least eight isoforms is consistent with the eight copies of actin genes present in the *Z. mays* genome (Moniz de Sá and Drouin, 1996). Several scenarios to explain the existence of complex gene families in angiosperms have been suggested (Meagher et al., 1991; Moniz de Sá and Drouin, 1996). One attractive hypothesis is that the increase in complexity would have arisen in parallel with an increase in morphological development (Meagher et al., 1991). This hypothesis is further supported by recent

evidence that shows a differential expression of actin in different tissues of *Arabidopsis thaliana* (An et al., 1996; Huang et al., 1996, 1997). At 72 h post-imbibition (Fig. 5), significant morphological changes begin to occur in maize seedlings such as active main root elongation, coleoptile expansion and developing of secondary roots. Therefore, this hypothesis would also be consistent with our view that some of the increase in actin expression in the maize seedling may reflect differential expression that accompanies cell division and differentiation.

Our results suggest that both qualitative and quantitative changes are seen in actin expression during the germination process of maize that might be correlated with morphological changes in seedling development. Future work will focus on the analysis of tissue specificity of the various isoforms and on establishing the significance of these observations at the gene level for root and shoot differentiation during the establishment of the seedling.

This study was supported by grant IN-201696 and IN-230399 from DGAPA-UNAM. Claudia Díaz was partially supported by a scholarship from DGAPA-UNAM and by grant IN-230399 . We thank Ms. Theresa A. Musket (University of Missouri, Columbia, USA) for providing the maize actin clone 5C01H03. We thank Dr. Federico Sánchez for providing some of the reagents used in this study. The photographic work of Sergio Trujillo is also acknowledged.

References

- An Y-Q, Huang S, McDowell JM, McKinney EC, Meagher RB (1996) Conserved expression of the Arabidopsis *ACT1* and *ACT3* actin subclass in organ primordia and mature pollen. *Plant Cell* 8: 15-30.
- Batley N, James N, Greenland A, Brownlee C (1999) Exocytosis and endocytosis. *Plant Cell* 11: 643-659.
- Berrie A (1985) Advanced plant physiology. In: Wilkins M (ed) Germination and dormancy. 1st Ed. PITMAN Publish Inc USA pp 440-444.
- Bewley JD, Black M (1994) Seeds. Physiology of development and germination. In: Cellular events during germination and seedling growth. 2nd Ed. Plenum Press, New York, USA pp 147-195.
- Boevink P, Oparka K, Santa Cruz S, Martin B, Betteridge A, Hawes C (1998) Stacks on tracks: The plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J* 15: 441-447.
- Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995.
- Cleary AL (1995) F-actin redistributions at the division sites in living *Tradescantia* stomatal complexes as revealed by microinjection of rhodamine-phalloidin. *Protoplasma* 185: 152-165.
- Clore AM, Dannenhoffer JM, Larkins BA (1996) EF-1 α is associated with a cytoskeletal network surrounding protein bodies in maize endosperm cells. *Plant Cell* 8: 2003-2014.

de Vries S, Hoge H, Bisseling T (1991) Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. In: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (eds) Plant molecular biology manual, vol 86. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 1-13.

Hawes CR, Brandizzi F, Andreeva AV (1999) Endomembranes and vesicle trafficking. *Curr Opin Plant Biol* 2: 454-461.

Huang S, An Y-Q, McDowell JM, McKinney EC, Meagher RB (1996) The *Arabidopsis* *ACT4/ACT12* actin gene subclass is strongly expressed in post-mitotic pollen. *Plant J* 10: 189-202.

Huang S, An Y-Q, McDowell JM, McKinney EC, Meagher RB (1997) The *Arabidopsis* *ACT11* actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, developing ovules, and pollen. *Plant Mol Biol* 33: 125-139.

Kim M, Hepler PK, Eun S-O, Ha KS, Lee Y (1995) Actin filaments in mature guard cells are radially distributed and involved in stomatal movement. *Plant Physiol* 109: 1077-1084.

Kost B, Mathur J, Chua N-H (1999) Cytoskeleton in plant development. *Curr Opin Cell Biol* 2: 462-470.

Kost B, Pius S, Chua N-H (1998) A GTP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments *in vivo* and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *The Plant J* 16: 393-401.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Li H, Lin Y, Heath RM, Zhu MX, Yang Z (1999) Control of pollen tube tip growth by a rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell* 11: 1731-1742.

McCurdy DW, and Williamson RE (1991) Actin and actin-associated proteins. In: Lloyd CW (ed) *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. Academic Press, New York, pp 1-14.

McLean BG, Eubanks S, Meagher RB (1990) Tissue-specific expression of divergent actins in soybean root. *Plant Cell* 2: 335-344.

Meagher RB (1991) Divergence and differential expression of actin gene families in higher plants. *Int Rev Cytol* 125: 139-163.

Meagher RB, McKinney EC, Kandasamy MK (1999) Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family. *Plant Cell* 11:995-1005.

Moniz de Sá M, Drouin G (1996) Phylogeny and substitution rates of angiosperm actin genes. *Mol Biol Evol* 13: 1198-1212.

O'Farrell PM (1975) High resolution two dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* 250: 4007-4021.

Radford JE, White R G (1998) Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *The Plant J* 14: 743-750.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sinclair J, Rickwood D (1981) Two dimensional gel electrophoresis. In: Hames BD, and Rickwood D (eds) Gel electrophoresis of proteins. IRL Press, Washington DC, pp 189-218.

Towbin J, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354.

Villanueva MA, Campos F, Díaz C, Colmenero-Flores JM, Dantán E, Sánchez F and Covarrubias A A (1999) Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. Planta 207: 582-589.

Villanueva MA, Ho S-Ch, Wang JL (1990) Isolation and characterization of one isoform of actin from cultured soybean cells. Arch Biochem Biophys 277: 35-41.

Yang Z (1998) Signaling tip growth in plants. Curr Opin Plant Biol 1: 525-530.

Zhang D, Wadsworth P, Hepler PK (1993) Dynamics of microfilaments are similar, but distinct from microtubules during cytokinesis in living, dividing plant cells. Cell Motil Cytoskeleton 24: 151-155.

Figure legends

Figure 1. Immunodetection of actin in *P. vulgaris* and *Z. mays* seeds by western immunoblotting with anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies. (A) A 10% Coomassie Brilliant Blue-stained gel of total protein extracts from embryo axes (lane 3) and endosperms (lane 2) of *Z. mays* or embryo axes (lane 5) and cotyledons (lane 4) of *P. vulgaris* dissected from the seeds showing a uniform protein loading ($\approx 50 \mu\text{g}$). Molecular weight markers are included in lane 1. (B) Western immunoblotting showing the 42-kDa actin band only in the positive rabbit-muscle control (lane 1), maize endosperm (lane 2), maize embryo axis (lane 3) and bean embryo axis (lane 5) extracts, but not in bean cotyledon extracts (lane 4).

Figure 2. Actin distribution in different parts of *Z. mays* seeds by western immunoblotting analysis with anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies. The seeds were separated into embryo axes, cotyledons and endosperm tissues, and extracts from each were prepared as described in materials and methods. Equivalent amounts of protein ($\approx 50 \mu\text{g}$) were loaded in lanes 2-4. The 42-kDa actin band was readily detected in the rabbit-muscle positive control (lane 1), embryo axes (lane 2) and cotyledons (or scutellum) (lane 3). A lighter but detectable signal was observed in lane 4, which corresponds to the endosperm tissue.

Figure 3. Time-course analysis of actin expression during germination of embryo axes of *Z. mays* as shown by western immunoblotting with anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies. The corresponding embryos were powdered and extracted as described in materials and methods. (A) Protein profile obtained on a 10% polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant Blue. Equivalent amounts of protein ($\approx 30 \mu\text{g}$) were loaded in lanes 3-7. Molecular weight markers were included in lane 1. Actin obtained from rabbit muscle is shown in lane 2. (B) Western immunoblotting detected the 42-kDa actin band from the first time point (lane 3, 0 h post-imbibition) and its steady increase throughout the time of the analysis (lane 4, 24 h; lane 5, 48 h; lane

6, 72 h; and lane 7, 96 h post-imbibition).

Figure 4. Northern blot analysis of actin mRNA from embryo axis of *Z. mays* throughout the germination process. For northern blots, total RNA was prepared from frozen powdered material according to materials and methods. Eight μg of total RNA were run in each lane. Blots were hybridized with *Z. mays* actin cDNA from clone 5C01H03. (A) Analysis at 0, 24, 48, 72 and 96 h after imbibition. (B) Equal loading of total RNA per lane was checked by fluorescence under UV light of ribosomal RNAs on the blot, previously stained on the gel with ethidium bromide.

Figure 5. Isoform composition of actin in *Z. mays* seedlings at different time points after imbibition. The presence of actin isoforms in the seedlings at 0, 24, 48, 72 and 96 h after imbibition was analyzed by 2D-PAGE according to O'Farrell (1975) and detected by western immunoblotting using anti-(calf thymus actin) polyclonal antibodies. Interpretative diagrams which include the spot shape and size of the isoforms at each time point are also shown (A'-E'). The developmental stage of the seedling is drawn for each time point at the right of the figure.

Figure 1.

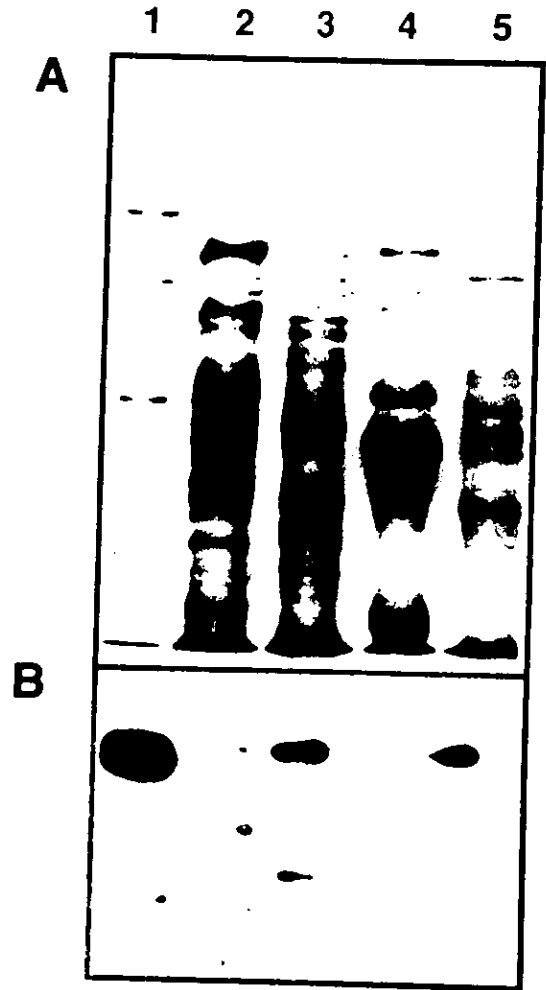


Figure 3.

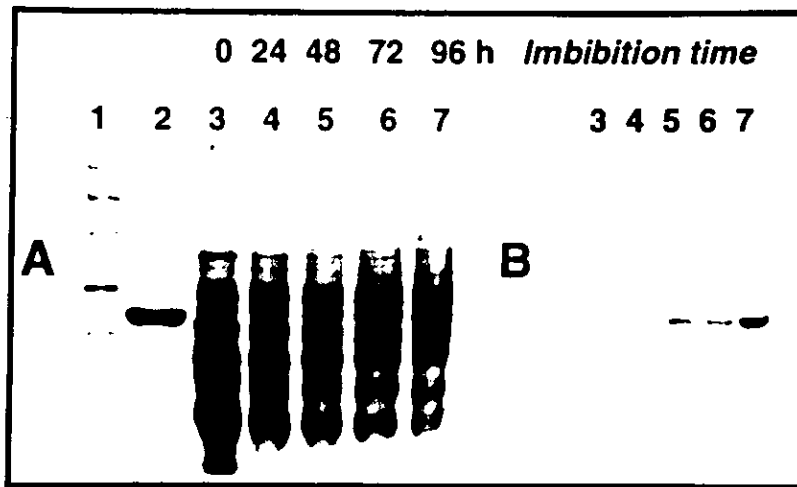


Figure 4.

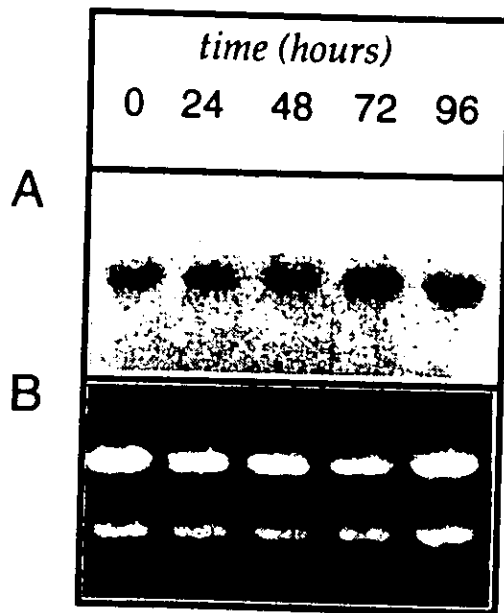
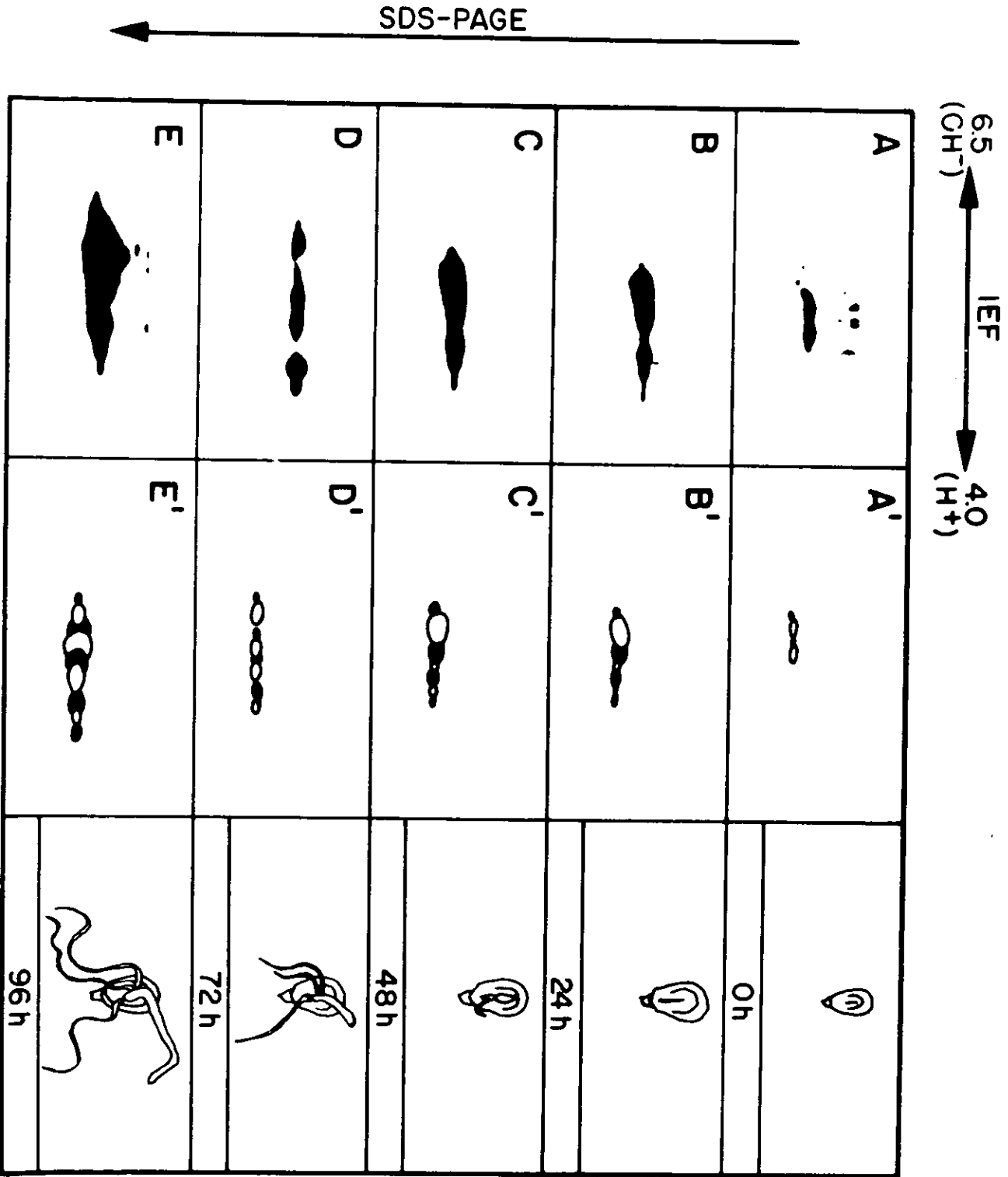


Figure 5.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Previos estudios han demostrado que los microfilamentos y los microtúbulos estructuran una red citoplásmica que estabiliza las características espaciales de la célula y que controla su polaridad durante el desarrollo. Asimismo, se ha sugerido que ambos tipos de filamentos participan durante la movilidad intracelular, la comunicación célula-célula y la expansión celular. Mientras que los microtúbulos generalmente juegan un papel estructural en los distintos procesos antes señalados, los microfilamentos frecuentemente intervienen en procesos dinámicos y en rearrreglos estructurales.

La reorganización de los filamentos de actina se encuentra regulado a distintos niveles y por un gran número de parámetros fisiológicos entre los que se incluyen la diferencia en la concentración de sales, el rango adecuado de pH y la presencia de una gran variedad de proteínas capaces de interactuar con la actina (ó ABPs). A la fecha, solo algunas de estas proteínas han sido identificadas en plantas vasculares y se desconoce gran parte de su función en la dinámica del citoesqueleto de actina. La mayoría de los estudios fisicoquímicos llevados a cabo con las ABPs de origen vegetal han utilizado a la actina animal como contraparte (Calvert *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1997; Ballweber *et al.*, 1998). Sin embargo, es posible que pequeñas variaciones en la secuencia de los sitios interactivos entre los ligandos heterólogos pudieran provocar interpretaciones erróneas de los resultados que así se obtengan.

La actina se ha purificado a partir de células de eucariontes por una combinación de métodos que incluyen ciclos de ensamblaje y desensamblaje de actina, intercambio aniónico, filtración en gel y cromatografía de afinidad con profilina o con DNasa I (Sheterline and Sparrow, 1995). Debido al bajo contenido de actina y a la alta actividad de proteasas en tejidos vegetales, los ciclos de ensamblaje y

desensamblaje de actina, el intercambio aniónico y la filtración en gel no son técnicas aplicables. Aunado a esto, los estudios que describen el aislamiento y la purificación de actina a partir de plantas superiores mediante el uso de cromatografía de afinidad no solo son limitados (Meagher and Williamson, 1994), sino parcialmente exitosos (Villanueva *et al.*, 1990; Andersland and Parthasarathy, 1993; Ren *et al.*, 1997).

Los resultados descritos en el trabajo titulado "Purification of multiple functional leaf-actin isoforms from *Phaseolus vulgaris* L." (Biochemical Journal (1999) 343: 597-60) incluido en este trabajo de tesis, señalan que, mediante el esquema de purificación utilizado, fue posible aislar y enriquecer a las ocho distintas isoformas de actina en estado funcional, lo cual se demostró por medio de ensayos de unión a distintas ABPs y a la faloidina y por ensayos de co-polimerización *in vitro*.

La enzima DNasa I forma un complejo de alta afinidad con distintos tipos de actina. Este hecho se debe a que el sitio de unión a esta enzima entre las actinas se encuentra altamente conservado a lo largo de la escala evolutiva (Sheterline and Sparrow, 1995). El utilizarla como ligando de selección en el sistema de cromatografía de afinidad permite el aislamiento de la actina a partir del extracto crudo en un solo paso, evitando de esta forma la exposición prolongada de esta proteína a las proteasas que normalmente se encuentran en los tejidos vegetales (Figura 1). Si bien es cierto que dicho método ha sido utilizado en estudios previos (Garrels and Gibson, 1976; Maekawa *et al.*, 1984; Villanueva *et al.*, 1990; Andersland and Parthasarathy, 1993), en plantas no se había documentado el aislamiento de distintas isovariantes de actina. En este trabajo fuimos capaces de enriquecer y de aislar por vez primera todas las isoformas de actina en estado funcional originalmente presentes en el tejido foliar de *P. vulgaris*, lo cual se confirmó por geles de isoelectroenfoque seguidos por ensayos tipo *western* (Figura 2), por ensayos de unión a dos distintas ABPs (Figura 3) y por ensayos de polimerización *in vitro* (Figuras 4 y 5). Este procedimiento para el aislamiento de la actina vegetal proporciona ventajas importantes, como son: a) Permite un incremento significativo en la detección de la composición de isovariantes

de actina presentes en el tejido vegetal; b) Minimiza la degradación de la actina por la actividad de proteasas; c) Las isovariantes recuperadas son funcionales; y d) Es aplicable a distintos tejidos vegetales, incluso de otras especies.

Por otro lado, la semilla en plantas angiospermas se caracteriza por la presencia de diversos tejidos cuya función se encuentra estrechamente relacionada durante el proceso de germinación. La multiplicidad de eventos que se llevan a cabo de manera coordinada durante este proceso permite el desarrollo inicial y el establecimiento de la plántula a partir de las reservas acumuladas en los tejidos de almacenamiento.

Se ha propuesto la participación del citoesqueleto de actina en procesos vegetales tales como el establecimiento de la polaridad, la determinación de la localización del plano de división, la programación del desarrollo y la deposición de la pared vegetal, la expansión polar y "de punta", la localización de receptores y el transporte a través de la membrana celular, el transporte de vesículas y de diversos mRNAs dentro de la célula, la corriente citoplásmica y en la orientación de algunos organelos (Meagher *et al.*, 1999). La mayoría de estos eventos, si no todos, deben formar parte del evento germinativo. Siguiendo esta premisa, decidimos estudiar el comportamiento de actina durante la germinación en una planta monocotiledónea (*Zea mays*) y en una dicotiledónea (*Phaseolus vulgaris*) con el objeto de comparar ambos resultados.

Los datos obtenidos sugieren que la cantidad total de actina en los distintos tejidos de las semillas maduras analizadas de alguna manera refleja su función durante la germinación. En ambos casos, la actina se localiza preferentemente en el eje embrionario (Villanueva *et al.*, 1999, Fig. 2B y Díaz-Camino and Villanueva, Fig. 1 y 2 en este trabajo de tesis) lo cual concuerda con el hecho de que es justamente éste quien dará origen a un nuevo organismo, por lo que requiere de la maquinaria necesaria para efectuar procesos dinámicos de transporte en los que el citoesqueleto de actina se encuentra necesariamente involucrado (Meagher *et al.*, 1999).

En este estudio, los tejidos de reserva muestran las características más distintivas en cuanto a la especie se refiere. A pesar del uso de sistemas de detección altamente sensibles (como es el caso del método de detección conjugado a quimioluminiscencia) fuimos incapaces de detectar la presencia de actina en extractos obtenidos a partir de cotiledones de *P. vulgaris* (Díaz-Camino and Villanueva, Fig. 1B en este trabajo de tesis). Este hecho no se debe a la degradación de actina durante el proceso de extracción, ya que a este nivel de desarrollo las semillas de *P. vulgaris* no presentan actividad significativa de proteasas y aunque así fuera, el método de extracción prevee la inactivación de las mismas. Sin embargo, a concentraciones similares de proteína total, la actina se detectó tanto en el escutelo como en el endospermo de *Z. mays* (Díaz-Camino and Villanueva, Fig. 2 en este trabajo de tesis).

El escutelo en la semilla de maíz es el cotiledón modificado cuyas funciones principales durante la germinación son la secreción de enzimas, la absorción de nutrientes parcialmente digeridos a partir del endospermo y su eventual transporte al embrión en desarrollo (Berrie, 1985; Moore *et al.*, 1998). El transporte de dichos nutrientes bien pudiera llevarse a cabo a través de los plasmodesmos o por endocitosis durante el transcurso de la germinación. De hecho, se ha sugerido que ambas vías de comunicación dependen del citoesqueleto de actina (Bewley and Black, 1994; Boevink *et al.*, 1998; Radford and White, 1998; Battey *et al.*, 1999; Kost *et al.*, 1999), lo cual explicaría su persistencia en la semilla madura. Por otro lado, la presencia de actina en el endospermo de maíz pudiera ser necesaria para la participación de los microfilamentos en la deposición y el ensamblaje de los cuerpos de almacenamiento de proteínas en este tejido durante la embriogénesis (Clare *et al.*, 1996) cuya composición básica se mantiene durante el período de dormancia y se detecta de manera residual en la semilla madura.

El patrón de activación y de desactivación de genes que codifican para actina y tubulina durante los procesos de germinación y el desarrollo de la plántula ha sido analizado por distintos grupos de investigación en años recientes (Montoliu *et al.*,

1989; McLean *et al.*, 1990 a; Han *et al.*, 1991; Carpenter *et al.*, 1992; An *et al.*, 1996; McDowell *et al.*, 1996; Vassilevskaia *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1998; Uribe *et al.*, 1998; entre otros). A este nivel, los resultados obtenidos indican que ambas proteínas inducen diferencialmente su expresión durante el proceso germinativo, hecho que pone de manifiesto su relevancia dentro de los distintos eventos que lo conforman.

Con el objeto de corroborar esta hipótesis, decidimos estudiar la expresión de actina durante la germinación en el tejido embrionario de *P. vulgaris* y de *Z. mays*. Cuando llevamos a cabo el análisis de la expresión de esta proteína en *P. vulgaris* encontramos que, efectivamente, su expresión se induce moderadamente durante las primeras 24 h, tras lo cual la inducción de actina se acentúa notablemente (Villanueva *et al.*, 1999, Fig. 4 en este trabajo de tesis). Los valores densitométricos obtenidos indican un incremento en la concentración total de actina de 2 veces en embriones de 24 h y de 5 veces en embriones de 72 h con respecto a la concentración inicial. Por otra parte, los estudios efectuados en *Z. mays* muestran un inducción moderada de la expresión de actina después de las 48 h seguida de un segundo incremento después de las 72 h (Díaz-Camino and Villanueva, Fig. 3 en este trabajo de tesis). Tanto en *P. vulgaris* como en *Z. mays*, el comportamiento observado a nivel de mRNA es totalmente coincidente con el determinado a nivel de proteína (Villanueva *et al.*, 1999, Fig. 5 A-B y Díaz-Camino and Villanueva, Fig. 4 en este trabajo de tesis).

Se ha mencionado con anterioridad que los eventos tempranos que se llevan a cabo durante la germinación se asocian inicialmente con la conversión, movilización y transporte de los nutrientes almacenados en los tejidos de reserva hacia los tejidos en franca expansión celular, mientras que los eventos tardíos incluyen procesos activos de extensión y de división celular que dan lugar a la organización estructural de los diversos órganos vegetales.

Posiblemente en *P. vulgaris* los arreglos de actina establecidos durante la embriogénesis se preservan en el período de dormancia. Durante los eventos

tempranos de la germinación, esta proteína pudiera ser re-utilizada para la estructuración de sistemas involucrados en la expansión celular y en el transporte de nutrientes en el embrión. Esta propuesta concuerda con los resultados obtenidos en ensayos tipo *northern* (Villanueva *et al.*, 1999, Fig. 5 A-B en este trabajo de tesis), en los que se evidencia una baja concentración de mRNA de actina en las primeras 24 h del evento germinativo a pesar de las considerables cantidades de la proteína detectada en ensayos tipo *western* a tiempos similares (Villanueva *et al.*, 1999, Fig. 4 en este trabajo de tesis). Por otro lado, la composición de isovariantes no cambia ($pI \approx 5.6, 5.7$ y 5.8), y solo aumenta moderadamente su expresión (Villanueva *et al.*, 1999, Fig. 6 en este trabajo de tesis). Sin embargo, a partir de las 48 h se detecta un incremento considerable tanto en la concentración total de actina como del mRNA (Villanueva *et al.*, 1999, Fig. 4, 5 A-B en este trabajo de tesis). La composición de isoformas señala cambios en el patrón de expresión (Villanueva *et al.*, 1999, Fig. 6 en este trabajo de tesis). Dentro de las primeras 48 h, se induce la expresión de la isovariante que se localiza en el extremo ácido ($pI \approx 5.5$), mientras que en el resto se detecta un aumento global. A partir de las 72 h, disminuye la concentración de la isoforma más básica del conjunto ($pI \approx 5.8$) y desaparece totalmente la isovariante situada en el extremo ácido (Villanueva *et al.*, 1999, Fig. 6 en este trabajo de tesis). Esto podría indicar que ciertas isovariantes son de expresión transitoria y son utilizadas para eventos tempranos específicos durante la germinación.

Es importante mencionar que los pI s determinados para las isoformas en el frijol se encuentran dentro del rango de los pI s descritos para la soya (*Glycine max*), una especie estrechamente relacionada a éste. Además, el número de genes que codifican para actina en el genoma de ambas especies es aproximadamente de seis (McLean *et al.*, 1990 a; Dantán *et al.* Comunicación personal). Lo anterior pudiera sugerir una expresión equivalente de actina durante el estado vegetativo, donde cada una de las isoformas se encuentra codificada por un gen diferente, aunque no podemos descartar la posibilidad de que la actina en frijol también se encuentre regulada por modificaciones post-traduccionales.

Meagher *et al.* (1991) proponen que la complejidad de la familia génica en angiospermas se ha generado a la par con el desarrollo morfológico. Dentro de este marco, los datos del estudio del comportamiento de actina durante la germinación de *P. vulgaris*, sugieren que las isoformas que se presentan de manera constitutiva (pl ≈ 5.6 y 5.7) pudieran participar en eventos que se sostienen a lo largo del proceso germinativo, como el crecimiento polar. Por otro lado, las isovariantes que se expresan transitoriamente coinciden con la formación de pelos radiculares, con la expansión de la radícula y con la formación de raíces laterales. Si bien es cierto que la extensión celular se activa una vez que se inicia la germinación, los procesos de diferenciación y de morfogénesis son, de hecho, eventos tardíos.

Adicionalmente, los resultados obtenidos a partir del estudio de la germinación en *Z. mays* muestran que la mayoría de la actina y del mRNA necesarios en los eventos tempranos de la germinación se encuentran presentes en el embrión, lo cual sugiere un requerimiento continuo de actina a lo largo del proceso (Díaz-Camino and Villanueva, Fig. 3 y 4 en este trabajo de tesis). El primer incremento detectado en la expresión de esta proteína se efectúa a las 48 h, tiempo que coincide con la emergencia de la radícula a través de la cubierta de la semilla. La composición de isovariantes a tiempos similares, comparadas con el tiempo inicial, indica un aumento tanto en la concentración total como en el número de isoformas llegando a un máximo de siete (Díaz-Camino and Villanueva, Fig. 5 A-C y A'-C' en este trabajo de tesis). Es importante mencionar que, a diferencia de los datos obtenidos en *P. vulgaris*, en este modelo de estudio los incrementos manifestados entre los tiempos de análisis fueron siempre moderados. A partir de las 72 h el patrón de expresión se modifica notablemente y se sostiene hasta el término del ensayo (Díaz-Camino and Villanueva, Fig. 5 D-E y D'-E' en este trabajo de tesis). Conforme dicho proceso se desarrolla, se detecta la presencia de al menos dos isovariantes más que se añan al complejo previo, y se induce el aumento del conjunto durante los últimos tiempos analizados. Este comportamiento concuerda con la expansión activa del coleóptilo y de la radícula y con la formación de raíces adventicias, por lo que la inducción

diferencial de isoformas pudiera estar relacionada con procesos de división y de diferenciación celular, los cuales son eventos característicos de la germinación tardía.

A diferencia de *P. vulgaris* en el que el aumento en la cantidad total de actina se debe fundamentalmente al incremento en la expresión de las dos isoformas mayoritarias, el aumento de actina en *Z. mays* se relaciona tanto con el número de isovariantes expresadas como con la concentración de cada una de ellas. El complejo patrón que se evidencia en *Z. mays* pudiera reflejar funciones más versátiles del citoesqueleto de actina en estados tardíos de la germinación en esta monocotiledónea. La presencia de ocho isoformas distintas es consistente con las ocho copias de genes que codifican para esta proteína en el genoma de maíz (Moniz de Sá and Drouin, 1996). Sin embargo, al igual que para *P. vulgaris*, existe la posibilidad de que el número de isoformas determinadas en ambos estudios se deban no solo a la expresión diferencial de la familia génica sino a modificaciones químicas efectuadas tras la síntesis de la proteína. Si bien este proceso ha sido previamente documentado (Aktories and Wegner, 1992; Jungbluth *et al.*, 1995; Gauthier *et al.*, 1997), no fue determinado en este trabajo y será el objetivo de un estudio posterior.

Se ha demostrado que la expresión de algunos de los genes que codifican para las diversas isovariantes de actina en plantas vasculares presentan patrones temporales y espaciales específicos (An *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996b; McDowell *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997). Sin embargo, la expresión de muchos de ellos se traslapa entre sí (Meagher *et al.*, 1999).

En el caso de actina, la pregunta de cómo la estructura determina la función ofrece un reto particular. Se han hecho considerables esfuerzos para entender como las distintas isoformas cubren las distintas funciones aún a pesar de su muy alta identidad en secuencia. Estos estudios enfatizan la importancia de la geometría del filamento y la flexibilidad conformacional en la definición de las interacciones entre la actina y las proteínas de unión a actina (Chik *et al.*, 1996; McGough *et al.*, 1997), quienes en

última instancia regulan el comportamiento del citoesqueleto de actina (Gibbon *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997a y b; Staiger *et al.*, 1997; Theriot, 1997; Ballweber *et al.*, 1998; Didry *et al.*, 1998; Yokota *et al.*, 1998).

Se han generado distintas propuestas para explicar la existencia de las complejas familias génicas en angiospermas (Meagher *et al.*, 1991; Moniz de Sá y Drouin, 1996). El grupo de Moniz de Sá y Drouin (1996) apunta que la evolución de la actina en angiospermas ha estado sujeta a condiciones selectivas más laxas con respecto a organismos animales, posibilitando así eventos de duplicación y de sustitución génica relativamente altos. Si esto fuera cierto ¿Por qué se han sostenido dichos cambios en la historia biológica?

Una posible respuesta es ofrecida por Meagher *et al.* (1999) Los autores sugieren que la co-expresión de isovariantes de actina en el mismo tipo celular, pudiera resultar en un comportamiento más dinámico. Esto es, si cada una de estas isoformas fuera funcionalmente distinta, al menos en una actividad (por ejemplo, la unión específica a un sustrato, a un cofactor y/o a interacciones con otras proteínas), la expresión de múltiples isovariantes de actina proveería a las células vegetales de una extraordinaria flexibilidad en cuanto a su capacidad de respuesta a estímulos externos, lo que provocaría cambios en la estructura del citoesqueleto y, en consecuencia, en la arquitectura celular.

LITERATURA CITADA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts K. and Watson, J. D. (1989) Molecular biology of the cell. 2nd Edition. *Garland Publishing Inc.* pp 613-680.

Bork, P., Sander, C. and València, A. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7290-7294.

Braam, J. (1999) If walls could talk. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 521-524.

Braun, M., Baluska, F., von Witsch, M. and Menzel, D. (1999) Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. *Planta* **209**: 435-443.

Cárdenas, L., Feijó, J. A. Kunkel, J. G., Sánchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P. K. and Quinto, C. (1999) *Rhizobium* Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant J.* **19**: 347-352.

Carpenter, L. J., Ploense, S. E., Snustad, D. P. and Silflow C. D. (1992) Preferential expression of an α -tubulin gene of Arabidopsis in pollen. *Plant Cell* **4**: 557-571.

Chik, J. K., Lindberg, U. and Shutt, C. E. (1996) The structure of an open state of β -actin at 2.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **263**: 607-623.

DeNofrio, D., Hooek, T. C. and Herman, J. M. (1989) Functional sorting of actin isoforms in microvascular pericytes. *J. Cell Biol.* **109**: 191-202.

- Didry, D., Carlier, M-F. and Pantaloni, D. (1998) Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin is increasing actin filament turnover. *J. Biol. Chem.* **273**: 25602-25611.
- Esau, K. (1977) The seed in: Anatomy of seed plants. 2nd Ed. *Wiley & Sons, Inc. N. Y.* pp 455-473.
- Fischer, K. and Schopfer, P. (1998) Physical strain-mediated microtubule reorientation in the epidermis of gravitropically or phototropically stimulated maize coleoptiles. *Plant J.* **15**: 119-123.
- Franklin-Tong, V. E. (1999) Signaling in pollination. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 490-495.
- Fyrberg, E. A., Fyrberg, C. C., Biggs, J. R., Saville, D., Beall, C. J. and Ketchum, A. (1998) Functional nonequivalence of *Drosophila* actin isoforms. *Biochem. Genet.* **36**: 271-287.
- Gandolfo, M. A., Nixon, K. C., Crepet, W. L., Stevenson, D. W. and Friis, E. M. (1998) Oldest known fossils of monocotyledons. *Nature*, **394**: 532-533.
- Gauthier, M. L., Lydan, M. A., O`day, D. H. and Cotter, D. A. (1997) Endogenous autoinhibitors regulate changes in actin tyrosine phosphorylation during *Dictyostelium* spore germination. *Cell Signal* **9**: 79-83.
- Gibbon, B. C., Ren, H. and Staiger, C. J. (1997) Characterization of maize (*Zea mays*) pollen profilin function *in vitro* and in live cells. *Biochem. J.* **327**: 909-915.
- Gibbon, B. C., Zonia, L. E., Kovar, D. R., Hussey, P. J. and Staiger, C. J. (1998) Pollen profilin function depends on interaction with proline-rich motifs. *Plant Cell* **10**: 981-993.

Gunning, P., Mohun, T., Ng, S., Ponte, P. and Kedes, L. (1984) Evolution of the human sarcomeric-actin genes: Evidence for units of selection within the 3' untranslated regions of the mRNAs. *J. Mol. Evol.* **20**: 202-214.

Han, I-S., Jongewaard, I. and Fosket, D. E. (1991) Limited expression of a diverged β -tubulin gene during soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) development. *Plant Mol. Biol.* **16**: 225-234.

Hartwing, J. H. and Kwiatkowski D. J. (1991) Actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**: 87-97.

Hernández, L. F. and Green, G. B. (1993) Transductions for the expression of structural pattern: Analysis in sunflower. *Plant Cell* **5**: 1725-1738.

Hightower, R. C. and Meagher, R. B. (1986) The molecular evolution of actin. *Genetics* **114**: 315-332.

Huang, S., McDowell, J. M., Weise, M. J. and Meagher, R. B. (1996*b*) The Arabidopsis profilin gene family. *Plant Physiol.* **111**: 115-126.

Jiang, C-J., Weeds, A. G. and Hussey, P. J. (1997*a*) The maize actin-depolymerizing factor, ZmADF3, redistributes to the growing tip of elongating root hairs and can be induced to translocate into the nucleus with actin. *Plant J.* **12**: 1035-1043.

Kabsch W. and Vandekerckhove J. (1992) Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 49-76.

- Kislauskis, E. H., Li, Z., Singer, R. H. and Taneja K. L. (1993) Isoform-specific 3' untranslated sequences sort β -cardiac and β -cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J. Cell Biol.* **123**: 165-172.
- Kropf, D. L., Bisgrove, S. R. and Hable, W. E. (1998) Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 117-122.
- Lloyd, C. and Gunning, P. (1993) Noncoding regions of the G-actin gene influence the impact of the gene on myoblast morphology. *J. Cell Biol.* **121**: 73-82.
- Lynch, T. M. and Lintilhac, P. M. (1997) Mechanical signals in plant development: A new method for single cell studies. *Dev. Biol.* **181**: 246-256.
- Mannherz H. G. (1992) Crystallization of actin in complex with actin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **267**: 11661-11664.
- Mauseth, J. D. (1998) Botany. An introduction to plant biology in: Seed plants II: Angiosperms. 2nd Ed. *Jones & Bartlett Publish. Inc.* pp 703-733.
- McDowell, J., An, Y-Q., McKinney, E. C., Huang, S. and Meagher, R. B. (1996 *b*) Preferential expression of the *Arabidopsis ACT7* actin gene in developing tissues. *Plant Physiol.* **111**: 699-711.
- McElroy, D., Rothenberg, M., Reece, K. S. and Wu, R. (1990) Characterization of the rice (*Oryza sativa*) actin gene family. *Plant Mol. Biol.* **15**: 257-268.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W. and Weeds, A. (1997) Cofilin changes the twist of F-actin: Implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* **138**: 771-781.

- McKenna, N., Meigs, J. B. and Wang, Y. L. (1985) Identical distribution of fluorescently labeled brain and muscle actins in living cardiac fibroblast and myocytes. *J. Cell Biol.* **100**: 292-296.
- McLaughlin, P. J. (1995) Actin-binding protein complexes at atomic resolution. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**: 643-675.
- McNulty, A. K. and Saunders, M. J. (1992) Purification and immunological detection of pea nuclear intermediate filaments: evidence for plant nuclear lamins. *J. Cell Sci.* **103**: 407-414.
- Minguez, A. and Moreno D-E. S. (1993) Immunological characterization of lamins in the nuclear matrix of onion cells. *J. Cell Sci.* **106**: 431-439.
- Montoliu, L., Rigau, J. and Puigdomènech, P. (1989) A tandem of α -tubulin genes preferentially expressed in radicular tissues from *Zea mays*. *Plant Mol. Biol.* **14**: 1-15.
- Moore, R., Clark, W. D., Vodopich, D. S., Stern, K. R. and Lewis, R. (1998) Botany in: Reproductive morphology of flowering plants. 2nd Ed. *WCB/McGraw-Hill Inc. U.S.A.* pp 383-412.
- Mullins, R. D., Kelleher, J. F. and Pollard, T. D. (1996) Actin' like actin? *Trends Cell Biol.* **6**: 208-212.
- Muñoz, F. J., Labrador, E. and Dopico, B. (1998) Brassinolides promote the expression of a new *Cicer arietinum* β -tubulin gene involved in the epicotyl elongation. *Plant Mol. Biol.* **37**: 807-817.
- Pollard, T. D. (1986) Assembly and dynamics of the actin filament system in nonmuscle cells. *J. Cell Biochem.* **31**: 87-95.

- Puius, Y. A., Mahoney, N. M. and Almo, S. C. (1998) The modular structure of actin-regulatory proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 23-34.
- Rayle, D. L. and Cleland, R. E. (1992) The acid growth of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* **99**: 1271-1274.
- Rozycki, M. D., Myslik, J. C., Schutt, C. E. and Lindberg, U. (1994) Structural aspects of actin-binding proteins. *Curr. Biol.* **6**: 87-95.
- Smith, L. G. (1999) Divide and conquer: Cytokinesis in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 447-453.
- Sook, S. A., Möpps, B., Weber, K. and Bhattacharya, D. (1999) The origin and evolution of green algal and plant actins. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 275-285.
- Staiger, C. J., Gibbon, B. C., Kovar, D. R. and Zonia, L. E. (1997) Profilin and actin depolymerizing factor: Modulators of actin organization in plants. *Trends Plant Sci.* **2**: 275-281.
- Staiger, C. J., Goodbody, K. C., Huseey, P. J., Valenta, R., Drøbak, B. K. and Lloyd, C. W. (1993) The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant J.* **4**: 631-641.
- Theriot, J. A. (1997) Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **136**: 1165-1168.
- Thuleau, P., Schroeder, J. and Ranjeva, R. (1998) Recent advances in the regulation of plant calcium channels: Evidence for regulation by G-proteins, the cytoskeleton and second messengers. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 424-427.

- Traas, J., Bellini, C., Nacry, P., Kronenberger, J., Bouchez, D. and Caboche, M. (1995) Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature* **375**: 676-677.
- Uribe, X., Torres, M. A., Capellades, M., Puigdomènech, P. and Rigau, J. (1998) Maize α -tubulin genes are expressed according to specific patterns of cell differentiation. *Plant Mol. Biol.* **37**: 1069-1078.
- Vassilevskaia, T. D., Bekman, E., Jackson, P., Pinto, R. C. and Rodrigues-Pousada, C. (1996) Developmental expression and regulation by light of two closely related β -tubulin genes in *Lupinus albus*. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1185-1189.
- Wobus, U. and Weber, H. (1999) Seed maturation: genetic programmes and control signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**: 33-38.
- Yakota, E., Takahara, K. and Shimmen, T. (1998) Actin-bundling protein isolated from pollen tubes of lily. *Plant Physiol.* **116**: 1421-1429.
- Yu, W. and Moreno D-E. S. (1999) The plant nucleoskeleton: ultrastructural organization and identification of NuMA homologues in the nuclear matrix and mitotic spindle of plant cells. *Exp. Cell Res.* **246**: 516-526.
- Zigmond, S. H. (1998) Actin cytoskeleton: The Arp2/3 complex gets to the point. *Curr. Biol.* **8**: 654-657.