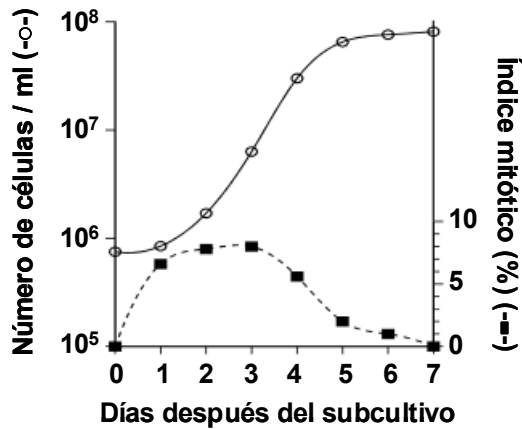


## RESULTADOS

### **1. Evolución de la actividad específica de la FALDH a lo largo de la curva de crecimiento de las células BY2.**

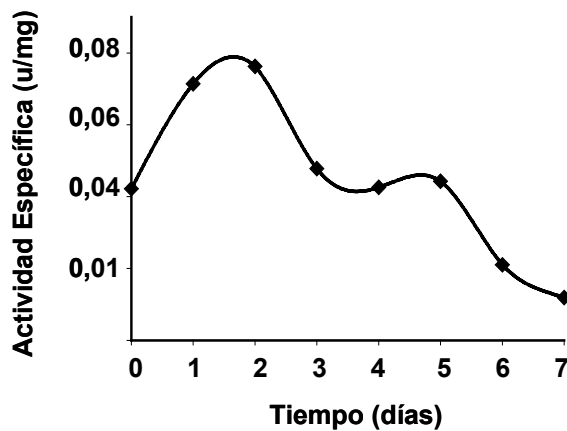
En la primera parte de nuestros estudios, utilizamos la línea celular de tabaco BY2 como sistema biológico para estudiar la respuesta de la FALDH a diferentes efectores. Seleccionamos las células BY2 por su facilidad de cultivo y porque es una línea celular frecuentemente utilizada en estudios de biología molecular y celular. El hecho de trabajar con un único tipo celular, frente a la multiplicidad de tipos celulares presentes en la planta entera de *Arabidopsis*, hace esperar una respuesta más homogénea.

En las condiciones de propagación descritas por Nagata et al., 1992, las células muestran una velocidad de crecimiento tal y como se representa en la Figura 7, de tal manera que en una semana se ha llegado a la saturación del cultivo. El índice mitótico máximo (5-8 %) se observa entre los días 1-4 después del subcultivo (Espunya et al., 1999).



**Figura 7.** Curva de crecimiento e índice mitótico de las células BY2. Las medidas fueron realizadas cada 24 horas. (Espunya et al., 1999).

La evolución de la actividad específica de la FALDH a lo largo de la curva de crecimiento puede observarse en la Figura 8. Es una curva bimodal, con dos picos de actividad situados en los días 2 y 5 respectivamente. Curiosamente, los dos picos observados en esta curva coinciden con los descritos por Nagata et al., 1992, en la curva que representa el número de plástidos por células durante el cultivo de las BY2. Esta coincidencia podría sugerir una posible localización plastídica de la FALDH dentro de la célula.



**Figura 8.** Actividad específica de la FALDH a lo largo de la curva de crecimiento de las células BY2. Las medidas fueron realizadas cada 24 horas.

Los experimentos que se relatan a continuación fueron realizados siempre con células en el día 2 de la curva de crecimiento, ya que era el punto donde se observaba el máximo de actividad específica de la FALDH y donde, además, las células se encontraban en crecimiento exponencial. Para cada tiempo de tratamiento se realizó un control, con el fin de eliminar el posible error en la variación de actividad de la FALDH con el tiempo, que se observa naturalmente en la curva de crecimiento de las células BY2.

## **2. Regulación hormonal de la FALDH.**

### **2.1 Respuesta de la FALDH al ácido salicílico (SA).**

El SA es un importante señalizador en la respuesta de defensa de las plantas. Cuando ocurre una infección por patógenos, se incrementan sus niveles endógenos, activando de esta forma muchos genes involucrados en la defensa de las plantas.

Se utilizó inicialmente una concentración de SA de 1 mM puesto que las concentraciones utilizadas por diferentes autores en la literatura oscilaban entre 50  $\mu$ M y 5 mM (Tenhaken y Rubell, 1997; Foodor et al., 1997; Pieterse et al., 1996; Rao et al., 1997). Observamos que las células BY2 se morían cuando eran tratadas con SA 1 mM durante 24 horas, por lo que decidimos realizar un estudio de viabilidad celular a diferentes concentraciones de SA. Después de incubar las células con SA, las muestras se teñían con Fluorescein diacetato (FDA) y se observaban al microscopio. El FDA es un colorante que penetra en la célula solamente cuando está viva, y por tanto, en las células vivas se podían apreciar los núcleos de color verde fluorescente y el citoplasma verde tenue, mientras que las células muertas no se teñían. Para determinar el porcentaje de células vivas hicimos contajes de alícuotas de los diferentes cultivos (aproximadamente 500 células en cada caso) después de teñirlos con FDA. Los resultados obtenidos con distintas concentraciones de SA se muestran en la Tabla 7.

| Concentración de SA | % de células vivas |
|---------------------|--------------------|
| control             | 95                 |
| 1 mM                | 10                 |
| 500 $\mu$ M         | 50                 |
| 200 $\mu$ M         | 60                 |
| 150 $\mu$ M         | 95                 |

**Tabla 7.** Determinación del % de viabilidad de células BY2 tratadas con SA. A las células control se les adicionó agua MilliQ que es el disolvente del SA. Las muestras fueron recogidas a las 24 horas de haber sido aplicado el SA, y posteriormente teñidas con FDA a una concentración de 0,1 mg/ml.

Como se puede apreciar, a una concentración de 150  $\mu$ M de SA se mantiene un % de células vivas igual que en el control y, por tanto, ésta fue la concentración elegida para realizar los experimentos posteriores. En la Figura 9 puede observarse la apariencia de las células BY2 vivas y muertas, tras la tinción con FDA.

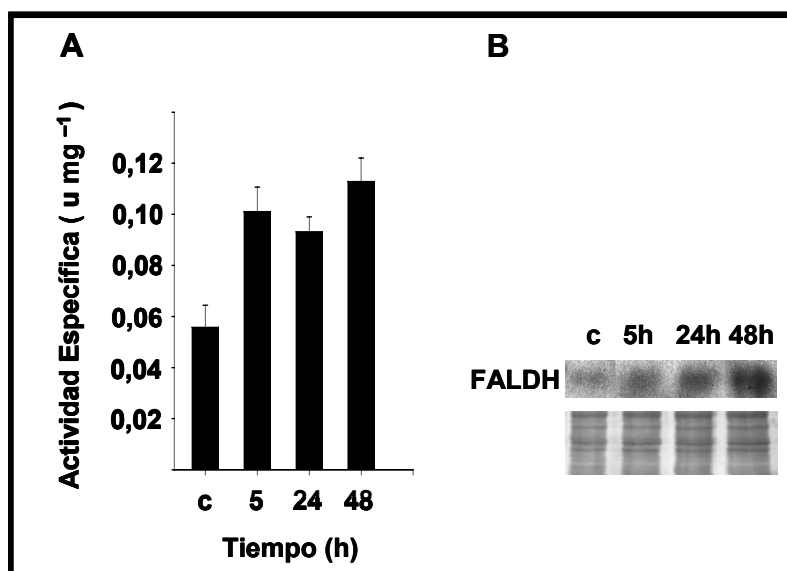


**Figura 9.** Células BY2 teñidas con FDA. A: células vivas; B: células vivas (color verde) y células muertas (incoloras).

Las células BY2 se incubaron con SA 150  $\mu$ M durante 5, 24 y 48 horas respectivamente. Según lo reportado en la literatura, los efectos del SA pueden aparecer (en dependencia de la especie vegetal en estudio) desde los 10 minutos de su aplicación hasta los 8 días (Tenhaken y Rubell, 1997; Foodor et al., 1997; Pieterse et

al., 1996; Rao et al., 1997; Xie y Chen, 1999). Se midió la actividad enzimática de la FALDH frente a S-hidroximetilglutación y la concentración de proteínas a los diferentes tiempos de incubación, y a partir de estos datos, se realizaron los cálculos de la actividad específica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10 A.

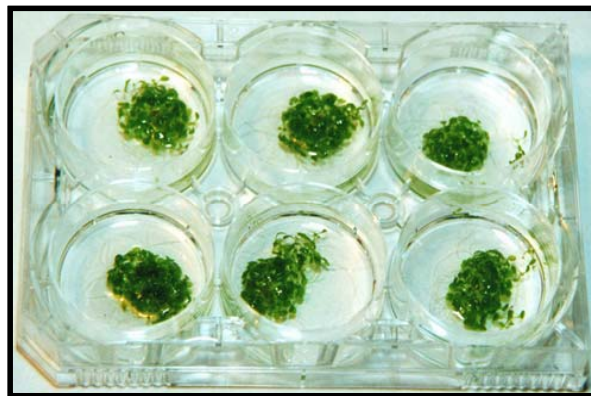
Con el fin de obtener más información sobre el mecanismo utilizado por el SA para producir el aumento de actividad de la FALDH, decidimos cuantificar la cantidad de enzima FALDH presente en cada momento, antes y después de los tratamientos. Esto se realizó por Western Blot, ya que en nuestro laboratorio contamos con un anticuerpo específico contra la FALDH de *Arabidopsis thaliana*. La cantidad de proteínas totales, aplicada en cada carril de la electroforesis fue idéntica (20  $\mu$ g), comprobándose por la intensidad de las bandas obtenidas después de teñir la membrana con Coomassie Blue. En la Figura 10 B se muestran los resultados correspondientes a las mismas muestras de las cuales se había medido previamente la actividad específica.



**Figura 10.** Efecto a diferentes tiempos (5, 24 y 48 horas) de la aplicación exógena de 150  $\mu$ M de SA en células de tabaco BY2. A: Actividad específica de la FALDH; las barras indican los valores medios ( $\pm$  SE) de 3 experimentos independientes. B: Western Blot; c corresponde a la adición de agua destilada como control. En la parte inferior de la figura se muestra la membrana teñida con Coomassie Blue. Se analizaron 20  $\mu$ g de un extracto de proteínas totales. Este experimento se realizó por triplicado.

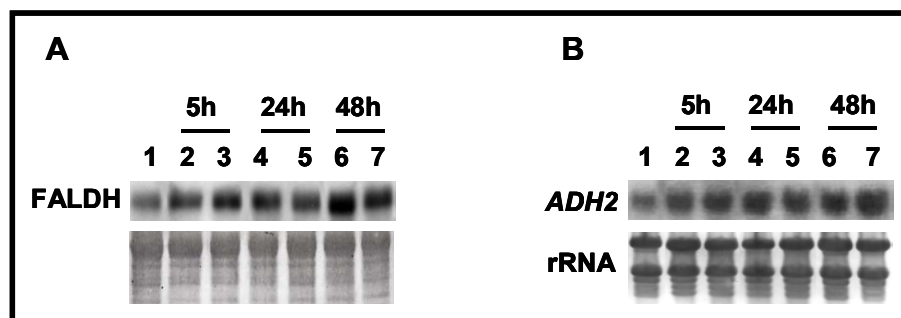
A partir de estos resultados puede concluirse que la aplicación exógena de SA a las células de tabaco BY2 provoca un marcado incremento tanto de la actividad específica como de la acumulación de proteína FALDH. En ambos casos, el mayor efecto se observó a las 48 horas después del tratamiento.

Estos mismos experimentos se realizaron con plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio líquido (Figura 11). El cultivo en medio líquido permite una gran reproductividad de las condiciones de crecimiento y una gran facilidad de aplicación de cualquier tratamiento exógeno, ya que el compuesto es rápidamente absorbido por las plantas. Además, las plántulas crecen más rápido que en tierra, ya que se les suministra en el medio todos los nutrientes necesarios para su desarrollo, entre ellos la sacarosa.



**Figura 11.** Plántulas de *Arabidopsis thaliana* germinadas en medio líquido en una placa estéril de 6 pocillos (aproximadamente 20-30 semillas por pocillo).

Cuando aplicamos exógenamente 150  $\mu$ M de SA a las plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio líquido observamos un aumento insignificante en los niveles de la FALDH. Por tal motivo, decidimos realizar experimentos con diferentes concentraciones de SA. Al aplicar 500  $\mu$ M y 1 mM de SA, pudimos apreciar un incremento tanto en los niveles de la FALDH como en los niveles de mRNA del gen *ADH2*, que codifica por la FALDH de *Arabidopsis* (Figura 12 A y B).



**Figura 12.** Efecto de la aplicación exógena de SA sobre plántulas de *Arabidopsis*. El tratamiento se realizó a diferentes tiempos (5, 24, 48 horas) con 500  $\mu$ M de SA (carriles 2, 4, 6) y 1 mM de SA (carriles 3, 5, 7). El carril 1 corresponde a la adición de agua destilada como control. A: Western Blot. Se analizaron 20  $\mu$ g de un extracto de proteínas totales. En la parte inferior de la figura se muestra la membrana teñida con Coomassie Blue. B: Northern Blot. En cada carril se depositaron 15  $\mu$ g de RNA total. La hibridación se realizó con el gen *ADH2* marcado con  $\alpha$   $^{32}$ P-dCTP. En la parte de debajo de la figura se muestra la membrana teñida con Methylene Blue. Ambos experimentos se realizaron por triplicado.

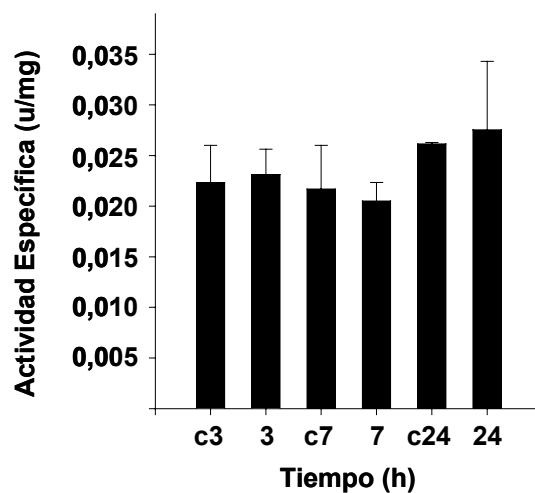
A partir de estos resultados puede concluirse que la mayor acumulación de la proteína se obtiene a las 48 horas del tratamiento con SA (Figura 12 A), tanto a la concentración de 500  $\mu$ M como de 1 mM de SA. Sin embargo los niveles de mRNA se incrementan desde las 5 horas después del tratamiento y persisten hasta las 48 horas (Figura 12 B). Estos resultados sugieren que existe una fuerte activación transcripcional del gen *ADH2* por ácido salicílico.

## 2.2 Respuesta de la FALDH al Ácido Abscísico (ABA).

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona reguladora del crecimiento que participa en la señalización de la respuesta a herida en algunos casos. Además es de vital importancia para el desarrollo y supervivencia de las plantas.

Células BY2 en el día 2 de su crecimiento fueron incubadas con ABA a una concentración de 100  $\mu$ M. Esta concentración es suficiente para inducir algunos genes regulados por ABA, tal como los genes *RAB* o *LEA* (Hildmann et al., 1992; Birkenmeier

y Ryan, 1998). Además, normalmente los efectos producidos por ABA se detectan durante las primeras 24 horas después de su aplicación (Hildmann et al., 1992; Birkenmeier y Ryan, 1998; Carrera y Prat, 1998). Por tal motivo, se decidió recolectar muestras a diferentes tiempos (3, 7 y 24 horas) y medir la evolución de la actividad de la FALDH. En cada tiempo del experimento se realizó un control consistente en incubar las células con dimetil sulfóxido (DMSO), disolvente del ABA. Después de medir las actividades enzimáticas y determinar la concentración de proteínas en cada muestra, realizamos los cálculos de actividad específica y no pudimos observar diferencias significativas en la actividad FALDH en respuesta a los tratamientos con ABA (Figura 13). Este experimento se realizó por triplicado.



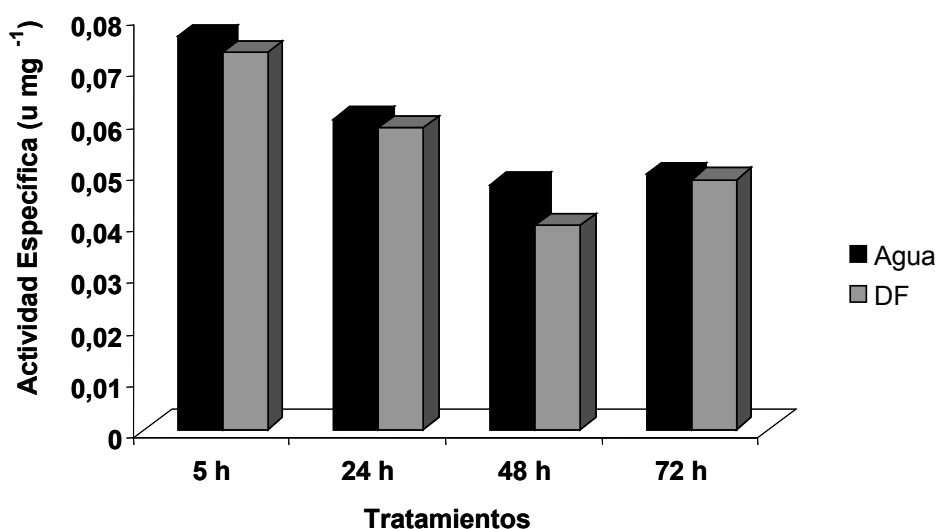
**Figura 13.** Efecto de la aplicación exógena de ABA sobre la actividad específica de la FALDH a diferentes tiempos (3, 7, 24 horas) en células BY2. Las barras indican los valores medios ( $\pm$  SE) de 3 experimentos diferentes.



### 2.3 Respuesta de la FALDH al ácido jasmónico (JA).

El ácido jasmónico (JA) y el metil jasmonato (MeJA) se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. El JA es una fitohormona que juega un papel crucial en diversos aspectos del desarrollo, así como en las reacciones de defensa de las plantas frente a patógenos. Es considerado el señalizador más importante de la respuesta a herida y al ataque por patógenos.

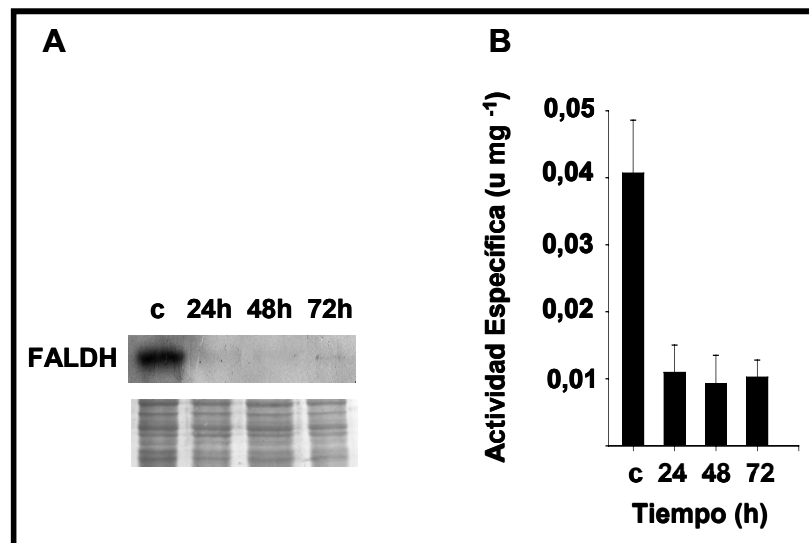
Las células BY2 fueron incubadas con JA a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  a varios tiempos, ya que en estudios realizados por otros autores las concentraciones utilizadas estaban comprendidas entre 45 y 60  $\mu\text{M}$ , y los tiempos de incubación entre 2 y 72 horas (Lee et al., 1996; Reinbothe et al., 1994; Latin et al., 1999; Rojo et al., 1998; Berger et al., 1996). Para saber si la dimetil formamida (disolvente del JA) provocaba algún tipo de efecto sobre las células, hicimos un experimento previo comparando las actividades específicas de las células BY2 tratadas con dimetil formamida, a varios tiempos, y las actividades específicas de células BY2 a las cuales solamente se les había adicionado agua. Los resultados pueden verse en la Figura 14.



**Figura 14.** Actividades específicas de la FALDH a diferentes tiempos (5, 24, 48 y 72 horas) en las células BY2 tratadas con dimetil formamida (DF) o solamente con agua destilada.

Como se puede observar, no hay variación significativa de la actividad específica de las BY2 como consecuencia del tratamiento con dimetil formamida, ya que evoluciona de manera similar a cuando se les adiciona agua. Las actividades obtenidas en cada tiempo coinciden con las de la curva de crecimiento que se describe al inicio de este capítulo, teniendo en cuenta que los tratamientos se realizan siempre en el día 2 de crecimiento de las BY2.

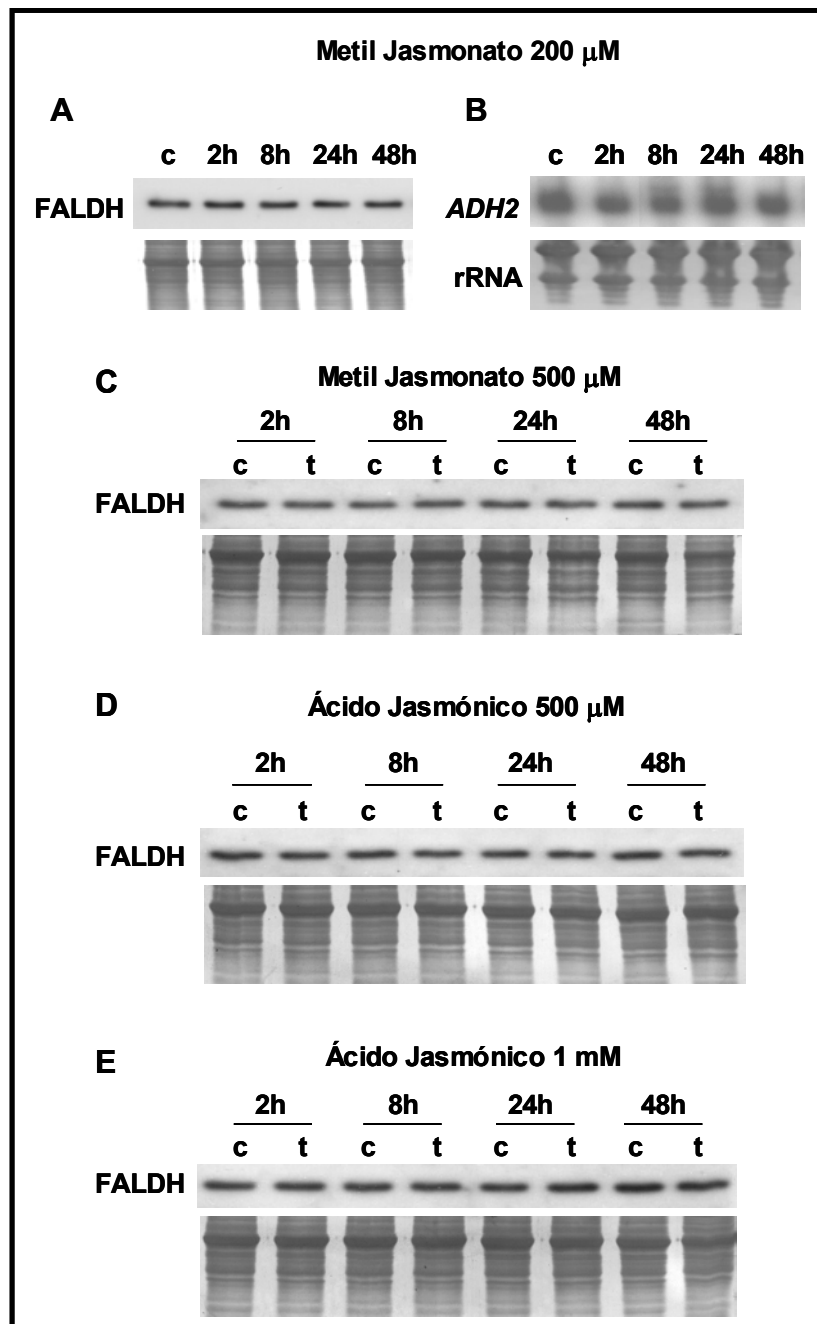
Como consecuencia del tratamiento con JA (Figura 15), se observa claramente una represión de la FALDH en la cantidad de proteína presente (Figura 15 A), que se correlaciona con la disminución de la actividad específica de dicho enzima (Figura 15 B). La respuesta al tratamiento con JA se observa a las 24 horas y persiste hasta las 72 horas. Las mediciones se realizaron a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento, ya que anteriormente se había realizado un grupo de experimentos a tiempos más cortos no observándose ningún efecto.



**Figura 15.** Efecto de la aplicación exógena de 50  $\mu$ M de JA sobre células de tabaco BY2. El tratamiento se realizó a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) A: Western Blot; c corresponde a la adición de dimetil formamida como control. En la parte inferior de la figura se muestra la membrana teñida con Coomassie Blue. Se analizaron 20  $\mu$ g de un extracto de proteínas totales. Este experimento se realizó por triplicado. B: Actividad específica de la FALDH; las barras indican los valores medios ( $\pm$  SE) de 3 experimentos independientes.

El tratamiento de las plántulas de *A. thaliana* con 50  $\mu\text{M}$  de JA en medio líquido no produjo ningún cambio en los niveles de la FALDH. Por tal motivo, decidimos realizar experimentos con concentraciones más elevadas de JA y también con MeJA. Al aplicar 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 1 mM de JA y MeJA, tampoco apreciamos cambio alguno ni en los niveles de la FALDH ni en los del mRNA correspondiente al gen *ADH2* (Figura 16). En el caso del tratamiento con 1 mM de JA observamos que a partir de las 24 horas las plantas comenzaban a ponerse un poco amarillas, tanto las tratadas como los controles. Esto podría deberse a la cantidad de dimetil formamida presente como disolvente que puede ser tóxica para la planta. Sin embargo no observamos ningún cambio en los niveles de la proteína después del experimento de Western Blot.

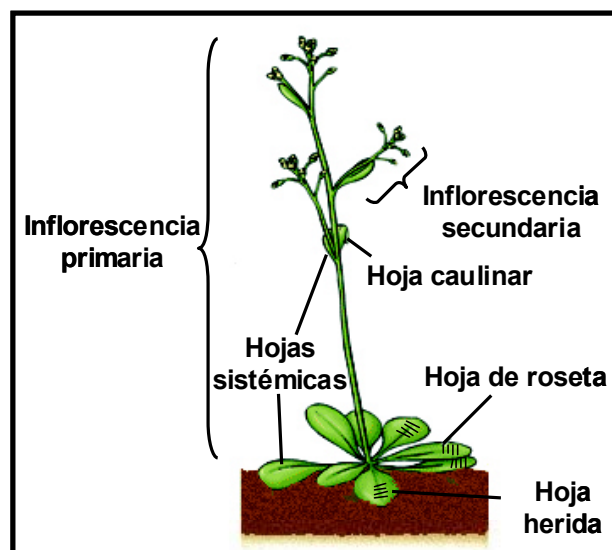
**Figura 16.** (En la página siguiente) Efecto de la aplicación exógena de JA en *Arabidopsis*. Los experimentos se realizaron a diferentes tiempos (2, 8, 24 y 48 horas) con 200  $\mu\text{M}$  de MeJA (A y B), 500  $\mu\text{M}$  de MeJA (C), 500  $\mu\text{M}$  de JA (D), y 1 mM de JA (E); c corresponde a la adición de dimetil formamida como control. A, B, C,D y E: Western Blot. Se analizaron 20  $\mu\text{g}$  de un extracto de proteínas totales. En la parte inferior de la figura se muestra la membrana teñida con Coomassie Blue. B: Northern Blot. En cada carril se depositaron 15  $\mu\text{g}$  de RNA total. La hibridación se realizó con el gen *ADH2* marcado con  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -dCTP. En la parte inferior de la figura se muestra La membrana está teñida con Methylene Blue. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.



### 3. Represión transcripcional del gen *ADH2* por herida.

Cuando se produce un daño mecánico o herida a una planta, se desencadenan una serie de eventos bioquímicos y moleculares que son idénticos a los que ocurren como consecuencia del ataque de insectos. La respuesta de un gen a herida, por tanto, es una indicación de la respuesta de defensa al ataque por insectos herbívoros.

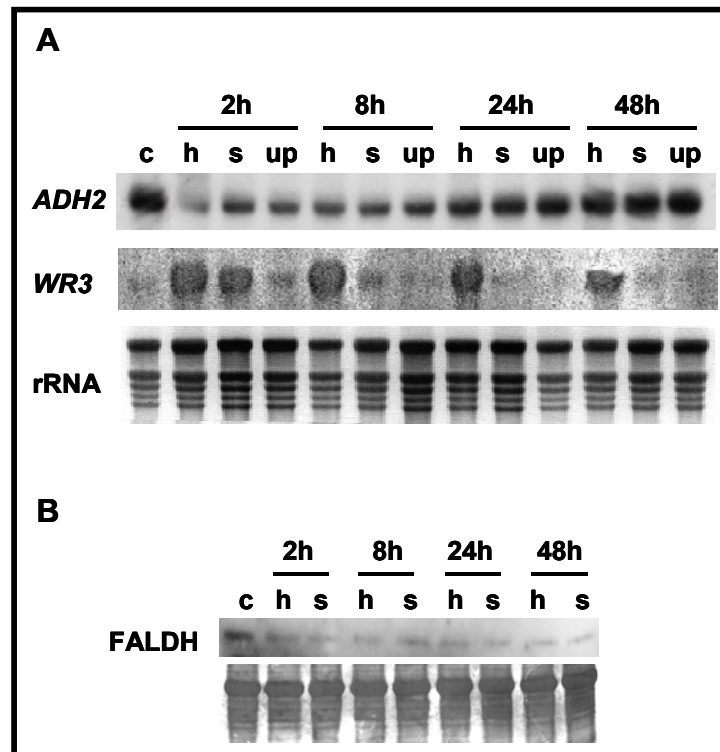
Para los experimentos de herida, la mitad de las hojas de la roseta de una planta de *Arabidopsis* fueron dañadas con la ayuda de unas pinzas. La respuesta sistémica se midió en la otra mitad de la roseta (hojas de la roseta no heridas) y en las hojas caulinares (Figura 17).



**Figura 17.** Diferentes partes de la planta de *Arabidopsis thaliana*.

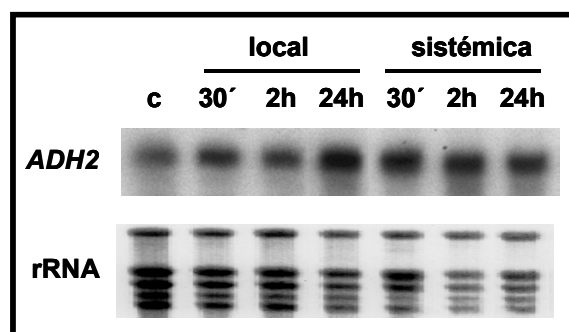
Para averiguar si la FALDH está involucrada en las respuestas de defensa, examinamos el mRNA correspondiente al gen *ADH2* a diferentes tiempos después de producir una herida a la planta. La Figura 18 muestra una disminución de la cantidad del transcripto, tanto en hojas heridas como en sistémicas (roseta y caulinar), indicando una represión transcripcional del gen. La mayor represión se observó a las 2 horas después de la herida. Los niveles de mRNA se recuperaron hasta los niveles normales

a las 48 horas después del daño mecánico. Como control de este experimento, se hibridó la misma membrana con el gen inducible por herida *WR3*, cedido por el grupo del Dr. J. Sánchez-Serrano, mostrándose una acumulación transitoria de los niveles de mRNA tal y como se describió en 1997 (Titarenko et al., 1997). La disminución de los niveles de mRNA del gen *ADH2* se correlacionó con la disminución de los niveles de la proteína FALDH medidos por Western Blot, ambos en las hojas heridas y sistémicas (Figura 18 B). El efecto sobre la proteína se observó a partir de las 2 horas después de la herida, y se mantuvo hasta las 48 horas.



**Figura 18.** Represión del gen *ADH2* de *A. thaliana* inducida por herida. Se indica en cada caso el tiempo transcurrido después de la herida. A: Northern Blot. En cada carril se depositaron 15  $\mu$ g de RNA total. La hibridación se realizó con el gen *ADH2* o *WR3* marcados con  $\alpha$   $^{32}$ P-dCTP. Como control se muestra la tinción con bromuro de etidio del rRNA. B: Western Blot. Se analizaron 20  $\mu$ g de un extracto de proteínas totales. En la parte inferior se muestra la membrana teñida con Coomassie Blue. La nomenclatura utilizada fue la siguiente: c, control (hojas de la roseta sin herir); h, hojas heridas de la roseta; s, hojas no heridas de la roseta (respuesta sistémica); up, hojas caulinares de las plantas heridas.

La expresión de algunos genes inducibles por herida, tales como el *Jr1*, *Jr2* o *VPS* es también fuertemente inducida por la aplicación exógena de JA (Peña Cortés et al., 1995). Para comprobar si el ácido jasmónico estaba involucrado en la regulación por herida del gen *ADH2* utilizamos el mutante de *Arabidopsis coi1* que es insensible a JA (Feys et al., 1994). Después de la herida, no observamos ninguna represión del gen *ADH2* en las hojas de este mutante, antes al contrario observamos que los niveles de mRNA fueron ligeramente más altos tanto en la hojas heridas como en las sistémicas (Figura 19). Estos resultados apoyan la idea de que el JA está involucrado en la represión del gen *ADH2* provocada por herida en la planta de *Arabidopsis*.

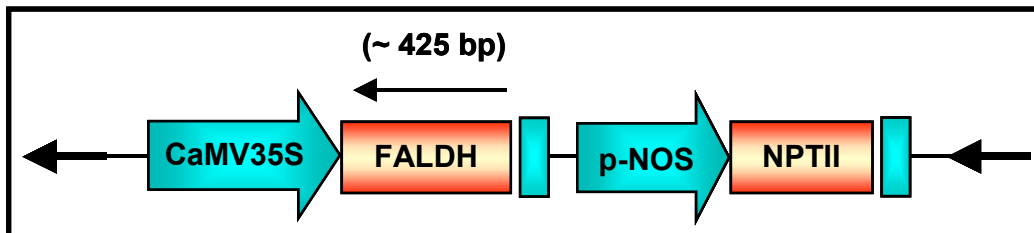


**Figura 19.** Respuesta del gen *ADH2* después de la herida en el mutante de *Arabidopsis coi1*. Se indica en cada caso el tiempo transcurrido después de la herida. Los resultados se analizaron por Northern Blot. En cada carril se depositaron 5 µg de RNA total. La hibridación se realizó con el gen *ADH2* marcado con  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP. Como control se muestra la tinción con bromuro de etidio del rRNA. La nomenclatura utilizada fue la siguiente: c, control (hojas de la roseta sin herir); local, hojas heridas de la roseta; sistémica, hojas no heridas de la roseta.

#### 4. Obtención y análisis de plantas transgénicas de *A. thaliana*.

Se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* portadoras de una construcción en la cual un fragmento de 425 pares de bases del cDNA de la FALDH (comenzando por el primer nucleótido del extremo 5' hasta el nucleótido 425) fue clonado en sentido inverso, bajo el control del promotor CaMV35S. Dicha construcción (Figura 20) se realizó en el vector pBin19, cuyo T-DNA contiene el gen de la neomicina

fosfotransferasa II (NPTII), que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, permitiendo así la selección de los transformantes de un modo rápido y sencillo.



**Figura 20.** Esquema de la construcción “antisentido” de la FALDH realizada en el vector pBin19.

En las plantas transgénicas portadoras de la construcción “antisentido” se esperaba observar una disminución de la actividad de la FALDH, como consecuencia de la formación de un híbrido entre el RNA antisentido *ADH2* sobreexpresado por el transgen y el RNA del gen *ADH2* endógeno.

#### 4.1 Clonación del cDNA en el vector pDH51.

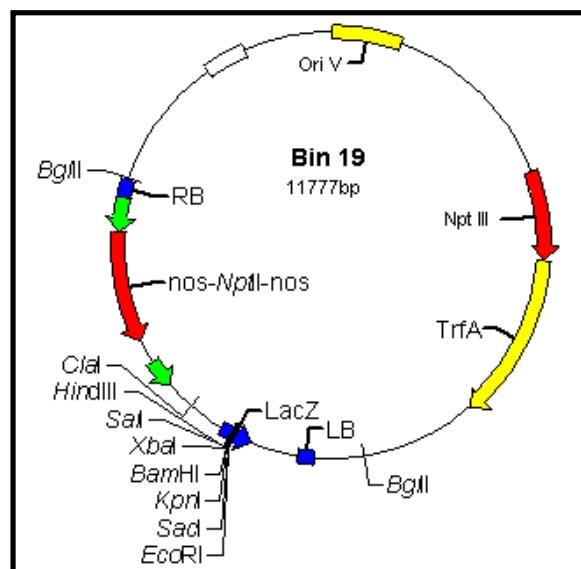
El clonaje para transformar las plantas de *A. thaliana* se realizó en dos etapas: en primer lugar se clonó el cDNA de la FALDH en el vector pDH51, y a continuación el fragmento de DNA correspondiente se subclonó en el vector de expresión de plantas pBin19.

El vector pDH51 contiene el promotor del gen del RNA 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador de la transcripción. Para realizar el primer clonaje, el cDNA procedente del vector pBluescript SK +/- (Martínez et al., 1996) fue digerido con *Pst*I-*Bgl*II y el vector pDH51 se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I. Después de la ligación y transformación de células competentes de *E. coli*, la presencia del inserto en las colonias positivas se comprobó por digestión con *Eco*RI.



## 4.2 Clonación en el vector pBin19.

El vector pBin19 (Figura 21) fue el que utilizamos para la posterior transformación de *Agrobacterium*, ya que es un vector binario de plantas y por tanto aprovecha el hecho de que la región *vir* de *Agrobacterium* puede actuar en *trans* respecto al T-DNA, es decir, reconocerlo aunque se encuentre en un plásmido diferente. El plásmido Ti desarmado de *Agrobacterium* solo tiene la región *vir*. Los bordes del T-DNA se encuentran en el pBin19 que tiene además un origen de replicación funcional en *E. coli* y en *Agrobacterium* (Bevan, 1984).

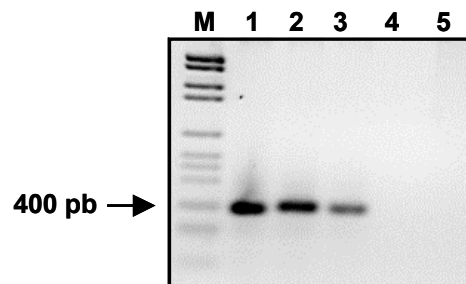


**Figura 21.** Mapa del vector pBin19 utilizado para transformar plantas de *A. thaliana*.

El pBin19 se digirió con *EcoRI* al igual que la construcción pDH51-FALDH. La presencia del inserto se comprobó mediante digestión con *EcoRI*.

Después de la transformación de células competentes de *Agrobacterium* con el pBin19-FALDH, comprobamos la transformación mediante una reacción de PCR. Utilizamos dos primers específicos para la FALDH de *Arabidopsis* que amplificaban un

fragmento de aproximadamente 400 pb. El resultado de la amplificación se analizó por electroforesis en geles de agarosa (Figura 22).



**Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % del producto de amplificación por PCR. M: Marcador de peso molecular. 1: Vector 5.1 (cDNA de la FALDH procedente del vector pBluescript SK +/-) 2: pBin19-FALDH. 3: Extracto de DNA de *Agrobacterium* transformado con la construcción pBin19-FALDH. 4: Control negativo con DNA de *Agrobacterium* sin transformar. 5: Control negativo utilizando solo los primers.

#### 4.3 Transformación de plantas de *A. thaliana* y selección de plantas transformadas homocigotas.

Se infiltraron plantas de *A.thaliana* (generación T1) con *Agrobacterium tumefaciens* (que contenía la construcción antisentido de la FALDH) y se dejaron crecer hasta la producción de semillas (generación T2). Se sembraron las semillas en placas con medio de selección GM/ Kanamicina 60  $\mu$ g/ml y se seleccionaron las plántulas resistentes al antibiótico. Obtuvimos un total de 40 transformantes, los cuales fueron transplantados individualmente a tierra, dejándose crecer hasta la obtención de semillas (generación T3). La generación T3 se creció en placas con medio de selección GM/ Kanamicina 60  $\mu$ g/ml y sólo 17 líneas mostraron segregación mendeliana (proporción positivos : negativos de 3:1). De estas 17 líneas se crecieron en tierra hasta la madurez 12 plantas de cada línea. Una vez obtenidas las semillas (generación T4), se sembraron nuevamente en placa con medio de selección GM/ Kanamicina 60  $\mu$ g/ml. Se seleccionaron 15 líneas en las cuales el 100 % de las plantas eran resistentes al

antibiótico. En la Figura 23 se esquematiza todo el proceso de selección, desde la infiltración de las plantas T1 hasta la obtención de las plantas homocigotas.

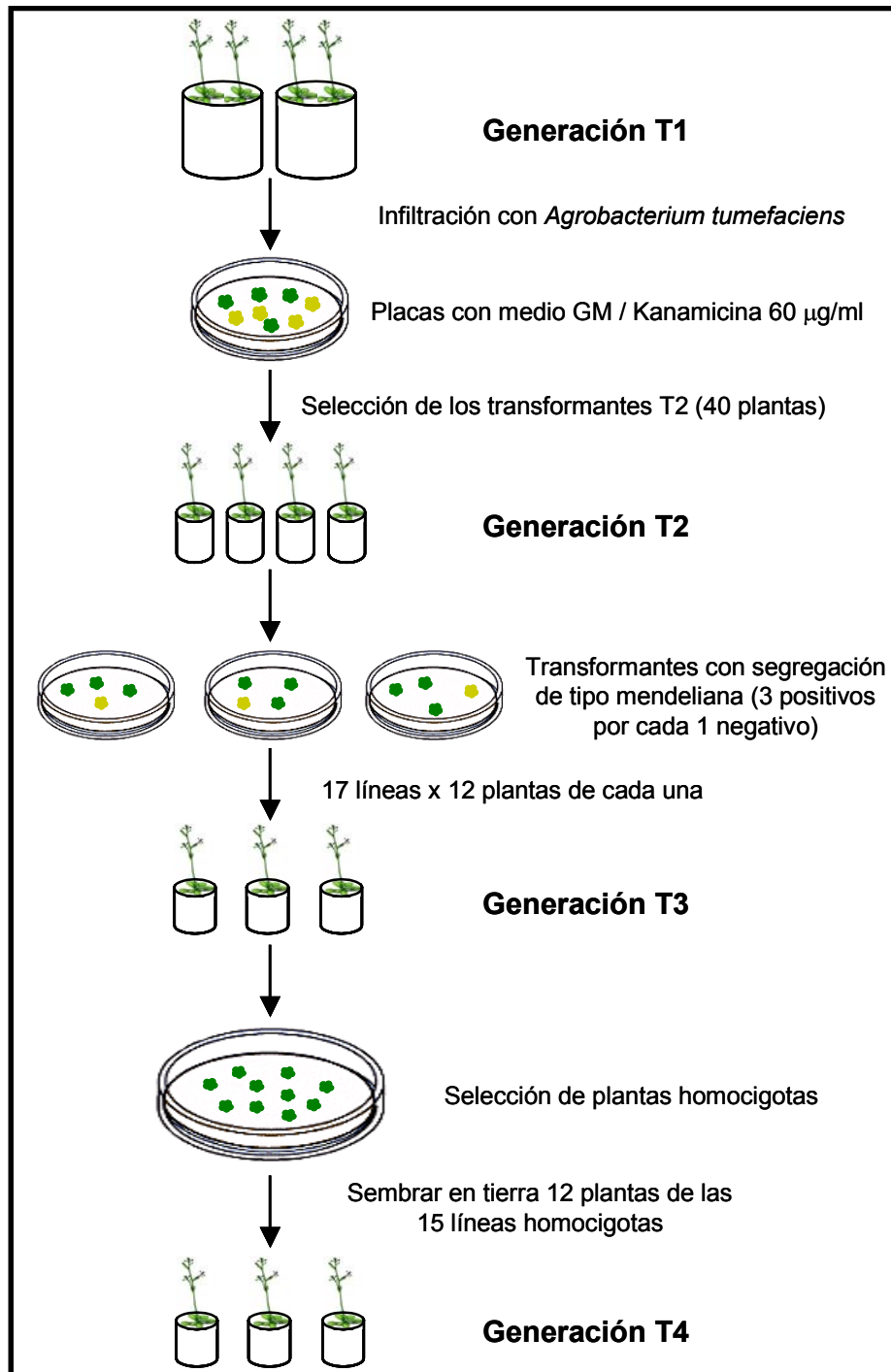
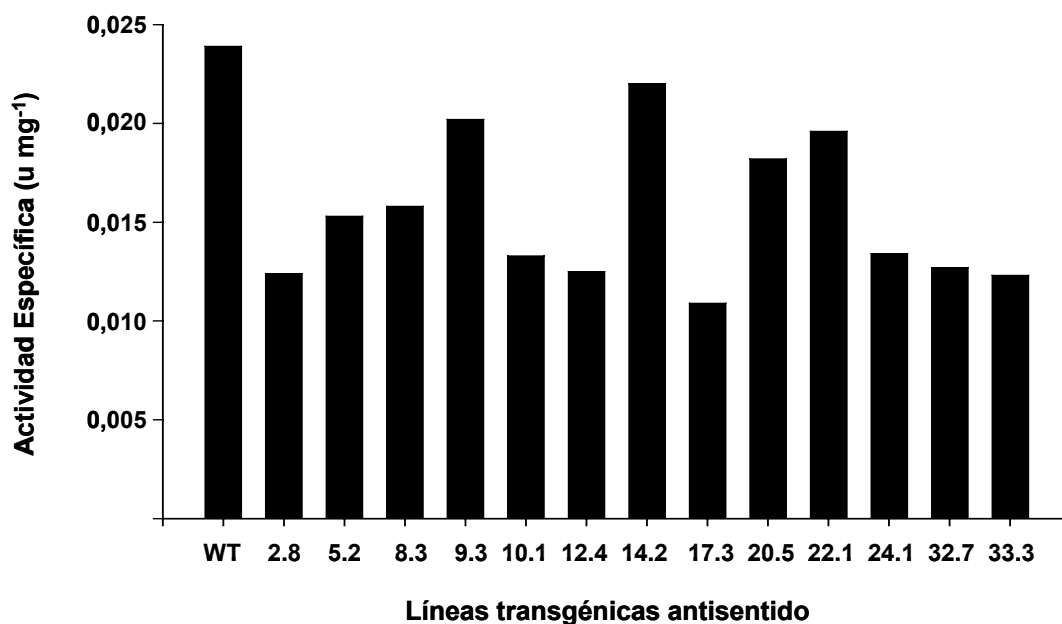


Figura 23. Esquema de obtención y selección de las plantas transgénicas.

#### 4.4 Análisis de las plantas transgénicas mediante ensayos de actividad enzimática.

Se analizaron las líneas transgénicas antisentido homocigotas mediante ensayos de actividad enzimática. La actividad se midió a partir de un extracto proteico procedente de plántulas de 15 días de edad, crecidas en placas GM con Kanamicina. Como control se utilizaron plantas sin transformar crecidas en placas GM sin antibiótico.

Los resultados de los ensayos de actividad FALDH de las 13 líneas transgénicas antisentido seleccionadas se muestran en la Figura 24.



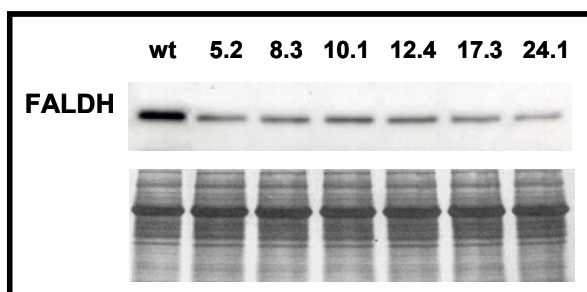
**Figura 24.** Actividad específica FALDH en las líneas transgénicas antisentido. En la gráfica se representan las actividades de 13 líneas transgénicas homocigotas. La actividad específica se midió tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos muestran una disminución de la actividad específica FALDH de las plantas transgénicas antisentido con respecto al control, que fue realizado con plantas sin transformar. Se puede observar que en algunas líneas la disminución llega hasta un 50 % aproximadamente. La variación que se observa en las

diferentes líneas transgénicas es el resultado esperado, teniendo en cuenta que el transgen se inserta al azar, repercutiendo este hecho en su expresión.

#### 4.5 Análisis de las plantas transgénicas mediante Western Blot.

Se realizó un ensayo por Western Blot de las líneas transgénicas antisentido homocigotas que se consideraron más representativas según los datos de actividad enzimática. En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos.



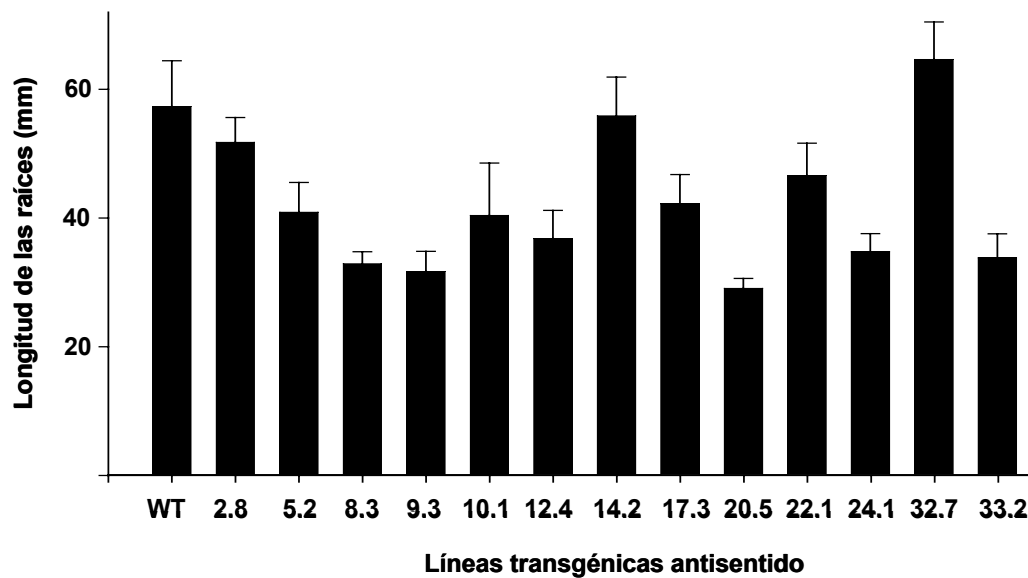
**Figura 25.** Análisis mediante Western Blot de algunas de las líneas transgénicas antisentido homocigotas. Se analizaron 20  $\mu\text{g}$  de un extracto de proteínas totales obtenido de plántulas de 15 días de edad. En la parte inferior se muestra la membrana teñida con Coomassie Blue.

Como puede observarse, la disminución de los niveles de la proteína FALDH en las plantas transgénicas antisentido homocigotas, con respecto a las plantas sin transformar (wt) se corresponde con la disminución de actividad enzimática FALDH.

#### 4.6 Estudio del fenotipo de las plantas transgénicas.

Para conocer si las plantas transgénicas exhibían algún cambio en el fenotipo con respecto a las plantas wt, decidimos poner a germinar 10 semillas de cada una de las líneas transgénicas en placas con medio GM y transplantarlas a tierra al cabo de 14 días. Con la ayuda de un pie de rey digital, medimos la longitud de las raíces y el diámetro de las rosetas de cada planta de 30 días de edad.

En la Figura 26 y en la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos con respecto a la longitud de las raíces.



**Figura 26.** Longitud de las raíces de las plantas transgénicas antisentido de 30 días de edad. Se midieron raíces de 10 plantas de cada línea. Los barras representan el valor medio ( $\pm$  SE) de 10 mediciones independientes.

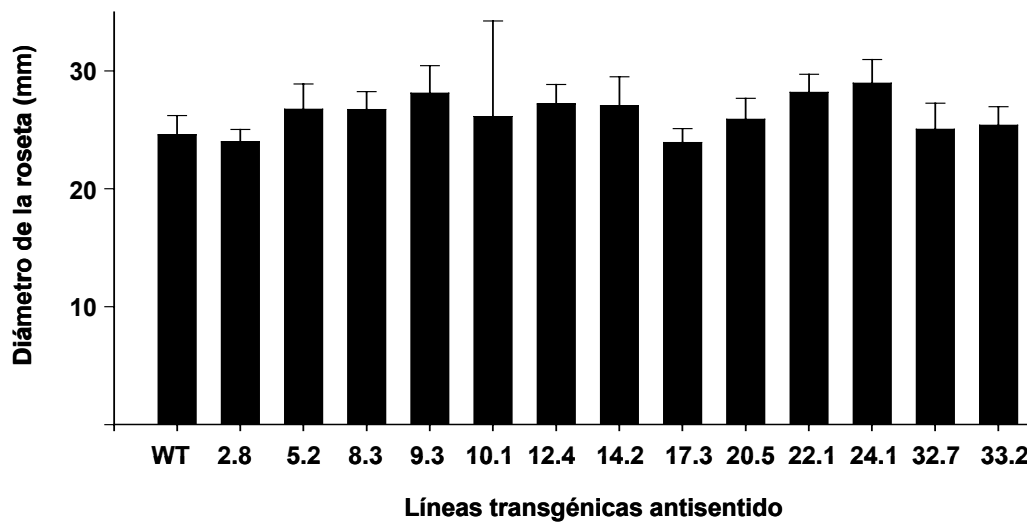
Como se puede observar en la Figura 26, la mayoría de las líneas transgénicas antisentido presentaban raíces más cortas que la línea control. Para confirmar este resultado se realizó un test de hipótesis de comparación de medianas con la prueba T para muestras independientes y un valor de confianza del 95 % y del 99 % respectivamente. El programa utilizado fue el SPSS 10.0. En la Tabla 8 se muestran los valores medios de la longitud de las raíces y su respectiva desviación estándar.

| Líneas | Longitud de las raíces (mm) | Signif. (Valor $p$ ) |
|--------|-----------------------------|----------------------|
| wt     | 57,3170 ± 7,1112            | -                    |
| 2.8    | 51,7310 ± 3,8522            | 0,042*               |
| 5.2    | 40,8740 ± 4,6134            | 0,000**              |
| 8.3    | 32,8730 ± 1,8546            | 0,000**              |
| 9.3    | 31,6230 ± 3,1507            | 0,000**              |
| 10.1   | 40,3450 ± 8,1225            | 0,000**              |
| 12.4   | 36,7390 ± 4,3857            | 0,000**              |
| 14.2   | 55,7850 ± 6,0220            | 0,609                |
| 17.3   | 42,1300 ± 4,5473            | 0,000**              |
| 20.5   | 28,9860 ± 1,5264            | 0,000**              |
| 22.1   | 46,4950 ± 5,0290            | 0,023*               |
| 24.1   | 34,6650 ± 2,7899            | 0,000**              |
| 32.7   | 64,5110 ± 5,8136            | 0,023*               |
| 33.2   | 33,6890 ± 3,7299            | 0,000**              |

**Tabla 8.** Valor medio de la longitud de las raíces de las plantas transgénicas antisentido de 30 días de edad. Se midieron raíces de 10 plantas de cada línea y se muestra su desviación estándar. La diferencia existente entre la línea control (wt) y las líneas transgénicas fue analizada mediante un test de hipótesis de comparación de medianas con la prueba T para muestras independientes y un valor de confianza del 95 % (\*  $p \leq 0,05$ ) y del 99 % (\*\*  $p \leq 0,01$ ).

Las líneas 5.2, 8.3, 9.3, 10.1, 12.4, 17.3, 20.5, 24.1 y 33.2, presentaron diferencias altamente significativas con respecto al control ( $p \leq 0,01$ ), mientras que en el caso de las líneas 2.8, 22.1, 32.7 se obtuvo un valor de  $p \leq 0,05$ , mostrando por lo tanto un valor de confianza del 95 %. Las raíces de las plantas estudiadas de la línea 14.2 tenía una longitud similar a la de la línea control (wt). En todos los casos se observa una inhibición de la elongación de la raíz, pero ésta no es proporcional a la disminución de la actividad FALDH.

También realizamos medidas del diámetro de las rosetas de las mismas plantas utilizadas para analizar la longitud de las raíces. Para validar estos resultados se realizó un test de hipótesis de comparación de medianas con la prueba T para muestras independientes y un valor de confianza del 95 % y del 99 %. El programa utilizado fue el SPSS 10.0. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27 y la Tabla 9.



**Figura 27.** Diámetro de las rosetas de las plantas transgénicas antisentido de 30 días de edad. Se midieron rosetas de 10 plantas de cada línea. Los barras representan el valor medio ( $\pm$  SE) de 10 mediciones independientes.



| Líneas | Diámetro de las rosetas (mm) | Signif. (Valor $p$ ) |
|--------|------------------------------|----------------------|
| wt     | 24,5700 ± 1,6348             | -                    |
| 2.8    | 23,9780 ± 1,0460             | 0,348                |
| 5.2    | 26,7570 ± 2,1208             | 0,018*               |
| 8.3    | 26,7280 ± 1,5017             | 0,007**              |
| 9.3    | 28,1140 ± 2,3143             | 0,001**              |
| 10.1   | 26,1110 ± 8,1085             | 0,563                |
| 12.4   | 27,1790 ± 1,6401             | 0,002**              |
| 14.2   | 27,0240 ± 2,4611             | 0,017*               |
| 17.3   | 23,9250 ± 1,1476             | 0,321                |
| 20.5   | 25,8730 ± 1,7759             | 0,105                |
| 22.1   | 28,1610 ± 1,5173             | 0,000**              |
| 24.1   | 28,9350 ± 1,9958             | 0,000**              |
| 32.7   | 25,0230 ± 2,2003             | 0,608                |
| 33.2   | 25,3740 ± 1,5503             | 0,274                |

**Tabla 9.** Valor medio del diámetro de las rosetas de las plantas transgénicas antisentido de 30 días de edad. Se midió el diámetro de las rosetas de 10 plantas de cada línea y se muestra su desviación estándar. La diferencia existente entre la línea control (wt) y las líneas transgénicas fue analizado mediante un test de hipótesis de comparación de medianas con la prueba T para muestras independientes y un valor de confianza del 95 % (\*  $p \leq 0,05$ ) y del 99 % (\*\*  $p \leq 0,01$ ).

Mediante el estudio del diámetro de las rosetas de las diferentes líneas de plantas transgénicas y de las plantas control (wt) y gracias al análisis estadístico pudimos llegar a la conclusión de que las líneas 2.8, 10.1, 17.3, 20.5, 32.7 33.2 mostraban un fenotipo similar al de las plantas sin transformar, mientras que las líneas 5.2, 8.3, 9.3, 12.4, 14.2, 22.1 y 24.1 presentaban rosetas ligeramente más grandes.

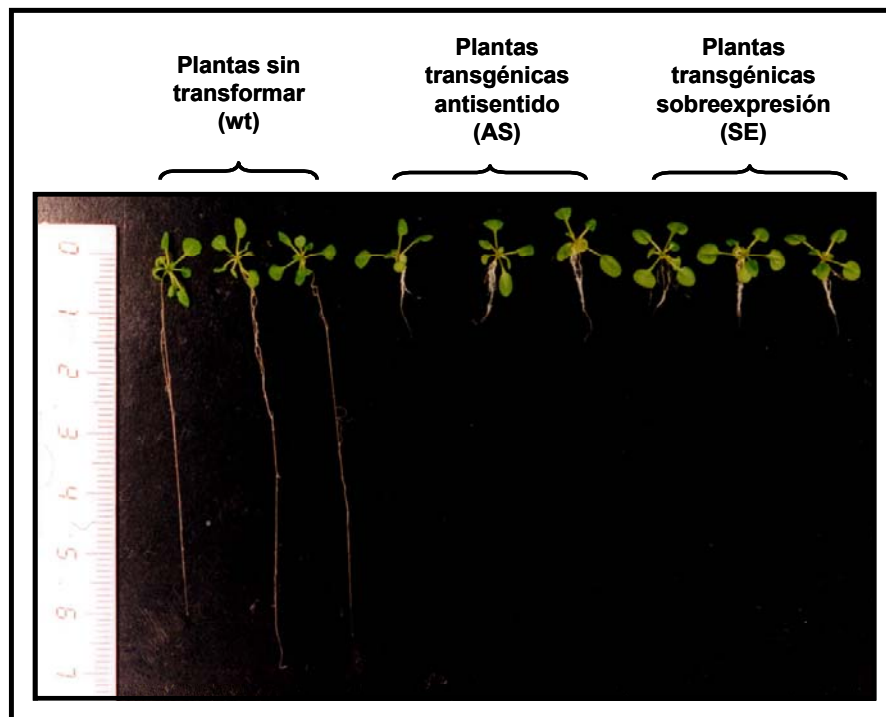
Al encontrar que existían diferencias significativas en la longitud de las raíces, decidimos estudiar si tal efecto se observaba solo en la planta adulta o también desde el inicio del crecimiento. Para ello, comparamos las longitudes de las raíces de 13

plántulas germinadas *in vitro* correspondientes a la línea de *Arabidopsis* sin transformar (wt), con la línea transgénica antisentido 24.1 (as) y una línea transgénica de sobreexpresión (se) obtenida previamente en nuestro grupo (Achkor et al; 2003). Los resultados se exponen en la Tabla 10 y en la Figuras 28.

| Líneas | Longitud de las raíces (mm) | Signif. (Valor <i>p</i> ) |
|--------|-----------------------------|---------------------------|
| WT     | 46,8338 ± 2,1153            | -                         |
| AS     | 10,2315 ± 0,6841            | 0,000**                   |
| SE     | 10,2562 ± 1,0364            | 0,000**                   |

**Tabla 10.** Valor medio de la longitud de las raíces de las plantas transgénicas y la línea control (wt) de 8 días de edad. Se midieron raíces de 13 plantas de cada línea y se muestra su desviación estándar. La diferencia existente entre la línea control (wt) y las líneas transgénicas fue analizado mediante un test de hipótesis de comparación de medianas con la prueba T para muestras independientes y un valor de confianza del 99 % (\*\*  $p \leq 0,01$ ).

En la Figura 28 puede observarse las diferencias altamente significativas entre las plantas transgénicas antisentido y de sobreexpresión con respecto a las plantas sin transformar.



**Figura 28.** Longitud de las raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 8 días de edad. Se muestran las raíces de plantas sin transformar (fenotipo salvaje), de plantas transgénicas antisentido y de sobreexpresión.

Con los resultados expuestos anteriormente, queda demostrado que al modificar los niveles intracelulares de la FALDH se originan cambios fenotípicos importantes como son la inhibición de la elongación de la raíz y la variación del tamaño del diámetro de la roseta.

#### **4.7 Metabolismo de formaldehído exógeno por las líneas transgénicas antisentido.**

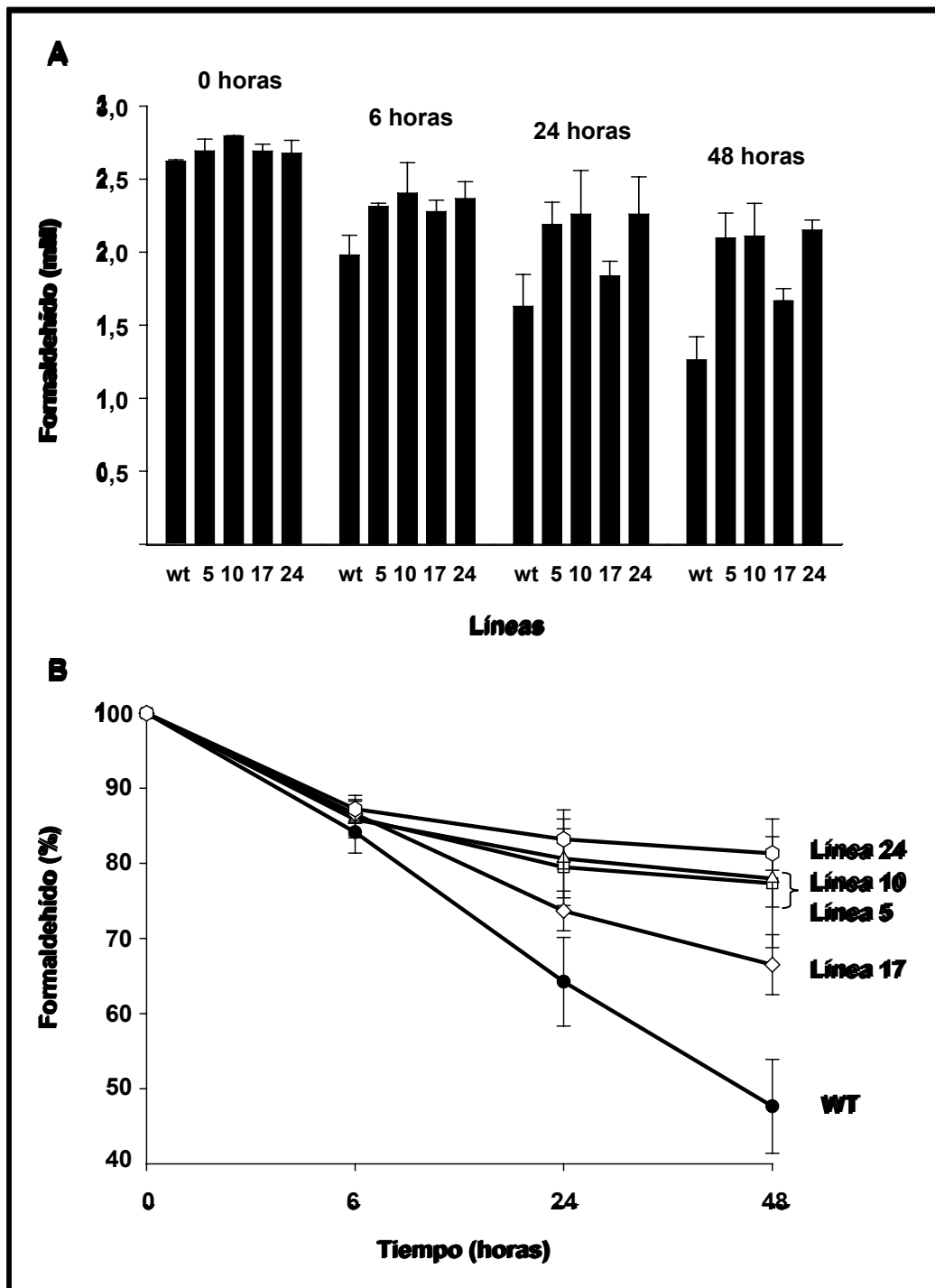
Se seleccionaron algunas de las líneas transgénicas que presentaban mayor disminución de la actividad FALDH (5.2,10.1,17.3,24.1) para estudiar si la presencia de menor cantidad de enzima intracelular podía hacer variar la capacidad de la planta de metabolizar concentraciones elevadas de formaldehído exógeno. Utilizamos plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en medio líquido, debido a la alta reproducibilidad de

las condiciones de crecimiento y a la facilidad de aplicación del formaldehído, que se adicionó directamente al medio de cultivo.

Se utilizaron plántulas transgénicas antisentido homocigotas de 9 días de edad. Como control, se emplearon plántulas de *Arabidopsis* sin transformar (fenotipo salvaje), crecidas en las mismas condiciones que las líneas transgénicas.

En nuestro grupo se habían realizado anteriormente estudios de metabolismo de formaldehído exógeno con plantas transgénicas que sobreexpresan la FALDH (Achkor et al., 2003) y por tanto ya se tenían establecidas las condiciones idóneas para este tipo de experimento. Por tal motivo, decidimos añadir al medio de cultivo de las plántulas una concentración de 2,6 mM de formaldehído exógeno. Se realizaron mediciones de la concentración de formaldehído restante en el medio al cabo de 0, 6, 24 y 48 horas después de su adición. Los tiempos y las concentraciones de formaldehído fueron las mismas tanto en las plantas transgénicas como en las plantas control. En paralelo, se realizó un control consistente en medio de cultivo sólo (sin plantas) con la misma concentración inicial de formaldehído, con el fin de descartar una posible disminución de formaldehído por evaporación.

En la Figura 29 (A y B) puede observarse que las plantas transgénicas antisentido metabolizan más lentamente el formaldehído exógeno que las plantas control. La mayor diferencia entre las plantas control y las transgénicas se observa a las 48 horas, donde las plantas control han metabolizado alrededor del 50 % del formaldehído mientras que las transgénicas han consumido entre el 15 y el 30 % por lo que queda aún en el medio entre el 70 y el 85 % del formaldehído inicial (Figura 30 B). Las líneas 5.2, 10.1 y 24.1 presentan una menor eficacia en la capacidad de metabolizar formaldehído que la línea 17.3.



**Figura 29.** Metabolismo de formaldehído exógeno por las líneas transgénicas antisentido homocigotas crecidas en medio líquido.