



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS
DE MAÍZ BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS
BIÓTICO Y ABIÓTICO**

Tesis que presenta

Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler

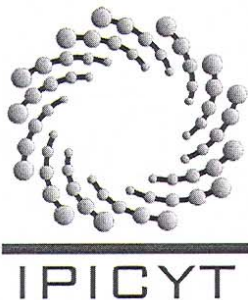
Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2007



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS DE MAÍZ BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler** y aprobada el **10 de enero de 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Director de la tesis)

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Asesor de la tesis)

Dr. J. Sergio Casas Flores
(Asesor de la tesis)

Dr. Saúl Fraire Velázquez
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (172293) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 007 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 18 días del mes de enero del año 2007, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT
Dr. Saúl Fraire Velázquez	Sinodal externo	UAZ

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler

sobre la Tesis intitulada:

Análisis del Metabolismo de Poliaminas de Maíz Bajo Condiciones de Estrés Biótico y Abiótico

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

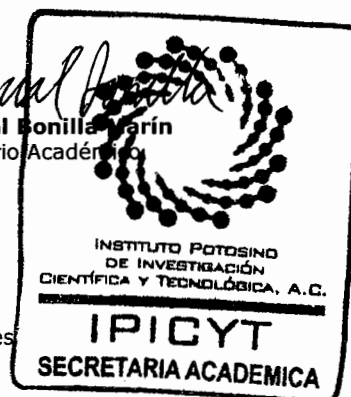
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 18 días del mes enero de 2007.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



DEDICATORIA

Con Amor y Cariño...

A mi esposo, Miguel

A mis papás, Ida y Adán

A mis abuelos, Theresia y Peter Joseph

A mis hermanos Marcos, Peter, Theresia y Miguel

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por sus asesorías, consejos, por su gran amistad y el apoyo incondicional para la realización de esta tesis.

Al Dr. Oscar A. Ruiz de INTECH, Argentina, por ofrecerme la gran oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio. Por su apoyo y consejos.

Al Dr. José Ruiz Herrera de CINVESTAV Unidad Irapuato, por sus sugerencias y el tiempo empleado en la revisión de mis artículos.

A los Doctores Sinodales, por sus ideas, sugerencias y el tiempo empleado en la revisión de esta tesis.

A mis amigas, en especial a Ana, Ceci, Tere y Mido por su gran amistad y los buenos momentos.

A mis compañeros del Laboratorio 7: Azucena, Alicia, Claudia, Eloisa, Erika, Imelda, Lorena, Maribel, Pablo, Rocío, Telma, Yadira por su amistad, apoyo y los buenos momentos.

A mis compañeros de la Unidad de Biotecnología 1 del INTECH en Argentina, en especial a Santiago (Prolino), Elisa, Andrés, Maria, Rosalía, Diego y Fabricio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada No. 172293.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

ÍNDICE

ÍNDICE	vii
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
ANEXO	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. GENERALIDADES DE LAS POLIAMINAS.....	3
2. METABOLISMO DE POLIAMINAS EN PLANTAS.....	6
a) Biosíntesis de poliaminas.....	6
b) Biosíntesis de poliaminas conjugadas.....	13
c) Catabolismo de poliaminas.....	14
d) Transporte de poliaminas.....	15
3. POLIAMINAS EN PLANTAS.....	16
a) Localización en diferentes órganos de plantas.....	18
b) El papel de las poliaminas en el desarrollo de las plantas..	22
4. EL PAPEL DE LAS POLIAMINAS DURANTE EL ESTRÉS.....	25
a) Estrés abiótico.....	26
i) Estrés salino.....	26
ii) El estrés salino y las poliaminas.....	28
iii) El ácido abscísico y las poliaminas..	31
b) Estrés biótico.....	32
i) Patógenos y poliaminas.....	32
5. MODELOS DE ESTUDIO.....	35
a) Maíz.....	35
b) <i>Ustilago maydis</i>	36

III. OBJETIVOS	38
a) Objetivo general.....	38
b) Objetivos específicos.....	38
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	40
1. MATERIAL VEGETAL, MEDIOS DE CULTIVO Y MÉTODOS.....	40
a) Variedades de maíz empleadas.....	40
b) Medio de cultivo para plantas en semihidroponia.....	40
c) Cultivo del material vegetal.....	41
2. MICROORGANISMOS.....	41
a) Cepas empleadas.....	41
i) Cepas de <i>Ustilago maydis</i>	41
ii) Cepas de <i>Escherichia coli</i>	41
b) Medios de Cultivo.....	42
i) Medios de cultivo para el crecimiento de <i>Ustilago maydis</i>	42
ii) Medios de cultivo para el crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	42
c) Métodos de crecimiento.....	42
i) Crecimiento de <i>Ustilago maydis</i>	42
ii) Crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	43
3. PLÁSMIDOS.....	43
4. TRATAMIENTOS DE ESTRÉS.....	44
a) Estrés abiótico (salinidad).....	44
i) Corto plazo.....	44
ii) Largo plazo.....	44
b) Estrés biótico (interacción maíz- <i>Ustilago maydis</i>).....	44

i)	Inoculación de plantas de maíz.....	44
ii)	Tratamientos con metil jasmonato...	45
5.	TÉCNICAS PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.....	46
a)	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	46
6.	TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	46
a)	Aislamiento de ADN plasmídico.....	46
b)	Aislamiento de ADN genómico de maíz.....	46
c)	Aislamiento de ARN total de maíz.....	46
7.	TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y SECUENCIA- CIÓN DE GENES ESPECIFICOS	47
a)	Síntesis de ADNc mediante RT-PCR.....	47
b)	Amplificación de cada transcrito por PCR.....	47
c)	Aislamiento del ADNc que codifica la espermidina sintasa de maíz <i>Zmspds2</i>	49
d)	Aislamiento de un segundo fragmento de ADNc que codifica una espermidina sintasa de maíz (<i>Zmspds2B</i>).....	50
e)	Aislamiento de la secuencia genómica del gen <i>Zmspds2</i> ...	51
f)	Secuenciación de ADN.....	51
8.	ANÁLISIS BIOQUÍMICOS.....	51
a)	Determinación de poliaminas.....	51
b)	Determinación de prolina.....	52
c)	Determinación de clorofila.....	52
d)	Determinación de actividad enzimática.....	53
i)	Actividad ADC y ODC.....	53

ii) Actividad PAO.....	53
e) Determinación de la concentración de proteína.....	54
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y BIOINFORMÁTICOS.....	54
a) Programas empleados para el análisis de secuencias de ADN y proteínas.....	54
b) Análisis estadísticos.....	54
V. RESULTADOS.....	55
1. EFECTO DEL ESTRÉS SALINO SOBRE LA REGULACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE POLIAMINAS EN MAÍZ (<i>Zea mays L.</i>).....	55
2. PERFIL DE POLIAMINAS EN PLANTAS DE MAÍZ SOMETIDAS A UN ESTRÉS SALINO A LARGO PLAZO.....	67
3. <i>Zmspds2</i> , SECUENCIA GENÓMICA Y SU REGULACIÓN EN RESPUESTA A HORMONAS Y FACTORES AMBIENTALES.....	92
4. EFECTO DE LA INTERACCIÓN DE <i>USTILAGO MAYDIS</i> SOBRE EL METABOLISMO DE POLIAMINAS DE MAÍZ.....	107
VI. DISCUSIÓN GENERAL.....	155
VII. REFERENCIAS.....	164

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genes involucrados en el metabolismo de PAs en plantas cuyas secuencias han sido aisladas y caracterizadas.....	17
Tabla 2. Variedades de maíz empleadas.....	40
Tabla 3. Solución de Hoagland 1X.....	40
Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las poliaminas más comunes.....	3
Figura 2. Biosíntesis de poliaminas en plantas.....	7
Figura 3. Interconversión entre arginina y ornitina.....	8
Figura 4. Participación del SAM en la regulación del metabolismo del nitrógeno.....	12
Figura 5. Conjugados de ácidos hidroxicinámicos y poliaminas.....	13
Figura 6. Catabolismo de poliaminas.....	15
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	37

ANEXO

1. AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DE ORNITINA DESCARBOXILASAS DE ASCOMICETOS FITOPATÓGENOS.....	184
2. GENERACIÓN DE UNA GENOTECA SUSTRACTIVA DE <i>Ustilago maydis</i> DURANTE LA TRANSICIÓN DIMORFICA <i>in vitro</i>	191

RESUMEN

La salinidad, junto con la sequía y las bajas temperaturas, constituyen los factores ambientales más adversos que afectan dramáticamente el desarrollo de las plantas. Además, el ataque por patógenos e insectos constituye un factor más en la pérdida de los cultivos.

Las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina (Put, Spd y Spm), son policationes alifáticas de bajo peso molecular involucrados en múltiples procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas, y también en respuesta a factores de estrés biótico y abiótico.

En el presente trabajo, se analizaron cambios en el metabolismo de las poliaminas de maíz bajo dos condiciones de estrés, uno abiótico que comprende el efecto del NaCl y el otro biótico, que incluye la interacción del maíz con el hongo biotrófico *Ustilago maydis*. Pocos genes involucrados en la biosíntesis de poliaminas de maíz han sido aislados y caracterizados. En este sentido, se aisló la secuencia completa del ADNc y la secuencia genómica equivalente al marco de lectura abierto de la espermidina sintasa 2 (*Zmspds2*) de maíz. Este gen participa en la biosíntesis de Spd a partir de Put. De manera interesante, la organización genómica del gen de la *Zmspds2* es altamente homologa a otros genes que codifican para aminopropil transferasas de plantas (espermidina o espermina sintasas), manteniendo conservados el tamaño y la secuencia de la mayoría de los exones. Respecto a los intrones, se observó que también mantienen una similitud elevada, y conservan los bordes típicos entre las secuencias exon/intron de plantas.

A nivel transcripcional, se analizó la expresión del gen *Zmspds2* junto con la de otros genes involucrados en la biosíntesis de poliaminas (*adc*, *odc* y *samdc*) en diferentes órganos de la planta de maíz, encontrándose una expresión mayoritaria de estos transcritos en hojas. En el caso del estrés salino, se observó una regulación positiva de los genes *Zmspds2*, *Zmspds1* y *samdc*. Sugerimos, que principalmente, el gen que codifica para la ZmSPDS2 podría jugar un papel muy importante en la respuesta del maíz a este tipo de estrés, ya que su expresión

aumenta con la subsecuente acumulación y/o mantenimiento de los niveles intracelulares de espermina. Además, se aisló una variante de procesamiento alternativo (“splicing”) del transcrito del *Zmspds2* (*Zmspds2B*), la cual se expresa únicamente en presencia de cloruro de sodio. Se encontró que el gen de la *Zmspds2* se induce en respuesta a ácido abscísico (ABA), choque osmótico y altas temperaturas lo que sugiere la presencia de elementos de respuesta como ABRE, DRE/CRT, HSE en el promotor de este gen. Estas evidencias sugieren una conexión importante entre el estrés salino, el ácido abscísico y las poliaminas.

En el caso del estrés biótico, se analizó el metabolismo de las poliaminas de maíz durante la interacción con *Ustilago maydis*, incluyendo etapas de la infección como clorosis y la formación de tumores. Esta interacción dió lugar a un aumento en la expresión de los genes *adc*, *samdc1*, *samdc2* y *samdc3* en los tejidos infectados. Además, un aumento notorio en la actividad ADC en los tejidos infectados, se asoció a la acumulación de Put libre y conjugada en estos sitios. La formación de conjugados podría estar asociada directamente con la infección. Estos conjugados participarían en la generación de agentes anti-fúngicos y también en la reducción de la concentración poliaminas libres que podrían estar involucradas en el desarrollo del tumor. Por otro lado, el catabolismo de poliaminas (espermidina y espermina) mediado por la enzima PAO, fue estimulado durante la interacción, sugiriendo un papel importante de este proceso en la lignificación y la formación de la pared durante el desarrollo del tumor.

Este trabajo, constituye el primer reporte de regulación transcripcional de la espermidina sintasa en respuesta a estrés salino en plantas y la presencia de una variante de splicing asociada a este proceso. Por otro lado, la evidente acumulación de putrescina libre y conjugada durante el desarrollo de tumores inducidos por *Ustilago maydis* en maíz, sugiere un papel sumamente importante para la putrescina en estrés biótico.

Palabras clave: estrés, maíz, poliaminas, regulación transcripcional, salinidad, *Ustilago maydis*

ABSTRACT

Soil salinity, in conjunction with drought, high and low temperatures, constitute the major abiotic stresses affecting plant growth and development. In addition, pathogen and insect attack contribute to another percentage of losses in crop productivity.

Polyamines, putrescine, spermidine and spermine (Put, Spd and Spm), are low molecular weight aliphatic polycations involved in multiple physiological and developmental processes in plants, and also in response to biotic and abiotic stress conditions.

In the present work, we analysed changes in maize polyamine metabolism under two different stress conditions. On one side, we analyzed the effect of salinity (abiotic stress) and on the other side, the interaction of the maize plant with the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. Up to now few sequences coding maize polyamine biosynthetic genes have been isolated and characterized. In these sense, we isolated the full length cDNA sequence and also the genomic sequence equivalent to the open reading frame of the maize spermidine synthase 2 (*Zmspds2*) gene. This gene participates in Spd biosynthesis from Put. Interestingly, the genomic organization of this gene is highly homologous to other genes encoding plant aminopropyl transferases (spermidine and spermine synthases), conserving size and sequence similarity of most of the exons. In addition, introns also present a considerable sequence homology, including conservation of plant exon/intron boundaries.

At the transcriptional level, we analysed the expression of the *Zmspds2* gene and that of other genes involved in polyamine biosynthesis (*adc*, *odc* and *samdc*), in different maize organs, finding a predominant expression in leaves. In the case of salt stress, we observed an up-regulation of the *Zmspds2*, *Zmspds1* and *samdc* genes. Our results suggest an important role of the *Zmspds2* gene in the response of maize plants to salt stress, in which transcript accumulation might be related to spermine accumulation and/or maintenance of the intracellular levels of this polyamine under stress. In addition, a splicing variant of the *Zmspds2* gene

(*Zmspds2B*) was identified to be induced only in response to NaCl. We observed that the *Zmspds2* gene is responsive to abscisic acid (ABA), osmotic stress and heat shock suggesting the presence of *cis* acting elements such as ABRE, DRE/CTR and HSE in the promoter region of this gene. This data support a connection between salt stress, abscisic acid and polyamines.

In the case of biotic stress, we analysed changes in polyamine metabolism during the maize-*Ustilago maydis* interaction, including symptoms of chlorosis and tumor development. This interaction leads to an up-regulation of the *adc*, *samdc1*, *samdc2* and *samdc3* genes in the infected tissues. In addition, a pronounced increased in ADC activity was related to free and conjugated Put accumulation in the infected tissues. The formation of conjugates might be directly related to the infection, and possibly involved in the generation of anti-fungal agents. In addition, it might reduce free polyamine levels possibly involved in tumor development. On the other hand, polyamine catabolism, mainly that related to Spd and Spm degradation by PAO activity (polyamine oxidase), was stimulated during the interaction suggesting an important role of this process in cell wall-stiffening or lignification during tumor growth.

This is the first report of transcriptional regulation of the spermidine sintase gene in response to salt stress in plants, and the generation of a splicing variant of this gene in this response. On the other hand, the evident accumulation of free and conjugated Put during the development of tumors induced by *Ustilago maydis*, suggest an important role for Put during biotic stress.

Key words: maize, polyamines, salinity, stress, transcriptional regulation, *Ustilago maydis*

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, conocer los mecanismos por medio de los cuales las plantas perciben una serie de condiciones ambientales adversas, y activan cascadas de señalización y mecanismos que les permiten adaptarse y tolerar estas condiciones constituye, uno de los grandes retos de la biología molecular.

Las plantas al ser organismos sésiles están constantemente en contacto con factores de estrés como son salinidad, sequía, altas y bajas temperaturas al igual que el ataque de patógenos. La salinidad junto con la sequía, constituye uno de los principales factores de estrés abiótico que afectan el desarrollo agrícola a nivel mundial. Actualmente, el 20% de las tierras cultivadas y cerca del 50% de las tierras irrigadas en el mundo están afectadas por salinidad (Zhu, 2001; Sairam y Tyagi, 2004). Esto es un problema ya que una gran variedad de cultivos de importancia económica son altamente sensibles a la salinidad, lo que constituye un factor determinante para la productividad, la distribución de los cultivos y el suministro de alimentos (Flowers, 2004a; Bartels y Sunkar, 2005). Aunado a los factores ambientales, el ataque por patógenos constituye un porcentaje considerable adicional en la pérdida de cultivos.

Los mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés son multifactoriales e incluyen la expresión de ciertos grupos de genes, la producción de proteínas de respuesta a estrés y la acumulación de solutos compatibles [azúcares, amino ácidos, ácidos orgánicos, betaínas y poliaminas (PAs) entre otros], involucrados en la protección de estructuras celulares, el mantenimiento de la homeostasis iónica y el ajuste osmótico, y la regulación de la expresión génica (Hasegawa *et al.*, 2000; Sairam y Tyagi, 2004). De estos mecanismos, el estudio del metabolismo de las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) ha ido en aumento en las últimas dos décadas. Las poliaminas (PAs) son policationes alifáticas de bajo peso molecular involucrados en múltiples procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas, animales, hongos y bacterias (Cohen, 1998).

Actualmente, la participación de las PAs en respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico en plantas ha mostrado un campo nuevo e interesante en la regulación e implicación de estos compuestos. Se ha sugerido que sus propiedades de captación de radicales libres, estabilización de membranas, protección a ácidos nucleicos y recientemente su papel en la regulación de la expresión génica, comprenden algunos de los mecanismos por medio de los cuales confieren tolerancia al estrés.

El presente trabajo de tesis involucra el análisis del metabolismo de poliaminas de maíz bajo dos condiciones de estrés: uno abiótico que comprende el efecto de la salinidad y el otro biótico que incluye la interacción del maíz con el hongo biotrófico *Ustilago maydis*. Estudiar el efecto de dos condiciones de estrés contrastantes sobre el metabolismo de poliaminas, pretende ampliar los conocimientos básicos sobre la regulación de estos compuestos, y permitirá a futuro plantear estrategias para la generación de plantas con características especiales que les permitan sobrellevar condiciones de estrés biótico y abiótico.

II. ANTECEDENTES

1. GENERALIDADES DE LAS POLIAMINAS

Las poliaminas (PAs), putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm), son policationes alifáticas de bajo peso molecular involucrados en múltiples procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas, animales, hongos y bacterias (Fig. 1).

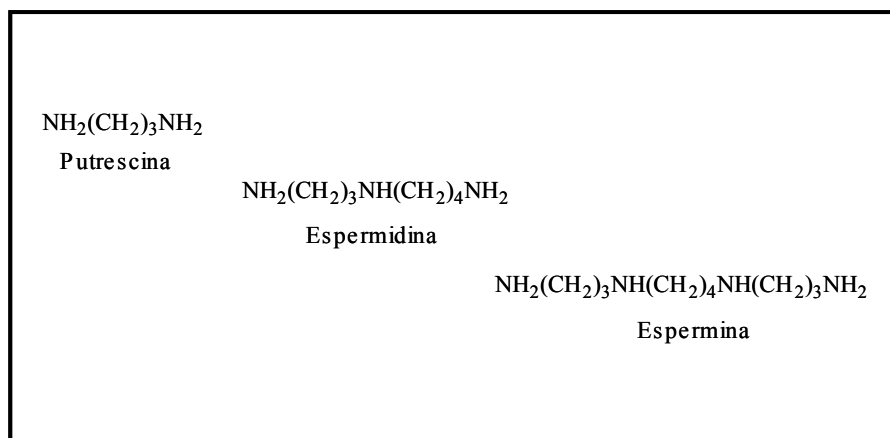


Figura 1. Estructura química de las poliaminas más comunes.

A nivel celular, las PAs participan en el funcionamiento adecuado de canales iónicos, el empaquetamiento de ADN y la estabilización de la cromatina, en procesos de replicación, transcripción y traducción, y en el proceso de la apoptosis (Childs *et al.*, 2003). La actividad biológica de las PAs por una parte, se atribuye a su naturaleza catiónica. A pH fisiológico, la Put, Spd y Spm se encuentran protonadas y poseen dos, tres y cuatro cargas positivas, respectivamente. Esta carga les permite unirse fuertemente a diferentes moléculas cargadas negativamente dentro de la célula. Se ha reportado la interacción de PAs con los grupos fosfato del ADN y del ARN, con componentes aniónicos de los fosfolípidos y con componentes de la pared celular como pectinas (Heby, 1986; Kakkar *et al.*, 2000; Childs *et al.*, 2003). Además, también se han reportado interacciones con canales de potasio y receptores de glutamato (Ficker *et al.*, 1994).

La interacción de PAs con el ADN puede inducir cambios conformacionales entre la estructura usual de la doble hélice, con giro a la derecha (B), a una estructura con giro a la izquierda (Z) (Hasan *et al.*, 1995). Estos cambios pueden ocurrir en segmentos cortos de ADN, inducidos principalmente por Spd y Spm. La presencia de la conformación ADN-Z juega un papel importante a nivel biológico en la modulación de la replicación del ADN, en eventos de recombinación y en el control de la expresión génica (Heby, 1986; Balasundaram y Tiagy, 1991; Igarashi y Kashiwagi, 2000; Childs *et al.*, 2003).

Asimismo, las poliaminas aumentan la estabilidad del complejo de los nucleosomas (Morgan *et al.*, 1987) y participan en la condensación y remodelación de la estructura de la cromatina (Matthews, 1993; Balasundaram y Tyagi, 1991). La formación de fibras de 30 nm es un ejemplo característico de la condensación de la cromatina *in vitro* inducida por PAs (Smirnov *et al.*, 1988). De esta manera, además de las histonas, las poliaminas juegan un papel muy importante en la condensación de la cromatina y por lo tanto en la transcripción y replicación del ADN. Se sabe que procesos de acetilación que modifican a histonas pueden acetilar también a las PAs. Está caracterizado que la histona acetiltransferasa encargada de acetilar a la histona H4 puede acetilar a la Spd (Balasundaram y Tyagi, 1991). Se ha sugerido que la acetilación de histonas y PAs ocurre en “tandem” para alterar la estructura y función de los nucleosomas, regulando de esta manera procesos importantes como la transcripción y la replicación del ADN (Balasundaram y Tyagi, 1991). Recientemente, Lindemose *et al.*, (2005) demostraron la unión secuencia-específica de las PAs a regiones de ADN ricas en adenina, con lo que se propone que las PAs podrían regular la expresión génica al interactuar con estas regiones a nivel de promotores.

Por otro lado, las PAs protegen al ADN de la degradación enzimática, degradación por rayos X y gamma (γ), de las especies reactivas del oxígeno, por radicales libres y por calor (Ha *et al.*, 1998; Childs *et al.*, 2003). En este caso, la capacidad de compactación del ADN y la capacidad de secuestrar radicales libres, son los

atributos principales de las PAs que brindan estabilidad y protección al ADN. Además, debido a su carácter de ácido débil, podrían amortiguar el citoplasma en condiciones de estrés ácido (Slocum *et al.*, 1984).

En el caso de proteínas, las PAs interaccionan con estas moléculas modificando su estructura. Por ejemplo, el factor de iniciación de la traducción eIF5A sufre una modificación a nivel post-traducciona dependiente de Spd (Cooper *et al.*, 1983; Childs *et al.*, 2003). Esta modificación es indispensable para la viabilidad celular (Schnier *et al.*, 1991), y consiste en la generación de un nuevo amino ácido (hipusina) por transferencia de un grupo aminobutilo de la Spd a un residuo de lisina del factor eIF5A (Park *et al.*, 1982). Otro ejemplo, es la modulación de la síntesis de proteínas mediante el mecanismo de desplazamiento en un nucleótido específico, por parte de los ribosomas, al procederse a la lectura del marco del ARNm correspondiente, fenómeno conocido como cambio de marco de lectura del ribosoma (“Ribosomal frameshifting”). Esto se ha reportado en el caso de la anti enzima (Childs *et al.*, 2003). Ésta es una proteína que estimula la degradación de la ornitina descarboxilasa (ODC), enzima encargada de la biosíntesis de Put, mediante la acción del proteosoma 26S en un proceso dependiente de ATP. La acción de la anti enzima es de suma importancia, ya que además de inhibir la actividad ODC suprime la absorción de PAs exógenas, controlando los niveles intracelulares de estos compuestos (Mitchell *et al.*, 1994). La anti enzima es codificada por dos marcos de lectura abiertos (ORFs) superpuestos. El primero de ellos contiene dos metioninas; sin embargo, un cambio de marco de lectura del ribosoma (+1, -2, dependiendo del organismo) es necesario para acceder al segundo ORF y se lleve a cabo la traducción de la proteína funcional (Rom y Kahara, 1994). Este cambio debe ocurrir una base antes del codón de termino del primer ORF y depende del contenido intracelular de PAs.

La función de varias proteínas puede ser afectada directa o indirectamente por PAs, ya sea interactuando con ellas o bien, modulando su unión con ácidos nucleicos (Childs *et al.*, 2003). Dentro de ellas se ha observado la interacción con proteínas neuroactivas como los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) que son

permeables a calcio (Ca^{+2}) y están involucrados en la transmisión sináptica central. Se ha visto que la unión de PAs a dominios extracelulares de estas proteínas induce su activación mientras que la unión a sitios de su canal iónico las inhibe (Usherwood, 2000; Igarashi and Kashiwagi, 2000). Por otro lado, la unión de factores de transcripción a sus elementos de respuesta en el ADN se ha visto estimulada por PAs. Por ejemplo, la unión de los receptores de estrógenos (ER) a sus elementos de respuesta EREs ocurre en eventos dependientes de la concentración de Spm. Un rango de 100 a 500 μM estimula la interacción del complejo ER-ERE mientras concentraciones mayores de 1000 μM las inhibe. Efectos similares han sido observados en la interacción de otros factores de transcripción como NF- κB con sus elementos de respuesta NRE (Thomas y Thomas, 2001).

Finalmente, se ha estimado que las PAs se encuentran mayoritariamente formando un complejo ARN-PAs (Igarashi y Kashiwagi, 2000). Esto les permite participar en la regulación de la expresión génica y la modulación de la síntesis de proteínas al modificar la estructura de los ARN mensajeros, ribosomales (ensamblaje de las subunidades 30 S) y de transferencia (formación del enlace Isoleucina-tRNA) principalmente. Además, confieren una mayor protección y estabilidad a estas estructuras (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Childs *et al.*, 2003).

2. METABOLISMO DE POLIAMINAS EN PLANTAS

a) Biosíntesis de poliaminas

El contenido de poliaminas (PAs) presente en un momento dado, es el resultado de varios factores: su biosíntesis, así como del transporte intercelular (absorción y/o secreción), de su conjugación con compuestos fenólicos y macromoléculas como proteínas y de su catabolismo (Tiburcio *et al.*, 1997). La biosíntesis de PAs inicia con la descarboxilación de aminoácidos como arginina, ornitina y lisina, siendo la Putrescina (Put) la primera en ser sintetizada. En plantas, existen dos vías de síntesis de Put (Fig. 2). Y una vía directa, en la cual se genera Put a partir

de ornitina por acción de la ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17). Una vía indirecta que implica una serie de intermediarios a partir de arginina hasta generar Put. La vía indirecta comienza con la descarboxilación de arginina a agmatina mediante la enzima arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19). Subsecuentemente, la agmatina es hidrolizada a N-carbamoil-putrescina por la enzima agmatina iminohidrolasa (AIH, EC 3.5.3.12) y convertida a Put por la N-carbamoil-putrescina amidohidrolasa (NCPAH, EC 3.5.1.53) (Tiburcio *et al.*, 1997; Bagni y Tassoni, 2001). Las poliaminas superiores espermidina (Spd) y espermina (Spm), son sintetizadas a partir de Put por la adición de grupos amino-propilo mediante las enzimas espermidina sintasa (SPDS, EC 2.5.1.16) y espermina sintasa (SPMS, EC 2.5.1.22), respectivamente. Los grupos amino-propilo son generados por la descarboxilación de la S-adenosilmetionina (SAM) mediante la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC, EC 4.1.1.50).

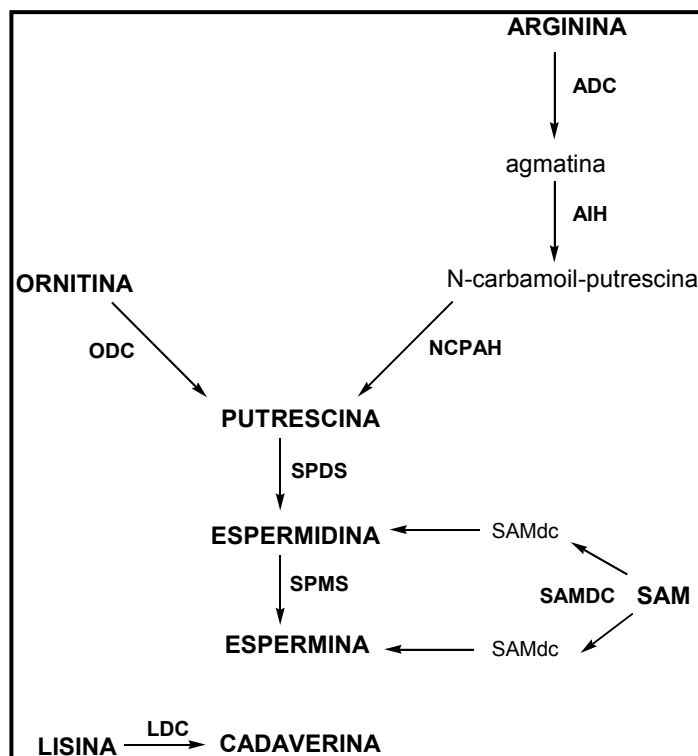


Figura 2. Biosíntesis de poliaminas en plantas. ADC, arginina descarboxilasa; AIH, agmatina iminohidrolasa; SAMdc, S-adenosilmetionina descarboxilada; NCPAH, N-carbamoil-putrescina amidohidrolasa; ODC, ornitina descarboxilasa; SAMDC, S-adenosilmetionina descarboxilasa.

En algunas familias de plantas (Gramineae, Leguminoseae y Solanaceae) al igual que en algunas bacterias, la biosíntesis de cadaverina (Cad), la cual es un análogo de la Put, se lleva a cabo por la descarboxilación de la lisina mediante la lisina descarboxilasa (LDC, EC 4.1.1.18) como se muestra en la Figura 2 (Smith y Wilshire, 1975).

La presencia de dos vías alternas para la biosíntesis de Put en plantas, en las cuales se ha observado una localización diferencial de las enzimas involucradas en los compartimentos celulares (ADC en citoplasma y cloroplasto; ODC en citoplasma y núcleo), sugiere que ambas enzimas tienen un papel fisiológico diferente (Borrell *et al.*, 1995; Tiburcio *et al.*, 1997). Se ha visto que estas enzimas son reguladas de manera tejido-específica y en respuesta a las etapas de desarrollo de la planta (Kumar *et al.*, 1997; Walden *et al.*, 1997). Se ha propuesto que la ODC está involucrada principalmente en procesos de división y proliferación celular en tejidos jóvenes, mientras que la ADC con procesos de elongación celular y también en respuesta a estrés (Tiburcio *et al.*, 1997; Kakkar y Sawhney, 2002). La actividad de las tres descarboxilasas (ODC, ADC y SAMDC) sugiere un punto importante de control metabólico en la célula partiendo de la vida media muy corta de estas enzimas (Cohen, 1998).

Por otro lado, los sustratos ornitina y arginina empleados por ambas vías (directa e indirecta, respectivamente), pueden ser interconvertidos por las enzimas arginasa (EC 3.5.3.1, arginina a ornitina) y ornitina transcarbamilasa (OTC, EC 2.1.3.3, ornitina a citrulina a arginina) como se muestra en la Figura 3 (Bagni y Tassoni, 2001).

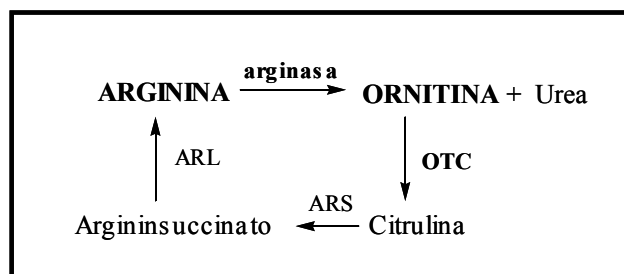


Figura 3. Interconversión entre arginina y ornitina. OTC, ornitina transcarbamilasa; ARS, argininsuccinato sintasa; ARL, argininsuccinasa.

La SAMDC se localiza principalmente en citoplasma (Torrighiani *et al.*, 1986) y está asociada con procesos de división y diferenciación celular (Mad Arif *et al.*, 1994). En el caso de la SPDS y la SPMS se ha descrito que estas enzimas se localizan en citoplasma formando parte de un complejo multienzimático o metaboloma (Panicot *et al.*, 2002a). La SPDS se asocia a tejidos en crecimiento tanto en eventos de división celular como en eventos de elongación celular, mientras que la SPMS se ha visto implicada principalmente a procesos de elongación celular (Alabadi y Carbonell, 1999b; Hanzawa *et al.*, 2000).

En general, la biosíntesis de PAs depende tanto de la etapa de crecimiento de la planta como de factores ambientales entre los cuales el estrés, la luz y el ciclo circadiano juegan un papel importante (Yoshida *et al.*, 1999; Bouchereau *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha reportado que las enzimas involucradas en la biosíntesis de PAs sufren ciertas modificaciones, o bien están sometidas a etapas de control como lo son la regulación transcripcional, traduccional y post-traduccional (Walden *et al.*, 1997). A continuación se describen algunos de estos eventos, los cuales han sido observados principalmente en las descarboxilasas (ADC, ODC y SAMDC):

ADC (arginina descarboxilasa)

Esta enzima se sintetiza como una pro-enzima (precursor inactivo), la cual requiere de un corte proteolítico y la formación de un puente disulfuro para ser activa (Malmberg y Cellino, 1994). Este proceso puede ser inhibido por Spm (Tiburcio *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha observado que la actividad ADC no siempre correlaciona con los niveles de expresión de su transcrito, lo que sugiere un control a nivel post-transcripcional o traduccional (Rastogi *et al.*, 1993; Perez-Amador *et al.*, 1995). Esto se ha descrito en plantas como chícharo (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*), y se ha sugerido que la presencia de regiones 5' no traducibles (5'-UTR) largas en los ARNm que codifican para la *adc* de estas plantas, podrían estar involucradas en este tipo de regulación (Perez-Amador *et al.*, 1995). Además, se ha reportado la presencia de pequeños marcos de lectura

abiertos “uORFs” en las regiones 5'-UTR de la *adc* de diferentes especies de plantas (Pérez-Amador *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2005). Estos uORFs varían en tamaño (6 a 11 amino ácidos), no mantienen un consenso, y se ha propuesto que inhiben la traducción del ORF principal (Chang *et al.*, 2000).

SAMDC (S-adenosilmetionina descarboxilasa)

Al igual que la ADC, la SAMDC es sintetizada como un precursor inactivo, el cual también requiere de un corte proteolítico para liberar las dos subunidades (α y β) que conforman la enzima funcional (Mad Arif *et al.*, 1994; Schröder y Schröder, 1995). Este proceso es auto-catalítico y ocurre en un residuo conservado de serina (Xiong *et al.*, 1997). Por otro lado, los transcritos de las SAMDCs de plantas se caracterizan por tener regiones largas no traducibles (5'-UTR) que contienen dos pequeños marcos de lectura superpuestos altamente conservados (uORFs) (Franceschetti *et al.*, 2001). Se ha descrito que muchos genes, principalmente aquellos que controlan procesos de crecimiento y desarrollo, contienen uORFs en la región 5'-UTR (Kozak, 1987). En el caso de la *samdc*, la presencia de estos uORF juegan un papel muy importante en la regulación traduccional del ORF principal (Hanfrey *et al.*, 2002). Además, se han localizado posibles regiones PEST (regiones ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina) en las SAMDCs de plantas. Estas regiones son características de proteínas con una alta velocidad de recambio, teniendo una vida media corta ≤ 1 h (Rechsteiner y Rogers, 1996; Cohen, 1998; Tiburcio *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997). En la regulación de la expresión de los genes que codifican a la SAMDC participan diversos factores como hormonas, incluso las propias PAs (Tiburcio *et al.*, 1997).

ODC (Ornitina descaboxilasa)

Poco se conoce sobre la regulación de la ODC en plantas en comparación con mamíferos donde los mecanismos involucrados en su síntesis y degradación han sido ampliamente caracterizados (Heby y Persson, 1990; Li y Coffino, 1992; 1993; 1994; Tiburcio *et al.*, 1997). En comparación con mamíferos, todas las ODC's de plantas caracterizadas hasta el momento carecen de una extensión carboxi-

terminal, la cual se ha propuesto está involucrada en la degradación rápida de la proteína por medio de la antienzima (Murakami *et al.*, 1992; Michael *et al.*, 1996; Flemetakis *et al.*, 2004). En mamíferos, la antienzima es inducida por Spd y estimula la degradación de ODC vía el proteosoma 26 S. La ausencia del dominio carboxi-terminal previamente descrito hace suponer que las enzimas de plantas son más estables. Por otro lado, comparaciones entre secuencias de ODC's de plantas y mamíferos ha permitido identificar la región de amino ácidos conservados equivalente al probable sitio de unión de la antienzima en ODC's de mamíferos, al igual que la identificación de posibles sitios PEST en el extremo carboxi-terminal (Flemetakis *et al.*, 2004; Jiménez-Bremont *et al.*, 2004). Sin embargo, estos datos son especulativos ya que hasta el momento no se ha reportado ninguna secuencia que codifique un gen para la antienzima en plantas. Por otro lado, se ha descrito la presencia de un pequeño marco de lectura abierto (uORF) en la región 5'-UTR del ARNm de la *odc* de tomate (Kwak y Lee, 2001). La presencia de este uORF controla de manera negativa la regulación del ORF principal. En mamíferos, también se ha reportado la presencia de pequeños marcos de lectura (uORFs) en los 5'-UTR de *odc*'s, y su función es similar a la descrita en plantas (Shantz y Pegg, 1999). Finalmente, las enzimas ODC y ADC pertenecen al grupo IV de enzimas descarboxilasas dependientes del cofactor fosfato de piridoxal (Sandmeier *et al.*, 1994). En la ODC de ratón, se identificaron residuos de lisina y cisteína (Lys⁶⁹, Cys³⁶⁰) responsables de la unión del cofactor fosfato de piridoxal y también de inhibidores específicos como la α -difluorometilornitina (DMFO) (Poulin *et al.*, 1992). Estos sitios también han sido identificados en ambas enzimas de plantas (Tiburcio *et al.*, 1997).

SPDS y SPMS (Espermidina sintasa y Espermina sintasa)

Las enzimas anteriormente descritas (ADC, SAMDC y ODC) no contienen intrones en el marco de lectura abierto, a diferencia de las SPDS y SPMS de plantas, las cuales presentan varios intrones (Panicot *et al.*, 2002a; Zhang *et al.*, 2003; Hanzawa *et al.*, 2000, 2002). Esta característica da lugar a la expresión de diferentes variantes de estos genes por eventos de procesamiento alternativo de

exones (Ikeguchi *et al.*, 2006). En plantas, el aislamiento y caracterización de aminopropil transferasas (SPDS y SPMS) es un tema sumamente reciente y poco se conoce sobre su regulación. Sin embargo, en el caso de las SPDS se han identificado secuencias consenso características de la familia de las espermidina sintasas y también los sitios de unión propuestos para el SAM y el SAM descarboxilado (Posfai *et al.*, 1989; Hashimoto *et al.*, 1998; Hatanaka *et al.*, 1999). En humano se ha reportado que el ARNm que codifica a la *spds* contiene una región 5'-UTR rica en GC's (guaninas y citocinas) lo cual se ha propuesto tiene un efecto negativo sobre la traducción del mensajero (Kauppinen, 1995).

Sumado a lo anterior, el metabolismo de PAs interactúa con otras vías de síntesis de metabolitos secundarios. El SAM, juega un papel muy importante en esta interacción, ya que regula el metabolismo del nitrógeno al ser sustrato común para la síntesis de PAs, de etileno y también la síntesis de nicotina y otros alcaloides relacionados (Tiburcio *et al.*, 1997). Además, el SAM participa en diferentes reacciones de transmetilación dentro de la célula (Figura 4). Se ha sugerido que las PAs y el etileno afectan diferencialmente procesos antagónicos como crecimiento y senescencia al compartir el mismo sustrato. Aparte del SAM, existen otros sustratos como la ornitina y la arginina que participan en la síntesis tanto de PAs como la de otros compuestos nitrogenados: la prolina y la urea, respectivamente (Tiburcio *et al.*, 1997; Bhatnagar *et al.*, 2001).

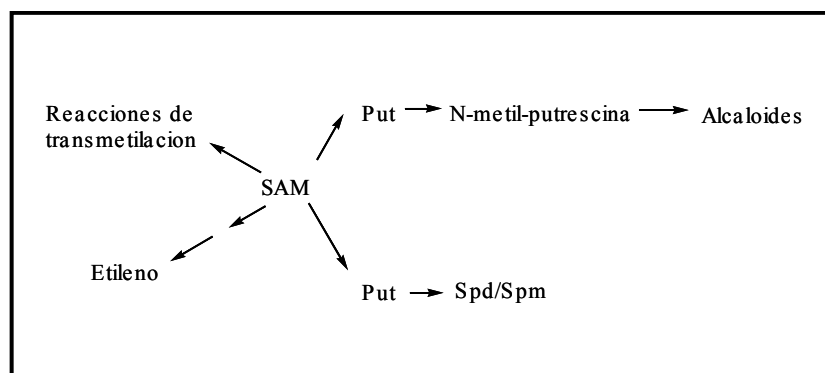


Figura 4. Participación del SAM en la regulación del metabolismo del nitrógeno.

b) Biosíntesis de poliaminas conjugadas

Las PAs de plantas pueden encontrarse en su forma libre o formando conjugados con moléculas pequeñas como ácidos hidroxicinámicos o bien unidas a macromoléculas como proteínas (Martin-Tanguy, 1997; 2001). Los conjugados solubles de PAs con ácidos hidroxicinámicos (principalmente, ácido cumárico, ácido caféico y ácido ferúlico), son sintetizados como monómeros mientras que los dímeros constituyen la fracción insoluble (Figura 5).

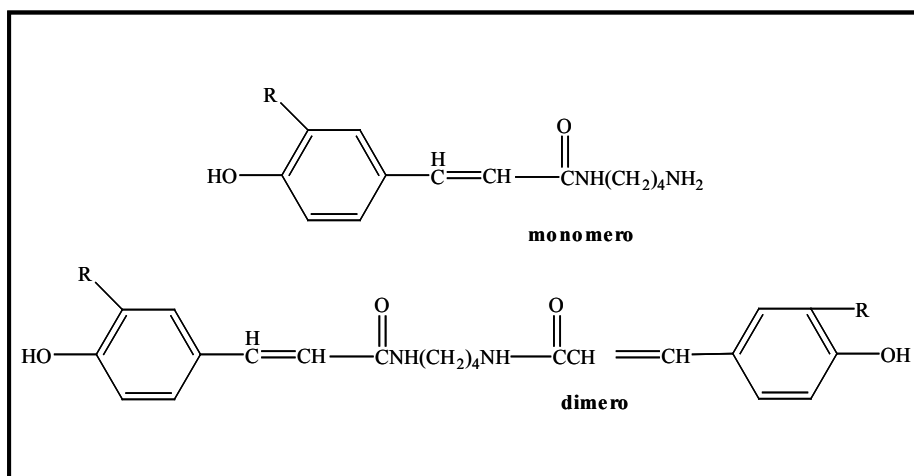


Figura 5. Conjugados de ácidos hidroxicinámicos y poliaminas.

Estos conjugados son de particular importancia para la regulación del contenido intracelular de PAs y por su interacción con componentes de la pared celular (Bagni y Pistocchi, 1990). Además, la formación de conjugados juega un papel importante en la eliminación de compuestos fenólicos tóxicos los cuales inhiben el crecimiento (Martin-Tanguy, 1997). La proporción entre PAs libres y conjugadas varía entre las diferentes especies de plantas. Por ejemplo, en tabaco más del 90% del contenido de PAs se encuentra en forma conjugada (Torrighiani *et al.*, 1987). La síntesis de PAs conjugadas se lleva a cabo por la formación de un enlace amida, empleando ésteres de acetil coenzima A (CoA), por la acción de diferentes transferasas (Negrel *et al.*, 1989). Estas transferasas difieren en su especificidad por los derivados que generaran. Por ejemplo, la putrescina hidroxicinamoil transferasa (PHT, EC 2.3.1.-) cataliza la transferencia de ácidos hidroxicinámicos entre la CoA y la putrescina (Negrel, 1989).

La función de las PAs conjugadas aún no es clara, sin embargo, se ha propuesto que estos compuestos son marcadores de floración ya que su biosíntesis va de la mano con este proceso, es decir, cuando existe un retraso en la biosíntesis de conjugados también se afecta la floración (Martin-Tanguy, 1985). Además, se ha sugerido que estos compuestos están involucrados en la transición entre los meristemas vegetativo y floral. Por otro lado, se ha sugerido que participan en mecanismos de defensa a estrés biótico y abiótico principalmente por su capacidad de captación de radicales libres y también por sus propiedades antifúngicas (Bagni y Tassoni, 2001; Martin-Tanguy, 2001; Walters, 2003).

Finalmente, las poliaminas unidas a proteínas están involucradas en diferentes procesos como la fotosíntesis, la inducción de floración y también en mecanismos de defensa contra condiciones de estrés abiótico y deficiencia nutricional (Tiburcio *et al.*, 1997; Del Duca *et al.*, 1995; Martin-Tanguy, 2001). Se ha descrito que la enzima transglutaminasa (EC 2.3.2.13), la cual se localiza en el cloroplasto, participa en la unión covalente de PAs a proteínas como la Rubisco y algunas apoproteínas del complejo clorofila a/b en un proceso estimulado por luz (Del Duca *et al.*, 1994). Estos eventos juegan un papel importante en la protección de proteínas como la Rubisco ante la acción de proteasas, preservando de esta manera la eficiencia de la fotosíntesis.

c) Catabolismo de poliaminas

El catabolismo de PAs se afecta por la acción de una o varias oxidasas: ya sea diamino oxidasas (DAO, E.C. 1.4.3.6) y/o poliamino oxidasas (PAO E.C. 1.4.3.3). La enzima DAO se localiza principalmente en la pared celular y de ahí puede ser liberada al apoplasto, aunque también se ha detectado en mitocondria (Angelini *et al.*, 1993; Scoccianti *et al.*, 1991). Los principales sustratos de la DAO son la Put y la Cad, sin embargo; también puede actuar sobre algunas monoaminas aromáticas y alifáticas. El catabolismo de Put genera Δ^1 -pirrolina, amonio y peróxido de hidrógeno (Fig. 6). La Δ^1 -pirrolina es subsecuentemente convertida a GABA (ácido- γ -aminobutírico) por acción de la pirrolina deshidrogenasa.

Finalmente, el GABA entra al ciclo de Krebs en forma de succinato (Bagni y Tassoni, 2001; Bouchereau *et al.*, 1999).

La Spd y Spm son degradadas por la enzima PAO, la cual se localiza principalmente en la pared celular (Federico y Angelini, 1991). La degradación de Spd por acción de la PAO, genera Δ^1 -pirrolina y 1,3-diaminopropano mientras que la degradación de la Spm genera 1,3-aminopropilpirrolina y diaminopropano además de peróxido de hidrógeno. El diaminopropano puede ser convertido finalmente en β -alanina (Bagni y Tassoni, 2001).

Debido a lo anterior, el catabolismo de PAs no solo implica un proceso degradativo sino también una conexión importante entre el metabolismo de aminoácidos y el de carbono.

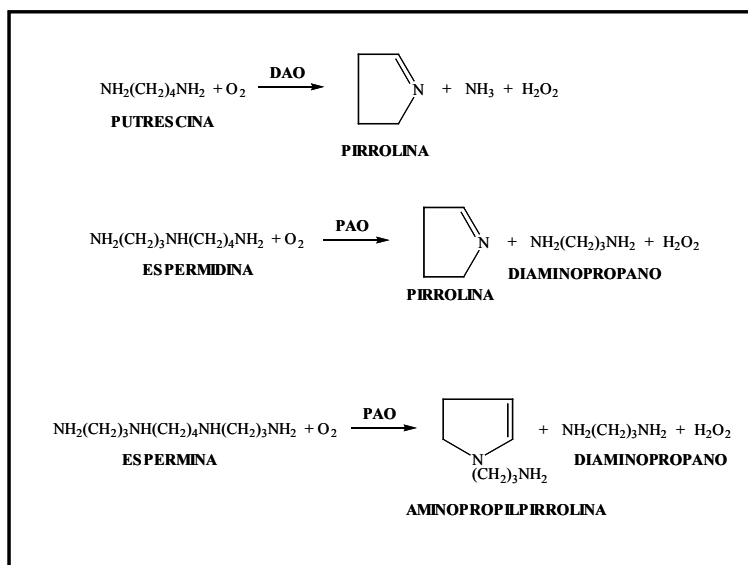


Figura 6. Catabolismo de poliaminas. DAO, diamino oxidasa; PAO; poliamino oxidasa

d) Transporte de poliaminas

En general, las células sintetizan la cantidad de PAs que necesitan, sin embargo; poseen transportadores que les permiten captar PAs del exterior. En plantas, la absorción de PAs a nivel celular es un proceso muy rápido el cual llega a saturación después de 1 a 2 min. Además, es un mecanismo activo, estimulado por auxinas, en el cual las PAs absorbidas son generalmente acumuladas en vacuolas en forma de PAs conjugadas (Tiburcio *et al.*, 1997; Antognomi *et al.*, 1998). En este sentido, únicamente las PAs libres son transportadas (Antognomi

et al., 1998). Por otro lado, el transporte a distancia dentro de la planta involucra la translocación de PAs a través del xilema y el floema en un proceso dependiente de la velocidad de transpiración (Bagni y Pistocchi, 1991). Se ha propuesto que este transporte se lleva a cabo en contra de un gradiente de concentración el cual implica el uso de transportadores específicos y energía (Pistocchi *et al.*, 1987; Antognoni *et al.*, 1998).

3. POLIAMINAS EN PLANTAS

En plantas, la concentración intracelular de PAs va desde una escala micromolar hasta un poco más de milimolar, lo cual es mucho mayor a la concentración intracelular de fitohormonas. Se ha propuesto que las PAs constituyen un nuevo grupo de reguladores de crecimiento y/o que actúan como segundos mensajeros hormonales; es decir, median la acción de las hormonas como parte de su señalización y respuesta (Slocum y Flores, 1991; Kakkar y Sawhney, 2002). Se ha descartado la posibilidad de que las PAs sean estrictamente hormonas ya que no comparten todas las características descritas para una hormona: “son moléculas que ejercen un efecto significativo a nivel fisiológico y de desarrollo, siendo activas a bajas concentraciones y ejerciendo su efecto en un sitio distinto al sitio donde han sido sintetizadas”. En este sentido, las PAs ejercen sus efectos a concentraciones mayores (milimolar). Además, poco se conoce sobre su transporte.

Por otro lado, se ha sugerido que las PAs constituyen una reserva de carbono y nitrógeno al menos en tejidos en cultivo (Revisado por Kakkar y Sawhney, 2002). A nivel fisiológico, participan en diferentes procesos de crecimiento y desarrollo en plantas incluyendo eventos de división celular, rizogénesis, embriogénesis somática, senescencia, desarrollo de flores, maduración de frutos, viabilidad del polen y en respuesta a factores de estrés biótico y abiótico (Evans y Malmberg, 1989; Kakkar y Rai, 1993; Galston *et al.*, 1997; Bouchereau *et al.*, 1999; Kakkar *et al.*, 2000; Kakkar y Sawhney, 2002). Hasta el momento se han aislado y

caracterizado algunos genes que participan en el metabolismo de poliaminas en plantas como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes involucrados en el metabolismo de PAs en plantas cuyas secuencias han sido aisladas y caracterizadas

Gen	Planta	Referencia
adc	<i>Avena sativa</i>	Bell y Malmberg, 1990
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Rastogi <i>et al.</i> , 1993
	<i>Pisum sativum</i>	Perez-Amador <i>et al.</i> , 1995
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Watson y Malmberg, 1996
	<i>Glycine max</i>	Nam <i>et al.</i> , 1997
	<i>Oryza sativa</i>	Chattopadhyay <i>et al.</i> , 1997
	<i>Vitis vinifera</i>	Primikiriou y Roubelakis-Angelakis, 1999
	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Chang <i>et al.</i> , 2000
	<i>Brassica juncea</i>	Mo y Pua, 2002
	<i>Pringlea antiscorbutica</i>	Hummel <i>et al.</i> , 2004
	<i>Lotus japonicus</i>	Flemetakis <i>et al.</i> , 2004
<i>Malus sylvestris</i>	Hao <i>et al.</i> , 2005	
odc	<i>Datura stramonium</i>	Michael <i>et al.</i> , 1996
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Kwak y Lee, 2001
	<i>Capsicum annuum</i>	Yoo <i>et al.</i> , 2004
	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Xu <i>et al.</i> , 2004
	<i>Lotus japonicus</i>	Flemetakis <i>et al.</i> , 2004
	<i>Malus sylvestris</i>	Hao <i>et al.</i> , 2005
samdc	<i>Solanum tuberosum</i>	Mad Arif <i>et al.</i> , 1994
	<i>Spinacia oleracea</i>	Bolle <i>et al.</i> , 1995
	<i>Catharanthus roseus</i>	Schröder y Schröder, 1995
	<i>Hordeum chilense</i>	Dresselhaus <i>et al.</i> , 1996
	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Lee <i>et al.</i> , 1997
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i> y <i>Zea mays</i>	Franceschetti <i>et al.</i> , 2001
	<i>Pisum sativum</i> L.	Marco y Carrasco, 2002
	<i>Brassica juncea</i>	Hu <i>et al.</i> , 2005

Continuación Tabla 1.

Gen	Planta	Referencia
spds	<i>Arabidopsis thaliana</i> ,	Hashimoto <i>et al.</i> , 1998; Hanzawa <i>et al.</i> , 2002
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Alabadi y Carbonell, 1999b
	<i>Pisum sativum</i>	Alabadi y Carbonell, 1999a
	<i>Coffea arabica</i>	Hatanaka <i>et al.</i> , 1999
	<i>Oryza sativa</i>	Imai <i>et al.</i> , 2004a
	<i>Cucumis sativus L</i>	Wang <i>et al.</i> , 2005
	<i>Zea mays</i>	Rodríguez-Kessler <i>et al.</i> , 2006 (En este trabajo de Tesis)
spms	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Panicot <i>et al.</i> , 2002a; Hanzawa <i>et al.</i> , 2000
	<i>Malus sylvestris</i>	Kitashiba <i>et al.</i> , 2005
dao	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Moller y McPherson, 1995
	<i>Cicer arietinum</i>	Rea <i>et al.</i> , 1998
	<i>Glycine max</i>	Delis <i>et al.</i> , 2006
pao	<i>Zea mays</i>	Cervelli <i>et al.</i> , 2000
	<i>Hordeum vulgare</i>	Cervelli <i>et al.</i> , 2001
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Yoda <i>et al.</i> , 2006

a) Localización en diferentes órganos de plantas

Los genes involucrados en el metabolismo de poliaminas se expresan de manera tejido-específica, dependiendo de las etapas de desarrollo de la planta y en respuesta a diferentes condiciones de estrés. En el caso de la *odc*, diferentes autores apoyan la hipótesis de una expresión mayoritaria de este gen en tejidos en proliferación celular, principalmente en zonas meristemáticas, donde una división celular activa podría estar ocurriendo (Schwartz *et al.*, 1986; Michael *et al.*, 1996). En jitomate (*Lycopersicon esculentum*), la expresión del gen de la *odc* fue detectado en órganos jóvenes incluyendo hojas, hipocotilo y meristemas apicales de raíz, además en brotes y en flores (Alabadi y Carbonell, 1998; Kwak y Lee, 2001). En chile (*Capsicum annuum*), la expresión del gen fue detectada a la par con el proceso de maduración del fruto, existiendo una expresión mayor en las

etapas tardías (Zainal *et al.*, 2002). En *Datura stramonium* el transcrito de la *odc* se acumuló notablemente en cultivos de raíz transformados con *Agrobacterium rhizogenes*. Estos cultivos presentaban una tasa de crecimiento rápida, con raíces laterales abundantes y un gran número de meristemos (Michael *et al.*, 1996).

De manera opuesta al gen de la *odc*, el de la *adc* se expresa principalmente en tejidos en proceso de elongación, así como en respuesta a las etapas de desarrollo de la planta y a diferentes factores ambientales. Estudios realizados en soya (*Glycine max*), chícharo (*Pisum sativum*) y jitomate (*L. esculentum*) concuerdan con esta afirmación (Rastogi *et al.*, 1993; Pérez-Amador *et al.*, 1995; Nam *et al.*, 1997). En el caso de la soya, una mayor expresión del transcrito y de la actividad enzimática de la ADC fue detectada en hipocotilos jóvenes, principalmente en la zona de elongación del hipocotilo, y también en la raíz de plántulas de 3 a 5 días de edad. Además, en plantas maduras, la expresión y la actividad fue mayoritaria en tallo y raíz mientras que en hojas el transcrito fue escasamente detectado (Nam *et al.*, 1997). En la planta de mostaza (*Brassica juncea*), se reportó un patrón similar de expresión (Mo y Pua, 2002).

En jitomate, se observaron cambios en la expresión de *adc* durante la maduración del fruto, aumentando gradualmente el transcrito a medida que el fruto fue madurando (Rastogi *et al.*, 1993).

En un trabajo reciente en soya, se determinó por hibridación “*in situ*” que los transcritos de la *adc* y *odc* se co-localizan en células en expansión de raíz e hipocotilo (Delis *et al.*, 2005). En este trabajo se sugirió que ambos genes están implicados en procesos de elongación celular.

En ciertas especies de plantas como jitomate, soya, uva (*Vitis vinifera*) entre otras, el gen de la *adc* se encuentra como copia única, mientras que en otras especies se ha detectado en dos o más copias (Galloway *et al.*, 1998; Hummel *et al.*, 2004). La existencia de genes duplicados o parálogos de la *adc* en plantas (*adc1* y *adc2*) implica la regulación diferencial de estos genes en respuesta a etapas de desarrollo y estrés, además de una posible localización distinta a nivel celular. Se

ha propuesto que la generación de genes duplicados surge de la subdivisión de las actividades realizadas por el gen ancestral, en este caso especializando a cada gen para una expresión particular, ya sea tejido y/o tiempo específica. Esto se ha estudiado ampliamente en Brassicaceas como *A. thaliana* y *Pringlea antiscorbutica* entre otras, donde la *adc2* actúa como un gen de respuesta a estrés, mientras que la *adc1* se regula de manera tejido específica y en respuesta a las etapas de crecimiento de la planta (Galloway *et al.*, 1998; Hummel *et al.*, 2004). Por otro lado, la presencia de genes duplicados o en múltiples copias no es un evento exclusivo de la *adc*. Diferentes autores han reportado esta característica en otros genes involucrados en la vía de síntesis de poliaminas (*odc*, *samdc*, *spds*), sin embargo; estos eventos son intrínsecos de cada especie y no siguen un patrón común. (Hanzawa *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005).

El gen de la *samdc* mantiene una expresión mayoritaria de su transcrito en tejidos jóvenes y disminuye su expresión a medida que la planta madura y envejece. Esto se ha descrito para diferentes especies de plantas como se ejemplifica a continuación. En *Oryza sativa*, la expresión del transcrito de la *samdc* se detectó en hojas, en la región del nodo y en el endospermo (Pillai y Akiyama, 2004). En plantas de chícharo (*P. sativum*), la *samdc* mostró un patrón de expresión relativamente uniforme en todos los tejidos analizados: hojas, tallo, raíz y ovarios (Marco y Carrasco, 2002). En el caso de papa (*Solanum tuberosum*), la mayor expresión del transcrito fue observado en tejidos jóvenes como botones florales, mientras que una disminución del mismo se reportó en órganos maduros como flores y polen (Mad Arif *et al.*, 1994). En clavel (*Dianthus caryophyllus*) se identificaron dos transcritos que codifican para la *samdc* (CSDC9 y CSDS16), los cuales se expresan diferencialmente durante las diferentes etapas del desarrollo floral. La expresión de CSDS16 fue abundante en todas las etapas consideradas desde botones florales hasta flores maduras (9 días post-antesis) mientras que el transcrito CSDS9 aumentó su expresión únicamente a los 3 días post-antesis. Además, durante el estado vegetativo de estas plantas la expresión de ambos transcritos fue mayoritaria en tallo seguida de hojas y raíz donde los niveles de

expresión fueron bajos (Lee *et al.*, 1997). En mostaza (*Brassica juncea*), se reportó la presencia de una familia de *samdc*s constituida por cuatro genes (BjSAMDC1, BjSAMDC2, BjSAMDC3 y BjSAMDC4) cuya expresión fue detectada especialmente en órganos reproductivos y en raíz, mientras que en hojas jóvenes y pétalos los niveles de expresión fueron bajos (Hu *et al.*, 2005).

El gen de la *spds* se expresa en tejidos en desarrollo, sin importar que este proceso esté asociado a división o elongación celular. En jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), se reportó una sobreexpresión del transcrito de la *spds* en etapas tempranas del desarrollo del fruto, que incluye los días 5 al 8 post-antesis, donde el desarrollo está asociado principalmente a procesos de división celular (Alabadi y Carbonell, 1999b). Además, se detectó la expresión del transcrito en tejidos vegetativos como raíz y brotes. En un estudio realizado en chícharo (*P. sativum*) por los mismos autores, se observó que la expresión de la *spds1* se induce transitoriamente en etapas tempranas del desarrollo del fruto, sin embargo; este proceso es mediado principalmente por procesos de elongación celular (Alabadi y Carbonell, 1999a). Estas evidencias involucran a la *spds* en ambos procesos, en la división y en la elongación celular. En *A. thaliana* se han descrito dos copias del gen de la *spds* (*Atspds1* y *Atspds2*) los cuales se expresan mayoritariamente en raíz (Hanzawa *et al.*, 2002). En manzana (*Malus sylvestris*) se determinó la presencia de dos copias del gen de la *spds* (*Mdspds1* y *Mdspds2*) cuyos niveles de expresión fueron mayores en hojas jóvenes mientras que en hojas maduras y brotes fueron muy bajos. Además, niveles elevados de expresión se detectaron durante el desarrollo del fruto (Zhang *et al.*, 2003). Los autores también reportaron la presencia de un variante de procesamiento de la *spds2* de manzana (*Mdspds2b*) la cual se expresa diferencialmente en hojas maduras y brotes a diferencia de los otros dos transcritos descritos previamente.

Finalmente, poco se conoce sobre espermina sintasas (*spms*) en plantas ya que solo han sido caracterizadas en *A. thaliana* y en manzana. En *A. thaliana* se ha descrito la presencia de dos genes que codifican espermina sintasa, *acl5* y *Atspms*. Ambos genes se expresan principalmente en las regiones del internodo

en tallo, en botones florales y en raíz (Hanzawa *et al.*, 2000, 2002). En el caso de manzana se han descrito dos secuencias homólogas a las reportadas para *A. thaliana* las cuales fueron nombradas como *Mdac15* y *Mdspms*. Se ha visto que la expresión del gen *Mdac15* es baja en tejidos vegetativos, encontrándose únicamente en hojas jóvenes mientras que en órganos reproductivos, se expresa en botones florales y en etapas tempranas del desarrollo del fruto, principalmente en la fase de división celular. El patrón de expresión del gen *Mdspms* es similar al del transcrito *Mdac15* en tejidos vegetativos, mientras que en órganos reproductivos es detectado en todas las etapas del desarrollo del fruto, incluyendo la fase de alargamiento celular y maduración (Kitashiba *et al.*, 2005).

Como se describió previamente, la expresión de los genes de biosíntesis de poliaminas a través de los diferentes órganos de plantas, no sigue un patrón común, lo que implica diferentes mecanismos de regulación y adaptaciones evolutivas entre especies.

b) El papel de las poliaminas en el desarrollo de las plantas

Las poliaminas participan en una gran variedad de procesos fisiológicos en plantas incluyendo eventos de división celular, rizogénesis, embriogénesis somática, senescencia, desarrollo de flores, y maduración de frutos, entre otros. En un principio, se elucidó el efecto que ejercen las PAs en procesos de desarrollo y crecimiento en plantas, al alterar los niveles intracelulares de estos compuestos con el uso de inhibidores específicos. Dentro de ellos, el uso de α -difluorometilornitina (DFMO, análogo de la ornitina) y difluorometilarginina (DFMA, análogo de la arginina) permitió inhibir la síntesis de Put al bloquear de manera específica las actividades ODC y ADC, respectivamente. Su modo de acción es irreversible actuando sobre el sitio activo de estas enzimas (Slocum y Flores, 1991). Además, la interconversión entre ambos inhibidores (DFMA en DFMO) puede llevarse a cabo por acción de la arginasa. El metilglioxal-bis guanilhidrazona (MGBG) es un inhibidor reversible y competitivo de la SAMDC, sin embargo; no es específico ya que también puede bloquear las actividades de la

ADC y de la PAO. Por otro lado, la ciclohexilamina es un inhibidor reversible y competitivo de la SPDS y la SPMS, no obstante su función ha sido cuestionada (Batchelor *et al.*, 1986). Si bien, estos inhibidores son poco estables e inespecíficos, se han empleado en diferentes estudios para elucidar el papel de PAs en procesos como la división celular, la embriogénesis somática, la regeneración de plantas en cultivo y en respuesta a estrés (Revisado por Kakkar *et al.*, 2000).

El empleo de la ingeniería genética ha permitido la generación de mutantes con resultados prometedores en el estudio de la regulación de la biosíntesis de PAs, para descifrar su implicación en procesos esenciales en las plantas como por ejemplo desarrollo y estrés. La mayoría de las investigaciones realizadas en esta área se ha desarrollado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En esta planta se han generado mutantes por interrupciones de la expresión del gen empleando sistemas de transposones o inserción del TDNA (líneas Salk) y también se han generado sobreexpresantes de casi todos los genes involucrados en la biosíntesis de poliaminas (*adc*, *samdc*, *spds*, *spms*) excepto la ornitina descarboxilasa (*odc*). A diferencia de otras plantas, hasta el momento no se ha descrito ninguna secuencia genómica que codifique para el gen de la *odc* en *A. thaliana*, a pesar de las evidencias que demuestran la existencia de una posible actividad ODC en esta planta (Tassoni *et al.*, 2003; Hanfrey *et al.*, 2001).

La sobreexpresión del gen de la *adc2* de *A. thaliana* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, generó plantas con un fenotipo enano, las cuales presentaban un retraso en el proceso de floración y deficiencia en la síntesis de giberelinas (Alcazar *et al.*, 2005). Se observó que estas plantas acumulaban niveles elevados de Put sin cambios significativos en el contenido de Spd y Spm. Este hecho se reportó también en células de álamo (*Populus nigra*) transformadas con el gen de la *odc* de ratón, al igual que en plantas de arroz sobreexpresando el gen de la *adc* de avena (Bhatnagar *et al.*, 2001; Capell *et al.*, 1998). Estos trabajos sugieren que los niveles intracelulares de Spd y Spm son

regulados más finamente que los de Put. Por otra parte, en plantas transgénicas de arroz transformadas con el cDNA antisentido de la *adc* de avena, se observó que la reducción en los niveles de Put y Spd provocada por la disminución de la actividad de ADC, no afectaba los niveles de los transcritos de *odc* y *samdc* (Trung-Nghia *et al.*, 2003).

La generación de plantas transgénicas de tabaco, las cuales sobre-expresan los genes de la *adc* de avena y la *odc* de ratón, acumulan grandes cantidades de Put presentando varias alteraciones en el crecimiento y desarrollo, como son reducción en el crecimiento del tallo, internodos cortos, desarrollo de clorosis en hojas, y flores con un tamaño reducido de estambres, además de raíces cortas (Masgrau *et al.*, 1997; Panicot *et al.*, 2002b; DeScenzo y Minocha, 1993). Resultados similares fueron reportados en plantas transgénicas de papa expresando el gen en antisentido de la *samdc* (Kumar *et al.*, 1996). Estas plantas se caracterizaron por la presencia de tallos precarios, con muchas ramificaciones e internodos cortos.

En el caso del gen de la *spds*, la generación de una doble mutante ($\Delta spds1$ y $\Delta spds2$) determinó que estos genes son indispensables para la viabilidad o supervivencia de *A. thaliana*. Estas mutantes detienen su desarrollo en el estado embrionario (Imai *et al.*, 2004b). De manera contraria, la sobreexpresión del gen de la *spds* en *Arabidopsis* bajo el control del promotor 35SCMV, generó plantas transgénicas con niveles elevados de Spd, las cuales fueron tolerantes a condiciones de estrés abiótico (Kasukabe *et al.*, 2004).

Finalmente, la mutación de uno de los dos genes que codifican a la espermina sintasa (ACL5) en *A. thaliana* también genera un fenotipo enano, en el cual existe una notoria disminución en el crecimiento del tallo, lo cual sugiere una importante participación de las PAs, principalmente Spm, como regulador de procesos de elongación en tallo (Hanzawa *et al.*, 2000).

Los fenotipos anteriormente descritos, tanto en plantas mutantes como en las sobreexpresantes, apoya la hipótesis general que la regulación adecuada de los niveles intracelulares de PAs influyen en procesos de crecimiento y desarrollo en plantas.

4. EI PAPEL DE LAS POLIAMINAS DURANTE EL ESTRÉS

Durante las últimas décadas, se le ha dado gran importancia a la regulación de la síntesis de PAs bajo condiciones de estrés (Bouchereau *et al.*, 1999). Se ha propuesto que las PAs juegan un papel importante en los mecanismos de tolerancia o resistencia de las plantas a condiciones adversas como estrés salino, hídrico, osmótico, estrés por frío y congelamiento, acidez, deficiencias nutricionales, daño mecánico, por contaminantes atmosféricos y ataque por patógenos, entre otros (Bouchereau *et al.*, 1999; Walters, 2003).

Se ha relacionado el aumento en los niveles de PAs, como consecuencia del estrés, con la capacidad que tienen estos compuestos de unirse tanto a cationes como a aniones. La unión de las PAs a aniones como los fosfolípidos de las membranas o ácidos nucleicos, protegen a estas moléculas de reacciones de tipo oxidativo. Por otra parte, la unión a cationes como Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} o Ni^{2+} evitan la formación de radicales libres. Las PAs se comportan como antioxidantes eficientes en muchos sistemas biológicos y también pueden tener función como quelantes en vegetales, por lo que son buenos candidatos para la protección de células vegetales frente al daño oxidativo derivado de la presencia de metales pesados, como el cadmio que es letal para el crecimiento y desarrollo de las plantas, causando daños severos incluso a bajas concentraciones (Lovaas, 1997).

La eficacia de las PAs en la respuesta al estrés abiótico ha sido estudiada en una gran variedad de plantas, en condiciones como la falta de nutrientes (Flores, 1991), el estrés causado por un choque osmótico (Bouchereau *et al.*, 1999), la contaminación atmosférica (Marco y Carrasco, 2002) y la contaminación por

metales pesados (Groppa *et al.*, 2003) lo que provoca en las plantas variaciones drásticas en el metabolismo de nitrógeno y de PAs. En la siguiente sección nos enfocaremos al estrés salino, el cual constituye uno de los temas centrales de estudio en la presente tesis.

a) Estrés abiótico

i) Estrés salino

La salinidad constituye uno de los principales factores de estrés abiótico que afectan el desarrollo agrícola a nivel mundial. Actualmente, el 20% de las tierras cultivadas y cerca del 50% de las tierras irrigadas en el mundo están afectadas por salinidad (Zhu, 2001; Sairam y Tyagi, 2004). Una gran variedad de cultivos de importancia económica son altamente sensibles a la salinidad, lo que constituye un factor determinante para la productividad, la distribución de los cultivos y el suministro de alimentos (Flowers, 2004; Bartels y Sunkar, 2005).

La salinidad, como su nombre lo indica, es la acumulación de grandes cantidades de sales solubles en el suelo, principalmente cloruro de sodio (NaCl), aunque otras sales como el sulfato de magnesio (MgSO₄) participan en menor grado. La salinidad afecta la homeostasis o el equilibrio del potencial hídrico de la planta al igual que la distribución iónica (Zhu, 2001). En este sentido, la salinidad ejerce un efecto similar al déficit de agua o sequía, al reducir la disponibilidad del agua en suelo. Además, causa daño molecular y celular por toxicidad iónica. En su conjunto, el componente osmótico y el iónico del estrés salino, generan un desequilibrio nutricional en la planta y como estrés secundario, se ocasiona un estrés oxidativo.

La alteración en la homeostasis ocurre tanto a nivel celular como a nivel de la planta completa, dando lugar a una disminución en el crecimiento y desarrollo de la misma, incluso la muerte (Zhu, 2001). De manera que una planta con tolerancia requiere de mecanismos de detoxificación, de restablecimiento de la homeostasis celular, y de la restauración del crecimiento de la planta aunque este sea lento. Estos mecanismos de tolerancia incluyen la expresión de ciertos grupos de genes, la producción de proteínas de estrés y la acumulación de solutos compatibles

(azúcares, amino ácidos, ácidos orgánicos, betaínas y PAs entre otros), involucrados en la protección de estructuras celulares, mantenimiento de la homeostasis iónica y el ajuste osmótico, y en la regulación de la expresión génica (Hasegawa *et al.*, 2000; Sairam y Tyagi, 2004).

A nivel celular, la integridad de las membranas, la actividad de diferentes enzimas, la adquisición de nutrientes y la función del aparato fotosintético, son afectados por los efectos tóxicos del estrés salino debidos principalmente a la generación de especies reactivas de oxígeno (Zhu, 2001). Los mecanismos de detoxificación incluyendo la producción de proteínas antioxidantes como superóxido dismutasas, ascorbato peroxidasas, glutatión reductasas entre otras, al igual que osmolitos compatibles ayudan a la captura o eliminación de las especies reactivas de oxígeno previniendo el daño a estructuras celulares (Zhu, 2001). Por otro lado, el restablecimiento de la homeostasis osmótica y iónica está mediada por la acción de proteínas transportadoras. El sodio inhibe la actividad de muchas enzimas, por lo tanto, es indispensable evitar su acumulación en citoplasma y organelos. En este sentido, el impedir la entrada de sodio a la célula, almacenarlo en vacuolas o bien transportarlo nuevamente al exterior de la célula, son algunas de las principales estrategias seguidas por plantas tolerantes como las halófilas, para alcanzar la homeostasis iónica y osmótica. Dentro de estos mecanismos, la acumulación de sodio en vacuolas previene su toxicidad en citoplasma y ayuda a mantener la homeostasis osmótica, ya que actúa como un osmolito dentro de este organelo (Flowers *et al.*, 1977). Se ha visto que la familia de transportadores del tipo “antiport” $\text{Na}^+\text{-H}^+$ están involucrados en este proceso (Apse *et al.*, 1999). En *A. thaliana*, la sobreexpresión de uno de ellos, AtNHX1, optimizó en gran medida la tolerancia de esta planta al estrés salino (Apse *et al.*, 1999). Por otro lado, el transporte de sodio al exterior de la célula, es mediado también por transportadores del tipo $\text{Na}^+\text{-H}^+$. Los del tipo $\text{Na}^+\text{-K}^+$ o bien ATPasas de Na^+ presentes en mamíferos, no han sido detectados en plantas. Recientemente, se reportó que la sobreexpresión del gen SOS1, el cual codifica a un transportador de

membrana $\text{Na}^+\text{-H}^+$, reduce el contenido de sodio en brotes de plantas de *A. thaliana* confiriéndoles tolerancia (Shi *et al.*, 2003).

Al mismo tiempo que se restablece la homeostasis iónica, la osmótica se alcanza con la síntesis de osmolitos compatibles, los cuales ayudan a disminuir el potencial osmótico en la célula de manera que la planta pueda absorber agua (Zhu, 2001).

Finalmente, la salinidad inhibe el crecimiento de la planta al afectar el proceso de fotosíntesis, por el cierre de estomas y también por la baja tasa de absorción de dióxido de carbono (CO_2). El estrés también puede afectar directamente los procesos de división y expansión celular. La restauración del crecimiento, aunque a una velocidad mucho menor, constituye una característica que les permite a las plantas adaptarse y tolerar el estrés (Zhu, 2001).

ii) El estrés salino y las poliaminas

El efecto del estrés salino sobre el metabolismo de PAs, incluyendo alteraciones en los niveles intracelulares de estos compuestos, y también en las enzimas involucradas en su biosíntesis y catabolismo ha sido estudiado en plantas mono y dicotiledóneas (Bouchereau *et al.*, 1999). Se ha visto que existe una gran variabilidad de respuesta entre las diferentes especies de plantas. Además, los componentes osmótico y iónico del estrés salino ejercen diferentes efectos, por lo que las PAs podrían tener funciones diferentes o bien específicas en respuesta a estas condiciones. Por ejemplo, Prakash *et al.*, (1988) reportaron que los niveles intracelulares de Put, Spd y Spm disminuyen en plantas de arroz sometidas a estrés salino mientras que Basu *et al.*, (1988) reportaron una acumulación en la misma variedad de arroz. A pesar de la variabilidad de respuesta, diferentes autores apoyan la idea de que las especies tolerantes, acumulan mayoritariamente Spd y Spm en comparación con especies sensibles las cuales acumulan Put (Krishnamurthy y Bhagwat 1989; Santa-Cruz *et al.*, 1997; Chattopadhyay *et al.*, 1997). También se ha propuesto que ésta mayor acumulación de Spd y Spm es una respuesta adaptativa (Erdei *et al.*, 1996). Asimismo, la acumulación de Spm se ha considerado de suma importancia para tolerar el estrés debido a su

capacidad de captación de radicales libres, estabilización de membranas y por su participación en una vía de señalización la cual fue recientemente descrita durante la respuesta hipersensible (HR) en tabaco (Ha *et al.*, 1998; Drolet *et al.*, 1986; Uehara *et al.*, 2005). Por otro lado, la capacidad de establecer un balance iónico a nivel celular se ha atribuido a las PAs en general por su naturaleza catiónica (Reggiani *et al.*, 1993).

Numerosos estudios han sugerido que la acumulación de PAs se debe en principio a la activación de la enzima ADC. Por ejemplo, Chattopadhyay *et al.*, (1997) reportaron que cultivos de arroz tolerantes a estrés salino muestran un incremento gradual en la actividad ADC en función de concentraciones crecientes de NaCl, mientras que los cultivos sensibles mostraron un pico de actividad seguido de una notoria disminución. Además, los cultivos tolerantes presentaron un incremento significativo en los niveles del transcrito de la *adc*. Legocka y Kluck, (2005) reportaron un aumento en la actividad ADC en la raíz de *Lupinus luteus*, en respuesta a un estrés salino y osmótico con la subsiguiente acumulación de Put en hojas, proponiendo el transporte de PAs a través del xilema durante estrés. Además, en esta planta una mayor proporción de PAs se encontró unida a membranas microsomales. Se ha propuesto que las PAs unidas a la membrana inhiben la lipoperoxidación, al captar los radicales libres empleados para la conversión de ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) en etileno (Drolet *et al.*, 1986). De esta manera, se mantiene la integridad de la membrana y también se reduce su fluidez por acción de las PAs (Roberts *et al.*, 1986). En hojas de mostaza (*Brassica juncea*), se encontró un aumento en las concentraciones de Spm libre y conjugada a ácidos hidroxicinámicos sometidas a un estrés salino a corto plazo (Mo y Pua, 2002). Además, se observó un aumento significativo en la transcripción del gen *adc3*, mientras que los otros dos transcritos *adc1* y *adc2* fueron poco afectados. Estos resultados sugieren una regulación diferencial de los genes de la *adc* de mostaza en respuesta al estrés salino (Mo y Pua, 2002). Por otro lado, Hao *et al.*, (2005) reportaron un aumento en los niveles del transcrito de la *adc* en tallos de manzana sometidos a concentraciones de 300 mM de NaCl.

Hummel *et al.*, (2004) reportaron un aumento en la transcripción del gen de la *adc2*, en respuesta a estrés salino y estrés por frío en raíz y tallos de *P. antiscorbutica*. En *A. thaliana*, se observó un aumento en la expresión del gen *Atadc2*, con la subsiguiente acumulación de Put durante estrés salino (Urano *et al.*, 2003; Urano *et al.*, 2004). La generación de plantas mutantes de *A. thaliana* para el gen *Atadc2* por los mismos autores, sugirió un papel muy importante para este gen en la producción de Put y la tolerancia al estrés salino (Urano *et al.*, 2004).

A excepción del gen de la *adc*, existe poca evidencia sobre la participación del resto de los genes de la biosíntesis de PAs en plantas durante estrés salino. En el caso de la *samdc*, recientemente se reportó la acumulación del transcrito en hojas de mostaza tratadas con 400 mM de NaCl (Hu *et al.*, 2005). En cultivos de arroz tolerantes a estrés por frío (*Oryza japonica* cv. Yukihikari) se observó un aumento significativo en el transcrito de la *samdc* en respuesta a diferentes factores de estrés incluyendo salinidad, sequía y frío (Pillai y Akiyama, 2004). En el caso de la *spds*, no se han reportado trabajos que impliquen la regulación transcripcional de este gen en respuesta a estrés salino, sin embargo; la generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* sobreexpresando el gen de la *spds* de *Cucurbita ficifolia* generó plantas con un alto contenido de Spd, las cuales fueron tolerantes a diferentes condiciones de estrés incluyendo salinidad, sequía, estrés osmótico, por frío y congelamiento (Kasukabe *et al.*, 2004).

De acuerdo a todo lo anterior, existen muchas evidencias que demuestran la participación de las PAs en la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés, sin embargo; los mecanismos por medio de los cuales actúan aún son especulativos. Dentro de ellos, la captación de radicales libres y la estabilización de membranas están involucrados en la protección directa contra el estrés, y recientemente se ha sugerido que la regulación de la expresión génica mediada por una vía de señalización dependiente de PAs, activa genes de respuesta a estrés como

factores de transcripción DREB, la proteína rd29A, entre otros (Kasukabe *et al.*, 2004; Uehara *et al.*, 2005).

iii) El ácido abscísico y las poliaminas

El ácido abscísico (ABA) juega un papel muy importante en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés abiótico como sequía, salinidad y bajas temperaturas al igual que procesos fisiológicos como son el desarrollo de semillas, latencia y germinación (Bartels y Sunkar, 2005). Estos factores de estrés estimulan la acumulación de ABA, el cual a su vez induce el cierre de estomas y la expresión de múltiples genes involucrados en la acumulación de osmolitos compatibles y de proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) y también de genes involucrados en mecanismos de señalización y de regulación de la transcripción (Zhu, 2002; Bartels y Sunkar, 2005). Se ha observado que la aplicación exógena de ABA induce la expresión de genes de una manera similar a un tratamiento de estrés (Chandler y Robertson, 1994). En el caso de genes involucrados en la biosíntesis de PAs, existen algunos reportes que confirman que la aplicación exógena de ABA estimula la transcripción de algunos de estos genes y también la acumulación de PAs (Hanzawa *et al.*, 2002; Urano *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005). Por ejemplo, en *A. thaliana*, el gen de la *adc2* y no el de la *adc1* es inducido en respuesta a ABA (Perez-Amador *et al.*, 2002; Alcázar *et al.*, 2006). Se ha propuesto que esto ocurre en una vía de señalización dependiente de ácido abscísico al encontrarse elementos de respuesta a ABA o ABRE (CACGTG) en las regiones promotoras del gen de la *adc2*. Por otro lado, el gen de la *spms* de *Arabidopsis* también es inducido a nivel transcripcional por ABA, mientras que otro gen que codifica espermina sintasa (*ACL5*) es inducido por auxinas (ácido 3-indol acético ó IAA) y no por ABA (Hanzawa *et al.*, 2002). Se ha sugerido que el ABA induce la síntesis de PAs bajo condiciones de estrés, esto se ha observado en plantas de maíz sometidas a estrés salino (Liu *et al.*, 2005).

b) Estrés biótico

i) Patógenos y poliaminas

Se ha reportado que las PAs están relacionadas con las rutas de señalización de las plantas en la respuesta al ataque por patógenos (Martin-Tanguy y Negrel, 1987). Sin embargo, hasta el momento, poco se conoce sobre la regulación del metabolismo de PAs en respuesta al estrés biótico, no obstante, la información existente, muestra una clara alteración en el metabolismo de estos compuestos en interacciones compatibles e incompatibles de plantas con diferentes patógenos (Walters, 2003). El primer trabajo realizado en esta área fue en plantas de cebada infectadas con el hongo biotrófico *Puccinia hordei* (Greenland y Lewis, 1984). Esta interacción dió lugar a la acumulación de niveles elevados de Spd, fenómeno que se asoció a la formación de “green-islands”. Éstas, constituyen las regiones contiguas a los sitios de infección, contienen células metabólicamente activas y son una fuente de nutrientes disponible que podría aprovechar el patógeno. Por otro lado, Walters *et al.*, (1985) reportaron que además de Spd, los niveles de Put y Spm al igual que las actividades enzimáticas de la ADC, ODC y SAMDC aumentan en hojas de cebada infectadas con el hongo *Blumeria graminis f. sp. hordei*.

En contraste a estos trabajos, Edreva (1997) reportó una disminución en el contenido de PAs en plantas de tabaco infectadas con *Peronospora tabacina*, *Erysiphe cichoracearum*, *Alternaria tenuis* o bien con *Pseudomonas tabaci*. Esta disminución fue más notoria cuando la planta exhibía un daño mayor. Se propuso que esta disminución estaba asociada con el envejecimiento del tejido, ya que las PAs son características de tejidos jóvenes y metabólicamente activos (Edreva, 1997).

En interacciones que generan hipertrofia e hiperplasia de los tejidos infectados como en el caso de Brassicaceas inoculadas con el hongo *Plasmodiophora brassicae* se observa una notoria acumulación de PAs (Put, Spd y Spm) (Walters y Shuttleton, 1985). Se ha propuesto que esta acumulación esta asociada a un

mayor número de eventos de división celular en estos tejidos. Además, por el alto contenido de citocininas y auxinas, las cuales se sabe inducen la biosíntesis de PAs.

Por otro lado, la acumulación de PAs conjugadas se ha reportado en diferentes interacciones entre hongos y plantas (Revisado por Walters, 2003). Por ejemplo, la infección de tubérculos de papa con *Phoma exigua* induce la acumulación de feruoiil-putrescina (Malmberg, 1984). Los dímeros de p-cumaroil-2-hidroxi-igmatina, se producen y se acumulan en plantas de cebada en respuesta a la infección con *Erysiphe graminis f. sp. hordei* (Von Röpenack *et al.*, 1998). Se ha propuesto que estos compuestos contribuyen a la formación de una barrera fenólica, haciendo la pared celular de la planta más resistente a la hidrólisis enzimática. Se ha visto que tienen propiedades antifúngicas incluyendo la inhibición del crecimiento micelial y reducción en la germinación de esporas (Fattarusso *et al.*, 1999; Von Röpenack *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2001).

En otro estudio en cebada y su respuesta hipersensible al hongo *B. graminis f. sp. hordei*, Walters *et al.*, (2002) reportaron un aumento importante en los niveles de Put y Spm en forma libre así como de las formas conjugadas de Put, Spd y Spm, desde el primer día hasta los cuatro días después de la inoculación. Estos cambios en los niveles de PAs, iban acompañados a su vez por aumentos en las actividades enzimáticas ODC, ADC y SAMDC e incluyendo las enzimas catabólicas DAO y PAO. En ese mismo estudio se comprobó también un aumento en las actividades de dos de las enzimas participantes en la conjugación de PAs como son PHT (putrescina hidroxicinamoiltransferasa) y TFT (tiramina feruoiil CoA transferasa) posterior a la inoculación del patógeno.

Además, se ha observado que el metil jasmonato, el cual es una molécula de señalización en respuesta a daño mecánico y estrés biótico, induce la síntesis de PAs libres y conjugadas (Walters *et al.*, 2002; Creelman y Mullet, 1997). Walters *et al.*, (2002) reportaron que el pretratamiento de plantas de cebada (*Hordeum*

vulgare L. cv. Golden Promise) con metil jasmonato estimula la síntesis de PAs libres y conjugadas, al igual que las enzimas involucradas en su biosíntesis generando protección sistémica contra *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*.

Respecto a bacterias, se cuenta con pocos estudios, por ejemplo, se ha documentado un aumento de Put en tallos de olivo después de la infección con *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* (Roussos, 2002).

En interacciones con virus, el sistema más estudiado ha sido plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV). En este sistema se pueden observar dos respuestas, una infección sistémica con muerte de la planta o bien lesiones necróticas localizadas controladas por el gen de resistencia N, generando una respuesta hipersensible (Whitham *et al.*, 1994). La acumulación de PAs se ha estudiado ampliamente en la respuesta hipersensible (cultivos tolerantes de tabaco), encontrándose un aumento en las actividades enzimáticas ODC, ADC, SAMDC y de las enzimas catabólicas DAO y PAO, aunado a una regulación transcripcional positiva de los genes *odc*, *samdc* y *spds*, al igual que un aumento en los niveles de PAs libres y conjugadas (feruoil-putrescina, di-feruoil-putrescina y feruoil-tiramina) (Negrel *et al.*, 1984; Torrigiani *et al.*, 1997; Marini *et al.*, 2001; Yoda *et al.*, 2003). Mientras que en variedades sensibles de tabaco, se ha observado que no existe acumulación de PAs (Marini *et al.*, 2001). Las PAs producidas durante la respuesta hipersensible pueden ser catabolizadas en el apoplasto por las enzimas DAO y PAO, generando peróxido de hidrógeno, el cual junto con otras especies reactivas de oxígeno participa en la muerte celular o inducción de las lesiones necróticas (Yoda *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha propuesto que los conjugados de PAs poseen actividad antiviral, inhibiendo la replicación del virus, logrando reducir el número de lesiones causadas por la entrada del patógeno (Martin-Tanguy *et al.*, 1976).

La acumulación de Spm en los espacios intercelulares induce la síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis (PR) durante la respuesta hipersensible

(Yamakawa *et al.*, 1998). Recientemente, se reportó que la acumulación de Spm participa en la inducción de genes de respuesta a estrés incluyendo factores de transcripción (ZFT1), peroxidasas, y proteína cinasas (SIPK, WIPK) entre otras, durante la respuesta hipersensible en una vía de señalización dependiente de Spm (Uehara *et al.*, 2005).

5. MODELOS DE ESTUDIO

a) Maíz

El maíz (*Zea mays*) es un cereal de gran importancia económica a nivel mundial. Pertenece a la familia Poaceae (ó gramíneas) y se caracteriza por ser una planta robusta, de fácil desarrollo y producción anual. A nivel mundial la planta de maíz es empleada para la producción de grano y forraje, y también en la industria farmacéutica y de plásticos para la producción de la obtención de aceite, barnices, pinturas, cauchos artificiales, jabones y almidones entre otros (SAGARPA, 2004-2005).

México, ocupa el quinto lugar a nivel mundial en la producción de maíz después de Estados Unidos, China, la Unión Europea y Brasil con 22 Mill/Ton correspondientes al 3.1% de la producción mundial (SAGARPA, 2004-2005). Además de su importancia económica, a nivel biológico el maíz constituye un modelo clásico para estudios genéticos. También constituye junto con el arroz, un modelo interesante para comprender la evolución y la función del genoma de las gramíneas. Ambos cereales provienen de un antecesor común, tienen un contenido similar de genes y conservan el orden de genes a lo largo de segmentos discretos de ADN (sintenia). Se ha sugerido que el genoma del maíz es anfidiplóide (generado por la fusión de dos genomas diploides) o bien alopoliploide (fusión de dos genomas diferentes y su posterior duplicación) y se ha descrito que contiene una gran proporción de elementos de ADN duplicados (60-80%) que constituyen inserciones repetidas de transposones, una diferencia importante con el genoma de arroz (Wilson *et al.*, 1999).

El maíz contiene un número estimado de 50,000 genes distribuidos en 10 cromosomas, y su genoma haploide contiene aproximadamente 2.5 billones de nucleótidos. Como modelo de estudio presenta varias características importantes: es una planta de crecimiento rápido, su bioquímica y genética se conocen bien, y su genoma se está secuenciado (TIGR maize database).

b) *Ustilago maydis*

El hongo biotrófico *Ustilago maydis* es un basidiomiceto, agente causal del “carbón de maíz” o huitlacoche. Se considera un modelo experimental amigable para el estudio del dimorfismo, eventos de recombinación homóloga e interacciones planta-patógeno (Banuett, 1992, 1995, 2002; Ruiz-Herrera y Martínez-Espinosa, 1998; Ruiz-Herrera *et al.*, 2000; Bölker, 2001).

El ciclo de vida de *U. maydis* comienza con el desarrollo de células haploides no patógenas, las cuales presentan un crecimiento levaduriforme y se reproducen por gemación. La fusión de células haploides genéticamente compatibles genera una estructura infecciosa conocida como dicarion, la cual presenta crecimiento micelial. Esta estructura infecciosa es capaz de colonizar la planta de maíz y generar tumores llenos de esporas diploides o “teliosporas” melanizadas en las partes aéreas de la planta, principalmente en la mazorca (Christensen 1963; Banuett 1992, 2002; Banuett y Herskowitz, 1996; Ruiz-Herrera y Martínez-Espinosa, 1998). Aunque *U. maydis* no es un patógeno obligado del maíz, requiere a su hospedero para completar su ciclo de vida. Por otro lado, la fusión del dicarion y su crecimiento filamentoso está regido por los loci *a* y *b*. El loci *a* contiene los alelos *a1* y *a2* los cuales codifican un sistema de receptor/feromona que permite el apareamiento de cepas haploides compatibles (Bölker *et al.*, 1992). El crecimiento filamentoso del dicarion depende del loci *b* el cual codifica a las proteínas bE y bW. Estas proteínas forman dímeros en combinaciones no alélicas y generan un factor de transcripción activo, el cual se requiere para el crecimiento filamentoso y la patogénesis (Kämper *et al.*, 1995; Basse y Steinberg, 2004).

La infección del maíz ocurre por penetración directa del dicarion, al formar una estructura tipo apresorio, y también a través de las aperturas de los estomas o por heridas en la planta (Banuett y Herskowitz, 1996). Uno de los primeros síntomas visibles de la infección es la formación de regiones cloróticas (amarillamiento del tejido) cerca del sitio donde penetró el hongo al igual que la producción de antocianinas (Banuett y Herskowitz, 1996). Los tumores se desarrollan en grupos sobre los sitios donde se formó la clorosis. Estos tumores se caracterizan por la hiperplasia de células meristemáticas, asociada a procesos de proliferación y elongación celular (Snetselaar y Mims, 1994; Banuett y Herskowitz, 1996). El ciclo de vida del *U. maydis* se esquematiza en la Figura 7.

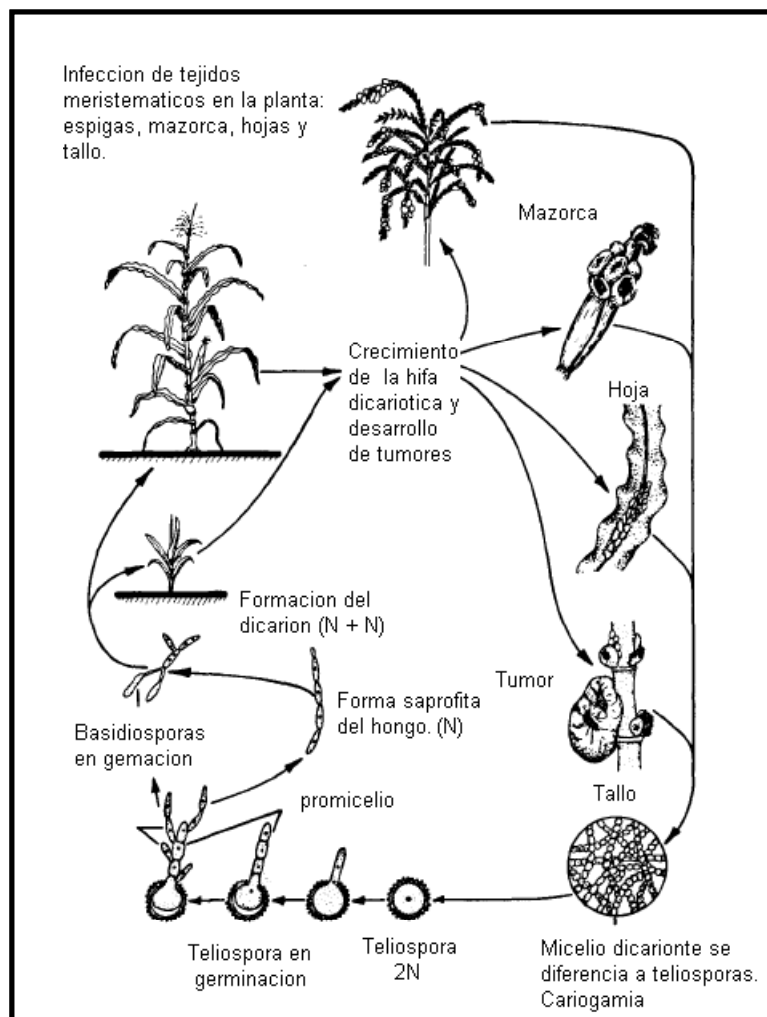


Figura 7. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Imagen tomada de Banuett (1992)

III. OBJETIVOS

a) Objetivo general

Analizar el metabolismo de las poliaminas en maíz bajo condiciones de estrés salino y durante la interacción con el hongo biotrófico *Ustilago maydis*.

b) Objetivos específicos

A.- Aislar y secuenciar genes involucrados en la vía de síntesis de poliaminas en maíz.

A1.- Aislar y caracterizar al gen *spds2* que codifica una espermidina sintasa de maíz.

A2.- Aislar el ADNc completo de la *spds2* de maíz por la técnica de RACE 5' y 3'.

A3.- Analizar la expresión de los genes *adc*, *odc*, *samdc* y *spds2* en diferentes órganos de la planta de maíz.

B.- Analizar el metabolismo de las poliaminas de maíz bajo condiciones de estrés salino.

B1.- Analizar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de poliaminas (*adc*, *odc*, *samdc*, *spds1*, *spds2*) en plantas de maíz sometidas a estrés salino por un corto (horas) y largo plazo (días).

B2.- Determinar el contenido de las poliaminas libres en plantas de maíz sometidas a estrés salino a largo plazo.

B3.- Determinar el contenido de prolina y clorofila en plantas de maíz sometidas a estrés salino a largo plazo.

C.- Analizar el metabolismo de las poliaminas de maíz durante la interacción con el hongo biotrófico *Ustilago maydis*.

C1.- Analizar la expresión de los genes involucrados en la síntesis (*adc*, *odc*, *samdc1*, *samdc2*, *samdc3*, *spds1*, *spds2*) y el catabolismo (*pao*) de las poliaminas de maíz en diferentes etapas de la infección: clorosis y tumores.

C2.- Determinar el contenido de las poliaminas libres y conjugadas de maíz en diferentes etapas de la infección.

C3.- Analizar el efecto del metil-jasmonato sobre la expresión y contenido de las poliaminas en plantas infectadas con *Ustilago maydis*.

C4.- Determinar la actividad enzimática ADC, ODC y PAO en tumores de hojas de maíz producidos por el hongo *Ustilago maydis*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL, MEDIOS DE CULTIVO Y MÉTODOS

a) Variedades de maíz empleadas

Las variedades de maíz empleadas en el presente estudio se describen en la siguiente tabla.

Tabla 2. Variedades de maíz empleadas

<i>Variedad</i>	<i>Ensayo</i>	<i>Características</i>
<i>Zea mays</i> var. cafime (mejorado)	Estrés abiótico (Salinidad)	Tolerante a la sequía
<i>Zea mays</i> var. cacahuazintle (criollo)	Estrés biótico (Interacción con <i>Ustilago maydis</i>)	Susceptible a la infección

b) Medio de cultivo para plantas en semihidroponia

Para el cultivo de plantas en semihidroponia, se empleó la solución nutritiva de Hoagland 0.5X (Hoagland y Arnon, 1950) con una modificación en la concentración de hierro. La solución stock de Hoagland se prepara 1X como se describe en la Tabla 3.

TABLA 3. Solución de Hoagland 1X

Solución	Contenido	Para 1 L de Hoagland 1X
A	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1M	1 ml
B	KNO_3 1M	6 ml
C	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M	4 ml
D	MgSO_4 1M	2 ml
Micronutrientes	*	1 ml
Solución de Hierro	**	0.25 ml

*Micronutrientes, 1 L de solución stock contiene: H_3BO_3 (2.86 mg), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.81 mg), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.22 mg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.08 mg), $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.02 mg).

** Solución stock de hierro: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.089 M o bien equivalente al 2.5%), EDTA (0.07 M), pH 7.1. La preparación original de Hoagland contenía 1 mL de solución de tartrato de hierro al 5%, a diferencia de la empleada que contiene sulfato de hierro al 2.5%.

c) Cultivo del material vegetal

Las semillas de las variedades de maíz empleadas en este estudio, fueron desinfectadas con una solución al 50% de hipoclorito de sodio comercial (6% de cloro) durante 30 min y lavadas con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas, fueron germinadas en oscuridad durante dos días a $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2$. Se sembró una semilla por maceta en un sustrato grado hortícola (*Cosmoceel*, Monterrey, México) o bien, en semihidroponía (sustrato arena/perlita 3:1, sub-irrigado con la solución nutritiva de Hoagland 0.5X), dependiendo del experimento realizado. Todos los cultivos se llevaron a cabo en una cámara de temperatura controlada con un fotoperiodo de 16 h luz (13,000 luxes)/8 h oscuridad a $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2$.

2. MICROORGANISMOS

a) Cepas empleadas

i) Cepas de *Ustilago maydis*

Se emplearon dos cepas haploides FB1 (a_1b_1) y FB2 (a_2b_2) de *Ustilago maydis* (F. Banuett, California State University, Long Island, USA). Estas cepas fueron conservadas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ en viales con glicerol al 50%. Se mantuvieron a $4\text{ }^\circ\text{C}$ en medio sólido YEPD por un mes aproximadamente.

ii) Cepas de *Escherichia coli*

Se emplearon las cepas DH5 α y TOP10 de *E. coli* para la transformación y amplificación del ADN recombinante. Estas cepas fueron conservadas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ en viales con glicerol al 50%. Se mantuvieron a $4\text{ }^\circ\text{C}$ en medio sólido LB por cuatro meses aproximadamente.

b) Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron preparados con agua destilada. En los casos que fue necesario, se añadieron antibióticos esterilizados por filtración, a una concentración de 100 µg/ml (ampicilina o carbenicilina) y 50 µg/ml (kanamicina). Para la preparación de medios sólidos se empleó agar (MOBIO) al 2%.

i) Medios de cultivo para el crecimiento de *Ustilago maydis*

YEPD: extracto de levadura 1%, glucosa 1%, bacto peptona 2%.

ii) Medios de cultivo para el crecimiento de *Escherichia coli*

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de *E. coli* se prepararon de acuerdo a lo sugerido por Sambrook *et al.*, (1989).

LB: extracto de levadura 0.5%, bacto triptona 1%, NaCl 1%.

SOC: triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM.

c) Métodos de crecimiento

i) Crecimiento de *Ustilago maydis*

1. Cultivos sólidos: las cepas de *U. maydis* (FB1 ó FB2) se inocularon con una asada proveniente de medios líquidos, sólidos o de stocks en glicerol, y se incubaron de 2 a 4 días a 28 °C.
2. Cultivos líquidos: las cepas de *U. maydis* (FB1 ó FB2) se inocularon de un preinóculo, se incubaron a 28 °C por 24 h a una agitación constante (150 rpm).
3. Cultivos para inoculación de maíz: cada cepa de *U. maydis* (FB1 ó FB2), fue crecida por separado en medio YEPD a 28 °C durante 24 h con agitación constante (150 rpm). Después de este tiempo, volúmenes iguales de ambas suspensiones celulares fueron mezcladas e incubadas a 28 °C durante 24 h con agitación lenta (50 rpm). Una vez mezcladas, las células fueron recuperadas por centrifugación, lavadas tres veces con agua

destilada estéril y ajustadas a una concentración de 1×10^8 células/ml. Esta suspensión fue empleada para la inoculación de plántulas de maíz como se describe más adelante.

i) Crecimiento de *Escherichia coli*

Los cultivos sólidos de *E. coli* se inocularon con una asada proveniente de medios líquidos o sólidos, y se incubaron a 37 °C por 24 h. Los cultivos líquidos se inocularon de un preinóculo y se incubaron a 37 °C por 18 h con agitación constante (200 a 250 rpm).

3. PLÁSMIDOS

Los plásmidos empleados para la clonación de los genes aislados en este trabajo se describen a continuación:

1. pCR4-TOPO: Plásmido bacteriano autoreplicativo, con un tamaño de 3.9 kb, empleado para clonar, secuenciar y expresar genes heterólogos. Contiene los genes que confieren resistencia a kanamicina y a ampicilina, el gen letal *ccdB* de *E. coli* fusionado al fragmento C-terminal del gen de la β -galactosidasa (*LacZ α*) y un sitio de clonación múltiple. La ligación del producto de PCR interrumpe la expresión de la fusión *ccdB-LacZ α* permitiendo así el crecimiento exclusivo de clonas recombinantes mientras que las clonas con ausencia de inserto mueren por la transcripción del gen letal *ccdB* (Invitrogen, USA).
2. pGEM: Plásmido bacteriano autoreplicativo, con un tamaño de 3.0 kb, empleado para clonar, secuenciar y expresar genes heterólogos. Contiene el péptido α del gen que codifica para la β -galactosidasa y un sitio de clonación múltiple. La ligación del producto de PCR inactiva el péptido α del gen de la β -galactosidasa permitiendo la selección de clonas recombinantes por coloración (Promega, USA).

4. TRATAMIENTOS DE ESTRÉS

a) Estrés abiótico (salinidad)

Se realizaron estudios de estrés salino a corto y largo plazo empleando plántulas de maíz (*Zea mays* L.) de la variedad Cafime. Esta variedad de maíz se ha caracterizado como tolerante a la sequía en las primeras etapas de desarrollo.

i) Corto plazo

Para este estudio, se crecieron plántulas de maíz en un sustrato grado hortícola durante 15 días. Al cabo de este tiempo, las hojas fueron cortadas y colocadas en tubos de ensayo conteniendo diferentes soluciones de cloruro de sodio (25, 150 y 400 mM) durante 1.5 y 12 h. El experimento se llevó a cabo en una cámara de luz y temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) controladas. Como control se empleó agua destilada estéril.

ii) Largo plazo

Para este estudio, se crecieron plántulas de maíz en semihidroponía durante 10 días. Al cabo de este periodo se sometieron a estrés salino por 1 y 7 días. El estrés fue aplicado al añadir a la solución nutritiva de Hoagland 0.5X, la cantidad necesaria de cloruro de sodio para obtener concentraciones de 0 (control), 25, 150 y 400 mM.

Al término de ambos experimentos (corto y largo plazo) se congelaron las hojas en nitrógeno líquido para análisis posteriores.

b) Estrés biótico (interacción maíz-*Ustilago maydis*)

Se estudió la interacción del maíz (*Zea mays* L.) con el hongo biotrófico *Ustilago maydis*. Todos los experimentos se llevaron a cabo en plántulas, empleando la variedad Cacahuazintle la cual es sumamente susceptible a la infección por este hongo.

i) Inoculación de plantas de maíz

Se inocularon plántulas de maíz de 6 días de edad en la región del nodo con 20 μL de una suspensión de 1×10^8 células/ml de *Ustilago maydis* (cepas FB1+FB2)

empleando una jeringa estéril de acuerdo a lo descrito por Martínez-Espinosa *et al.*, (2003). Se analizaron síntomas de infección en hojas y se seleccionaron las siguientes muestras:

1. Muestras sin síntomas de infección (I), son hojas de plantas inoculadas con el hongo sin síntomas evidentes de infección (2 días post-inoculación).
2. Zona de clorosis (ChI), la cual se caracteriza por pérdida de pigmentación o amarillamiento de las hojas y constituye uno de los primeros síntomas detectables de la infección (4 días post-inoculación).
3. Zona de tumores (T), se desarrolla en los sitios donde previamente se había detectado clorosis como una hiperplasia de los tejidos meristemáticos (9 y 13 días post-inoculación).
4. Zona que rodea al tumor (ST), zona verde, aparentemente sana que se localiza a la periferia de los tumores. Toma de muestra: 9 y 13 días post-inoculación.
5. Hoja sana (L), son hojas aparentemente sanas de plantas infectadas. Toma de muestra: 9 y 13 días post-inoculación.
6. Control (C): hojas de plantas sanas, no inoculadas con el hongo.
7. Control por daño mecánico o mock (W): se obtiene al pseudo inocular la planta picándola en la región del nodo únicamente con una jeringa nueva estéril, generando un daño mecánico por herida. Toma de muestras: 2 y 9 días post-inoculación.

Todas las muestras (1 al 7) se congelaron en nitrógeno líquido para estudios posteriores.

ii) Tratamientos con metil jasmonato

El metil jasmonato (MJ) es una molécula de señalización en respuesta a daño mecánico y estrés biótico. Los tratamientos con MJ se realizaron previo a la inoculación con el hongo biotrófico *Ustilago maydis*. Para ello, plántulas de maíz de 5 días de edad fueron transferidas a camaradas selladas y expuestas a vapores de MJ por 24 h. Se empleó una solución de MJ al 95% y se aplicó en algodones prehumedecidos con 20 μ L cada uno. Los ensayos se llevaron a cabo

bajo condiciones de luz y temperatura controladas. Al finalizar, las plantas fueron inoculadas con la suspensión de células de *U. maydis* como se describió previamente.

5. TÉCNICAS PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

a) Transformación de *Escherichia coli*

Se emplearon células químicamente competentes (preparadas con cloruro de calcio) y electrocompetentes de *E. coli* para la transformación. Se utilizaron plásmidos (pCR4 o pGEM) de mezclas de ligación. Se empleó el método de transformación basado en choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989) y la técnica de electroporación de acuerdo a las especificaciones del fabricante (BTX, USA).

6. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

a) Aislamiento de ADN plasmídico

El ADN plasmídico fue obtenido empleando el método de extracción descrito por Birnboim y Doly (1979). Este método se basa en la purificación del ADN plasmídico al desnaturalizar selectivamente el ADN cromosómico en un medio alcalino, generando un precipitado insoluble, mientras el ADN plasmídico permanece soluble.

b) Aislamiento de ADN genómico de maíz

El ADN genómico fue obtenido de hojas de maíz empleando el método de extracción descrito por Dellaporta *et al.* (1983) y también empleando el método comercial DNeasy Plant Mini Kit de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Germany).

c) Aislamiento de ARN total de maíz

El ARN total fue obtenido de hojas de maíz empleando el método del TRIzol de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen, USA). Este método se basa en la extracción de ARN empleando una mezcla de fenol-cloroformo e isotiocianato de guanidina de acuerdo a lo desarrollado por Chomczynski y Sacchi

(1987). Además, se empleó la marca comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

7. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS

a) Síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante RT-PCR

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 5 µg de ARN total obtenido de hojas de maíz sometidas a las condiciones de estrés biótico y abiótico descritas previamente. De manera general, el ARN total fue digerido con la enzima DNAsa I (Invitrogen, USA), durante 15 min a temperatura ambiente eliminando así el ADN genómico presente. La síntesis de ADNc se realizó empleando el Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA). Cada reacción (30 µL) contenía 5 µg de ARN total, 0.5 µg de Oligo-dT (12-18), dNTPs 0.5 mM, buffer Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM con KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, ditioneitol (DTT) 10 mM, 40 U de Inhibidor de ARNasa Recombinante (RNaseOUT) y 50 U de Transcriptasa Reversa (SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase). La reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 50 min. Además, de manera simultanea se realizaron reacciones control sin Transcriptasa Reversa para verificar la ausencia de ADN genómico. Un microlitro de cada ADNc fue empleado como templado para los análisis de PCR como se describe a continuación.

b) Amplificación de cada transcrito por PCR

Se diseñaron diferentes parejas de oligonucleótidos para analizar la expresión de los transcritos involucrados en la biosíntesis (*Zmodc*, *adc*, *samdc*, *Zmspds1* y *Zmspds2*) y degradación (*pao*) de poliaminas de maíz mediante RT-PCR. En el caso de la *Zmspds2*, los oligos se diseñaron en base a secuencias altamente conservadas de espermidina sintetasas de plantas, como se describe en la sección “c”. Para los demás genes, los oligos fueron diseñados directamente sobre las secuencias reportadas en la base de datos (TIGR y NCBI) para enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas en maíz. Los oligonucleótidos diseñados se muestran en la siguiente Tabla:

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados

Gen	No. de Acceso al GenBank	Oligonucleótidos diseñados		Tamaño del amplicón de ADNc (pb)
<i>Zmodc</i>	AY123224	RTODC5 sentido	5'-tgtgctagccgtgctgaaatt-3'	486
		RTODCPI3 antisentido	5'-ttgctgcggtggtgaactggtg-3'	
<i>adc</i>	AY110562	5ADCMZ sentido	5'-ctataactaccacatgaacctct-3'	236
		103ADCM antisentido	5'-gtacggccacgtagtagccaccgag-3'	
<i>samdc1</i>	Y07767	ZMSAM5 sentido	5'-attcaccggatccaatggctgttc-3'	1223
		ZMSAM3 antisentido	5'-cccgggttactcatcaagcact-3'	
<i>samdc2</i>	AY103940	5ZmSAMDC2 sentido	5'-cagtgacaaaagatatcaaagacca-3'	1341
		3ZmSAMDC2 antisentido	5'-tgggcataaataattaggcttgctg-3'	
<i>samdc3</i>	AY104070	5ZmSAMDC3 sentido	5'-ctctctttcttgcaaacgtcatcc-3'	1238
		3ZmSAMDC3 antisentido	5'-gtgaagaaccacctaagttatccaaatc-3'	
<i>Zmspds2</i>	AY730048	SPDS-MAIZE-5 sentido	5'-tgcagcagcggcactgac-3'	374 anidado
		SPDS-MAIZE-3I antisentido	5'-ggaggtgagtaaccatttcttgta-3'	
		SPDS-MAIZE-3 antisentido	5'-gcacatagcatgaaaccaatgacacact-3'	876
<i>Zmspds1</i>	AY103592	5SPDS1 sentido	5'-gatctccgccgtcatccg-3'	803
		3SPDS1 antisentido	5'-cctttgattcataggatgctcatcctc-3'	
<i>pao</i>	AJ251568 AJ251018 AJ251019	5-PAO sentido	5'-atgagttcctcccgtcctt-3'	1503
		3-PAO antisentido	5'-ctagtcatacttccctggacat-3'	

Gen	No. de Acceso al GenBank	Oligonucleótidos diseñados		Tamaño del amplicón de ADNc (pb)
<i>Actina-1</i>	J01238	5ACT sentido	5'-aactgggatgacatggagaa -3'	622
		3ACT antisentido	5'-atcacacttcatgatggagttgta-3'	

El gen de la *actina-1* fue empleado como control de carga. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), empleando la enzima Taq polimerasa de diversas compañías. Las condiciones de amplificación programadas para cada gen fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94 °C 5 min, seguidos de 30 ciclos de 94 °C 45 s (etapa de desnaturalización); 59 °C (*Zmodc*), 50 °C (*adc*), 60 °C (*samdc2* y *pao*), 62 °C (*samdc3*), 64 °C (*samdc1*, *Zmspds1* y *Zmspds2*) y 57 °C (*actina-1*) durante 45 s (etapa de alineamiento de los oligonucleótidos); y 60 s a 72 °C (etapa de extensión) excepto para las *samdc*'s y la *pao* donde el tiempo de extensión fue de 80 s y 120 s, respectivamente. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 µL conteniendo 1 µL del ADNc como templado, buffer Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 3.5 mM, dNTPs 200 µM, oligonucleótidos 0.2 µM y 2.5 U de Taq ADN polimerasa. Cada producto de PCR fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% (w/v). La intensidad (píxeles) de cada banda fue cuantificada con el programa Quantity One (Bio-Rad). La señal de cada transcrito fue normalizada con la señal de la actina.

c) Aislamiento del ADNc que codifica la espermidina sintasa de maíz (*Zmspds2*)

Para aislar un fragmento del ADNc que codifica la espermidina sintasa de maíz, se diseñaron oligonucleótidos en base a secuencias altamente conservadas de diferentes espermidinas sintasas (SPDS) de plantas como *Arabidopsis thaliana* (No. de Acceso al GenBank AJ251297), *Coffea arabica* (AB015599), *Lycopersicon esculentum* (AJ006414), *Nicotiana glauca* (AB006692), *Oryza sativa*

(AB098063), *Pisum sativum* (AF043109) y *Solanum tuberosum* (AJ345003). Los oligonucleótidos diseñados fueron los siguientes: 5'-tgcagcagcggcactgac-3' (SPDS-MAIZE-5, sentido); 5'-ggaggtgagtaaccatttctgta-3' (SPDS-MAIZE-3I, antisentido) y 5'-gcacatagcatgaaaccaatgacaccact-3' (SPDS-MAIZE-3, antisentido). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un volumen de 50 µL como se describió previamente.

Las condiciones programadas para cada ciclo fueron: etapa de desnaturalización, 94 °C 45 s, etapa de alineamiento de los oligonucleótidos, 64 °C 45 s, y la etapa de extensión, 72 °C 80 s. El producto de PCR obtenido, de 876 pb fue subclonado en el plásmido pGEM (Promega Corporation Madison USA) y secuenciado. Para identificar el inicio de la transcripción (5'-UTR) y el sitio de adición del poli A (3'-UTR), se usó la técnica de RACE (Rapid Amplification of cDNA ends; Ausbel *et al.*, 1989). El ARN total de hojas de maíz fue obtenido como se describió previamente. Los productos amplificados por RT-PCR fueron subclonados en el plásmido pGEM y después secuenciados. Las secuencias del nucleótido antisentido (955-982 pb) usadas para el 5'-RACE, y la del nucleótido con sentido (107-124) usadas para el 3'-RACE fueron los siguientes: 5'-gcacatagcatgaaaccaatgacaccact-3' (GSP1) y 5'- tgcagcagcggcactgac-3' (GSP2).

d) Aislamiento de un segundo fragmento de ADNc que codifica una espermidina sintasa de maíz (*Zmspds2B*)

Se aisló un segundo fragmento de ADNc que codifica una espermidina sintasa (*Zmspds2B*) de maíz en muestras tratadas con diferentes concentraciones de NaCl por 12 h. Este fragmento, fue amplificado con los oligonucleótidos SPDS-MAIZE-5 (sentido) y SPDS-MAIZE-3I (antisentido), descritos previamente. El producto de PCR obtenido, de 329 pb fue subclonado en el plásmido pGEM (Promega Corporation Madison USA) y secuenciado.

e) Aislamiento de la secuencia genómica del gen *Zmspds2*

La secuencia del gen que codifica la espermidina sintasa de maíz (*Zmspds2*) fue obtenida por PCR. Se diseñaron cuatro oligonucleótidos específicos en base a la secuencia completa del ADNc previamente obtenido: 5'-caagagactgggaccttcaaag-3' (ZMSPLI5, sentido), 5'-gagtggtgatggtggtgt-3' (ZMGONOM3, sentido), 5'-acaccaccatcaccacctc-3' (ZMGONOM5, antisentido,) and 5'-catcctattactgcagatgg-3' (ZM3UTRF, antisentido). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 µL conteniendo: 1 µL de ADN genómico (200 ng), Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM con KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, dNTPs 200 µM, 0.2 µM de cada oligonucleótido y 2.5 U Taq ADN polimerasa. Las condiciones programadas para cada ciclo fueron: etapa de desnaturalización, 94 °C 45 s, etapa de alineamiento de los oligonucleótidos, 60 ó 64 °C 45 s, y la etapa de extensión, 72 °C 3 min. Con los oligonucleótidos empleados se obtuvieron dos productos de PCR sobrepuestos: A (1178 pb) y B (2728 pb). Estos productos fueron clonados en el plásmido pCR4-TOPO y secuenciado por ambas cadenas.

f) Secuenciación de ADN

La secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos en este trabajo, fueron procesados empleando el secuenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin Elmer) en el Laboratorio Nacional de Genómica del Cinvestav, Unidad Irapuato. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del GenBank bajo los siguientes números de acceso: AY730048 (*Zmspds2*, cADN completo), DQ247922 (*Zmspds2*, genómico).

8. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

a) Determinación de poliaminas

El contenido de poliaminas libres, Put, Spd y Spm fue determinado por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) como dansil-poliaminas de acuerdo al método descrito por Marcé *et al.*, (1995). Las poliaminas libres fueron extraídas a partir de 300 mg de material vegetal (hojas) con 1 mL de ácido perclórico al 5% (v/v). Los extractos se incubaron a 4 °C por 16 h y se recuperaron

por centrifugación. Las dansil-poliaminas se obtuvieron al hacer reaccionar: 200 μ L del extracto vegetal, 100 μ L de Na_2CO_3 saturado, 200 μ L de cloruro de dansilo (5 mg por mL de acetona) y 5 μ L de 1,7-diaminoheptano (HTD, 100 μ M) como estándar interno. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 16 h. Al cabo de este periodo se añadió 100 μ L de prolina (100 mg por mL) para parar la reacción de dansilación. Las dansil-poliaminas fueron extraídas con 400 μ L de tolueno. La fase orgánica fue evaporada, las poliaminas libres fueron resuspendidas en acetonitrilo (100 μ L) y analizadas por HPLC.

Los conjugados solubles de poliaminas fueron obtenidos por hidrólisis ácida. Para ello, 200 μ L del extracto vegetal fueron hidrolizados con 200 μ L de HCL 2N a 110 $^{\circ}$ C por 18 h. El producto de la hidrólisis fue secado y resuspendido en 200 μ L de ácido perclórico al 5% (v/v). El contenido de poliaminas fue determinado como se describió previamente.

b) Determinación de prolina

El contenido de prolina fue determinado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 520 nm, empleando el método de la ninhidrina descrito por Magne y Larher (1992). De manera general, se obtiene un extracto vegetal al hervir 500 mg muestra (hojas) en 2 mL de agua destilada. Después, se mezclan 500 μ L del extracto vegetal con 500 μ L de citrato de sodio (0.2 M, pH 4.6) y 2 mL de ninhidrina al 1% (ácido acético: agua 60: 40). La mezcla se hierve por 1 h. Finalmente, la prolina fue extraída con 2 mL de tolueno y su concentración fue determinada espectrofotométricamente. Como estándar se empleó prolina pura (Sigma).

c) Determinación de clorofila

El contenido de clorofila (μ g clorofila/g) fue determinado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 645 y 663 nm, empleando el método de extracción en acetona al 80% descrito por Arnon (1949).

d) Determinación de actividad enzimática

i) Actividad ADC y ODC

La determinación de la actividad de la arginina decarboxilasa (ADC) y de la ornitina decarboxilasa (ODC) se realizó en extractos crudos de material vegetal, empleando sustratos marcados radiactivamente de acuerdo al método descrito por Birecka (1991). El material vegetal (hojas) fue molido con nitrógeno líquido en un mortero y homogenizado en un buffer de extracción pH 7.5 (fosfato de potasio 100 mM, ácido ascórbico 20 mM, EDTA 5 mM, PMSF 10 mM, PLP 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, PEG y PVP al 0.1%). La reacción se incubó a 37 °C por 45 min empleando como sustratos marcados 50nCi de L-[U-¹⁴C] arginina o bien 50nCi de L-[1-¹⁴C] ornitina y 10 μM de arginina u ornitina no marcados, respectivamente. Se añadió ácido perclórico al 10% para terminar la reacción y liberar el CO₂ marcado, el cual es atrapado en discos de papel filtro previamente humedecidos con KON 2N. El número de cuentas radioactivas proporcional a la actividad de cada enzima fue determinado en un contador de centelleo Beckman LS 5000 TD.

ii) Actividad PAO

La actividad poliamino oxidasa (PAO) fue determinada de acuerdo al método descrito por Cona *et al.*, (2003). El material vegetal (hojas) fue molido con nitrógeno líquido en un mortero y homogenizado en un buffer de extracción pH 6.5 (Fosfato de potasio 0.1 M y PMSF 0.5 mM). La actividad PAO fue medida espectrofotométricamente por la formación de un complejo color rosa ($\xi_{515} = 2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como resultado de la oxidación y condensación de la 4-aminoantipirina (0.1 mM) y el ácido 2-hidroxi-3,5-diclorobenceno sulfónico (DHBS, 1 mM) en presencia de la peroxidasa de rabanito. Los ensayos de actividad PAO se realizaron en un volumen total de 1 ml empleando como sustratos espermidina o espermina 2 mM. La reacción se llevó a cabo a 30 °C.

e) Determinación de la concentración de proteína

La concentración total de proteínas se determinó empleando el método de Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina como estándar.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y BIOINFORMÁTICOS

a) Programas empleados para el análisis de secuencias de ADN y proteínas

Las secuencias de ADN y proteína fueron analizadas con el programa DNASTAR (Madison, WI). El análisis de dominios y sitios activos de proteínas se realizó con el programa InterProScan de la base de datos EBI (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK). Las comparaciones y alineamientos de las secuencias de proteínas se realizó con el programa ClustalW de la base de datos EBI. Los árboles filogenéticos fueron obtenidos con los programas MegAlign (DNASTAR) y MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). La localización de posibles sitios PEST se realizó con el algoritmo PESTfind de la base de datos EMBnet (European Molecular Biology Network, Vienna, At).

b) Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos para determinar diferencias significativas en el contenido de poliaminas, prolina, clorofila y actividades enzimáticas en los diferentes tratamientos, se realizaron con el programa GraphPad Prism 3.0 software. Se empleó el método estadístico de ANOVA con la prueba de Tuckey para la comparación de pares de columnas.

V. RESULTADOS

1. EFECTO DEL ESTRÉS SALINO SOBRE LA REGULACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE POLIAMINAS EN MAÍZ (*Zea mays L.*)

Esta primera parte del proyecto consistió en el aislamiento y clonación de genes involucrados en la biosíntesis de poliaminas de maíz. Se reporta el aislamiento de una secuencia de ADNc completa que codifica el gen de la espermidina sintasa (*Zmspds2*) obtenido por técnicas de RACE 5' y 3'. Esta secuencia presenta una homología con un 81.9% de identidad con la SPDS2 de *Oryza sativa*. Además, se detectó la expresión de los transcritos *adc*, *odc*, *samdc* y *Zmspds2* en diferentes órganos de maíz por RT-PCR, siendo mayoritaria la expresión en hojas. Por otro lado se evaluó el efecto del estrés salino en un sistema de hoja cortada empleando concentraciones crecientes de cloruro de sodio (0, 25, 150 y 400 mM a 1.5 y 12 h). Nuestros resultados muestran que solo los transcritos *Zmodc* y *Zmspds2A* se inducen en respuesta al estrés salino. De manera interesante, un segundo transcrito que codifica una espermidina sintasa de maíz (*Zmspds2B*) se sobre-expresó únicamente en presencia de sal. La comparación entre las secuencias de la *Zmspds2A* y *Zmspds2B* con la correspondiente región genómica reveló que ambos transcritos son productos del mismo gen por un proceso de splicing alternativo. Por otro lado, el transcrito de la *adc* se acumuló en respuesta a un choque hipoosmótico, en hojas control tratadas con agua destilada estéril. Este trabajo constituye un nuevo aspecto de regulación del metabolismo de poliaminas bajo condiciones de estrés abiótico, ya que es el primer reporte de regulación transcripcional de la espermidina sintasa en respuesta a estrés salino en plantas y la presencia de una variante de splicing asociada a este proceso.

Manuscrito publicado en la revista "Plant Growth Regulation"

Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis

Margarita Rodríguez-Kessler¹, Angel G. Alpuche-Solis¹, Oscar A. Ruiz² and Juan F. Jiménez-Bremont^{1,*}

¹División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa de San José 2055, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78216, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México; ²Unidad de Biotecnología 1, IIB-INTECH/UNSAM-CONICET, Ruta Circunvalación Laguna, km. 6 cc 164, (7130) Chascomús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.; *Author for correspondence (e-mail: jbremont@ipicyt.edu.mx; phone: +52-444-8-342000; fax: +52-444-8-342010)

Received 25 June 2005; accepted in revised form 17 December 2005

Key words: Alternative splicing, Polyamines, RT-PCR, Salt stress, Spermidine synthase, *Zea mays*

Abstract

A cDNA for spermidine synthase (SPDS), which converts putrescine to the higher polyamine spermidine using decarboxylated *S*-adenosylmethionine as a cofactor, was isolated from *Zea mays* leaves (*Zmspds2A*). Comparison of the deduced amino acid sequence revealed a high homology (81.9%) with *Oryza sativa* SPDS2. RT-PCR analyses showed that *Zmspds2A* was equally expressed in leaves, stem and roots. In contrast, transcripts of other genes related to polyamine biosynthesis (*Zmodc*, *adc* and *samdc*) showed tissue-specific regulation. The effect of salt stress on the expression of all these genes in maize leaves exposed to NaCl solutions of different concentrations was analysed. Our results showed that only *Zmodc* and *Zmspds2A* were up-regulated by salt stress; whereas the other two genes were barely affected by this treatment. In addition to *Zmspds2A*, a second transcript encoding a maize spermidine synthase (*Zmspds2B*) that also became up-regulated by salt stress, was identified. Comparison of partial cDNA sequences of transcripts *Zmspds2A* and *Zmspds2B* with the corresponding genomic DNA region revealed the existence of alternative splicing mechanism, opening a new aspect in plant polyamine biosynthesis modulation under abiotic stress.

Abbreviations: ADC – arginine decarboxylase; ODC – ornithine decarboxylase; ORF – open reading frame; PCR – polymerase chain reaction; Put – putrescine; RT-PCR – reverse-transcription polymerase chain reaction; Sam – *S*-adenosylmethionine; SAMDC – *S*-adenosylmethionine decarboxylase; Spd – spermidine; SPDS – spermidine synthase; Spm – spermine; SPMS – spermine synthase

Introduction

Accumulation of high concentrations of soluble salts in soil, adversely affects plant growth and development. This is an important problem since a significant proportion of the cultivated and

irrigated lands in the world are salt-affected in different degrees (Sairam and Tyagi 2004). Most of the cultivated crops are salt-sensitive and accordingly salt stress negatively influences agricultural economy. Inhibition of plant growth due to salinity involves a reduction in water availability,

2. PERFIL DE POLIAMINAS EN PLANTAS DE MAÍZ SOMETIDAS A UN ESTRÉS SALINO A LARGO PLAZO

En base a los hallazgos reportados previamente por nuestro grupo de trabajo, que incluyen la regulación a nivel transcripcional de dos variantes de splicing del gen de la *Zmspds2* (*Zmspds2A* y *Zmspds2B*) en respuesta a un estrés salino a corto plazo en un sistema de hoja cortada, se decidió evaluar el efecto en planta completa en estrés a largo plazo. Se determinó el contenido de poliaminas en hojas de plantas de maíz sometidas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0, 25, 150 y 400 mM) durante 1 y 7 días en un sistema de semi-hidroponía. Nuestros resultados mostraron que la Spd y la Spm se acumulan en respuesta al estrés. Además, se observó que esta acumulación es producto de la regulación diferencial de dos genes que codifican para la espermidina sintasa de maíz *Zmspds1* y *Zmspds2*. Estos genes mantienen una homología con 63% de identidad entre ellos. La *Zmspds2* se induce, junto con su variante de splicing en un periodo de 24 h indicando que estos transcritos responden principalmente al componente osmótico del estrés salino. Mientras que el transcrito de la *Zmspds1* se induce a la semana de estrés. Además, el transcrito de la *samdc* el cual también participa en la biosíntesis de Spd y Spm se induce bajo estas condiciones. Finalmente, se evaluó el efecto de la aplicación de poliaminas exógenas sobre la germinación de semillas de maíz sometidas a salinidad. Se observó que la Spd y Spm, estimulan la germinación en concentraciones elevadas de sal (400 mM). Nuestros resultados apoyan la hipótesis de un efecto de protección de las PAs ante condiciones de estrés mediante sus propiedades de captación de radicales libres, estabilización de membranas, ajuste iónico celular, y también por su papel sobre la regulación de la expresión génica.

Polyamine profiles in maize plants under salt-stress

Margarita Rodríguez-Kessler^a, Oscar A. Ruiz^b and Juan F. Jiménez-Bremont^{a*}

^a División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa de San José 2055, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78216, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

^b Unidad de Biotecnología 1, IIB-INTECH/UNSAM-CONICET, Ruta Circunvalación Laguna, km. 6 cc 164, (7130) Chascomús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

* Author for correspondence; phone: (+52) 444-8-342000; fax: (+52) 444-8-342010, email: jbremont@ipicyt.edu.mx

Summary

Salinity is one of the major abiotic stresses affecting plant agriculture worldwide. Polyamine accumulation under salt stress has been reported for different plant systems suggesting a protective effect, acting as free radical scavenger, stabilizing cellular membranes and maintaining cellular ionic balance under these conditions. In the present study we evaluated whether long salt stress treatments lead to higher polyamine (spermidine and spermine) accumulation in maize seedling and if this is a result of the transcriptional regulation of two maize aminopropyl transferase genes, *Zmspds1* and *Zmspds2*. Our data show a time and NaCl dependent regulation of the *Zmspds2* and *Zmspds1* genes, suggesting that the former might be hyperosmotic responsive while the later NaCl responsive. In addition, these regulation contributes to the maintenance of the Spd and Spm levels under stress.

Key words: polyamines, salts-stress, spermidine synthase, *Zea mays*

Abbreviations: ADC, arginine decarboxylase; ODC, ornithine decarboxylases; PAs, polyamines; PCA, perchloric acid; PCR, polymerase chain reaction; Put, putrescine; RT-PCR, reverse-transcriptase polymerase chain reaction; SAMDC, S-adenosylmethionine decarboxylases; Spd, spermidine; SPDS, spermidine synthase; Spm, spermine; SPMS, spermine synthase.

Introduction

Salinity is one of the major abiotic stresses affecting plant agriculture worldwide. Most of the commercially important crops are salt sensitive and as a consequence salinity is becoming a threat to food supply (Flowers, 2004). High salt-stress disrupts homeostasis of water potential and ion distribution which results in plant molecular damage, growth arrest and even death (Zhu, 2001). In order to achieve salt tolerance, plants rely on three main strategies: detoxification, homeostasis re-establishment and growth regulation. These processes involve the production of stress proteins, the accumulation of compatible solutes (sugars, amino and organic acids, betaines and polyamines) and the expression of different set of genes (Sairam and Tyagi, 2004; Zhu, 2001).

Polyamines (PAs) are small organic cations, involved in both developmental (Evans and Malmberg, 1989; Kakkar et al., 2000) and stress responses in plants (Bouchereau et al., 1999). Putrescine (Put) biosynthesis in plants can be addressed by two decarboxylases: Ornithine decarboxylase (ODC) and Arginine decarboxylase (ADC). The higher PAs, spermidine (Spd) and spermine (Spm) are synthesized by spermidine and spermine synthase (SPDS and SPMS) by the successive addition of aminopropyl groups to Put. The aminopropyl moiety is derived from methionine, which is first converted into S-adenosylmethionine (Sam) and then decarboxylated via S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC).

PAs accumulation under salt stress has been reported for both mono and dicotyledonous plants (Bouchereau et al., 1999). In these sense, seedlings of *Lupinus luteus* accumulate Put and Spd in leaves in response to NaCl (Legocka and Kluk, 2005). Accumulation of Spd and Spm rather than Put has been reported in rice and tomato salt tolerant cultivars in comparison to the salt sensitive cultivars (Krishnamurthy and Bhagwat, 1989; Santa-Cruz et al., 1997). The function of PAs is presumed to be protective, acting as free radical scavenger, stabilizing cellular membranes and maintaining cellular ionic balance (Besford et al., 1993; Bouchereau et al., 1999).

Transcriptional regulation of some polyamine biosynthetic genes, mainly *adc*, has been reported under salt stress. Accumulation of the *adc* transcript was observed in apple shoots subjected to 300 mM NaCl (Hao et al., 2005). Brassica species such as *Arabidopsis thaliana* and *Pringlea antiscorbutica* accumulate the *adc2* transcript in response to salt stress (Hummel et al., 2004; Urano et al., 2003) while in mustard (*Brassica juncea*) the *MADC3* transcript is accumulated in these response (Mo and Pua, 2002). In the case of *samdc* genes, an up-regulation was observed while treating mustard leaves with 400 mM of NaCl (Hu et al., 2005). In a previous work, we reported the up-regulation of two maize *spds* transcripts (*Zmspds2A* and *Zmspds2B*), both generated by alternative splicing, in a detached leave system with short-term salt treatments (Rodriguez-Kessler et al., 2006). Despite the importance of these findings, we were interested in knowing whether longer salt stress treatments lead to higher PAs (Spd and Spm) accumulation and if this is a result of the transcriptional regulation of two maize aminopropyl transferase genes, *Zmspds1* and *Zmspds2*. All of these, supporting the hypothesis that Spd and Spm are biochemical indicators of salt stress response (Bouchereau et al., 1999; Krishnamurthy and Bhagwat, 1989; Sanchez et al., 2004).

Materials and Methods

Plant Material

Seeds of *Zea mays* (cv. cafime) were surface disinfected with 50% commercial sodium hypochlorite solution (6% free chlorine) for 30 min, and rinsed several times with sterile distilled water. Aseptic seeds were germinated in an agrolite/water support, grown hydroponically in plastic pots filled with a mixture of sand and agrolite (3:1) and sub-irrigated with half strength Hoagland's nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950). Pots, each containing one plant, were maintained in growth chambers under a 12 h light (13,000 luxes) and 12 h dark cycle, at 25 °C ± 2 °C. Ten 10-d-old seedlings were subjected to 1 and 7-d of salt-stress by adding 0, 25, 150 and 400 mM of NaCl to the Hoagland's nutrient solution. After each salt treatment, leaves were transferred to liquid nitrogen for subsequent total RNA isolation, and estimation of polyamines, proline and total chlorophyll content.

RNA isolation and RT-PCR assays of gene transcripts

Total RNA was isolated from maize leaves using the RNAqueous® KIT (Ambion, USA). After DNase I treatment, first strand cDNA synthesis was performed in a total volume of 30 µL using the SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA). Each reaction mixture contained 5 µg of total RNA, 0.5 mM dNTP mix, 0.5 µg Oligo-dT (12-18) adapter primer, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol (DTT), 40 U of Recombinant RNase Inhibitor (RNaseOUT™) and 50 U of SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase. The RT reaction was carried out at 42 °C for 50 min. Control reactions without reverse transcriptase were performed simultaneously. One µL of the RT reaction was used as template for PCR assays, amplifying the *samdc*, *Zmspds2* and *actin-1* gene transcripts

as described previously (Rodríguez-Kessler et al., 2006). In addition, a set of oligonucleotides were designed to amplify another gene encoding a maize spermidine synthase obtained at the NCBI database, which was named as *Zmspds1* (GenBank AY103592): 5SPDS1 5'-gatctccgccgcatcccg-3'sense and 3SPDS1 5'-cctttgatttcataggatgctcctc-3' anti-sense. These oligonucleotides are specific for the *Zmspds1* gene and do not amplify the *Zmspds2* transcript. All PCR products were electrophoretically separated in 1% (w/v) agarose gels. Quantitation of signals was performed by the image analysis program Quantity One (Bio-Rad). Each signal was normalized to the *actin* signal.

Free polyamines determination

Free polyamines (Put, Spd and Spm) were estimated as dansyl-derivatives by reversed phase HPLC in leaves of salt-stressed maize seedlings (1, 7 and 14-d) as described by Marcé et al. (1995). In general, 300 mg of the plant material were extracted with 1 mL of 5% (v/v) perchloric acid (PCA) and then incubated overnight at 4 °C. The extracts were recovered by centrifugation and 200 µL of the supernatants were dansylated in a mixture containing 100 µL of saturated Na₂CO₃, 200 µL dansylchloride (5 mg per mL acetone) and 5 µL of 100 µM 1-7 diamino heptane (HTD) as internal standard. The mixture was incubated overnight in darkness at RT. Reaction was stopped by adding 100 µL proline (100 mg per mL) and dansylated polyamines were extracted with 400 µL toluene. Organic phase was vacuum-evaporated and dansylated polyamines were dissolved in 100 µL acetonitrile and analyzed by HPLC.

Proline and total chlorophyll estimation

Proline (Pro) content was determined spectrophotometrically at 520 nm following the ninhydrin method described by Magne and Larher (1992), using pure Pro (*Sigma*) as standard. Free Pro was extracted from leaves of salt-stressed maize seedlings (1, 7 and 14-d) by boiling 0.5 g of the vegetal material in 2 mL of distilled water. Then 500 μ L of sodium citrate (0.2 mol/L, pH 4.6) and 2 mL of 1% ninhydrin (acetic acid : water 60 : 40) were added to 500 μ L of the vegetal extract. Mix was boiled 1 h, 2 mL toluene were added for the extraction and then centrifuged. Organic phase was read spectrophotometrically.

Total chlorophyll was estimated in 80% acetone extracts obtained from the same samples mentioned above for Pro determination according to Arnon (1949). One-way-ANOVA and Tukey post-test were performed to assess statistical significance between treatments, using GraphPad Prism 3.0 software.

Sequence analysis

A cDNA sequence encoding a maize spermidine synthase gene (GenBank AY103592) different from the previously isolated *Zmspds2* cDNA (Rodríguez-Kessler et al., 2006), was obtained from the NCBI (National Center for Biotechnology) database. Analysis of protein domains and functional sites were carried out using InterProScan at the EBI (European Bioinformatics Institute) database. Comparison and protein sequence alignments were carried out using the ClustalW at the EBI (European Bioinformatics Institute) database. The phylogenetic tree was constructed using MEGA 3.1 version (Kumar et al., 2004).

Results

Effect of salt-stress on the expression of the Zmspds1 and Zmspds2 genes

The participation at the transcriptional level of the *samdc* gene and of two aminopropyl transferase genes *Zmspds1* and *Zmspds2* in the salt-stress response, was evaluated in maize leaves of hydroponically grown seedlings (see Materials and Methods) subjected to 0, 25, 150 and 400 mM of NaCl during 1 and 7-d. The maize *Zmspds2* gene can be transcribed in two known splicing variants, *Zmspds2A* and *Zmspds2B*, under salt-stress conditions (Rodríguez-Kessler et al., 2006). The *Zmspds2A* variant is originated by removal of introns and setting exons together, while in the shorter *Zmspds2B* variant, in addition to the introns an exon is removed by alternative splicing. As shown in Figure 1A, the *Zmspds2A* variant is up-regulated (2-fold at 25 and 150 mM; 4-fold at 400 mM) in response to 1 d of salt-stress, in agreement with our previous findings (Rodríguez-Kessler et al., 2006). In addition, the *Zmspds2B* variant, is also produced although at low levels, only in response to NaCl (Fig. 1A', enlargement of 1A). Another gene encoding a maize spermidine synthase obtained at the NCBI database, which was named as *Zmspds1*, shares higher protein sequence homology with the plant SPDS1 proteins: 89.6% with *Oryza sativa* SPDS1 (GenBank AJ251298), 82.8% with *Datura stramonium* SPDS1 (GenBank Y08252), 79.6% with *Arabidopsis thaliana* SPDS1 (GenBank AJ251296), 79.6 with *Pisum sativum* SPDS1 (GenBank AF043108), 78.9% with *A. thaliana* SPDS2 (GenBank AJ251297), 63.8% with *O. sativa* SPDS2 (GenBank AB098063) and 62.6% with *Zea mays* SPDS2 (GenBank AY730048). The *Zmspds1* open reading frame consists of 957 bp encoding a polypeptide of 318 amino acids with a predicted molecular mass of 34, 876 Da. The deduced protein (ZmSPDS1) contained the characteristic motifs of SPDS's: the conserved sequence of the spermidine synthase family ([VAI]-[LAV]-[LIV](2)-G-G-G-x-[GC]-x(2)-[LIVA]-x-E; underlined, Fig. 2A)

and the proposed binding motif for SAM and dcSAM (motifs I to VI; shaded, Fig. 2A) (Posfai et al., 1989; Hashimoto et al., 1998; Hatanaka et al., 1999). Protein sequence alignments using the ClustalW program showed that the plant SPDS1 are shorter than the SPDS2 sequences (Figure 2A). In addition, the plant SPDS1 sequences present the maximal homology in the central region and the carboxy-termini of the protein, whereas the amino-termini presents the major variability (Fig. 2A). In contrast with the SPDS2 and the *A. thaliana* SPDS3 proteins, a region of 14 amino acids between Arg59 and Pro74 of the *ZmSPSD2* is absent in all the SPDS1 sequences (Fig. 2A). A phylogenetic tree including the *spds* genes from different species, and the spermine synthase from *A. thaliana* (ACL5) is also shown (Fig. 2B). As observed in the tree, the *Zmspds1* is grouped within the plant SPDS1 proteins and the dicot SPDS2 proteins whereas the monocot SPDS2 and the SPDS3 from *A. thaliana* constitute a separate group of plant SPDS's.

On the other hand, in contrast with *Zmspds2*, the *Zmspds1* shows no changes in the expression pattern at 1 d of stress (Fig. 1B). In the case of the *samdc* gene, an up-regulation (ca.1.5-fold) was observed at 150 and 400 mM (Fig. 1C). We also measured the transcription of the *adc* gene, responsible for Put biosynthesis, nevertheless the transcript levels were extremely low, almost undetectable at both 1 and 7-d of stress (data not shown). As loading control, the maize actin-1 gene was used (Fig. 1D y H).

Opposite to the up-regulation observed for the *Zmspds2* gene at 1-d of stress, 7-d produced no changes in the *Zmspds2* expression pattern and the *Zmspds2B* splicing variant was not detected (Fig. 1E, E'). The *samdc* gene showed an induction at 25 mM (ca. 1.5 fold) while no changes were observed at 150 and 400 mM (Fig. 1G). In the case of the *Zmspds1* gene an up-regulation (3 and 2-fold; respectively) was observed at 150 and 400 mM (Fig. 1F). Our data show a time and NaCl dependent regulation of the

Zmspds2 and *Zmspds1* genes, suggesting that the former might be hyperosmotic responsive while the later NaCl responsive.

Effect of salt-stress on PAs content in maize leaves

Free polyamines (PAs; Put, Spd and Spm) were estimated as dansyl-derivatives by reversed phase HPLC (see Materials and Methods) in the same samples as described previously for RT-PCR analysis. As shown in Figure 3, 1-d of stress caused a reduction (ca. 55%) of Put levels at 25 mM of NaCl whereas a slight increase was observed for Spd and Spm (Fig. 3A, B, C). The reduction in the Put might be associated to the use of this molecule as substrate for the synthesis of higher PAs. Following a higher concentration of NaCl (150 mM) an increase of ca. 40% in Put levels was observed while the higher PAs, Spd and Spm show a similar behavior as described at 25 mM (Fig. 3A, B, C). It is suggested that the up-regulation of the *samdc* and *Zmspds2* gene transcripts previously described (Fig. 1A, C) might contribute to the slight increases observed in Spd and Spm at 25 and 150 mM of NaCl (Fig. 3B, C). The higher concentration of NaCl used in this study (400 mM) did not change the PAs content (Fig. 3A, B, C). Larger periods of stress (7 d) produced a 2.5-fold increase in the Put content at 25 mM of NaCl whereas ca. 2-fold was observed for Spd and Spm (Fig. 3D, E, F). In contrast with the PAs accumulation observed at 25 mM, the Put and Spm content was not affected at 150 mM whereas Spd reduced ca. 50% (Fig. 3D, E, F). Finally, the major concentration of NaCl used reduces Put and Spd content but Spm is maintained (Fig. 3D, E, F). It is important to notice that the maize polyamine content (mainly Put and Spd) is higher in maize seedlings treated 1 d with stress rather than with 7 d. In the case of Spm, at both 1 and 7-d, the plant tends to maintain and/or increase the content of these amine suggesting an important role for Spm under salt-stress.

Effect of salt stress on proline and total chlorophyll content in maize leaves

In addition to PAs, we evaluated the levels of proline (Pro) in stressed leaves, as universal marker of water deficit and salinity (Taylor, 1996), and compared the pattern of accumulation of this osmoticum with those of PAs. As shown in Figure 4A, no changes were observed in the Pro content at 1 d of stress (white bars) while ca. a 2 and 3-fold increase was observed at 150 and 400 mM of NaCl respectively, during 7 d (gray bars). Comparing the data between Figures 3 and 4A, it is observed that PAs biosynthesis is stimulated earlier than Pro's under salt-stress in maize. As supplemental data, we continued the stress treatment until 14 d, time point at which the permanent wilting point of the maize plants was reached at 400 mM. The proline content increased steeply since day 10 (4- and 15-fold, at 150 and 400 mM) up to day 14 (5-fold at 150 mM) (Fig. 4A, grid lined and black bars).

On the other hand, it is well established that the rate of photosynthesis diminishes with stress, accompanied with the degradation of chlorophyll and chlorophyll-protein complexes (Björkman et al., 1981). In these sense, we determined the chlorophyll content in the same samples described previously for Pro estimation. It was observed that the total chlorophyll content rises ca. 2-fold with NaCl at 1 d of stress (Fig. 4B, white bars). At 7-d an increase of 1.5-fold was observed at 25 mM while no changes were observed at 150 and 400 mM (Fig. 4B, gray bars). At 10-d of stress no apparent changes in the chlorophyll content were observe while after 14-d a 40% reduction in chlorophyll content was observed at 150 mM (Fig. 4B, grid lined and black bars).

Discussion

During the last decade, special attention has been given to the regulation of polyamine biosynthesis under stress conditions and many genes involved in their biosynthesis have been cloned, mainly *odc*, *adc* and *samdc* (Bouchereau et al., 1999; Walden et al., 1997). Recently, the isolation of aminopropyltransferases, mainly *spds* has been matter of importance: *Lycopersicon esculentum* (Alabadi and Carbonell, 1999), *Arabidopsis thaliana* (Hanzawa et al., 2000), *Malus sylvestris* (Zhang et al., 2003), *Oryza sativa* (Imai et al., 2004) and *Zea mays* (Rodríguez-Kessler et al., 2006). At the present, we identified a sequence coding a different maize spermidine synthase gene than the previously isolated *Zmspds2* cDNA, at the NCBI database. These sequence was named as *Zmspds1* due to its high homology with the SPDS1 sequences of plants, specially with the *O. sativa* SPDS1 (89.6%). Transcriptional regulation of maize spermidine synthase genes under salt-stress was assed by our group in a previous effort using a detached leave system (Rodríguez-Kessler et al., 2006). Interestingly, two *Zmspds2* splicing variants (*Zmspds2A* y *Zmspds2B*) were up-regulated in a period of hours in this response. In our attempt to understand the significance of the maize spermidine synthase genes under salt-stress we evaluated if longer stress treatments had an effect over the regulation of two different maize spermidine synthase genes *Zmspds1* and *Zmspds2*. In agreement with our previous findings, longer periods of salt-stress still induced the expression of both *Zmspds2* (A and B) splicing variants, been the later only expressed in response to NaCl. In addition, in the case of the *Zmspds2* and *Zmspds1* genes, time-dependent and salt-dependent regulation was revealed, suggesting that the former is mainly hyperosmotic responsive (1 d) while the later is NaCl responsive (7 d). The differential regulation of both maize *spds* genes might play an important role in the proper adjustment of polyamine levels under stress. Differential regulation of *spds*

genes has been reported in rice cultivars subjected to long term chilling stress (Imai et al., 2004). Under this conditions the *Osspds2* but no the *Osspds1* is accumulated in roots. In addition to the spermidine synthase genes, the maize *samdc* gene was also up-regulated at 1 d of salt-stress. Changes in the *samdc* gene expression pattern have been reported during different stages of plant development (Marco and Carrasco, 2002) and in response to abiotic stress conditions (Tian et al. 2004; Marco and Carrasco, 2002; Pillai and Akiyama, 2004; Hu et al., 2005).

A direct comparison between the gene regulation pattern and the polyamine content becomes complex, nevertheless; our data suggests an active participation of maize spermidine synthases while the plant tend to maintain or accumulate Spm. As described in the results the levels of Spd and Spm in most of the samples did not increase above the basal levels during salt stress although an up-regulation of the *Zmspds2*, *Zmspds1* and *samdc* gene transcripts was detected. Similar observations were reported in *A. thaliana* seedlings subjected to water stress (Alcázar et al., 2006). These phenomena agrees with previous reports in which it was supported that the cellular levels of Spd and Spm are homeostatically more tightly regulated than those of Put (Alcazar et al., 2005; Urano et al., 2003; Bhatnagar et al., 2001).

It has been observed that tolerant cultivars accumulate mainly Spd and Spm in comparison to the sensitive ones which accumulate Put under salt-stress (Krishnamurthy and Bhagwat, 1989; Santa-Cruz et al., 1997). Different authors agree with the idea that Spm might be the most important polyamine due to their protective effects, acting as a radical scavenger (Ha et al., 1998; Drolet et al., 1986), in membrane stabilization (Flores, 1991) and recently, a Spm-dependent signaling pathway involved in hypersensitive response (HR) has been demonstrated (Yamakawa et al., 1998; Takahashi et al., 2003; Uehara et al., 2005). Up to date no reports supporting the

functionality of this pathway under abiotic stress conditions exists. However, *Arabidopsis thaliana* seedlings transformed with a spermidine synthase gene over-express several stress responsive genes, giving great importance to Spd as a signaling molecule under abiotic stress (Kasukabe et al., 2004). In fact, these plants maintain high levels of both Spd and Spm, opening the possibility that both PAs might contribute to the induction of genes in response to stress. In these sense, it is possible that the main function of PAs at the molecular level might be the regulation of genes under stress as well as developmental conditions, as proposed by different authors (For Review Childs et al., 2003; Matthews, 1993; Lindemose et al., 2005).

Finally, salinity induces multiple responses including the accumulation of different organic compounds. In these sense, we compared the pattern of PAs accumulation with that of Pro, which is considered an universal marker for water stress and salinity. Differences between the accumulation of both PAs and Pro were observed. Although the accumulation of PAs is not so dramatic as that of Pro in maize, salt-stress stimulated the biosynthesis of PAs earlier. This agrees with the general hypothesis that Spd and Spm are biochemical indicators of salt stress response (Bouchereau et al., 1999; Krishnamurthy and Bhagwat, 1989; Sanchez et al., 2004).

References

- Alabadi D and Carbonell J. Molecular cloning and characterization of a tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) spermidine synthase cDNA (Accession No. AJ006414). *Plant Physiol* 1999;120:935.
- Alcázar R, García-Martínez JL, Cuevas JC, Tiburcio AF, Altabella T. Overexpression of ADC2 in Arabidopsis induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *Plant J* 2005; 43:425-436.
- Alcázar R, Cuevas JC, Patron M, Altabella T, Tiburcio AF. Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 2006; 128:448-455.
- Arnon DI. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 1949;24:1-15.
- Bhatnagar P, Glasheen BM, Bains SK, Long SL, Minocha R, Walter C, Minocha SC. Transgenic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. *Plant Physiol* 2001; 125:2139-2153.
- Björkman O, Powles SB, Fork DC, Öquist G: Interaction between high irradiance and water stress on photosynthetic reactions. *Carnegie Institute of Washington Year Book* 1981;57-59.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 1999;140:103-125.
- Besford RT, Richardson CM, Campos JL, Tiburcio AF. Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* 1993;189:201-206.
- Childs AC, Mehta D, Gerner EW. Polyamines-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1-13.

- Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL, Thompson JE. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* 1986;25:367-371.
- Evans PT, Malmberg RL. Do polyamines have roles in plant development? *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1989;40:235-269.
- Flores HE. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In: Slocum RD, Flores HE, editors. *The biochemistry and physiology of polyamines in plants*. Boca Raton, FL: CRC Press 1991;214-255.
- Flowers TJ. Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot* 2004;55:307-319.
- Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RA. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:11140-11145.
- Hanzawa Y, Imai A, Michael AJ, Komeda Y, Takahashi T. Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 2002; 527: 176-180.
- Hao YJ, Kitashiba H, Honda C, Nada K, Moriguchi T. Expression of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase genes in apple cells and stressed shoots. *J Exp Bot* 2005;56:1105-1115.
- Hashimoto T, Tamaki K, Susuki K, Yamada Y. Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant Cell Physiol* 1998;39:73-79.
- Hatanaka T, Sano H, Kusano T. Molecular cloning and characterization of coffee cDNA encoding spermidine synthase. *Plant Sci* 1999;140:161-168.
- Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif Agr Expt Sts Circ* 1950;347.

- Hu WW, Gong H, Pua EC. Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-methionine decarboxylase genes from mustard (*Brassica juncea*). *Physiol Plant* 2005;124:25-40.
- Hummel I, Gouesbet Gwenola, El Amrani A, Aïnouche A, Couée I. Characterization of the two arginine decarboxylase (polyamine biosynthesis) paralogous of the endemic subantartic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica* and analysis of their differential expression during developmental and response to environmental stress. *Gene* 2004;342: 199-209.
- Imai R, Ali A, Pramanik HR, Nakaminami K, Sentoku N, Kato H. A distinctive class of spermidine synthase is involved in chilling response in rice. *J. Plant Physiol* 2004; 161:883-886.
- Kakkar RK, Nagar PK, Ahuja PS, Rai VK. Polyamines and plant morphogenesis. *Biol Plant* 2000; 43:1-11.
- Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S. Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stress and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2004;45:712-722.
- Krishnamurthy R, Bhagwat KA. Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. *Plant Physiol* 1989;91:500-504.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 2004;5:150-163.
- Legocka J, Kluk A. Effect of salt and osmotic stress on changes in polyamine content and arginine decarboxylase activity in *Lupinus luteus* seedlings. *J Plant Physiol* 2005; 162: 662-668.

- Magné C, Larher F. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Anal Biochem* 1992; 200.
- Marcé M, Brown DS, Capell T, Figueras X, Tiburcio AF. Rapid high performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *J Chromat B* 1995; 666:329-335.
- Marco F, Carrasco P. Expression of the pea S-adenosylmethionine decarboxylase gene is involved in developmental and environmental responses. *Planta* 2002;214:614-647.
- Matthews HR. Polyamines, chromatin structure and transcription. *Bioessays* 1993;15: 561-566.
- Mo H, Pua EC. Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. *Physiol Plant* 2002;114:439-449.
- Pillai MA, Akiyama T. Differential expression of an S-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under low temperature stress in japonica and indica rice genotypes. *Mol Gen Genomics* 2004;271:141-149.
- Posfai J, Bhaqwat AS, Posfai G, Roberts RJ. Predicted motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucl Acids Res* 1989; 17:2421-2435.
- Richard FJ, Coleman RG. Occurrence of putrescine in potassium-deficient barley. *Nature* 1952;170: 460.
- Rodríguez-Kessler M, Alpuche-Solís AG, Ruiz OA, Jiménez-Bremont JF. Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. *Plant Growth Reg* 2006;48:175-185.

- Sairam RK, Tyagi A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr Sci* 2004;86:407-421.
- Sanchez DH, Cuevas JC, Chiesa MA, Ruiz OA. Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Sci* 2005;168:541-546.
- Santa-Cruz A, Acosta M, Pérez-Alfocea F, Bolarin MC. Changes of free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultured and wild tomato species. *Physiol Plant* 1997;101:341-346.
- Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Seo S, Ohashi Y, Kusano T. Spermine signaling in tobacco: activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction. *Plant J* 2003;36:820-829.
- Taylor CB. Proline and water deficit: Ups, Downs, Ins, Outs. *Plant Cell* 1996;8:1221-1224.
- Tian AG, Zhao JY, Zhang JS, Gai JY, Chen SY. Genomic characterization of the S-adenosylmethionine decarboxylase genes from soybean. *Theor Appl Genet* 2004;108:842-850.
- Uehara Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Takahashi H, Matsui K, Ohme-Takagi M, Saitoh H, Terauchi R, Kusano T. Tobacco ZFT1, a transcriptional repressor with a Cys₂/His₂ type zinc finger motif that functions in spermine-signaling pathway. *Plant Mol Biol* 2005;59:435-448.
- Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Igarashi Y, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ* 2003;26:1917-1926.
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol* 1997;113:1009-1013.

Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 1998;118:1213-1222.

Zhang Z, Honda C, Kita M, Hu C, Nakayama M, Moriguchi T. Structure and expression of spermidine synthase genes in apple: two cDNAs are spatially and developmentally regulated through alternative splicing. *Mol Gen Genomics* 2003;268:799-807.

Zhu JK. Plant salt tolerance. *TRENDS in Plant Sci* 2001;6:66-71.

Legends to Figures

Figure 1. Effect of salt-stress on *Zmspds2*(A, E), *Zmspds1* (B, F) and *samdc* (C, G) expression in maize. Total RNA was isolated from leaves of maize seedlings subjected 1 and 7 d to different concentrations of NaCl (0, 25, 150 and 400 mM). Five µg of each RNA sample were used for RT-PCR analyses. Ten µL of the RT-PCR product was loaded on each lane and separated by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel. In the case of A' and E' 20 µL of the PCR product were loaded to visualize the *Zmspds2B* splicing variant. As loading control the actin product was used (D, H). The histogram shows relative *Zmspds2*, *Zmspds1* and *samdc* cDNAs abundance after normalization with the actin signal.

Figure 2. Multiple amino acid alignment (A) as derived by maximal homology of SPDS from the maize *Zmspds1* obtained at the NCBI database (AY103592) with the corresponding protein sequences of other plant SPDS's: At1, *Arabidopsis thaliana* (GenBank AJ251296), At2, *Arabidopsis thaliana* (GenBank AJ251297), At3, *Arabidopsis thaliana* (GenBank NM124691), Os1, *Oryza sativa* (GenBank AJ251298), Os2, *Oryza sativa* (GenBank AB098063) and Zm2, *Zea mays* (GenBank AY730048). Identical residues (asterisks) in the seven proteins and conserved amino acid substitutions (dots) are indicated. The proposed binding sites for SAM and dcSAM (motifs I to VI) are shadowed. A phylogenetic tree (B) representing the SPDS from *A. thaliana* (At1, At2, At3), *Datura stramonium* (Ds1, Ds2), *Escherichia coli* (Ec), *Hyoscyamus niger* (Hn1, Hn2), *Homo sapiens* (Hs), *Neurospora crassa* (Nc), *O. sativa* (Os1, Os2), *Pisum sativum* (Ps1, Ps2), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Z. mays* (Zm1, Zm2), and the spermine synthase gene ACL5 from *A. thaliana* was created by neighbor-joining method using the MEGA version 3.1 program (Kumar et al., 2004). The

distance scale represents evolutionary distance expressed as the number of substitutions per residue.

Figure 3. Content of free Put (A, D), Spd (B, E) and Spm (C, F) in leaves of maize seedlings subjected 1 and 7 d to 0 (control), 25, 150 and 400 mM of NaCl. Data are mean \pm SE (n=6) from two repeated experiments.

Figure 4. Proline (A) and total chlorophyll (B) content in leaves of maize seedlings subjected 1 (white-bars), 7 (gray-bars), 10 (grid line-bars) and 14 (dark-bars) days to 0 (control), 25, 150 and 400 mM of NaCl. Data are mean \pm SE (n=6) from two repeated experiments.

Figure 3

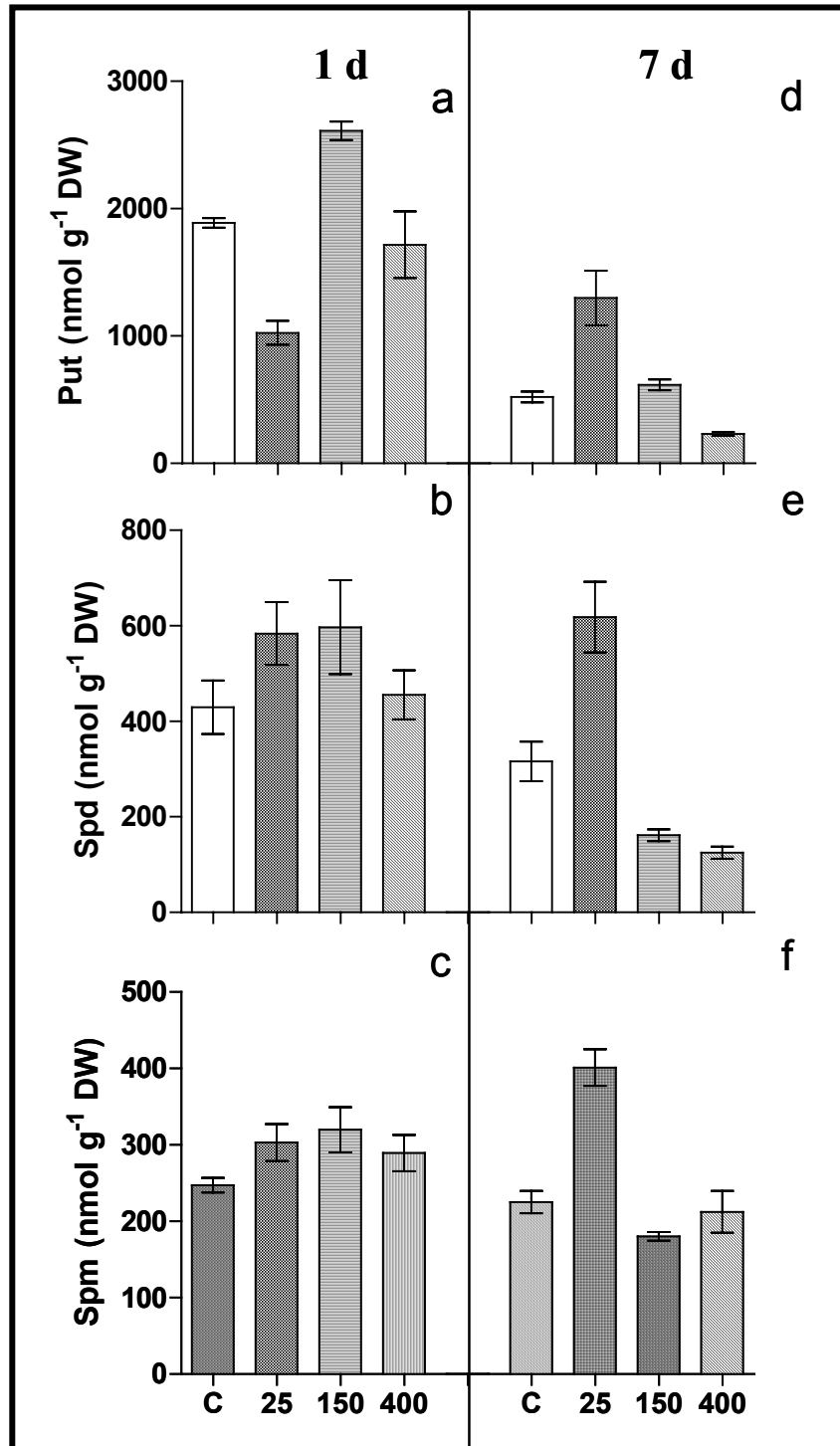
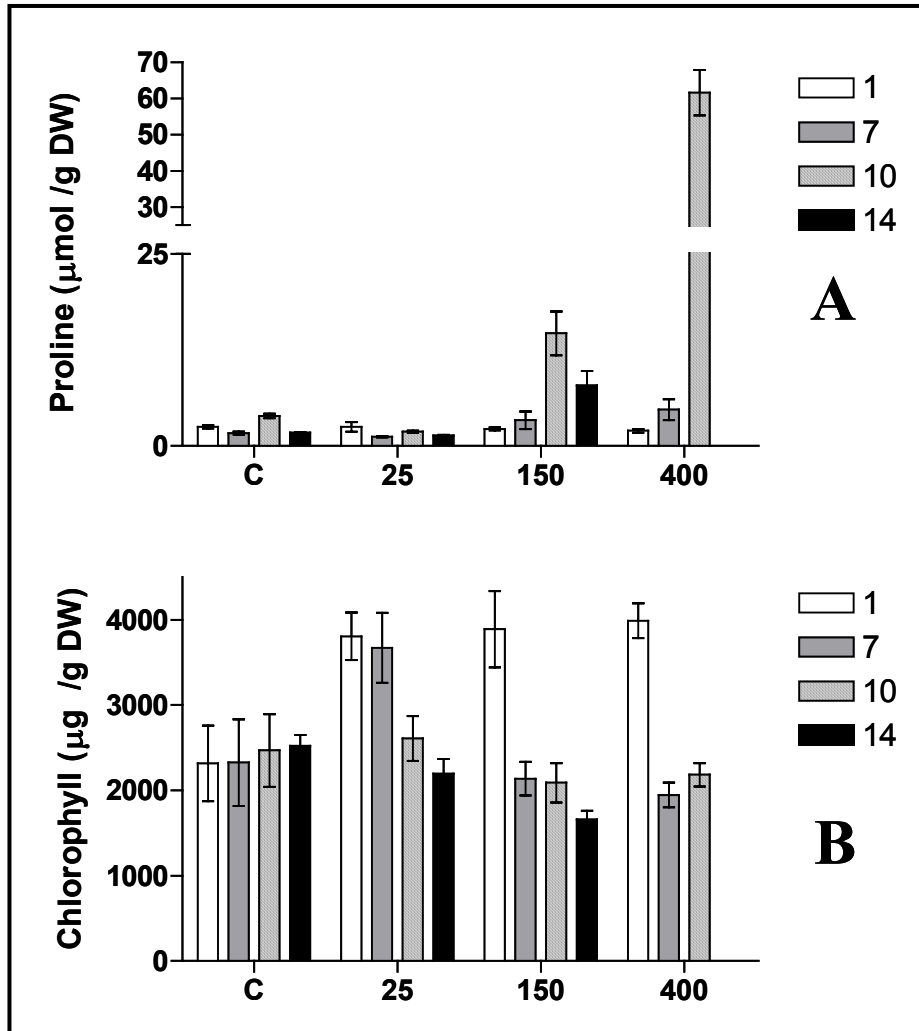


Figure 4



3. *Zmspds2*, SECUENCIA GENÓMICA Y SU REGULACIÓN EN RESPUESTA A HORMONAS Y FACTORES AMBIENTALES

Las aminopropil-transferasas como la espermidina sintasa (SPDS, EC 2.5.1.16) pertenecen a un grupo de enzimas que usan la s-adenosil-metionina descarboxilada (dcSAM) como donador de grupos aminopropilo y a la putrescina como grupo amino aceptor para la formación de espermidina. En el presente trabajo aislamos la secuencia genómica de la *Zmspds2* correspondiente a la región codificante de la enzima. Esta secuencia mide 3887 pb, la cual contiene 11 exones y 10 intrones. Esta secuencia presenta gran homología en su estructura genómica con los genes de la espermidina sintasa de arroz, manzana y con la espermina sintasa de Arabidopsis, conservándose los sitios de “splicing” y el tamaño de algunos exones. Además, de manera interesante ciertos intrones se conservan en tamaño y mantienen una homología considerable en su secuencia. En base a los elementos conservados en los promotores de la *spds2* de arroz y la *spms* de Arabidopsis se analizó la regulación a nivel transcripcional de la *Zmspds2* de maíz en respuesta a ácido abscísico (ABA), ácido giberélico (GA₃), ácido indol acético (IAA), altas temperaturas y choque osmótico. Se encontró que el gen de la *Zmspds2* se induce en respuesta a ABA, altas temperaturas y choque osmótico sugiriendo la presencia de elementos como ABRE, DRE/CRT y HSE en la región promotora de este gen en maíz.

***Zea mays* spermidine synthase 2. Genomic organization and gene regulation in response to hormones and stress conditions**

M. Rodríguez-Kessler¹, J. F. Jiménez-Bremont^{1*}

¹*División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa de San José 2055, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78210, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.*

* Author for correspondence; phone: (+52) 444-8-342000; fax: (+52) 444-8-342010, email: jbremont@ipicyt.edu.mx

Summary

Aminopropyltransferases such as Spermidine synthase (SPDS, EC 2.5.1.16) belong to a class of widely distributed enzymes that use decarboxylated S-adenosylmethionine as an aminopropyl donor and putrescine as an amino acceptor to form spermidine. We isolated the genomic sequence of the *Zea mays spds2* corresponding to the coding region, been 3887 bp in length and alternated by 11 exons and 10 introns. The isolated sequence revealed high degree of structure homology with the *Oriza sativa spds2*, *Arabidopsis thaliana spms* and *Malus domestica spds2* genomic sequences including conservation of exon length and splicing sites. Interestingly, some introns also conserved sequence length. Based on conserved *cis*-acting elements present in the *A. thaliana spms* and *O. sativa spds2* promoters, transcriptional regulation of the *Zea mays spds2* gene was assessed in response to ABA, GA₃, IAA, high temperature and osmotic stress (KCl). We found that the *Zmspds2* gene is responsive to ABA, heat and osmotic stress suggesting that conserved *cis* acting elements such as ABRE, DRE/CRT and HSE might be present in the *Zmspds2* promoter as found in the *A. thaliana* and *O. sativa* promoters.

Key words: spermidine synthase, maize, ABA, heat and osmotic stress

Introduction

Aminopropyltransferases such as Spermidine synthase (SPDS, EC 2.5.1.16) belong to a class of widely distributed enzymes that use decarboxylated S-adenosylmethionine (dcSAM) as an aminopropyl donor and putrescine (Put) as an amino acceptor to form spermidine (Spd). The dcSAM required for this reaction is derived from S-adenosylmethionine (SAM) by the action of S-adenosyl-methionine decarboxylase (SAMDC).

The polyamines (PAs), Put, Spd and Spermine (Spm) are essential for cell growth and viability, playing key roles in a variety of processes such as chromatin condensation, DNA replication, transcription, translation, membrane stabilization and the functioning of certain ion channels (Cohen, 1998; Childs et al., 2003; Igarashi and Kashiwagi, 2000). It has been suggested that these compounds might exert their cellular functions through differential gene regulation and evidence exists for interaction of PAs with DNA, preferentially with bend adenine tracts (Lindemose et al., 2005).

In plants, polyamines are involved in developmental processes and stress responses (Kakkar et al., 2000; Bouchereau et al., 1999). In the last decade many genes involved in plant polyamine biosynthesis have been cloned, mainly *odc*, *adc* and *samdc* (Walden et al., 1997). Recently, special attention has been given to the isolation of aminopropyltransferases, mainly *spds*: *Lycopersicon esculentum* (Alabadi and Carbonell, 1999), *Arabidopsis thaliana* (Hanzawa et al., 2000), *Malus sylvestris* (Zhang et al., 2003), *Oryza sativa* (Imai et al., 2004a), and *Zea mays* (Rodríguez-Kessler et al., 2006). Spermidine synthase genes are essential for plant survival. This aspect was demonstrated in *Arabidopsis thaliana* plants in which double-mutants of the *spds1* and *spds2* genes were affected in embryonic development (Imai et al., 2004b). The

generation of transgenic lines of *A. thaliana* over-expressing a *spds* gene exhibited a significant increase in the Spd content together with enhanced tolerance to various environmental stresses (Kasukabe et al., 2004).

In a previous study we reported the isolation of full length cDNA coding maize *Zmspds2* and its implication in salt stress responses (Rodríguez-Kessler et al., 2006). Now we report the genomic sequence of this gene. “In silico” analysis comparing the genomic organization of the *Zmspds2* revealed high homology with the *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* and *Malus domestica spds2* genes including conservation of exon length and splicing sites. Furthermore, the presence of putative *cis* acting elements such as ABRE, DRE/CRT and HSE in the promoter region of the *Zea mays spds2* gene were evaluated by RT-PCR analysis.

Materials and Methods

Plant Material

Seeds of *Zea mays* (cv. cafime) were sterilized with 50% commercial sodium hypochlorite solution (6% free chlorine) for 30 min, and rinsed several times with sterile distilled water. Aseptic seeds were germinated in an agrolite/water support, grown hydroponically in plastic pots filled with a mixture of sand and agrolite (3:1) and sub-irrigated with half strength Hoagland’s nutrient solution (Hoagland and Arnon 1950). Pots, each containing one plant, were maintained in growth chambers under a 12 h light (13,000 luxes) and 12 h dark cycle, at 25 °C ± 2 °C. Leaves of 10-d-old seedlings were detached, and the cut end immersed in sterile distilled water solutions containing 100 µM ABA, 100 µM GA₃, 1 mg/L IAA, 200 mM KCl, during 6 h at 25 °C ± 2 °C. Control leaves were immersed in sterile distilled water at 25 °C while heat shock

experiments were evaluated at 40 °C. After this time, leaves were transferred to liquid nitrogen and their total RNA was isolated.

DNA isolation and cloning of the genomic sequence of the maize spermidine synthase (Zmspds2)

Genomic DNA was isolated from maize leaves using the DNeasy Plant Mini Kit as recommended by the manufacturer (Qiagen, Hilden, Germany). The genomic sequence of the maize *Zmspds2* was obtained by PCR using different oligonucleotides designed on the basis on the full-length cDNA sequence reported previously (Rodriguez-Kessler *et al.*, 2006). The designed oligonucleotides were as follows: 5'-caagagactgggaccttcaaag-3' (sense, ZMSPLI5), 5'-gagtggtgatggtggtgt-3' (sense, ZMGENOM3), 5'-acaccaccatcaccacctc-3' (anti-sense, ZMGENOM5) and 5'-catcctattactgcagatgg-3' (anti-sense, ZM3UTRF). Each reaction was performed in a total volume of 50 µL containing: 1 µL of genomic DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.2 µM each primer and 2.5 U Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). The PCR cycling conditions were as follows: 35 cycles of 45s at 94 °C, 45s at 60 or 64 °C and 3 min at 72 °C, amplifying two overlapping PCR products: A (1178 bp) and B (2728 bp). Each product was cloned in TOPO pCR4 vector (Invitrogen, Carlsbad, USA) and sequenced on both strands.

Nucleic acid sequencing and analysis

DNA sequencing was conducted with double-stranded templates in an ABI PRISM 377 DNA automated sequencer (Perkin Elmer). The genomic sequence of the *Zmspds2* was assembled using the *Seqman* program (DNASTar, Madison, WI). Comparison by Clustal analysis of both the genomic and the cDNA sequences of the *Zmspds2* using the Clustal

W program at the EBI database (www.ebi.ac.uk) or the *Megline* program (DNASTar, Madison, WI), revealed intron-exon positions. The nucleotide sequence reported in this paper appear at the GenBank nucleotide sequence database under the Accession number DQ247922.

RNA isolation and RT-PCR assays of gene transcripts

Total RNA was isolated from maize leaves treated with hormones and subjected to different abiotic stress conditions as described above, using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). After DNase I (Invitrogen, Carlsbad, USA) treatment, first strand cDNA synthesis was performed in a total volume of 30 μ L using the SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA). Each reaction mixture contained 5 μ g of total RNA, 0.5 mM dNTP mix, 0.5 μ g Oligo-dT (12-18) adapter primer, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol (DTT), 40 U of Recombinant RNase Inhibitor (RNaseOUTTM) and 50 U of SuperScriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase. The RT reaction was carried out at 42 °C for 50 min. Control reactions without reverse transcriptase were performed simultaneously. One μ L of the RT reaction was used as template for PCR assays, amplifying the *Zmspds2* gene as described previously (Rodríguez-Kessler et al., 2006). PCR products were electrophoretically separated in 1% (w/v) agarose gels. Quantitation of signals was performed by the image analysis program Quantity One (Bio-Rad). Each signal was normalized to the *actin* signal.

Results

Isolation of the Zmspds2 genomic sequence

We isolated the genomic sequence of the *Zmspds2* gene by PCR using a set of specific oligonucleotides designed on the basis of the full length cDNA sequence previously isolated (Rodriguez-Kessler et al., 2006). We obtained two overlapping PCR products of 1178 bp (A) and 2728 bp (B) as shown in Figure 1A. These products were assembled into a genomic sequence of 3887 bp in length, which contained 11 exons represented as boxes which are alternated by 10 introns (represented by solid lines) as shown in Figure 1B. Comparison of the genomic organization of the *Oryza sativa spds2*, the *Arabidopsis thaliana spms* and the *Malus domestica spds2* genes with that of maize *Zmspds2* showed conservation in size of most of the exons (exon C to G) located between the ATG and TAA codons, specifically those located in the central part of these genes (Fig. 1B) (GRAMENE: A Comparative Mapping Resource for Grains, USA; Hanzawa et al., 2000; Zhang et al., 2003).

On the other hand, comparison of the ten intron sequences interrupting only the coding region of the *Zmspds2* and *Osspds2* genes, revealed a high sequence similarity between them (Figure 2). Interestingly, intron 5 is highly conserved in sequence (66.7%) and in length (88 and 83 nucleotides, respectively) in both genes *Zmspds2* and *Osspds2* as shown in Figure 2. Another example is intron 7, presenting a 55.6% of homology, and even the size is not conserved, some segments between both sequences are almost identical (Fig. 2). As observed, some rice introns were larger than those of maize and viceversa. It has been reported that around two-thirds of the higher plants introns are shorter than 150 nucleotides and most fall within a size range of 80-139 nt (Simpson and Filipowics, 1996). As shown in Figure 2, maize introns 1, 3, 5, and 6 fall into these category. It has been established that few plant introns are longer than 2-3 kb. In these

sense, higher-plant introns are typically much shorter than most mammalian introns. In addition, introns in the 5'-UTR region of many plant genes have been reported (Franceschetti et al., 2001; Simpson and Filipowics, 1996). As observed in Figure 2B, the rice *spds2* and the Arabidopsis *spms* contain introns in the 5'-UTR. It might be possible that the *Zmspds2* also contains introns in these region, nevertheless sequencing of it is needed. It has been suggested that these introns might contribute to the regulation of gene expression (Simpson and Filipowics, 1996; Jeong et al., 2006).

On the other hand, the introns in the *Zmspds2* gene contain the GT-AG borders which are commonly identified in plants (Lorković et al., 2000; Simpson and Filipowics, 1996). This borders are also conserved in the *Osspds2* sequence (GRAMENE: *A Comparative Mapping Resource for Grains*, USA).

The organization of the genomic sequence of aminopropyl transferases like the *spds* and *spms* described in Figure 2B suggests the expression of multiple isoforms of these genes by alternative splicing mechanisms. Evidence of these is the expression of two splicing variants of the maize *Zmspds2* (*Zmspds2A* and *Zmspds2B*) under salt stress (Rodriguez-Kessler et al., 2006).

Expression of the Zmspds2 in response to phytohormones and abiotic stress

Based on “in silico” analysis of the promoter regions of the *spds2* genes from *A. thaliana* (TIGR) and *O. sativa* (GRAMENE, *A Resource for Comparative Grass Genomics*), various conserved *cis* acting elements responsive to hormones (ABRE, DRE/CTR) and abiotic stress (HS, LTR) conditions were identified. In these sense we evaluated the possibility of the maize *Zmspds2* to be responsive to ABA, GA₃, IAA, KCL and heat shock by RT-PCR. In Figure 3, transcriptional regulation of the *Zmspds2* gene in the presence of ABA (2- fold induction), KCL (1.8-fold) and heat shock (2.8-

fold) is shown. In the case of ABA, induction of *spds* expression by these plant hormone has been reported in rice and Arabidopsis (Imai et al., 2004a; Hanzawa et al., 2000).

References

- Childs AC, Mehta D, Gerner EW. 2003. Polyamine-dependent gene expression. *Cellular and Molecular Life Science* **60**: 1-13.
- Franceschetti M, Hanfrey C, Scaramagli S, Torrigiani P, Bagni N, Burtin D, Michael AJ. 2001. Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *Biochem. J.* **353**: 403-409.
- Hanzawa Y, Imai A, Michael AJ, Komeda Y, Takahashi T. 2002. Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* **527**: 176-180.
- Igarashi K, Kashiwagi K. 2000. Polyamines: Mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**: 559-564.
- Imai R, Ali A, Pramanik HR, Nakaminami K, Sentoku N, Kato H. 2004a. A distinctive class of spermidine synthase is involved in chilling response in rice. *Journal of Plant Physiology* **161**: 883-886.
- Imai A, Matsuyama T, Hanzawa Y, Akiyama T, Tamaoki M, Saji H, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Komeda Y, Takahashi T. 2004b. Spermidine synthase genes are essential for survival of Arabidopsis. *Plant Physiology* **135**: 1565-1573.

- Jeong Y-M, Mun J-H, Lee I, Woo JC, Hong CH, Kim S-G. 2006. Distinct roles of the first introns on the expression of Arabidopsis profiling gene family members. *Plant Physiology* **140**: 196-209.
- Kakkar RK, Nagar PK, Ahuja PS, Rai VK. 2000. Polyamines and plant morphogenesis. *Biologia Plantarum* **43**: 1-11.
- Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S. 2004. Over-expression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **45**: 712-722.
- Lindemose S, Nielsen PE, Mollegaard NE. 2005. Polyamines preferentially interact with bend adenine tracts in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Research* **33**: 1790-1803.
- Lorković ZJ, Wieczorek-Kirk DA, Lambermon MHL, Filipowicz W. 2000. Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in Plant Science* **5**: 160-167.
- Simpson GG, Filipowicz W. 1996. Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation, and sub-nuclear organization of the spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology* **32**: 1-41.
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF. 1997. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiology* **113**: 1009-1013.
- Zhang Z, Honda C, Kita M, Hu C, Nakayama M, Moriguchi T. 2003. Structure and expression of spermidine synthase genes in apple: two cDNAs are spatially and developmentally regulated through alternative splicing. *Molecular Genetics and Genomics* **268**: 799-807.

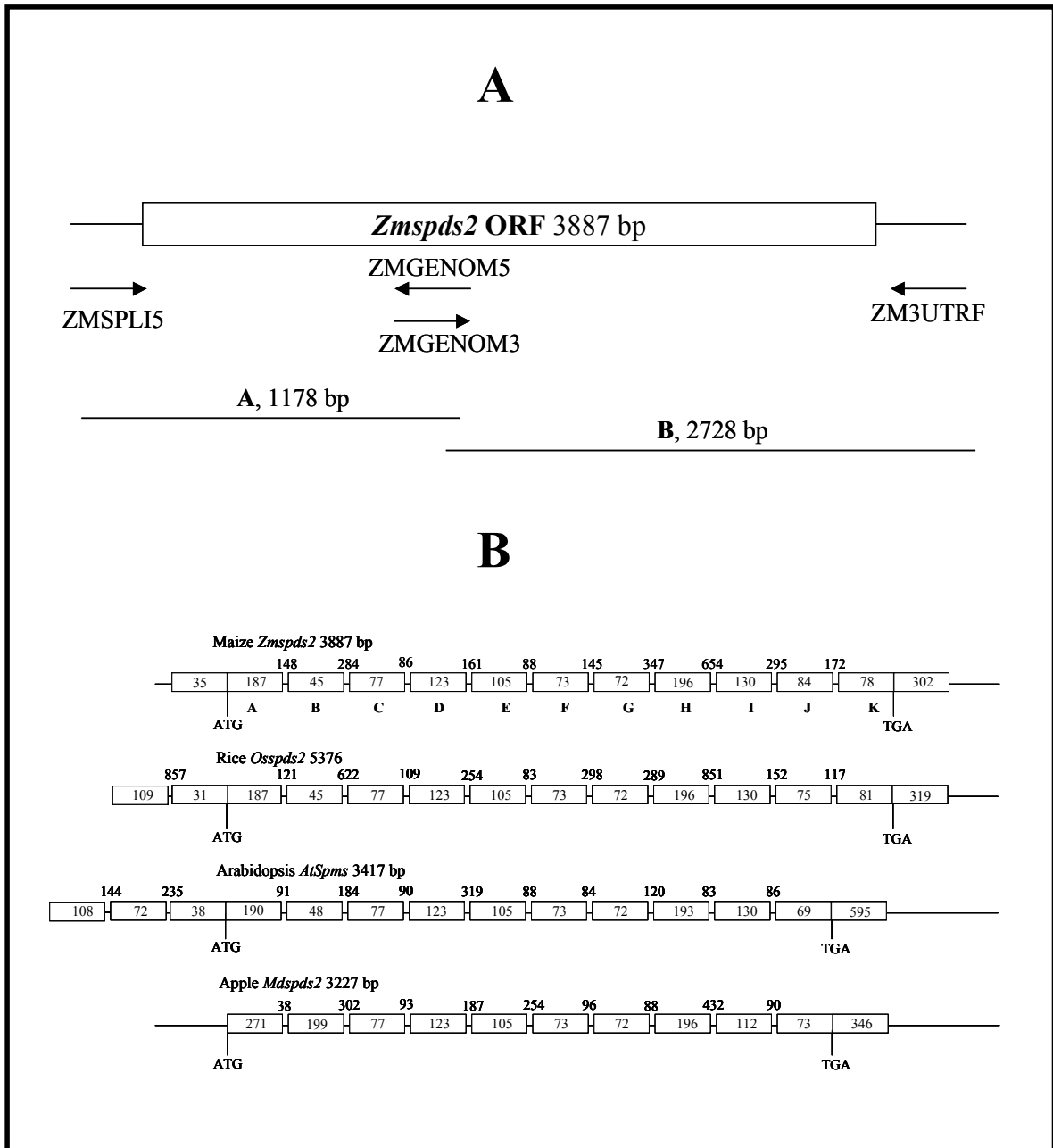
Legends to Figures

Figure 1. Location of the oligonucleotides used for the *Zmspds2* genomic sequence isolation (A). Genomic DNA was obtained from maize leaves (*Zea mays* cv. Cafime) using the Plant DNeasy Mini Kit. The genomic sequence was obtained by PCR, amplifying two overlapping PCR products: A (1178 bp) and B (2728 bp). Genomic organization of plant SPDS from maize, rice and apple and the SPMS from Arabidopsis (B). Conservation of exon length among all the genes is observed in the central part of the sequences.

Figure 2. Comparison of the intron sequences (intron1 to intron 10) of the *Zmspds2* and the *Osspds2* by Clustal analysis. These introns constitute only the ones interrupting the coding region, excluding the ones present in the 5'-UTR region. Asterisks show conserved nucleotides among both sequences.

Figure 3. Expression of the *Zmspds2* gene in response to environmental stresses and hormones. Total RNA was obtained from 10-d-old maize leaves in which the cut end was immersed in sterile distilled water solutions containing 100 μ M ABA, 100 μ M GA₃, 1 mg/L IAA, 200 mM KCl, during 6 h at 25 °C \pm 2 °C. Control leaves were immersed in sterile distilled water at 25 °C while heat shock experiments were evaluated at 40 °C. PCR products were electrophoretically separated in 1% (w/v) agarose gels. Quantitation of signals was performed by the image analysis program Quantity One (Bio-Rad). Each signal was normalized to the *actin* signal.

Figure 1



Intron 8

Zm -----
Os GTCCGTTGCTTCCCTTTTCTGTTCATAGTTTCCATGTACCTCATTGTTATCGTATACATATATGCTTAGCCCTCAATAATTTATGCACTTCTGCTAA 100

Zm -----CCAGGTATT-ATGCACTAATATTTTCCAATTCTC-TGCATGTGCATTTT- 49
Os AGACTCAAACATGAAGAGATAGGAATTAGGAAAGTTGGCCACACAGGTTAGAGCATCATACTAAATGAGTTGTTGTTTTTCGGACGCGCAAAGG 200
* * * * *

Zm -TTTCTCTTTAGTAATTTTCTGAGTTGTCCTCCAGGCCGCCCCATATGGGAGCCTACACTGGGCTG-----CCCTTTTTTAAAGTAGTTTCCGAGTT 141
Os ATTGCAAGTCAATATATTAGAAGGAAATACCTAAATGAGTTGTAATTGGGATCTAAAATGTTACTAGTAGAATTTATTTTTCTCATATTTGGTTAACTT 300
* * * * *

Zm ATCTTCTAAA-GGCAATTTTTTGACATATTTGG-----TTAGAAGGC---ATATTGGGCTCAGAGTCAAAAC-ATTGTATATCTCTTTATGTACC 227
Os GCTTCCAAGATAGTAAGTGCCATAATAATGTAGGAAAAATATCTTAGAAAATCCGAGCATTTATCTGGAGTTTGAATCCATAACATACTCAAATAAGCAGA 400
* * * * *

Zm AT-TGGACAGTTGGATCACCAGCGAAGCAGAGA----TAAATATCATTATGTTTGGGATATGATATTATACGCTC-GTAACTTGTGAAGTTCCCTA 320
Os ACCTGCAAAAATCTTTTACTACAATGTTGAAAAATTTATTGTTATATTGCTACTTCCCTGTGCCAATTTTGGCCTGTTCAAGTAGGCCA-GCAGCTGCAG 499
* * * * *

Zm ATCCTAAGTTTTGCTCGTACAGCA---CAGAGAGTAGGCAAA-GCATCTTGTAATTTTTGTAAGAAAAAAGCATCCTGTGATTGAAATGACTAGAGA 415
Os TGCCTCAGCTGCGCTGCAACAGCAGCTACAGCGGTTGGCCAGCTGCAGCGGTTGCACCTGGGCTGTGTAGAACAGCCCTGCAGAGCGGAAACGCTGCAGT 599
* * * * *

Zm TTGGACTCATTGG-CAAGTATGTAATGGATGAGGTGAACCTGTAATGGTCTGCTGCCAAGTATGCTTTGAAATATTTGCTGGTCACTTTTTTACCAGAA 514
Os TTAGACCTACCGAACAGGCCCTTTTATTGTTGGAATTTGGTCTAGTACTATAGCTTTTGGCTACTGTATGTCAAAGCAATTTGTTGTTAGAGGTCCTATA 699
* * * * *

Zm CACGCGA----GATTAATAAGAAGATTTGCTGGC-CACATTTTATGATAGAAAAAATT-TCAATTAICTGTTTTTGTCAATGTTGGAGAGATATTTTTT 607
Os TATGCAATCTTCAATTTTATATACTTTTGGTATGCAAGCGTGACAAATTTTTTATCAATTTCAATGTAGCTGTT-AATGTTGGACTTGTATTTTTT- 797
* * * * *

Zm GTGTCGACTTTTGCAAAAATTTTTC-AGCTAATCAAGTAGCTATTTGG----- 652
Os GTCTTTTTTTTACGTACCATAAGCTAATGAATCATGTAACATTTTGCATTGTCAG 851
* * * * *

Intron 9

Zm GFTTGTFTAGTTTATTTTCATTGTCCTTGCTACTTGTCTTTGTGAAAATCCTAGTCCACAATTACCTGGGAAATGACCTACACACCACAGTAATTTATTA 100
Os GFTCACTAACGTTATTTAATTT---CTGCCA-TTCTCTTTTCATAAGCTCTTATTCTGTACTTTCCCTCAA-----TATGTATC---TATTTT--CA 82
* * * * *

Zm AAATTATACAGGCATTTGCTTCATATTTTGTGCACAACACCCCCAAAATGA-CTACTGACTCATCATTCTCTTGTTCAGAAGCTCTTACCATAAT 199
Os CCCTAATGCAAGATTTCCATTCAACTTTGTTGTTAATTGTTAGTCAATGATGAAGCTGCTTGTCTTAATAG----- 152
* * * * *

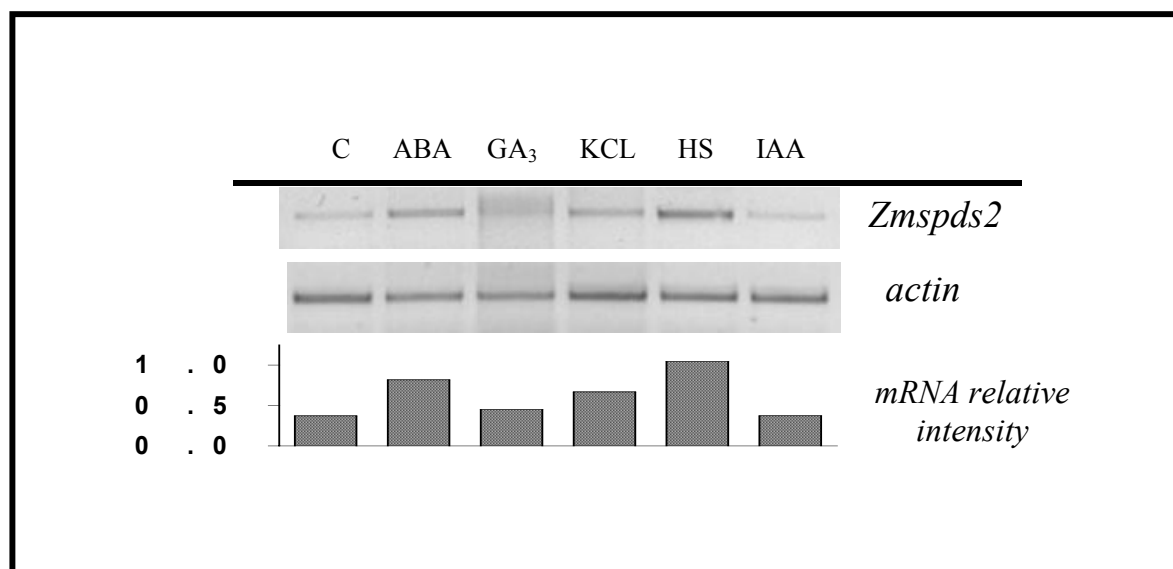
Zm GGAGTACTTGTATCATAGTGTCTTCTGTTGTTTTTGGTTGAAGATATTGCGCTGACATCAGATTTCTATTGAATTTTCTGTTTTCACAG 295
Os -----

Intron 10

Zm GTGAGTTGTTTGTAGTTACT-CTATTGATGGTGTGGTTAGTCTTTATGTCATGCAATTTTGTCTGCCAACATTTATAAGAAGAGAAGCTGGAACATAT 99
Os GTAGGTTACTTACTGCCITGTTGCTATTTCTTTTCTTTTCTGTCTGCGAA-CTGCG-ATGCTATTTTCG--GATTGTTGTAATGGAATTTGCTGATATAC 96
* * * * *

Zm ACCACTCCCTTTTTTTTGAATTTGCTACTGCACTGCTAACCTTTGCCTCTATTTTTCATATGCAATGATGACAG 172
Os AT-AATCTGTATGCCATAACAG----- 117
* * * * *

Figure 3.



4. EFECTO DE LA INTERACCIÓN DE *Ustilago maydis* SOBRE EL METABOLISMO DE POLIAMINAS DE MAÍZ

Se analizaron alteraciones en el metabolismo de poliaminas de maíz durante la interacción con el hongo biotrófico *Ustilago maydis*, considerando etapas de clorosis y de formación de tumores. Para llevar a cabo la interacción se inocularon plantas de maíz en la región del nodo con una densidad celular de 1×10^8 cel/ml. De manera general esta interacción dió lugar a un aumento en la biosíntesis de poliaminas, principalmente en los tumores y las regiones contiguas a estos sitios. A nivel transcripcional se analizaron los genes *adc*, *samdc1*, *samdc2*, *samdc3*, *Zmspds1*, *Zmspds2* y *pao*, y se determinó la actividad de la ADC y de la PAO. Se observó que los genes *adc*, *samdc1*, *samdc2* y *samdc3* se regulan positivamente durante la interacción. Además, un aumento notorio en la actividad ADC en los tejidos infectados se asoció a la acumulación de Put libre y conjugada en estos sitios. Estos resultados muestran un papel importante en la regulación de la ADC durante la interacción. Por otro lado, el papel del catabolismo de poliaminas (Spd y Spm) mediado principalmente por la enzima PAO, fue estimulado sugiriendo un papel trascendental de este proceso probablemente en eventos de lignificación y formación de pared celular durante el desarrollo del tumor. Todos estos procesos fueron estimulados por la aplicación de metil jasmonato.

Finalmente, las poliaminas ejercen diferentes mecanismos de respuesta al ataque por el patógeno, comenzando con la acumulación de poliaminas libres las cuales son subsecuentemente conjugadas (principalmente Put), permitiendo de esta manera la formación de una agente anti-fúngico y también la reducción de la concentración poliaminas libres que podrían estar involucradas en el desarrollo del tumor.

Manuscrito sometido a "New Phytologist"

Effect of *Ustilago maydis* infection on polyamine metabolism in maize plants

M. Rodríguez-Kessler¹, O. A. Ruiz², S. Maiale², J. Ruiz-Herrera³, J. F. Jiménez-Bremont¹⁺

¹*División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa de San José 2055, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78210, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.*

²*Unidad de Biotecnología 1, IIB-INTECH/UNSAM-CONICET, Ruta Circunvalación Laguna, km. 6 cc 164, (7130) Chascomús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.*

³*Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV, Unidad Irapuato, Apartado Postal 629, 36500 Irapuato, Guanajuato, México.*

⁺ Author for correspondence; phone: (+52) 444-8-342000; fax: (+52) 444-8-342010, email: jbremont@ipicyt.edu.mx

Word count

Summary: 190

Introduction: 987

Materials and Methods: 1734

Results and Discussion: 3915

Conclusion: 242

Total word count: **7068**

References: 2094

Figures: 8

Summary

- We measured alterations in polyamine metabolism during the infection of maize plants by the biotrophic pathogenic fungus *Ustilago maydis*.
- Maize seedlings were inoculated in the node region with *U. maydis* cell suspension, incubated in a growth chamber until chlorosis and tumor development were evident.
- We observed that infection induced an increase in polyamine biosynthesis, more noticeably in the tumors induced by the fungus, and in its neighbor tissues. This was due to an up-regulation mainly of *adc*, *samdc1*, *samdc2* and *samdc3* but not in *Zmodc*, *Zmspds1* and *Zmspds2* genes. As a result, an elevation in ADC levels occurred in the infected tissue, leading to the accumulation of polyamines mainly Putrescine. This result confirmed a predominant role of ADC in the process. All these phenomena were further increased by plant pre-treatment with methyl jasmonate. Evidences for a possible contribution of Spermidine and Spermine degradation by PAO activity related to cell wall-stiffening or lignification during tumor growth were also obtained.
- It is suggested that polyamines play an active role in the response of the maize plant to the infection by the pathogenic fungus, possibly through several mechanisms.

Key words: biotic stress, free and conjugated polyamines, methyl jasmonate, tumor, *Ustilago maydis*, *Zea mays*.

Abbreviations: ADC - arginine decarboxylase; FW - fresh weight; MJ - methyl jasmonate; ODC - ornithine decarboxylase; PAs - polyamines; PAO - polyamine oxidase; PCR - polymerase chain reaction; PEG - polyethyleneglicol; PLP - pyridoxal 5'-phosphate; PMSF - phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride; PVP - polyvinylpyrrolidone; RT-PCR - reverse-transcriptase polymerase chain reaction; Put - putrescine; SAMDC - S-adenosylmethionine decarboxylase; Spd - spermidine; SPDS - spermidine synthase; Spm - spermine; SPMS - spermine synthase.

Introduction

Ustilago maydis is a dimorphic and biotrophic pathogenic fungus responsible for common smut or “huitlacoche” in maize; and it is considered an excellent model for the study of plant-pathogen interactions (Banuett, 1992, 1995, 2002; Ruiz-Herrera & Martínez-Espinosa, 1998; Ruiz-Herrera *et al.*, 2000; Bölker, 2001; Basse & Steinberg, 2004). Initiation of the pathogenic development of the fungus occurs by the mating of two sexually compatible non-pathogenic haploid yeast-like cells to form a filamentous dikaryon capable of colonizing maize tissues, and the subsequent induction of large plant tumors, that at late stages of the infection fill with black teliospores (for review see Christensen 1963; Banuett 1992, 2002; Banuett & Herskowitz, 1996; Ruiz-Herrera & Martínez-Espinosa, 1998). Although, *U. maydis* is not an obligate parasite of maize, the completion of its sexual cycle requires the plant host. Early disease symptoms of infected maize plants are the formation

of chlorotic lesions and the accumulation of anthocyanins (Bannuett & Herskowitz, 1996). Later on, tumor development occurs at positions where strong chlorotic responses are observed. These tumors are associated with plant cell enlargement and proliferation (Snetselaar & Mims, 1994; Bannuett & Herskowitz, 1996).

Polyamines (PAs) are small aliphatic amines whose synthesis is tightly regulated. PAs are involved in the modulation of different cellular processes, including functioning of ion channels, chromatin organization, DNA replication, gene transcription, mRNA translation, cell proliferation and apoptosis (Tabor & Tabor, 1984; Cohen, 1998; Igarashi & Kashiwagi, 2000; Childs *et al.*, 2003). In plants, PAs occur either in free form, covalently bound to proteins, or conjugated to hydroxycinnamic acids (HCAAs) forming phenol amides (Martin-Tanguy, 1997). The first step in polyamine biosynthesis is the formation of putrescine (Put). In plants and some bacteria, this occurs by decarboxylation of arginine via arginine decarboxylase (ADC) in a pathway involving agmatine and N-carbamoylputrescine as intermediates (Evans & Mamlberg, 1989). In animals, fungi, and also in most plants, Put can be synthesized directly from ornithine via ornithine decarboxylase (ODC). The higher PAs, spermidine (Spd) and spermine (Spm) are synthesized from Put through the successive activities of spermidine synthase (SPDS) and spermine synthase (SPMS) through the addition of aminopropyl groups. The aminopropyl moiety is derived from methionine, which is first converted into S-adenosylmethionine (SAM) and then decarboxylated via S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC).

PAs have been implicated in the regulation of many physiological processes in plants (Galston & Sawhney, 1990; Kakkar & Rai, 1993; Kakkar *et al.*, 2000) and appear to play important roles in their defense mechanisms against environmental stresses (Bouchereau *et al.*, 1999). Recently, many studies demonstrating a role of PAs in response to abiotic stress

have been published, although the physiological significance of this relationship remains elusive. On the other hand, less information concerning the relationships of PAs to biotic stress exists. Nevertheless, the available information shows pronounced alterations in polyamine metabolism in both compatible and incompatible interactions of plants and pathogens (Walters, 2000, 2003a). Increased Spd levels in barley leaves infected with the biotrophic fungus *Puccinia hordei* were first reported by Greenland and Lewis (1984), and it was hypothesized that this increase was related to “green island” formation. In addition, increased activity of ADC, ODC and SAMDC was observed in barley leaves infected with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Walters *et al.*, 1985b; Walters & Wylie, 1986).

Jasmonates, natural regulators of developmental and biotic or abiotic stress responses in plants, are known to stimulate the production of secondary metabolites including PAs (Creelman & Mullet, 1997; Gundlach *et al.*, 1992; Biondi *et al.*, 2001). Treatment of barley leaves with methyl jasmonate induced the accumulation of free and conjugated PAs with increased activities of ODC, ADC, SAMDC and DAO (diamine oxidase), conferring systemic protection against powdery mildew infection (Walters *et al.*, 2002). PA conjugates (hydroxycinnamic acid amides or HCAAs), synthesized by the formation of an amide linkage with cinnamic acids, mainly p-coumaric, ferulic and caffeic acids (Negrel *et al.*, 1992), have been implicated in plant resistance to pathogens. HCAAs exhibit direct antifungal properties (Walters *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 1983) and it has been proposed that they contribute to the formation of a phenolic barrier, making cell walls more resistant to enzymatic hydrolysis (Clarke, 1982).

Recently, a Spm-mediated signal transduction pathway has been proposed to be involved in the hypersensitive response induced by *Tobacco mosaic virus* (TMV) in tobacco plants (Takahashi *et al.*, 2004), and different components of these pathway have been identified

(Yamakawa *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2004; Uehara *et al.*, 2005). The functionality of these pathway in other plant-pathogen interactions is still unknown, nevertheless this evidence highlights the importance of PAs and offers new insights on polyamine metabolism during biotic stress.

It is also well established that PAs are essential for cell division. The presence of increased amounts of these compounds in various animal as well as plant tumors has been reported (Scalabrio & Ferioli, 1982; Auvinen *et al.*, 1992; Cohen, 1998; Seiler, 2003; Walters, 2003a). For example, *Brassicacae* infected with *Plasmodiophora brassicae* that develop root hyperplasia (clubroot), and crown-gall tumors induced by *Agrobacterium tumefaciens* in potato, contain elevated levels of PAs as compared to normal plant tissues (Walters & Shuttleton, 1985a; Kulpa *et al.*, 1985).

In addition to PA formation, the role of PA catabolism has also been associated to pathogen resistance (Walters, 2003b). PAs are catabolised by cell wall-located enzymes: DAO and PAO (polyamine oxidase) yielding H₂O₂ (Bagni & Tassoni, 2001), which could act as a mediator of programmed cell death, lignification, wall stiffening and cellular defense (Laurenzi *et al.*, 1999; Lamb & Dixon, 1997; Walters, 2003b).

Finally, several reports concerning the pathways controlling morphogenesis and pathogenicity of *U. maydis* have been published (for reviews see Bölker, 2001; Ruiz-Herrera *et al.*, 2000; Basse & Steinberg, 2004), although less information on plant tumor development and regulation of maize defense related-genes exists (Basse, 2005). In this report we describe the effect of maize infection by *U. maydis* on the levels of PAs and the enzymes involved in their synthesis and degradation.

Materials and Methods

Strains and culture media

Two haploid strains, FB1 (a_1b_1) and FB2 (a_2b_2) of *Ustilago maydis* (F. Banuett, California State University, Long Island, USA) were used in this study. Strains were maintained at –70 °C in 50% (v/v) glycerol. They were recovered in YEPD liquid media (1% yeast extract, 1% peptone, 1% glucose), incubated at 28 °C for 2 - 3 d in an orbital shaker (150 rpm) and used as inoculum for subsequent experiments. Each strain was inoculated into 20 ml of YEPD liquid medium and incubated at 28 °C for 1 d with agitation (150 rpm). After this time, equal volumes of the cell suspensions were mixed and incubated at 28 °C for 1 d with slow agitation (50 rpm). Cells were recovered by centrifugation, washed with sterile distilled water, and adjusted to a cell density of 1×10^8 cells per ml. This suspension was used for inoculation of plant material as described below.

Plant material

Seeds of *Zea mays* (cv. Cacahuazintle) were sterilized with 50% commercial sodium hypochlorite solution (6% free chlorine) for 30 min, and rinsed several times with sterile distilled water. Aseptic seeds were germinated in an agrolite/water support and grown on a commercial substrate (*Cosmocel*, Monterrey, México) in plastic pots. Seedlings were maintained in growth chambers under a 16 h light ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and 8 h dark cycle, at $25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. Seedlings (6 d-old) were inoculated in the node region with 20 μl of the *U. maydis* (FB1+FB2) cell suspension using a sterile syringe. As negative controls non-inoculated plants and mock (mechanical wounded) plants were used.

Plant treatment with methyl jasmonate (MJ)

Five d-old maize seedlings were pre-treated for 24 h with methyl jasmonate (MJ) (Sigma, USA) previously to *U. maydis* inoculation. Twenty μl of 95% MJ were used for each experiment. Maize seedlings were transferred into a plastic chamber containing cotton balls treated with MJ. The chambers were sealed leaving maize plants exposed to MJ vapor during 24 h under a 16 h light ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and 8 h dark cycle, at $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. After MJ treatment, plants were inoculated with the fungal cell suspension as described previously.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from leaf blades of maize seedlings pre-treated or not with MJ and infected or not with *U. maydis*, using Trizol reagent following the manufacturer's recommended procedure (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA). Different RNA samples from both conditions were collected as follows:

Early time points of infection were analysed including leaf blade tissues of non-inoculated plants (C), leaf blade tissues of mechanically-wounded plants (W) and leaf blade tissues of inoculated plants (I), from 8 d-old seedlings (2 d post-inoculation). Following infection, 3 d later (5 d post-inoculation) chlorotic areas became visible in leaf blades (Chl). This sample is characteristic of the early detectable symptoms of infection and was also collected. Subsequently, samples from 15 d-old plants (9 d after inoculation) including leaf blade tumors (T), green area surrounding the tumors with no signs of infection (ST), leaf blade tissue with no disease symptoms (L), and as negative controls, leaf blade tissues of non-

inoculated plants (C), and leaf blade tissue of mechanically-wounded plants (W) were collected. Finally, leaf blade tumors (T) slightly melanized from 19 d-old seedlings (13 d post-inoculation) were also collected, including the corresponding ST, L and C samples as described previously.

After DNase I (*Invitrogen*) treatment, first strand cDNA synthesis was performed in a total volume of 30 μ l using the SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR according to the manufacturer's suggestions (*Invitrogen*). Each reaction mixture contained 5 μ g of total RNA, 0.5 mM dNTP mixture, 0.5 μ g Oligo-dT (12-18 mer) adapter primer, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol (DTT), 40 U of recombinant RNase inhibitor (RNaseOUTTM) and 50 U of SuperScriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase. The RT reaction was carried out at 42 °C for 50 min. Control reactions without reverse transcriptase were performed simultaneously. One μ l of the RT reaction was used as template for PCR assays as described below.

Different sets of oligonucleotides were designed to amplify each cDNA by RT-PCR. We amplified the *adc*, *samdc1*, *Zmodc*, *Zmspds2* and the *actin-1* gene transcripts using specific oligonucleotides as described previously (Rodríguez-Kessler *et al.*, 2006). In addition, we generated a new set of oligonucleotides which are specific to other transcripts encoding maize *samdc* and *spds* genes. These sequences were obtained at the NCBI and the TIGR maize databases. In these sense, two different *samdc* sequences were obtained at the NCBI database (Accession No. AY103940 and AY104070). These genes were tentatively named as *samdc2* and *samdc3*. They share between 63 and 73% of homology with the maize *samdc1*. The designed oligonucleotides were as follows: 5-ZmSAMDC2 5'-cagtgacaaaagatatcaagacca-3' (sense) and 3-ZmSAMDC2 5'-tgtggcataaataattagcttgctg-

3' (anti-sense); 5-ZmSAMDC3 5'-ctctctttcttgcaaaacgtcatcc-3' (sense) and 3-ZmSAMDC3 5'-gtgaagaaccacctaagttatccaaatc-3' (anti-sense). For the *spds* gene, another transcript encoding a maize spermidine syntase (GenBank AY103592) with an homology of 62% with the *Zmspds2*, was also obtained at the NCBI database. This sequence was named *spds1* and the designed oligonucleotides were as follows: 5SPDS1 5'-gatctccgccgcatcccg-3' (sense) and 3SPDS1 5'-cctttgatttcataggatgctcatcctc-3' (anti-sense). In addition to the polyamine biosynthetic genes, a set of oligonucleotides was designed to amplify the *pao* transcript, which participates in Spd and Spm catabolism. The nucleotide sequences: 5-pao 5'-atgagttcctccccgtcctt-3' (sense) and 5'-ctagtcatactttcctggacat-3' (anti-sense), directed against homologous regions of the three reported *pao* genes of maize (GenBank AJ251568, AJ251018 and AJ251019; Cervelli *et al.*, 2000); amplify all three copies. PCR amplifications were performed in 50 μ l reaction mixtures containing 1 μ l of the RT reaction product as template, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.2 μ M each primer and 2.5 U Taq polymerase (*Invitrogen*). The PCR amplification conditions for each gene were as follows: 5 min at 94 °C followed by 25 to 33 cycles (depending on the transcript) of 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C (*adc*), 59 °C (*Zmodc*), 64 °C (*samdc1* or *Zmspds1* or *Zmsdps2*), 62 °C (*samdc3*), 60 °C (*samdc2* or *pao*) and 57 °C (*actin-1*), and 60 s at 72 °C (except for all the *samdc* and the *pao* genes in which extension were performed for 80 s and 120 s, respectively), followed by 72 °C for eight min. PCR products were electrophoretically separated in 1% (w/v) agarose gels. Quantification of products was performed by the image analysis program Quantity One (Bio-Rad). The relative amount of each was normalized to that of the actin product.

Localization of fungal strains within the plant host by PCR

Detection of *Ustilago maydis* in infected maize plants was performed by PCR amplifying a specific region downstream the homeodomain of the bE genes as described by Martínez-Espinoza *et al.*, (2003). Genomic DNA was obtained from the same plant materials as described previously for RT-PCR analysis (T, ST, L, C, W) using the DNeasy Plant Mini Kit as recommended by the manufacturer (Quiagen, Hilden, Germany). PCR amplifications were performed starting from 200 ng of genomic DNA. The PCR cycling conditions were as follows: 5 min at 94 °C followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C, followed by 72 °C for eight min. PCR products were electrophoretically separated in 1% (w/v) agarose gels.

Extraction and determination of free and soluble conjugated polyamines

The content of free polyamines (Put, Spd and Spm) was determined in general using 300 mg of fresh plant material extracted overnight at 4 °C with 1 ml of 5% (v/v) perchloric acid. After centrifugation, 200 µl of the supernatants were dansylated in a mixture containing 100 µl of saturated Na₂CO₃, 200 µl dansylchloride (5 mg per ml acetone; ICN, USA) and 5 µl 100 µM 1,7 diamino heptane (HTD) as internal standard. The mixture was incubated overnight in darkness at room temperature. Reaction was stopped by adding 100 µl proline (100 mg per ml) and dansylated PAs were extracted with 400 µl toluene. The organic phase was vacuum-evaporated and dansylated PAs were dissolved in 100 µl acetonitrile and analyzed by reverse phase HPCL (Marcé *et al.*, 1995). The amount of soluble conjugated PAs was measured after liberation of polyamines by acid hydrolysis. In general, 200 µl of the perchloric acid extract was hydrolyzed with the same volume of 12 N

HCl during 18 h at 110 °C. The hydrolyzed product was dried, dissolved in 200 µl of 5% (v/v) perchloric acid, and PAs were measured as described above. One-way-ANOVA and Tukey post-test were performed to assess statistical significance between treatments, using GraphPad Prism 3.0 software.

Determination of ADC, ODC and PAO enzymatic activities

ADC and ODC were assayed using radiolabelled substrates in the supernatants of centrifuged crude extracts, following standard methods (Birecka, 1991). Plant material was ground to a fine powder with liquid N₂ using a mortar and pestle, homogenized in 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 for ADC, 20 mM ascorbic acid, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM PLP, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% PEG and PVP. ADC and ODC activities were assayed 45 min at 37 °C, using 50nCi L-[U-¹⁴C] arginine or 50nCi L-[1-¹⁴C] ornithine (both purchased from Amersham, UK) with 10 µM arginine (ICN) or ornithine (Sigma), respectively. Reactions were stopped with 10% perchloric acid and released CO₂ was trapped in paper discs soaked in 2 N KOH. Radioactivity was determined in a Beckman LS 5000 TD scintillation counter.

PAO activity was determined as described by Cona *et al.*, (2003). Plant material was ground to a fine powder as described above, and homogenized in 0.1 M potassium phosphate buffer with 1 mM PMSF (pH 6.5, tissue to buffer ratio 1:2 [w/v]). After centrifugation, supernatants were used for the determination of total protein concentration and PAO activity. PAO activity was measured spectrophotometrically by following the formation of a pink adduct ($\xi_{515} = 2.6 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$) as a result of the oxidation and following condensation of 0.1 mM 4-aminoantipyrine and of 1 mM 3,5-dichloro-2-

hydroxybenzene sulfonic acid (DCHBS) catalyzed by peroxidase. The assays were performed in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.06 mg horseradish type II peroxidase (Sigma), with 2 mM spermidine or spermine as the substrates in 1 ml total volume at 30 °C. Total protein concentration was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as the reference standard (Bradford, 1976).

Results and Discussion

In the present study we evaluated changes in polyamine metabolism during the time course of maize plants infection with *Ustilago maydis*. We analyzed different stages of the disease including a very early time point (2 d post-inoculation), the development of chlorotic spots (5 d post-inoculation), and the development of tumors (9 and 13 d post-inoculation) (Fig. 2A-D). Transcriptional regulation of different maize polyamine biosynthetic genes was assed by RT-PCR including the *adc*, the *samdc* (1, 2 and 3) and the *Zmspds* (1 and 2) genes. Up to now few sequences coding maize polyamine biosynthetic genes have been characterized (Franceschetti *et al.*, 2001; Rodríguez-Kessler *et al.*, 2006). In these sense, we searched for other sequences coding maize *samdc* and *spds* genes at the NCBI and at the TIGR maize databases. Two sequences encoding maize *samdc*'s tentatively named *Zmsamdc2* and *Zmsamdc3* were identified (Gen Bank AY103940 and AY104070). The maize SAMDC2 protein shares an homology of 80.3% with the *Oryza sativa* OsSAMDC2 (Gen Bank AJ251899), 73% with the *Zea mays* SAMDC1 (Gen Bank Y07767), 72% with the *O. sativa* SAMDC1 (Gen Bank Y07766), and 62.3% with the *Z. mays* SAMDC3, while the maize SAMDC3 sequence shares an homology of 80.1% with an *O. sativa* SAMDC sequence (Gen Bank AB122089, also named as SAMDC1) which is different from the other rice SAMDC1 (Gen Bank Y07767) and the SAMDC2 proteins. The *samdc2* open

reading frame (ORF) consists of 1,188 bp encoding a polypeptide of 395 amino acids with a predicted molecular mass of 43,201 Da, while the *samdc3* ORF consists of 1,179 bp encoding a polypeptide of 392 amino acids with a predicted molecular mass of 42,585 Da. The deduced proteins (ZmSAMDC2 and ZmSAMDC3) contained the characteristic motifs of SAMDC's: including the conserved glutamate (Fig. 1A, shadowed) and the conserved aspartic (Fig. 1A, filled circle) residues necessary for the stimulation of proenzyme processing of the human SAMDC by putrescine (Xiong *et al.*, 1997). In addition, the location of the proenzyme processing site is given (Fig. 1A, underlined) and the location of a disordered loop connecting the two structurally similar halves of the human enzyme (Fig. 1A, double-headed arrow). The putative PEST sequence characteristic of proteins with a high rate of turnover (Rechsteiner & Rogers, 1996) is present in all the maize SAMDC (1, 2 and 3) proteins and conserved in all the isolated plant SAMDCs (Fig. 1A, boxed). As shown in Figure 1B, the maize *samdc* genes constitute a compact group of plant *samdc*'s within the monocots.

In addition, another gene encoding a maize spermidine synthase obtained at the NCBI database, which was named as *Zmspds1* (GenBank AY103592), shares higher protein sequence homology with the plant SPDS1 proteins: 89.6% with *O. sativa* SPDS1 (GenBank AJ251298), 82.8% with *Datura stramonium* SPDS1 (GenBank Y08252), 80.6% *Hyoscyamus niger* (Gen Bank AB006690), 79.6% with *Arabidopsis thaliana* SPDS1 (GenBank AJ251296), 79.6% with *Pisum sativum* SPDS1 (GenBank AF043108), 78.9% with *A. thaliana* SPDS2 (GenBank AJ251297), 63.8% with *O. sativa* SPDS2 (GenBank AB098063) and 62.6% with *Z. mays* SPDS2 (GenBank AY730048). The *Zmspds1* ORF consists of 957 bp encoding a polypeptide of 318 amino acids with a predicted molecular mass of 34, 876 Da. The deduced protein (ZmSPDS1) contained the characteristic motifs of

SPDS's: the conserved sequence of the spermidine synthase family ([VAI]-[LAV]-[LIV](2)-G-G-G-x-[GC]-x(2)-[LIVA]-x-E; in motif I, underlined, Fig. 1C) and the proposed binding motifs for dcSAM (motifs II to VI; shaded, Fig. 1C) (Posfai *et al.*, 1989; Hashimoto *et al.*, 1998; Hatanaka *et al.*, 1999; Rodríguez-Kessler *et al.*, 2006). A phylogenetic tree including the *spds* genes from different species, and the spermine synthases from *A. thaliana* (AtACL5 and AtSMPS) and apple (MdACL5 and MdSPMS) is also shown (Fig. 1D). As observed in the tree, the ZmSPDS1 is grouped within the plant SPDS1 and SPDS2 proteins of the dicots whereas the monocot SPDS2 proteins (maize and rice) and the SPMS from *A. thaliana* (previously characterized as AtSPDS3) and from *Malus sylvestris* are clustered in a separate group. Considering the grouping of the ZmSPDS2 protein within the well characterized SPMS from *Arabidopsis* and apple, we suggest that the previously isolated gene *Zmspds2* might be a spermine synthase rather than a spermidine synthase as previously reported (Rodríguez-Kessler *et al.*, 2006); nevertheless, gain-of-function analysis should be conducted to prove this hypothesis. Literature exist supporting the idea that a few amino acids are unique and conserved in the SPDS's enzymes and contribute to the formation of the putrescine binding cavity (Korolev *et al.*, 2002; Kitashiba *et al.*, 2005). In the case of SPMS's these conserved amino acids change as shown in the ZmSPDS2 protein sequence: Phe is replaced by Val-234, Ile by Val-148, and Gly by Ala-204 (Fig 1C, boxed). These changes were also conserved in the *Arabidopsis* and apple SMPS's as well as in the OsSPDS2 (Kitashiba *et al.*, 2005).

Expression of polyamine biosynthetic genes is not affected after two days of fungal infection

After two days of fungal inoculation, no symptoms were observed at the naked eye in the maize plants (*Zea mays* cv. Cacahuazintle; Fig. 2A). Nevertheless, chlorotic lesion formation was reported at this stage by Banuett and Herzkowitz (1996) with the maize variety B164. To determine if there were changes in polyamine synthesis during the early stages of plant infection, we measured the levels of transcripts corresponding to *adc*, *Zmodc*, *samdc* (1, 2, 3) and *Zmspds* (1, 2) genes of maize by RT-PCR using specific oligonucleotides for each gene (see Materials and Methods). There were no changes in the expression levels of most of the gene transcripts involved in polyamine biosynthesis (Fig. 2E, F, H, I, J, lanes 1-3) excepting by the *samdc2* transcript which was down-regulated in the mechanically wounded-tissues (Fig. 2G, lane 2).

However, Jasmonate treatment brought about an increase in the transcript levels of the *samdc2* and *samdc3* genes (6 and 3-fold, respectively) only in the wounded tissues (Fig. 3C-D, lane 2) while a reduction in the same tissues was observed in the *Zmspds1* and *Zmspds2* genes (Fig. 3E-F, lane 2). It has been described that MJ stimulates PA synthesis in plants by alterations in both enzyme activity and transcription rate of *adc*, *odc* and *samdc* (Biondi *et al.*, 2001; Walters *et al.*, 2002; Perez-Amador *et al.*, 2002).

Up-regulation of *adc* and *samdc* genes during the development of chlorotic lesions

Chlorosis is one of the early and characteristic symptoms in maize plants infected with *U. maydis* (Christensen, 1963; Banuett & Herskowitz, 1996; Banuett, 2002). It has been reported that accumulation of the *adc* transcript occurs in young tissues where growth is associated with cell expansion or elongation (Cohen, 1998; Tiburcio *et al.*, 1990, 1997). It

is known that tumor induction by *U. maydis* in maize is the result of the proliferation (hyperplasia) of the plant meristematic tissues, mainly by cell elongation processes (Callow & Ling, 1973). Accordingly we considered the possibility that the *adc* gene might participate in the early steps of the infection process. In agreement with this hypothesis, we observed an increase (1.5-fold) in the expression of the corresponding transcript in the chlorotic lesions (Fig. 2L, lane 2). In the case of *samdc* genes, the *samdc2* and *samdc3* transcripts were observed to be up-regulated (3 and 2-fold, respectively) in the chlorotic lesions (Fig. 2N-O, lane 2) while the *samdc1* transcript was slightly affected (Fig. 2M, lane 2). Changes in *samdc* expression patterns have been described at different stages during plant development (Marco & Carrasco, 2002), and in response to different conditions of abiotic stress (Tian *et al.*, 2004; Marco & Carrasco, 2002; Pillai & Akiyama, 2004; Hu *et al.*, 2005). An increase in its expression, as well as that from other genes involved in PAs synthesis, was reported during the hypersensitive response of tobacco plants infected with TMV (Yoda *et al.*, 2003).

In the case of the *Zmspds1* there were no changes in the gene expression pattern at this time point of the infection whereas the *Zmspds2* showed a reduction (50%) in transcript levels in the chlorotic area (2P-Q, lane 2). Alterations in the expression of the *spds* genes have been mainly related to the abiotic stress responses (Imai *et al.*, 2004; Kasukabe *et al.*, 2004; Rodríguez-Kessler *et al.*, 2006), while only a limited number of reports involving these genes in biotic stress exist (Yoda *et al.*, 2003).

It is worth mentioning that in these analyses we were unable to detect the *Zmodc* transcript, which has been mainly associated to events of cell proliferation, and with an important role in biotic stress (Cohen, 1998; Walters, 2003). It is possible that the maize genome contains several copies of the *odc* gene as described for rice, in which the existence of three *odc loci*

was revealed (GRAMENE: A Comparative Mapping Resource for Grains, USA). It was hypothesized that the designed oligonucleotides (Jiménez-Bremont *et al.*, 2004) were not adequate to amplify the cDNA specific for the *Zmodc* gene involved in the response mechanism. However, this possibility was discarded by further experiments where ADC and ODC activity were measured (see below).

Finally, Jasmonate treatment brought about a higher increase (4-fold) in the expression levels of the *samdc3* gene in the chlorotic regions (Fig. 3K, lane2). In addition, the *samdc2* was not expressed at this time point of infection even in the control plants, suggesting that MJ regulates negatively the expression of this gene (Fig. 3J, lane 1-2).

Expression of genes involved in polyamine synthesis in Ustilago maydis-induced tumors

In mechanically-infected maize plants, tumors are normally formed in the chlorotic zones, as result of hyperplasia of the meristematic tissues. We analyzed the expression of the same genes described above in leaf tumors, and other zones (see Materials and Methods) of 15 d-old plants (9 d after inoculation). The *adc* transcript was observed in the non-inoculated plants and was up-regulated (3 and 4-fold, respectively) in tumors and in the zone surrounding the tumor (Fig. 2S, lanes 1, 3, 4). In addition, in the MJ-treated plants the *adc* transcript was detected in the same tissues (Fig. 3O, lane 1, 3) and also in the wounded plants where it was up-regulated (2-fold; Fig. 3O, lane 2). Induction of *adc* transcription in response to mechanical damage and MJ has been previously reported in *Arabidopsis thaliana* (Perez-Amador *et al.*, 2002). In addition, it has been reported that the *adc* transcript levels are induced by different plant growth stimulators such as hormones: gibberellins and auxins, or cytokinins (Perez-Amador *et al.*, 1995; Perez-Amador *et al.*,

2002). In this sense, the up-regulation of the *adc* transcript in tumors might be related to the increased production of phytohormones in these maize tissues.

As occurred at the chlorotic regions, the levels of the *samdc* transcripts (*samdc1*, *samdc2* and *samdc3*) were significantly up-regulated in the tumors (Fig. 2T, U, V, lane 3), whereas in the wounded-plants, transcript levels decreased (Fig. 2T, U, V, lane 2). In the case of MJ-treated plants an up-regulation of *samdc* genes was observed only in the wounded-plants (Fig 3Q, R, lane 2). In addition, as described in the chlorotic lesions, MJ down-regulates the expression of the *samdc2* transcript (Fig. 3Q, lane 1, 3, 5).

The *Zmspds1* transcript levels were unaltered in most of the analyzed samples even in the MJ treated plants (Fig. 2X and 3T, lane 1, 3, 4, 5) with exception of the wounded-plants where a notable down-regulation was observed (Fig. 2X, lane 2). The *Zmspds2* gene showed a 2-fold increase in transcript levels in tumors (Fig. 2W, lane 3) while no changes in the expression pattern were evident in the MJ treated plants (Fig. 3S). In agreement with our data, *A. thaliana* plants treated with MJ exhibit no changes in the *spds* expression (Perez-Amador *et al.*, 2002).

In addition to these data, we analysed the expression level of these genes in older tumors (13 d post-inoculation) from 19 d-old plants. These tumors were slightly melanized and accord with teliospore maturation. We observed that at this time point most of the analysed transcripts returned to the basal levels in the tumor zone (Fig. 2Z to EE, lane 2) excepting the *samdc3* gene which was still induced (2-fold, Fig. 2CC, lane 2).

The multiple changes observed in the transcript levels at different stages of plant infection might be related to the morphological alterations in leaf blades (chlorosis and tumors) induced by the pathogen or to the fungal density in the infected tissues. In these sense, we determined *U. maydis* distribution in the infected tissues (T, ST, L) of 15 d old plants (9 d

post-inoculation) by PCR. A specific region downstream the homeodomain of the bE genes of *U. maydis* was amplified according to Martinez-Espinosa *et al.*, (2003). We observed that the fungi was mainly in the tumor zone (T), while in the green areas surrounding the tumor (ST) and in the apparently healthy leaves (L) it was present but in a less amount (Fig. 4). In the control and in the mechanically wounded-plants no amplification products were observed, indicating that the fungi was present only in the infected tissues. In addition, a fungal suspension including the FB1 and FB2 strains was used as positive control.

All PCR amplifications were performed starting from 200 ng of genomic DNA and under the same cycling conditions. Although this method is not quantitative, it reveals in some extent the fungal density in the infected tissues.

Activity of ADC and ODC in tumors induced by Ustilago maydis

We measured the activity of both decarboxylases involved in Put biosynthesis, in the same samples utilized to measure the levels of gene transcripts. Levels of ODC were extremely low, although higher levels of activity were observed in the mechanical wounded tissue, as compared to the control (not shown). Interestingly, levels of ADC activity were about four times higher in the tumor than in the control plant tissue (Fig. 5). Tissue in the vicinity of the tumor had enzyme levels slightly higher than the control, whereas tissue from wounded plants displayed the lowest enzymatic levels. It is also worth mentioning that the results establish a possible significant role of ADC, in contrast to ODC, in the accumulation of Put in the invaded tissues.

Accumulation of free and conjugated polyamines in Ustilago maydis-infected maize plants

PAs were measured in all the infected and non-infected tissues of 8, 11 and 15 d-old infected maize plants (2, 5 and 9 d post-inoculation), using the same samples as those described above for mRNA analysis. Early time points of infection (2 d post-inoculation) showed a slight increase (1.7-fold) in the free Put content in the infected tissues (I) while the wounded-plants (W) presented a higher accumulation of 3-fold (Fig. 6A). Transient accumulation of Put has been reported as a characteristic event in response to mechanical wounding in plants (Perez-Amador *et al.*, 2002; Cowley & Walters, 2005). In the case of Spd and Spm a reduction in both infected (I) and (W) tissues was observed (Fig. 6B, C; 2 d post-inoculation). Later on, the chlorotic lesions (Chl) showed a pronounced increase (5-fold) in free Put levels (Fig. 6A; 5 d post-inoculation), which confirms the participation of the *adc* gene in the early steps of the infection process. In comparison with the chlorotic region, a lower increase in free Put levels (2-fold) was observed in the tumor zone (T) while the leaf zone that surrounded the tumors (ST) presented a higher free Put content (3-fold) than tumors (Fig. 6A; 9 d post-inoculation). In the case of Spd, the chlorotic lesions (Chl) showed a representative increase (2-fold) in free levels (Fig. 6B, 5 d-post inoculation). In contrast, Spd levels increased only 30% in the tumor (T), while in the rest of the analyzed tissues no significant differences were observed, as compared to the non-inoculated plants ($P \leq 0.05$, Fig. 6B, 9 d post-inoculation). Finally, Spm levels did not show any significant increase in the infected plants, even in the early chlorotic lesions (Fig. 6C). Accumulation of free Put, Spd and Spm was reported in the tumors of *Brassicacae* infected with the biotrophic fungus *Plasmodiophora brassicae* (Walters & Shuttleton, 1985a). It has been suggested that this accumulation is related to an increase in the rate of cell division.

Auxin and cytokinins have also been shown to induce PA accumulation (Slocum, 1991). In this regard it is known that *U. maydis* produces significant amounts of indole acetic acid (IAA), and that in the tumors induced in maize by the fungus, IAA levels increase 5-20 fold (Wolf, 1952, Guevara-Lara *et al.*, 2000); accordingly it is possible that the auxin might be indirectly responsible for the accumulation of PAs in the tumors. In relation to the observed accumulation of Put in the zone surrounding the tumors, it is relevant to point out that in other interactions involving biotrophic fungi, such as barley plants infected with *Puccinia hordei*, accumulation of polyamines also occurred in the tissues surrounding the infection. Although in the later interaction this increase was related to the formation of the so-called “green islands”, which are zones with a high metabolic activity, from which the fungus may obtain nutrients (Greenland & Lewis, 1984), the role of PA accumulation in the tissues surrounding the tumors induced by *U. maydis* is still unknown.

It is important to mention that free PA levels are higher in younger maize plants than in the older ones. This is observed comparing the controls of the different time points monitored (8, 11, 15 and 19 d-old maize seedlings), suggesting that at early stages of plant development a higher pool of PAs is needed.

On the other hand, data of accumulation of soluble conjugated PAs in infected maize plants were even more impressive. As observed in Figure 6, conjugated PAs were specific from evident symptoms of infection (chlorosis and tumors) while in the early stages (2 d post-inoculation) they were undetectable. Interestingly, in the chlorotic lesions (Chl) conjugated Put accumulated in high extent whereas in the healthy non-inoculated plants (C) were undetected (Fig. 6A; 5 d post-inoculation). After 9 d post-inoculation, conjugated PAs were hardly detected in the healthy non-inoculated plants (C) while the levels of conjugated Put in tumors increased 24-fold (T), and 5-fold in the zone around the tumors (ST; Fig. 6; 9 d

post-inoculation). Also a significant increase in the levels of conjugated Spd and Spm was observed in the tumor (T) and the zone around the tumors (ST) of infected plants (Fig. 6E, F; 9 d post-inoculation). These data reveal a clear accumulation of conjugated Put in the infected tissues (chlorotic regions and tumors).

Conjugated PAs have been associated to reproduction and floral induction processes of plants (see review by Kakkar & Rai, 1993; Martin-Tanguy, 2001). These conjugates participate in the regulation of PA concentration inside the cell (Bagni & Tassoni, 2001), and contribute to the formation of a phenolic barrier, through ester-ether linkages, making cell walls more resistant to enzymatic hydrolysis (Clarke, 1982). Also, due to their anti-fungal properties (Walters *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 1983), a role in the protection against these pathogens has been suggested (Martin-Tanguy, 1985, 1987; Walters, 2003a). The observation that the ratio of conjugated to free Put observed in the chlorotic lesions and in the tumor zone was 2:1, suggests that the accumulation of conjugated Put might play a double role. On one side, the accumulation of an anti-fungal agent and on the other, a mechanism to reduce the levels of free PAs that favor tumor growth.

Effect of methyl jasmonate on the accumulation of free and conjugated polyamines in Ustilago maydis-infected plants

Maize plants (5 d-old) were treated or not with MJ, and then inoculated with *U. maydis* as described. After 5 and 9 d post-inoculation, the levels of free and conjugated PAs in the described samples were measured. In the case of the 5 d post-inoculation samples, MJ brought about a 2-fold increase in free Put levels (Fig. 7A, C2) in comparison to the non-treated control (Fig. 7A, C1), while Spd and Spm were slightly affected (Fig. 7B-C, C2). On the other hand, in the 9 d post-inoculation samples, MJ treatment induced a significant

increase in the levels of free PAs: 8-fold for Put (Fig. 7A, C4), 2.5-fold for Spd (Fig. 7B, C4), and 1.3-fold for Spm (Fig. 7C, C4) in comparison to the non-treated control (Fig. 7A-C, C3). It is important to notice that these data reveal a long-range effect of MJ, since analyses were performed 5 and 9 days after treatment.

The relative levels of free PAs in the chlorotic lesion (Chl), tumors (T) and the zone around the tumors (ST) were not significantly increased by MJ treatment (compare data in Fig. 7 to those in Fig. 6). On the other hand, the treatment brought about an increase of Put (4-fold), and Spd (1.4-fold) (compare data in Fig. 7 to those in Fig. 6; 9-d post inoculation) in the apparently healthy leaves of the infected plants (L).

Regarding conjugated PAs, the levels of conjugated Put increased in the chlorotic lesions of the MJ-treated infected plants ca. 10-fold as compared to the MJ-treated non-inoculated plants (C2) (Fig. 7D). A similar increase (8-fold) was observed in the tumors of MJ-treated infected plants as compared to MJ-treated non-inoculated plants (C4) and 36-fold as compared to untreated non-inoculated plants (C3) (Fig. 7D). Conjugates of Spd and Spm were hardly detected (Fig. 7E, F; 9 d post-inoculation). In agreement with our data, low levels of Spm conjugates, in some cases undetectable and not affected by MJ treatment were also reported in barley leaves (Walters *et al.*, 2002). These data confirm an important role of Put conjugates in the plant response to biotic stress.

Activity and gene expression of pao in tumors induced by Ustilago maydis

In addition to polyamine biosynthesis we were interested in knowing if polyamine catabolism, specifically that related to the maize polyamine oxidase (PAO), was active in *U. maydis*-infected plants. Recently, the maize *pao* genes were cloned and sequenced (Cervelli *et al.*, 2000) and a main role for them was established in cell growth regulated by

light and auxins (Cona *et al.*, 2003). Different studies have suggested that the production of H₂O₂ during the oxidative degradation of Spd and Spm by PAO acts as a mediator of different physiological events such as signaling, lignification, wall stiffening, cellular defense and programmed cell death (Laurenzi *et al.*, 1999; Lamb & Dixon, 1997; Walters, 2003b). In this respect we hypothesize that the production of H₂O₂ as a result of PA catabolism mediated by PAO might be involved in tumor formation through cell wall-stiffening or lignification during growth and cell enlargement. In order to test this hypothesis we measured *pao* mRNA transcription and also PAO enzymatic activity in 15 d-old infected maize plants (9 d after inoculation), using similar samples as those described above. A 1.5-fold increase in *pao* transcript levels was observed in tumors (Fig. 8A, lane 2) where the higher enzymatic activity (2.5-fold increase) was detected (Fig. 8B, T). This result indicates a major production of H₂O₂ in the tumor tissue. In addition, a reduction of about 50% in transcript levels was observed in the zone surrounding the tumors which does not correspond with the increase (1.8-fold) observed in activity in the same samples (Fig. (A, B, lane 3). Finally, a reduction in transcript levels and activity was observed in the apparently healthy leaf (Fig. 8A, B, lane 4). Our data confirm a major role of PAO in Spd and Spm catabolism in the maize tumors induced by *U. maydis*. The production of H₂O₂ could be directly related to cell wall-stiffening or lignification during growth and cell enlargement of tumors.

Conclusions

In general, it was observed that the maize-*Ustilago maydis* interaction brought about an increase in PA biosynthesis, more noticeably in the chlorotic lesions and tumors formed during infection. This increase was related to the transcriptional regulation of the *adc*, *samdc2* and *samdc3* genes during early stages of the disease. As a result of this, increased enzymatic activity in tumors (at least of ADC), contributed to the accumulation of free and conjugated polyamines in the plant tissues. Put biosynthesis, due to ADC activity, could play an important role during tumor development in maize tissues, mainly on cell expansion or elongation. In addition, the contribution of PA degradation by PAO activity could be directly related to cell wall-stiffening or lignification during growth and cell enlargement of tumors. Although, H₂O₂ production by polyamine catabolism has been mainly related to the hypersensitive response and defense against pathogens (Walters, 2003b), we hypothesize that rather than a defense mechanism H₂O₂ may participate as a signaling molecule that could promote fungal differentiation (Leuthner *et al.*, 2005).

On the other hand, as described in other plant systems, it was observed that methyl jasmonate increased PA synthesis and accumulation in maize tissues. Finally, we suggest that PAs probably play an active role in maize response to the interaction by the pathogenic fungus, in which PAs might be accumulated and/or conjugated, reducing the levels of free PAs that might be involved in tumor development, and giving rise to an anti-fungal derivative.

Our work supports an important role for putrescine and its conjugates during biotic stress. Recently, microarray analysis of an *adc* overexpressing mutant in *A. thaliana* showed that high levels of putrescine in the transgene induced the expression of genes related to pathogenesis like PR proteins, etc (Alcázar *et al.*, 2005).

References

- Alcázar R, García-Martínez JL, Cuevas JC, Tiburcio AF, Altabella T. 2005.** Overexpression of *ADC2* in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *The Plant Journal* **43**: 425-436.
- Auvinen M, Paasinen A, Andersson LC, Hölttä E. 1992.** Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* **360**: 355-358.
- Bagni N, Tassoni A. 2001.** Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**: 301-317.
- Banuett F. 1992.** *Ustilago maydis*, the delightfull blight. *Trends in Genetics* **8**: 174-180.
- Banuett F. 1995.** Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumor in maize. *Annual Review of Genetics* **29**: 179-208.
- Banuett F, Herskowitz I. 1996.** Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965-2976.
- Banuett F. 2002.** Pathogenic development in *Ustilago maydis*. A progression of morphological transitions that results in tumor formation and teliospore production. In: Osiewacz HD, ed. *Molecular biology of fungal development*. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 349-398.
- Basse CW. 2005.** Dissecting defense-related and developmental transcriptional responses of maize during *Ustilago maydis* infection and subsequent tumor formation. *Plant Physiology* **138**: 1774-1784.
- Basse CW, Steinberg G. 2004.** *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* **5**: 83-92.

- Biondi S, Scaramagli S, Capitani F, Altamura MM, Torrigiani P. 2001.** Methyl jasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in tobacco thin layers. *Journal of Experimental Botany* **52**: 231-242.
- Birecka H. 1991.** Assay methods for enzymes of polyamine metabolism. In: Slocum RD, Flores HE, eds. *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*. CRC Press, Boca Raton, USA: 244-254.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J. 1999.** Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* **140**: 103-125.
- Bölker M. 2001.** *Ustilago maydis*, a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**: 1395-1401.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Callow JA, Ling IT. 1973.** Histology of neoplasms and chlorotic lesions in maize seedlings following the infection of sporidia of *Ustilago maydis* (DC) Corda. *Physiology and Plant Pathology* **3**: 489-494.
- Cervelli M, Tavladoraki P, Di Agostino S, Angelini R, Federico R, Mariottini P. 2000.** Isolation and characterization of three polyamine oxidase genes from *Zea mays*. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 667-677.
- Childs AC, Mehta D, Gerner EW. 2003.** Polyamine-dependent gene expression. *Cellular and Molecular Life Science* **60**: 1-13.
- Christensen JJ. 1963.** *Corn smut caused by Ustilago maydis*. Monograph 2. St. Paul MN, USA: American Phytopathological Society.

Clarke DD. 1982. The accumulation of cinnamic acid amides in the cell walls of potato tissue as an early response to fungal attack. In: Wood, R.K.S, ed. *Active defense mechanisms in plants*. Plenum Press, London, 321.

Cohen S. 1998. *A guide to the polyamines*. Oxford University Press, Oxford.

Cona A, Cenci F, Cervelli M, Federico R, Mariottini P, Moreno S, Angelini R. 2003. Polyamine oxidase, a hydrogen peroxide-producing enzyme, is up-regulated by light and down-regulated by auxin in outer tissues of the maize mesocotyl. *Plant Physiology* **131**: 803-813.

Cowley T, Walters DR. 2005. Local and systemic changes in arginine decarboxylase activity, putrescine levels and putrescine catabolism in wounded oilseed rape. *New Phytologist* **165**: 807-811.

Creelman RA, Mullet JE. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 355-381.

Evans PT, Mamlberg RL. 1989. Do polyamines have roles in plant development? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 235-269.

Franceschetti M, Hanfrey C, Scaramagli S, Torrigiani P, Bagni N, Burtin D, Michael AJ. 2001. Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *The Biochemical Journal* **353**: 403-409.

Galston AW, Sawhney RK. 1990. Polyamines in Plant Physiology. *Plant Physiology* **94**: 406-410.

Guevara-Lara F, Valverde ME, Paredes-López O. 2000. Is pathogenicity of *Ustilago maydis* (huitlacoche) strains on maize related to *in vitro* production of indole-3-acetic acid? *Word Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**: 481-490.

- Greenland AJ, Lewis DH. 1984.** Amines in barley leaves infected with brown rust and their possible relevance to formation of “green-islands”. *New Phytologist* **96**: 283-291.
- Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. 1992.** Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Science* **90**: 2389-2393.
- Hashimoto T, Tamaki K, Susuki K, Yamada Y. 1998.** Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant and Cell Physiology* **39**:73-79.
- Hatanaka T, Sano H, Kusano T. 1999.** Molecular cloning and characterization of coffee cDNA encoding spermidine synthase. *Plant Science* **140**:161-168.
- Hu WW, Gong H, Pua EG. 2005.** Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-methionine decarboxylase genes from mustard (*Brassica juncea*). *Physiology Plantarum* **124**: 25-40.
- Igarashi K, Kashiwagi K. 2000.** Polyamines: Mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**: 559-564.
- Imai R, Ali A, Pramanik HR, Nakaminami K, Sentoku N, Kato H. 2004.** A distinctive class of spermidine synthase is involved in chilling response in rice. *Journal of Plant Physiology* **161**: 883-886.
- Jiménez-Bremont JF, Camacho-Villasana YM, Cabrera-Ponce JL, Barba de la Rosa AP, Ochoa-Alejo N. 2004.** Sequence comparison of plant ornithine decarboxylase reveals high homology and lack of introns. *Biologia Plantarum* **48**: 193-198.
- Kakkar RK, Rai VK. 1993.** Plant polyamines in flowering and fruit ripening. *Phytochemistry* **33**: 1281-1288.
- Kakkar RK, Nagar PK, Ahuja PS, Rai VK. 2000.** Polyamines and plant morphogenesis. *Biologia Plantarum* **43**: 1-11.

Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S. 2004. Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **45**: 712-722.

Kitashiba H, Hao Y-J, Honda C, Moriguchi T. 2005. Two types of spermine synthase gene: *MdACL5* and *MdSPMS* are differentially involved in apple fruit development and cell growth. *Gene* **361**: 101-111.

Korolev S, Ikeguchi Y, Skarina T, Beasley S, Arrowsmith C, Edwards A, Joachimiak A, Pegg AE, Savchenko A. 2002. The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *Nature structural biology* **9**: 27-31.

Kulpa JM, Galsky AG, Lipetz P, Stephens R. 1985. Polyamines and crown gall tumor growth. *Plant Cell Report* **4**: 81-83.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**:150-163.

Lamb C, Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251-275.

Laurenzi M, Rea G, Federico R, Tavladoraki P, Angelini R. 1999. De-etiolation causes a phytochrome-mediated increase in polyamine oxidase expression in outer tissues of the maize mesocotyl: a role in the photomodulation of growth and cell wall differentiation. *Planta* **208**: 146-154.

Leuthner B, Aichinger C, Oehmen E, Koopmann E, Muller O, Muller P, Kahmann R, Bolker M, Schreier PH. 2005. A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for

filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics* **272**: 639-50.

Marcé M, Brown DS, Capell T, Figueras X, Tiburcio AF. 1995. Rapid high performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *Journal of Chromatography B* **666**: 329-335.

Marco F, Carrasco P. 2002. Expression of the pea S-adenosylmethionine decarboxylase gene is involved in developmental and environmental responses. *Planta* **214**: 614-647.

Martin-Tanguy J. 1985. The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Journal of Plant Growth Regulation* **3**: 381-399.

Martin-Tanguy J. 1987. Hydroxycinnamic acid amides, hypersensitivity, flowering and sexual organogenesis in plants. In: Von Wettstein D, Chua DN eds. *Plant Molecular Biology*. Plenum Publishing Corporation, New York 253-263.

Martin-Tanguy J. 1997. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiologia Plantarum* **100**: 675-688.

Martin-Tanguy J. 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Journal of Plant Growth Regulation* **34**: 135-148.

Martínez-Espinosa AD, León-Ramírez CG, Singh N, Ruiz-Herrera J. 2003. Use of PCR to detect infection of differentially susceptible maize cultivars using *Ustilago maydis* strains of variable virulence. *International Microbiology* **6**: 117-120.

Negrel J, Paynot M, Javelle F. 1992. Purification and properties of putrescine hydroxycinnamoyl transferase from tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell suspensions. *Plant Physiology* **98**: 1264-1269.

Pérez-Amador MA, Carbonel J, Granell A. 1995. Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.). *Plant Molecular Biology* **28**: 997-1009.

Perez-Amador MA, Leon J, Green PJ, Carbonell J. 2002. Induction of arginine decarboxylase *ADC2* genes provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **130**: 1454-1463.

Pillai MA, Akiyama T. 2004. Differential expression of an S-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under low temperature stress in japonica and indica rice genotypes. *Molecular Genetics and Genomics* **271**: 141-149.

Posfai J, Bhaqwat AS, Posfai G, Roberts RJ. 1989. Predicted motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Research* **17**:2421-2435.

Rechsteiner M, Rogers SW. 1996. PEST sequences and regulation of proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* **21**: 267-271.

Rodríguez-Kessler M, Alpuche-Solís AG, Ruiz OA, Jiménez-Bremont JF. 2006. Effect of salt-stress on the regulation of maize (*Zea mays* L) genes involved in polyamine biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation* **48**: 175-185.

Ruiz-Herrera J, Martínez-Espinosa AD. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology* **1**: 149-158.

Ruiz-Herrera J, León-Ramírez C, Martínez-Espinosa AD. 2000. Morphogenesis and pathogenesis in *Ustilago maydis*. *Recent Research Developments in Microbiology* **4**: 585-598.

Scalabrino G, Ferioli ME. 1982. Polyamines in mammalian tumors. Part II. *Advances in Cancer Research* **36**: 1-102.

Seiler N. 2003. Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Current Drug Targets* **4**: 537-564.

Slocum RD. 1991. Polyamine biosynthesis in plants. In: Slocum RD, Flores HE, eds. *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, 23-40.

Smith TA, Negrel J, Bird CR. 1983. The cinnamic acid amides of the di- and polyamines. In: Brachrach U, Kate A, Chayen R, eds. *Advances in polyamine research*. New York: Raven, **4**: 347-370.

Snetselaar KM, Mims CW. 1994. Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycological Research* **98**: 347-355.

Tabor CW, Tabor H. 1984. Polyamines. *Annual Review of Biochemistry* **53**: 749-780.

Takahashi Y, Berberich T, Yamashita K, Uehara Y, Miyazaki A, Kusano T. 2004. Identification of tobacco HINI and two closely related genes as spermine-responsive genes and their functional expression during the *Tobacco mosaic virus*-induced hypersensitive response and during leaf- and flower-senescence. *Plant Molecular Biology* **54**: 613-622.

Tian AG, Zhao JY, Zhang JS, Gai JY, Chen SY. 2004. Genomic characterization of the S-adenosylmethionine decarboxylase genes from soybean. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 842-850.

Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Galston AW. 1990. Polyamine metabolism. In: Mifflin BJ, ed. *Intermediary nitrogen metabolism. The biochemistry of plants*. Academic Press, New York **16**: 283-325.

Tiburcio AF, Altabella T, Borrell A, Masgrau C. 1997. Polyamine metabolism and its regulation. *Physiologia Plantarum* **100**: 664-674.

Uehara Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Takahashi H, Matsui K, Ohme-Takagi M, Saitoh H, Terauchi R, Kusano T. 2005. Tobacco ZFT1, a transcriptional

repressor with Cys₂/His₂ type zinc finger motif that functions in spermine-signaling pathway. *Plant Molecular Biology* **59**: 435-448.

Walters DR, Shuttleton MA. 1985a. Polyamines in the roots of turnip infected with *Plasmodiophora brassicae* Wor. *New Phytologist* **100**: 209-214.

Walters DR, Wilson PWF, Shuttleton MA. 1985b. Relative changes in levels of polyamines and activities of biosynthetic enzymes in barley infected with the powdery mildew fungus, *Erysiphe graminis* D. C. ex Merat f.sp. hordei Marchal. *New Phytologist* **101**: 695-705.

Walters DR, Wylie MA. 1986. Polyamines in discrete regions of barley leaves infected with the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*. *Physiologia Plantarum* **67**: 630-633.

Walters DR. 2000. Polyamines in plant-microbe interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**: 137-146.

Walters DR, Meurer-Grimes B, Rovira I. 2001. Antifungal activity of three spermidine conjugates. *FEMS Microbiology Letters* **10030**: 1-4.

Walters DR, Cowley T, Mitchell A. 2002. Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *Journal of Experimental Botany* **53**: 747-756.

Walters DR. 2003a. Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **64**: 97-107.

Walters DR. 2003b. Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist* **159**: 109-115.

Wolf TF. 1952. The production of indole acetic acid by *Ustilago zaeae*, and its possible significance in tumor formation. *Proceedings of the National Academy of Science* **38**: 106-111.

Xiong H, Stanley BA, Tekwani BL, Pegg AE. 1997. Processing of mammalian and plant S-adenosylmethionine decarboxylase proenzymes. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 28342-28348.

Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y. 1998. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **118**: 1213-1222.

Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H. 2003. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiology* **132**: 1973-1981.

Legends to Figures

Figure 1. Multiple amino acid alignments as derived by maximal homology of SAMDCs (A) and SPDSs (C), respectively. The alignments include the sequences obtained at the NCBI database for the maize *samdc2*, *samdc3* (A; Gen Bank AY103940, AY104070) and the *Zmspds1* genes (C; GenBank AY103592) and other sequences coding plant SAMDC's and SPDS's as follows: At1, *Arabidopsis thaliana* (SAMDC1, U63633; SPDS1, AJ251296), At2, *Arabidopsis thaliana* (SAMDC2, AJ251915; SPDS2, AJ251297), AtSPMS, *Arabidopsis thaliana* (SPDS3 or SPMS, NM_124691), MdSPMS, *Malus domestica* (SPMS, AB204520), Os1, *Oryza sativa* (SAMDC1, Y07766; SPDS1, AJ251298), Os2, *Oryza sativa* (SAMDC2, AJ251899; SPDS2, GenBank AB098063) and Zm2, *Zea mays* (SPDS2, AY730048). Identical residues (asterisks) in the proteins and conserved amino acid substitutions (dots) are indicated. For the SAMDC (A) proteins the conserved glutamate (shadowed) and the conserved aspartic (filled circle) residues necessary for the stimulation of proenzyme processing of the human SAMDC by putrescine are indicated. In addition, the location of the proenzyme processing site is given (underlined) and the location of a disordered loop connecting the two structurally similar halves of the human enzyme (double-headed arrow). The putative PEST sequence is boxed. For the SPDS (C) proteins the proposed binding sites for SAM and dcSAM (motifs II to VI, shadowed) and the conserved sequence of the spermidine synthase family (motif I, underlined) are shown. The conserved amino acids that contribute to the formation of the putrescine binding cavity are indicated (boxed). Phylogenetic trees representing the SAMDC's (B) and SPDS's (D) from different plants: *A. thaliana* (At1, At2, At3), *Datura stramonium* (Ds1, Ds2), *Hyoscyamus niger* (Hn1, Hn2), *O. sativa* (Os1, Os2), *Pisum*

sativum (Ps1, Ps2), *Z. mays* (Zm1, Zm2, Zm3), and the spermine synthase genes ACL5 and SPMS from *A. thaliana* and apple, were created by the neighbor-joining method using the MEGA version 3.1 program (Kumar *et al.*, 2004). The distance scale represents evolutionary distance expressed as the number of substitutions per residue.

Fig. 2. Expression of *adc*, *samdc* (1, 2, 3), *Zmspds* (1, 2) genes during the time course of the infection of maize plants with *U. maydis* including very early time points (A, 2 d post-inoculation), the development of chlorotic spots (B, 5 d post-inoculation), and the development of tumors (C and D, 9 d and 13 d post-inoculation). Total RNA was isolated from leaf blades of plants at different stages of infection. C, control plant; W, wounded plant; Chl, chlorosis; I, inoculated plant; T, tumor; ST, area around tumor and L, apparently healthy leaf from inoculated plant.

Fig. 3. Expression of *adc*, *samdc* (1, 2, 3), *Zmspds* (1, 2) genes in 8, 11, 15 and 19 d-old plants infected (2, 5, 9 and 13 d post-inoculation) or not with *U. maydis* and pre-treated or not with MJ. Total RNA was isolated from leaf blades of plants at different stages of infection. C, W, Chl, I, T, ST, and L as described in Figure 2.

Fig. 4. Detection of *U. maydis* in infected maize plants. Genomic DNA was isolated from leaf blades of 15-d old seedlings and a specific region downstream the homeodomain of the bE genes of *U. maydis* was amplified by PCR. C, W, T, ST, L as described in Figure 2.

Fig. 5 Activity of ADC in 15 d-old maize plants inoculated (9 d post-inoculation) or not with *U. maydis*. Activity expressed as *pmol* CO₂/mg fresh weight per min. C, W, T, ST and

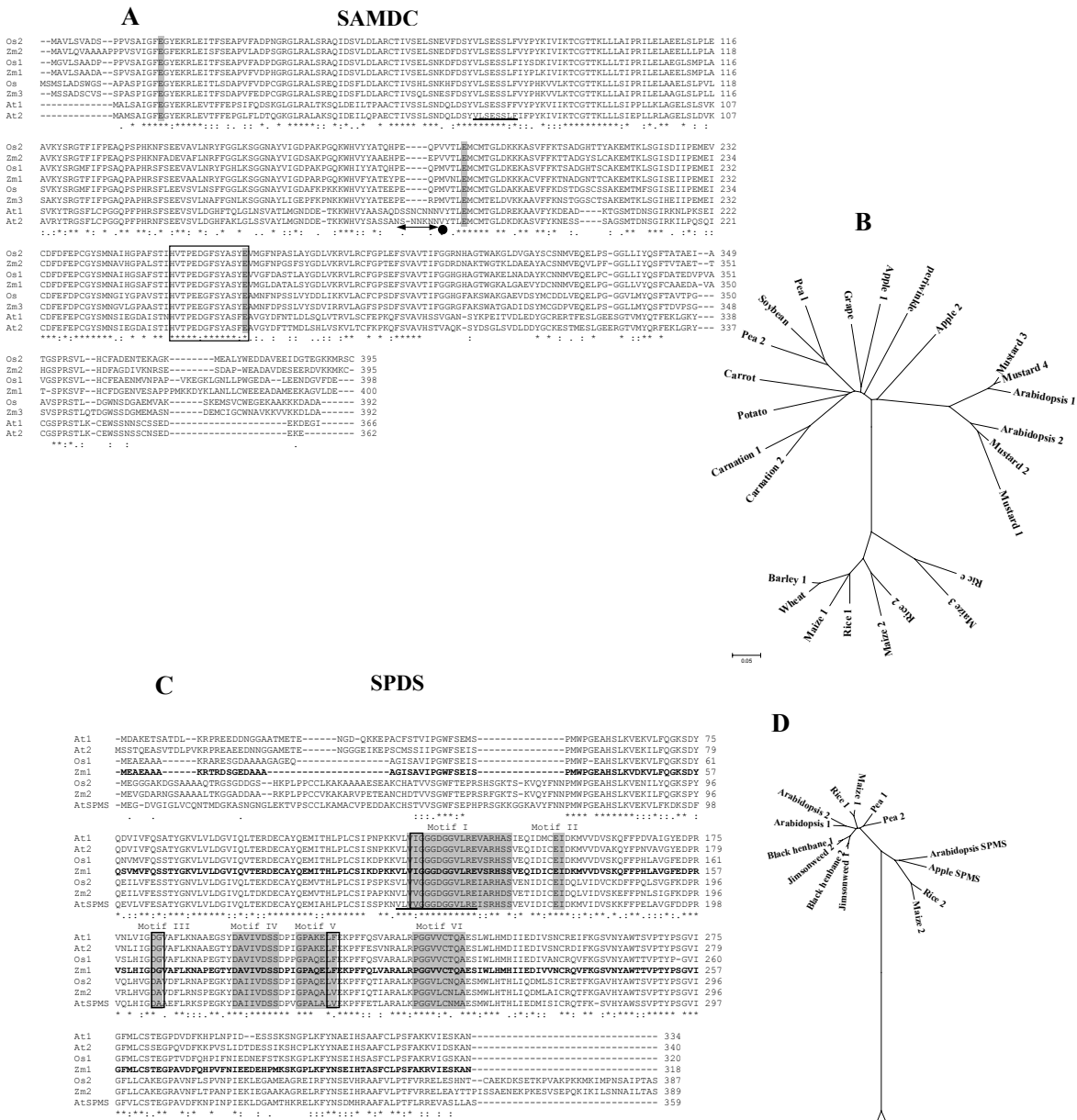
L, as described for Fig. 2. Data are mean \pm SE (n = 3) of a single representative experiment from two repeated experiments.

Fig. 6 Determination of free and conjugated polyamine contents in 8, 11 and 15 d-old maize plants infected (2, 5 and 9 d post-inoculation) or not with *U. maydis*. A, D, Put; B, E, Spm; C, F, Spd. C, W, Chl, I, T, ST and L as in Fig. 2. Data are mean \pm SE (n = 3) of a single representative experiment from two repeated experiments. ND, no-detected.

Fig. 7 Effect of MJ on the accumulation of free and conjugated polyamines in 11 and 15 d-old maize plants inoculated (5 and 9 d post-inoculation) or not with *U. maydis*. A, D, Put; B, E, Spd; C, F, Spm. C1 and C3, non-inoculated and un-treated controls from 11 and 15 d-old plants, respectively; C2 and C4, non-inoculated MJ-treated plants; W, Chl, I, T, ST and L, as described in Fig. 2 for MJ-treated plants. Data are mean \pm SE (n = 3) of a single representative experiment from two repeated experiments.

Fig. 8 Expression (A) and activity (B) of PAO in 15 d-old maize plants inoculated (9 d post-inoculation) or not with *U. maydis*. Activity expressed as nmol H₂O₂/g fresh weight per min. C, T, ST and L as described for Fig. 2. Data are mean \pm SE (n = 3) of a single representative experiment from two repeated experiments.

Figure 1



9d

13d

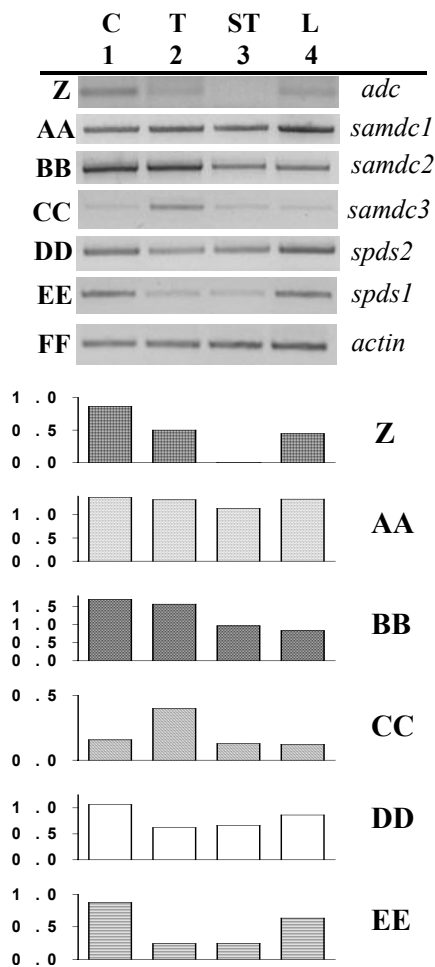
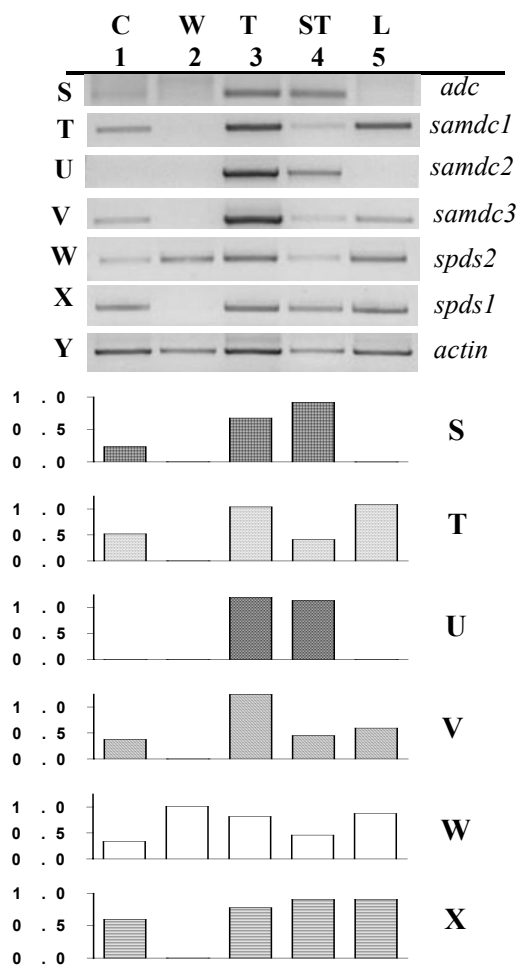


Figure 3.

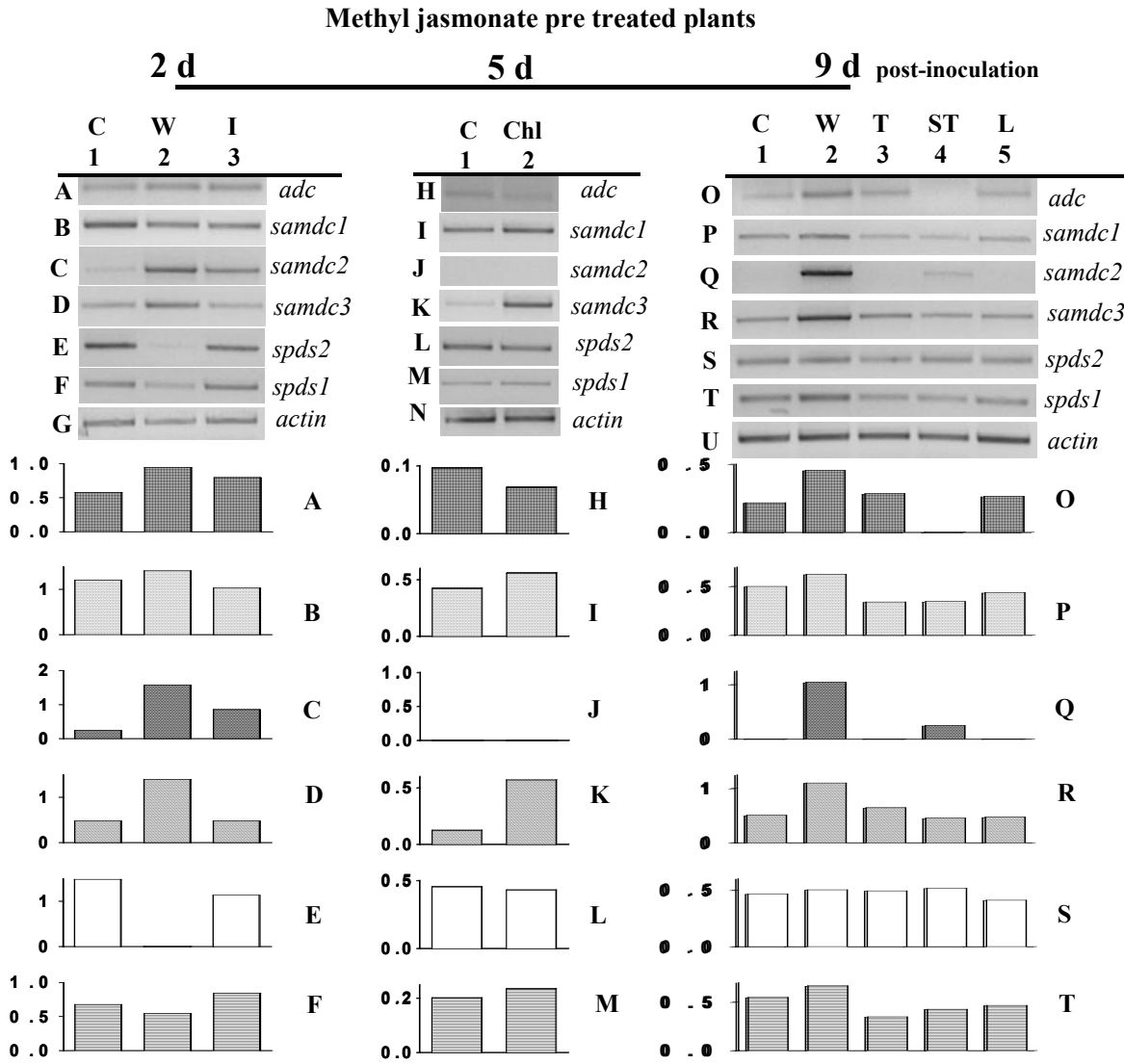


Figure 4.

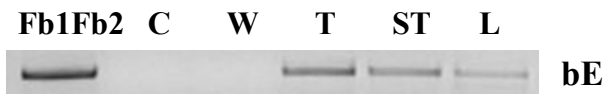


Figure 5

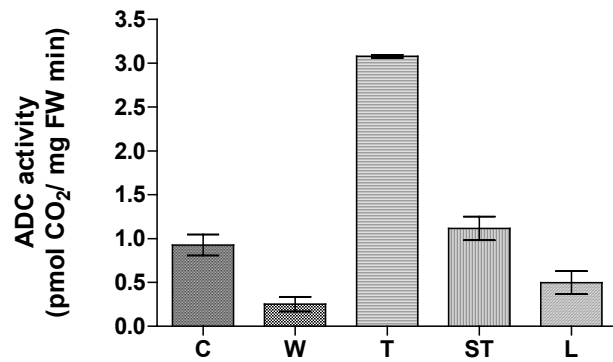


Figure 6

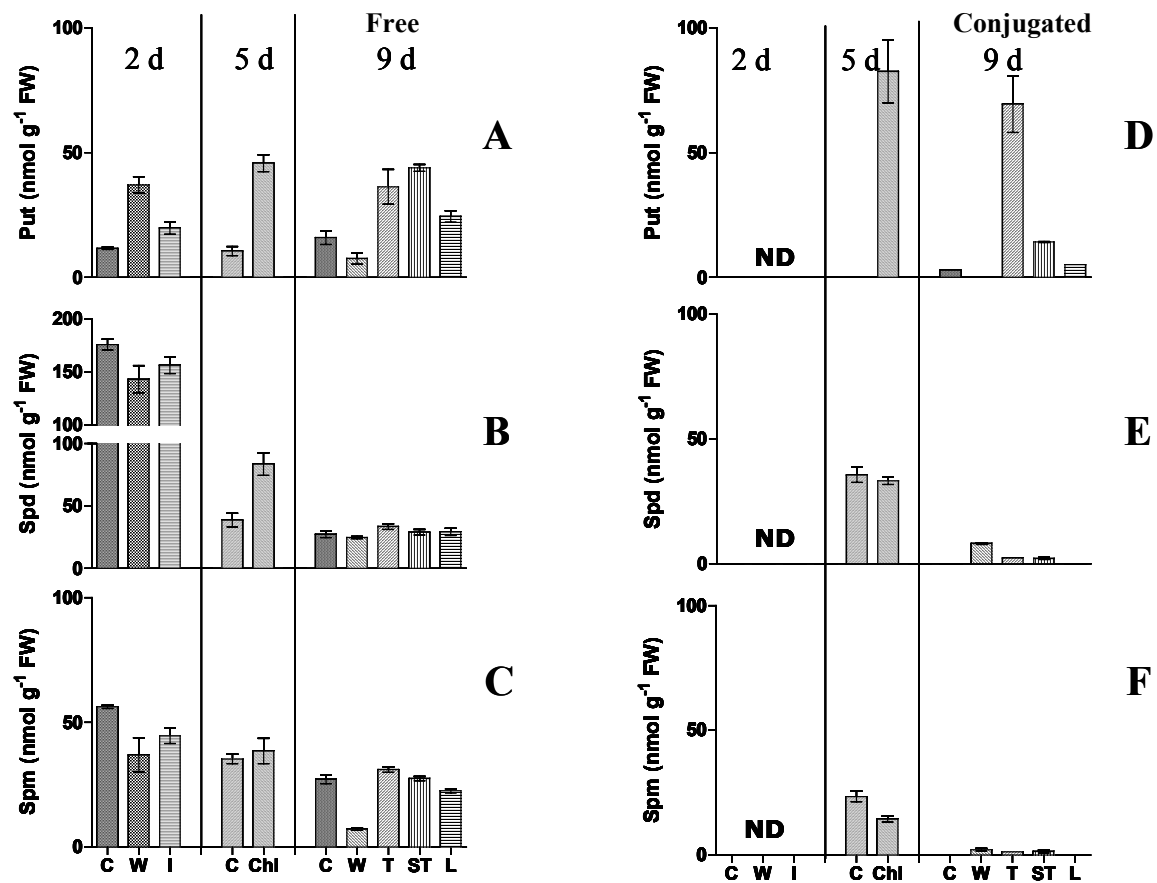


Figure 7

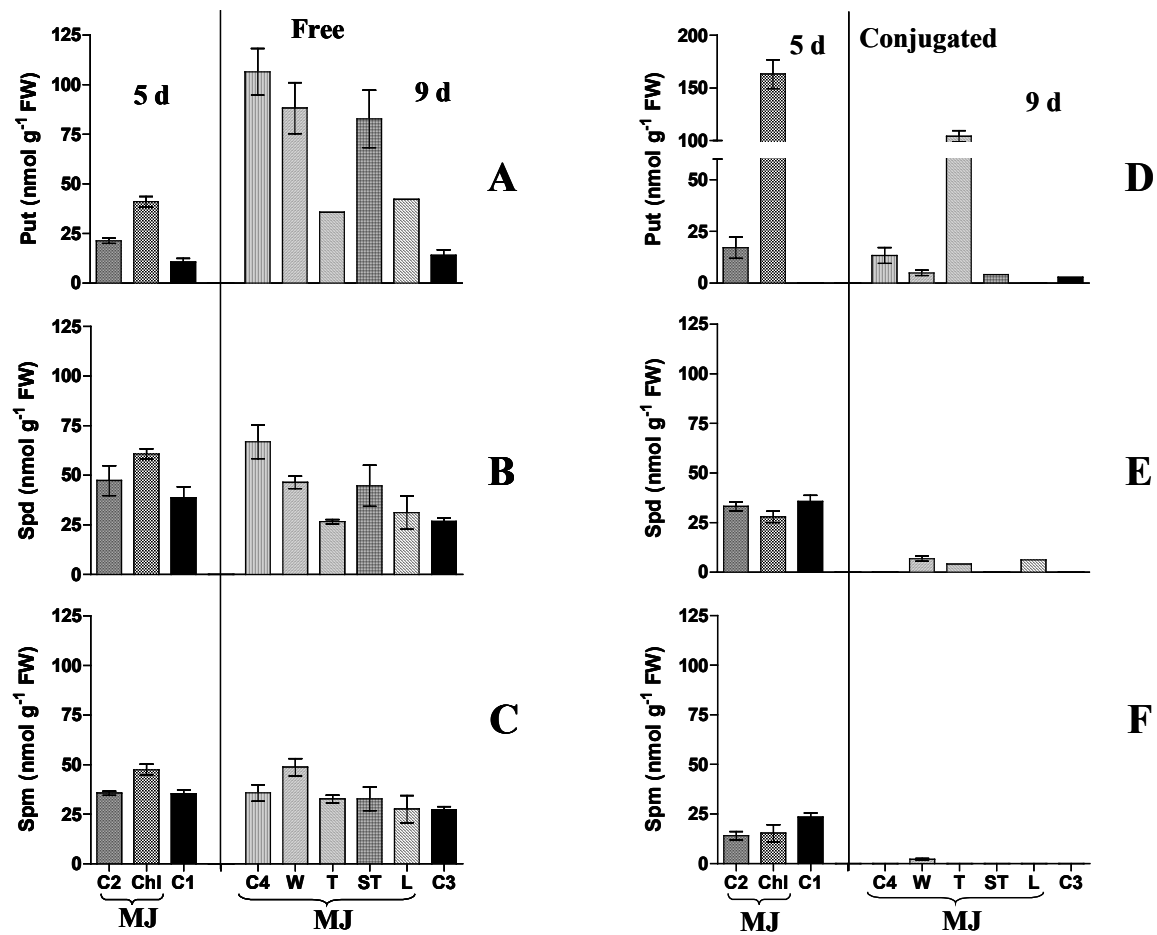
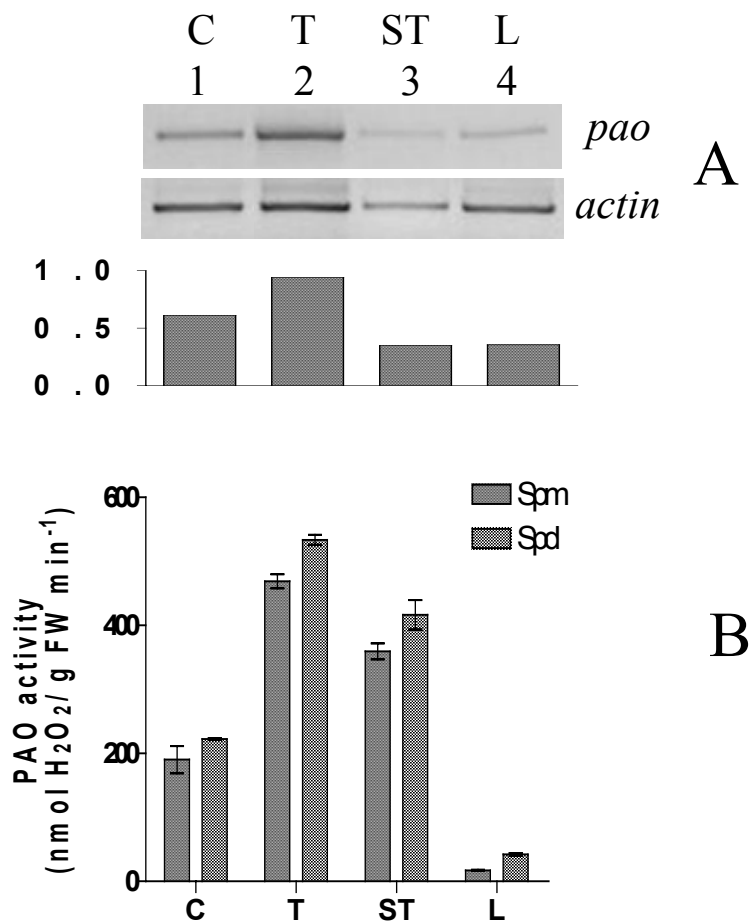


Figure 8



VI. DISCUSIÓN GENERAL

Estrés salino

La salinidad es uno de los principales factores de estrés abiótico que limitan la productividad de los cultivos. La problemática actual se asocia a las prácticas de irrigación donde la introducción de salinidad a los cultivos depende principalmente del manejo inadecuado y la baja calidad del agua empleada para estos fines. Las tierras irrigadas generan más del 30% de la producción agrícola global y se ha estimado que aproximadamente el 50% de estas tierras están afectadas por salinidad (Zhu, 2001; Sairam y Tyagi, 2004). Una gran variedad de cultivos de importancia económica son altamente sensibles (glicófitas) a este factor de estrés, sin embargo; la subsistencia de especies tolerantes (halófitas) soporta la existencia de bases genéticas y moleculares que confieren tolerancia a concentraciones elevadas de sales. Se ha observado que plantas sensibles tiene la capacidad de adaptarse a la salinidad (dependiendo de la especie, su sistema de respuesta y el tiempo de exposición al estrés), generando una respuesta de protección que incluye la expresión de ciertos grupos de genes, la producción de proteínas de estrés y la acumulación de solutos compatibles (azúcares, amino ácidos, ácidos orgánicos, betaínas y poliaminas entre otros), involucrados en la protección de estructuras celulares, mantenimiento de la homeostasis iónica y el ajuste osmótico, y en la regulación de la expresión génica (Hasegawa *et al.*, 2000; Sairam y Tyagi, 2004). Dentro de estos, se le ha dado gran importancia al estudio de alteraciones en el metabolismo de poliaminas (PAs) bajo diversas condiciones adversas incluyendo estrés salino, hídrico, osmótico, acidez, estrés por frío y congelamiento, deficiencias nutricionales, daño mecánico y ataque por patógenos, entre otros (Bouchereau *et al.*, 1999; Walters, 2003). Durante las últimas dos décadas, la investigación en esta área se enfocó a la determinación del contenido intracelular de estos compuestos y sus alteraciones al comparar plantas controles con plantas sometidas a diferentes tratamientos de estrés y también al comparar plantas tolerantes con plantas sensibles a diversos estreses. Además, se inició

con el aislamiento de genes involucrados en la biosíntesis poliaminas, principalmente por descarboxilasas *adc*, *odc* y *samdc* (Bouchereau *et al.*, 1999; Walden *et al.*, 1997) y recientemente, el aislamiento de las aminopropil transferasas sufrió un gran auge. En este sentido, en el presente trabajo de tesis se aisló la secuencia completa del ADNc que codifica la espermidina sintasa de maíz, *Zmspds2*, primero diseñando oligonucleótidos heterólogos en base a otras secuencias de *spds* de diversas plantas. Así se obtuvo un fragmento de 876 pb. Posteriormente, se obtuvo la secuencia completa del ADNc por técnicas de RACE 5' y 3'. Esta enzima se encarga de la biosíntesis de Spd a partir de Put y su nombre, ZmSPDS2, se asignó de acuerdo a la alta homología (81.9 %) presentada con su ortólogo en arroz OsSPDS2. La secuencia de ADNc de la *Zmspds2* es de 1590 pb incluyendo 96 pb de la región 5' no traducible (5-UTR), 1170 pb del marco de lectura abierto del gen y 324 pb de la región 3'-UTR. Su secuencia traducida corresponde a 389 aminoácidos y contiene los sitios conservados como son la secuencia consenso de la familia de las aminopropil-transferasas y los sitios de unión al SAM descarboxilado (Posfai *et al.*, 1989). Trabajos recientes han demostrado que las espermidina sintasas (SPDS) contienen ciertos aminoácidos únicos y conservados los cuales ayudan a la formación de una cavidad para la unión de su sustrato, la Put (Korolev *et al.*, 2002; Kitashiba *et al.*, 2005). Se ha visto que estos aminoácidos difieren en las esperminas sintasas (SPMS) que son otro grupo de aminopropil-transferasas encargadas de la biosíntesis de espermina a partir de espermidina. De manera interesante, la secuencia aislada como ZmSPDS2 presenta los cambios descritos para las SPMS incluyendo la sustitución de los aminoácidos fenilalanina por la valina-234, Isoleucina por valina-148 y glicina por alanina-204. Estos cambios también se encontraron en su ortólogo OsSPDS2 y en las esperminas sintasas descritas hasta el momento de Arabidopsis y manzana (Kitashiba *et al.*, 2005). De acuerdo a estas observaciones sugerimos que posiblemente el gen inicialmente aislado como *Zmspds2* podría actuar como una espermina en lugar de una espermidina sintasa. Sin embargo, se requieren desarrollar experimentos de

ganancia de función en mutantes deficientes en SPDS o SPMS de levadura o bien en *Arabidopsis* para determinar la actividad por complementación de función.

Además, se amplificó la secuencia de ADN genómico equivalente a la región de ADNc previamente obtenida. El fragmento del genómico de la *Zmspds2* equivalente al ORF obtenido mide 3887 pb, y contiene 11 exones y 10 intrones. La organización genómica de este gen es altamente homóloga a los genes de *spds* de arroz y manzana, y de *spms* de *Arabidopsis*. La mayoría de los exones de la parte central del gen se conservan en tamaño y de manera interesante los intrones mantienen una homología elevada. Los bordes de los intrones (GT-AG) también se mantienen conservados. Estos bordes se han reportado como característicos de intrones en plantas (Lorković *et al.*, 2000; Simpson y Filipowics, 1996). La estructura genómica de las espermidina sintetas sugiere que estos genes pueden dar lugar a variantes de los mismos por procesos de “splicing” alternativo (Ikeguchi *et al.*, 2006).

Por otro lado, el aislamiento de la *Zmspds2* se realizó en base a la observación de una inducción notoria de su transcrito en respuesta a un estrés salino a corto plazo en maíz. En este trabajo inicial, se empleó un sistema de hoja cortada, en el cual se sumerge la base de la hoja en soluciones con diferentes concentraciones de NaCl y se evalúa una respuesta rápida a nivel transcripcional de los genes de interés. De manera interesante el transcrito de la *Zmspds2A* mostró una inducción rápida a las 1.5 h de estrés en respuesta a salinidad la cual fue aún más pronunciada a las 12 h. Además, se observó la inducción de un segundo transcrito (*Zmspds2B*) únicamente en respuesta a NaCl, siendo su regulación dependiente de la concentración de sal aplicada y del tiempo de estrés. La secuenciación de este segundo transcrito (*Zmspds2B*) reveló que es idéntico en secuencia al ARNm de *Zmspds2A*, sin embargo; es más corto y carece una región de 45 nucleótidos. La comparación de la secuencia genómica de la *Zmspds2* con ambos transcritos (*Zmspds2A* y *Zmspds2B*) mostró que la región faltante corresponde al segundo exon de este gen, sugiriendo que ambos transcritos son productos del mismo gen por un mecanismo de “splicing alternativo”. Este hallazgo es de suma importancia ya que constituye un nuevo aspecto en la regulación de la biosíntesis de PAs en

respuesta a estrés salino. Hasta el momento solo se había reportado un evento de “splicing alternativo” en el gen de la espermidina sintasa en manzana (*Mdspds2*) sin embargo, esto se observó en respuesta a las etapas de desarrollo de la planta. Se sabe, que el proceso de “splicing alternativo” es una fuente importante para la generación de ARN mensajeros distintos que contribuyen a la variabilidad de proteínas en eucariontes superiores (Lorković *et al.*, 2000). Se ha descrito que algunos eventos de “splicing alternativo” son constitutivos, con una proporción similar de variantes en las diferentes células de la planta, mientras que otros eventos dependen de una regulación tejido específica o bien mediada por factores ambientales (Lorković *et al.*, 2000). La determinación de eventos de “splicing alternativo” en plantas ha ido en aumento, sin embargo; la significancia biológica del mismo es muchos casos es desconocida (Simpson y Filipowics, 1996). Es importante mencionar que ciertos factores de estrés como frío, exposición a metales pesados o anaerobiosis pueden afectar la eficiencia o los patrones de “splicing” (Simpson y Filipowics, 1996). En este sentido, la funcionalidad y la importancia biológica de la generación de una variante de “splicing” de la espermidina sintasa bajo condiciones de estrés salino aún es desconocida. Sin embargo, se podría especular que esta variante corta podría ser más estable bajo condiciones de estrés o bien participar en la formación de un complejo tipo metaboloma, como el descrito en *Arabidopsis*, de una manera más eficiente bajo condiciones de estrés (Panicot *et al.*, 2002a). El metaboloma es la formación de complejos que incluyen enzimas que participan en reacciones metabólicas secuenciales. De esta manera, se garantiza la transformación de los sustratos en los productos finales, por la vecindad de los sitios activos de las enzimas y al mismo tiempo evitando la difusión del sustrato o bien protegiendo intermediarios lábiles. Aunque estas hipótesis son sumamente especulativas, la estabilidad de un complejo que garantice la biosíntesis de Spd y Spm bajo condiciones de estrés, permitiría que estos compuestos ejerzan sus efectos de protección en la planta. Por otro lado, como se había mencionado anteriormente, el aislamiento y caracterización de aminopropil transferasas (SPDS y SPMS) es un tema sumamente reciente y poco se conoce sobre su regulación. Además, la presencia

de varios intrones que interrumpen el marco de lectura abierto de los genes caracterizados hasta el momento sugiere la expresión de diferentes variantes de los mismos por eventos de “splicing alternativo” (Ikeguchi *et al.*, 2006). Es importante mencionar, que no existían reportes anteriores a nuestro trabajo que involucraran la regulación transcripcional del gen de la *spds* en respuesta a estrés salino. Sin embargo, se había reportado la generación de plantas transgénicas de *A. thaliana*, sobre-expresando el gen de la *spds* de *Cucurbita ficifolia*, las cuales presentaban un alto contenido de Spd y de manera interesante resultaron tolerantes a diferentes condiciones de estrés incluyendo salinidad, sequía, estrés osmótico, por frío y congelamiento (Kasukabe *et al.*, 2004). Estas evidencias apoyan fuertemente la implicación de poliaminas como Spd y del gen involucrado en su biosíntesis en respuesta a estrés abiótico, incluyendo salinidad.

Debido a la respuesta que se observó del gen *Zmspds2* de maíz durante un estrés salino a corto plazo, se evaluó el efecto de un estrés mas prolongado apoyando la siguiente hipótesis: “la inducción del gen de la espermidina sintasa conlleva a la acumulación de poliaminas superiores (Spd y Spm)”. Además de la *Zmspds2*, se analizó la expresión de otro transcrito que codifica a otra espermidina sintasa de maíz (*Zmspds1*) cuya secuencia fue obtenida de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). De manera interesante ambos genes se inducen en respuesta al tratamiento de estrés salino, sin embargo, su inducción es dependiente del tiempo y de la concentración de NaCl aplicada. La *Zmspds2* se induce a tiempos cortos de exposición al estrés (24 h) mientras que la *Zmspds1* se induce tiempos mayores (1 semana) lo que sugiere que el primero de ellos responde al componente osmótico del estrés salino mientras que el segundo al estrés iónico. La regulación diferencial de ambos genes (*Zmspds1* y *Zmspds2*) podría jugar un papel muy importante en el ajuste de los niveles intracelulares de las poliaminas bajo condiciones de estrés. En otros sistemas, como arroz, se observó que el gen de la *Osspds2* se induce en respuesta a un estrés por frío prolongado mientras que la *Osspds1* no sufre cambios, implicando una regulación diferencial de los mismos bajo estrés (Imai *et al.*, 2004a).

Por otro lado, hacer una relación directa de los niveles de inducción del transcrito con la concentración intracelular de poliaminas en un momento dado se vuelve complejo. Sin embargo, nuestros datos sugieren que existe una participación activa de los genes de la espermidina sintasa de maíz mientras se mantienen o aumentan los niveles intracelulares de poliaminas en respuesta al estrés salino. En este sentido, sobre todo a periodos prolongados (1 semana), se observa una acumulación de Spm a concentraciones bajas de NaCl (25 mM) mientras que a concentraciones elevadas se mantienen los niveles de esta poliamina con respecto al control a pesar de la inducción transcripcional de los genes *Zmspds2*, *Zmspds1* y también de *samdc*. Resultados similares fueron reportados por Alcázar *et al.*, (2006) en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés hídrico. Este comportamiento se apoya del hecho que de que los niveles intracelulares de las poliaminas superiores Spd y Spm sufren un control homeostático mayor, manteniendo sus niveles sumamente regulados. Diferentes autores han sugerido que las especies tolerantes acumulan mayoritariamente Spd y Spm en comparación con especies sensibles las cuales acumulan Put, sin embargo esto no es una regla (Krishnamurthy y Bhagwat, 1989; Santa-Cruz *et al.*, 1997). También se ha propuesto que esta mayor acumulación de Spd y Spm es una respuesta adaptativa (Erdei *et al.*, 1996). Asimismo, la acumulación de Spm se ha considerado de suma importancia para tolerar el estrés debido a su capacidad de captación de radicales libres, estabilización de membranas y por su participación en una vía de señalización la cual fue recientemente descrita durante la respuesta hipersensible (HR) en tabaco (Ha *et al.*, 1998; Drolet *et al.*, 1986; Uehara *et al.*, 2005).

Finalmente, la regulación del metabolismo de poliaminas en maíz bajo condiciones de estrés salino podría jugar un papel muy importante en la tolerancia a esta condición ambiental. En este sentido, la inducción del transcrito de la *Zmspds2* de maíz en respuesta al ácido abscísico (ABA) apoya aún mas el papel de las poliaminas en estrés. El ABA, es una molécula de señalización de suma importancia para la adaptación de las plantas a condiciones de estrés abiótico como sequía, salinidad y bajas temperaturas al igual que procesos fisiológicos

como son el desarrollo de semillas, latencia y germinación (Bartels y Sunkar, 2005). Estos factores de estrés estimulan la acumulación de ABA, el cual a su vez induce el cierre de estomas y la expresión de múltiples genes involucrados en la acumulación de osmolitos compatibles y de proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), y también de genes involucrados en mecanismos de señalización y de regulación de la transcripción (Zhu, 2002; Bartels y Sunkar, 2005). Además, encontramos que este gen de la *Zmspds2* de maíz se induce en respuesta a otros factores como a KCl (choque osmótico) y también a altas temperaturas apoyando fuertemente que es un gen de respuesta a estrés.

Estrés biótico

A diferencia del estrés salino, la interacción maíz-*Ustilago maydis* da lugar a una acumulación sumamente notoria de los niveles intracelulares de PAs, principalmente de Put. La interacción maíz-*Ustilago maydis* se caracteriza por la formación de tumores en las partes aéreas de la planta, los cuales son producto de la hiperplasia de células meristemáticas por procesos de proliferación y elongación celular (Snetselaar y Mims, 1994; Bannuett y Herskowitz, 1996). En interacciones que generan hipertrofia e hiperplasia en los tejidos infectados se ha observado una notoria acumulación de PAs (Put, Spd y Spm) (Walters y Shuttleton, 1985). Se ha propuesto que esta acumulación esta asociada a un mayor número de eventos de división celular en estos tejidos. Además, por el alto contenido de citocininas y auxinas, las cuales se sabe inducen la biosíntesis de PAs. En nuestro caso, la hiperplasia generada por *Ustilago maydis* en maíz es principalmente por procesos de elongación celular (Callow y Ling, 1973). La arginina descarboxilasa (ADC), la cual se encarga de la síntesis de Put a partir de arginina, ha sido descrita como la principal fuente de esta poliamina bajo procesos de elongación celular al igual que en respuesta a factores de estrés abiótico (Tiburcio *et al.*, 1997; Kakkar y Sawhney, 2002). En este sentido, analizamos la expresión del gen *adc* en etapas tempranas de la infección (síntomas de clorosis) y también en los tumores generados durante la interacción. Observamos la acumulación del transcrito de la *adc* en las muestras cloróticas y en tumores

sugiriendo que este gen juega un papel muy importante en la formación de tumores por su participación en procesos de elongación o expansión celular. Además, una mayor actividad ADC en los tejidos infectados conlleva a la notoria acumulación de Put libre y conjugada durante la interacción. Por otro lado, los genes de la *samdc1*, *samdc2* y *samdc3* se regulan positivamente en muestras con clorosis y tumores. La *samdc* está asociada con procesos de división y diferenciación celular, y probablemente juegue un papel importante durante la interacción, en la síntesis de espermidina y espermina (Mad Arif *et al.*, 1994). A diferencia de la notable inducción observada en los genes de la *Zmsdps2* y *Zmsdps1* en el estrés salino, la interacción con *Ustilago* no indujo cambios en la expresión de estos genes. Por otro lado, el catabolismo de poliaminas asociado a la degradación de Spd y Spm mediante la enzima poliamino oxidasa (PAO) aumenta en los tumores generados por *Ustilago*. La degradación de estas PAs genera peróxido de hidrógeno H₂O₂, el cual se ha relacionado con señalización, lignificación de la pared celular, defensa y muerte celular programada. Sugerimos que la PAO participa principalmente en la lignificación y formación de la pared celular durante el desarrollo del tumor por procesos de elongación o expansión celular. No obstante, la generación de H₂O₂ por esta vía se ha asociado principalmente con la respuesta hipersensible y defensa contra patógenos. Proponemos que la generación de esta molécula podría estimular la diferenciación celular del hongo dentro de la planta como lo descrito por Leuthner *et al.*, (2005) donde la mutación del gen de la glioxal oxidasa de *Ustilago maydis*, el cual también genera H₂O₂, afecta la diferenciación celular del hongo.

Por otro lado, como se ha descrito en diferentes sistemas, el metil jasmonato (MJ), el cual es una molécula de señalización en respuesta al daño mecánico y ataque por patógenos induce la biosíntesis de poliaminas libres y conjugadas (Walters *et al.*, 2002; Creelman y Mullet, 1997). El pre-tratamiento de plantas de maíz con MJ previo a la inoculación de *Ustilago maydis* produjo una acumulación aún más notoria de poliaminas libres y conjugadas, principalmente Put en los sitios infectados. El metil jasmonato también afectó la regulación transcripcional de algunos genes, principalmente *adc* y *samdc* en las muestras control por daño

mecánico. Diferentes autores han demostrado que el MJ estimula la biosíntesis de PAs al alterar la transcripción y la actividad enzimática de los genes ADC, ODC y SAMDC en plantas (Biondi *et al.*, 2001; Walters *et al.*, 2002; Perez-Amador *et al.*, 2002). A parte del MJ, la presencia de niveles elevados de auxinas, como el ácido indol acético, en los tumores inducidos por *Ustilago* podría estimular la biosíntesis de PAs. Diferentes trabajos, han sugerido que las auxinas y citocininas inducen la acumulación de PAs (Slocum, 1991).

Finalmente, la acumulación de PAs libres Put, Spd y Spm fue notoria en los tejidos infectados, sin embargo, la acumulación de PAs conjugadas principalmente aquellas derivadas de Put fue más sorprendente. Las PAs conjugadas son de particular importancia para la regulación del contenido intracelular de PAs y por su interacción con componentes de la pared celular (Bagni y Pistocchi, 1990). Su función aún no es clara, sin embargo; se ha propuesto que estos compuestos son marcadores de floración y se ha sugerido que participan en mecanismos de defensa a estrés biótico y abiótico principalmente por su capacidad de captación de radicales libres y también por sus propiedades anti-fúngicas (Bagni y Tassoni, 2001; Martín-Tanguy, 2001; Walters, 2003).

En la interacción estudiada, maíz-*Ustilago maydis*, las PAs ejercen diferentes mecanismos de respuesta al ataque por el patógeno, comenzando con la acumulación de poliaminas libres, las cuales posiblemente fueron substrato para la subsecuentemente acumulación de poliaminas conjugadas, principalmente de Put, permitiendo de esta manera la formación de agentes anti-fúngicos y también la reducción de la concentración poliaminas libres que podrían estar involucradas en el desarrollo del tumor.

Nuestro trabajo sugiere que la Put y los conjugados que a partir de ella se generan, juegan un papel primordial en la respuesta de la planta al estrés biótico. Un trabajo reciente, realizado en *A. thaliana* apoya nuestros resultados al establecer que una sobreexpresante del gen de la ADC, la cual tiene niveles elevados de Put, sobreexpresa genes relacionados con patogénesis (proteínas PR, entre otras) (Alcázar *et al.*, 2005).

VII. REFERENCIAS

- Alabadi D, Carbonell J. 1998. Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiol.* **118**: 323-328.
- Alabadi D, Carbonell J. 1999a. Differential expression of two spermidine synthase genes during early fruit development and in vegetative tissues of pea. *Plant Mol. Biol.* **39**: 933-943.
- Alabadi D, Carbonell J. 1999b. Molecular cloning and characterization of a tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) spermidine synthase cDNA (Accession No. AJ006414). *Plant Physiol.* **120**: 935.
- Alcázar R, García-Martínez JL, Cuevas JC, Tiburcio AF, Altabella T. 2005. Overexpression of ADC2 in Arabidopsis induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *Plant J.* **43**: 425-436.
- Alcázar R, Cuevas JC, Patron M, Altabella T, Tiburcio AF. 2006. Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **128**: 448-455.
- Angelini R, Bragaloni M, Federico R, Infantino A, Porta-Puglia A. 1993. Involvement of polyamines, diamine oxidase and peroxidase in resistance of chick-pea to *Ascochyta rabiei*. *J. Plant Physiol.* **142**: 704-709.
- Antognomi F, Fornalè S, Grimmer C, Komor E, Bagni N. 1998. Long-distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. *Planta* **204**: 520-527.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumbald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256-1258.
- Arnon DI. 1949. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Bagni N, Pistocchi R. 1990. Binding, transport and subcellular compartmentation of polyamines in plants. In: Flores HE, Arteca RN, Shannon JC (eds)

- Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology and Interactions. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 62-72.
- Bagni N, Pistocchi R. 1991. Uptake and transport of polyamines and inhibitors of polyamine metabolism in plants. In: Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. (RD Slocum and HE Flores, eds). CRC Press, Boca Raton, FL. 105-120.
- Bagni N, Tassoni A. 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino acids* **20**: 301-317.
- Balasundaram D, Tyagi AK. 1991. Polyamine-DNA nexus: structural ramifications and biological implications. *Mol. Cell Biochem.* **100**: 129-140.
- Bhatnagar P, Glasheen BM, Bains SK, Long SL, Minocha R, Walter C, Minocha SC. 2001. Transgenic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. *Plant Physiol.* **125**: 2139-2153.
- Banuett F. 1992. *Ustilago maydis*, the delightfull blight. *Trends Genet.* **8**: 174-180.
- Banuett F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumor in maize. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 179-208.
- Banuett F, Herskowitz I. 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965-2976.
- Banuett F. 2002. Pathogenic development in *Ustilago maydis*. A progression of morphological transitions that results in tumor formation and teliospore production. In: Molecular Biology of Fungal Development. Osiewacz HD, eds. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 349-398.
- Bartels D, Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **24**: 23-58.
- Basse CW, Steinberg G. 2004. *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol Plant Pathol.* **5**: 83-92.
- Basu R, Maitra N, Ghosh B. 1988. Salinity results in polyamine accumulation in early rice (*Oryza sativa L.*) seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.* **15**: 777-786.
- Batchelor KW, Smith RA, Watson NS. 1986. Dicyclohexylamine is not an inhibitor of spermidine synthase. *Biochem J.* **233**: 307-308.

- Bell E, Malmberg RL. 1990. Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat, reveals similarity to the *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 431-436.
- Biondi S, Scaramagli S, Capitani F, Altamura MM, Torrigiani P. 2001. Methyl jasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in tobacco thin layers. *J. Exp. Bot.* **52**: 231-242.
- Birecka H. 1991. Assay methods for enzymes of polyamine metabolism. In: Slocum RD, Flores HE, eds. *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*. CRC Press, Boca Raton, USA: 244-254.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**:1513-1523.
- Bolle C, Herrmann RG, Oelmüller R. 1995. A spinach cDNA with homology to S-adenosylmethionine decarboxylase. *Plant Physiol.* **107**: 1461-1462.
- Bölker M, Urban M, Kahmann R. 1992. The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**: 441-450.
- Bölker M. 2001. *Ustilago maydis*, a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**: 1395-1401.
- Borrell A, Culiñez-Macià A, Altabella T, Besford RT, Flores D, Tiburcio AF. 1995. Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiol.* **109**: 771-776.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J. 1999. Polyamines and plant environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* **140**: 103-125.
- 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.* **72**: 248-254.
- Callow JA, Ling IT. 1973. Histology of neoplasms and chlorotic lesions in maize seedlings following the infection of sporidia of *Ustilago maydis* (DC) Corda. *Physiol. Plant Pathol.* **3**: 489-494.
- Capell T, Escobar C, Liu H, Burtin D, Lepri O, Christou P. 1998. Over-expression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.)

- affects normal development patterns *in vitro* and results in putrescine accumulation in transgenic plants. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 246-254.
- Cervelli M, Tavladoraki P, Di Agostino S, Angelini R, Federico R, Mariottini P. 2000. Isolation and characterization of three polyamine oxidase genes from *Zea mays*. *Plant Physiol. Biochem.* **38**: 667-677.
- Cervelli M, Cona A, Angelini R, Porticelli F, Federico R, Mariottini P. 2001. A barley polyamine oxidase isoform with distinct structural features and subcellular localization. *J. Biochem.* **268**: 3816-3830.
- Chandler P, Robertson M. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **25**: 113-141.
- Chang KW, Lee SH, Hwang SB, Park KY. 2000. Characterization and translational regulation of the arginine decarboxylase gene in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant J.* **24**: 45-56.
- Chattopadhyay MK, Gupta S, Sengupta DN, Ghosh B. 1997. Expression of arginine decarboxylase in seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as affected by salinity stress. *Plant Mol. Biol.* **34**: 477-483.
- Childs AC, Mehta D, Gerner EW. 2003. Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 1-13.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Christensen JJ. 1963. *Corn Smut Caused by Ustilago maydis*. Monograph 2. St. Paul MN, USA: American Phytopathological Society.
- Cohen S. 1998. A Guide to the Polyamines. Oxford University Press, Oxford, New York, 1-595.
- Cona A, Cenci F, Cervelli M, Federico R, Mariottini P, Moreno S, Angelini R. 2003. Polyamine oxidase, a hydrogen peroxide-producing enzyme, is up-regulated by light and down-regulated by auxin in outer tissues of the maize mesocotyl. *Plant Physiol.* **131**: 803-813.

- Cooper HL, Park MH, Folk JE, Safer B, Braverman R. 1983. Identification of the hypusine-containing protein Hy⁺ as translation initiation factor eIF-4D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**:1854-1857.
- Creelman RA, Mullet JE. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 355-381.
- Del Duca S, Tidu V, Bassi R, Esposito C, Serafini-Fracassini D. 1994. Identification of Chia/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus scaber* L. *Planta* **193**: 283-289.
- Del Duca S, Beninati S, Serafini-Fracassini D. 1995. Polyamines in chloroplasts: Identification of their glutamyl and acetyl derivatives. *Biochem. J.* **305**: 233-237.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 19-22.
- Delis C, Dimou M, Efrose RC, Flemetakis E, Aivalakis G, Katinakis P. 2005. Ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase gene transcripts are co-localized in developing tissues of *Glycine max* etiolated seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 19-25.
- Dellis C, Dimou M, Flemetakis E, Aivalakis G, Katinakis P. 2006. A root-and hypocotyl-specific gene coding for cooper-containing amine oxidase is related to cell expansion in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* **57**: 101-111.
- DeScenzo RA, Minocha SC. 1993. Modulation of cellular polyamines in tobacco by transfer and expression of mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Mol. Biol.* **22**: 113-127.
- Dresselhaus T, Barcelo P, Hagel C, Lorz H, Humbeck K. 1996. Isolation and characterization of a *Triticum* cDNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase that is circadian-clock-regulated. *Plant Mol. Biol.* **30**: 1021-1033.
- Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL, Thompson JE. 1986. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* **25**:367-371.
- Edreva A. 1997. Tobacco polyamines as affected by stresses induced by different pathogens. *Biol. Plant.* **40**: 317-320.

- Erdei L, Szegletes Z, Barabas K, Pestenacz A. 1996. Response in polyamine titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings. *J. Plant Physiol.* **147**: 599-603.
- Evans PT, Malmberg RL. 1989. Do polyamines have roles in plant development? *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 235-269.
- Fattarusso E, Lanzotti V, Tagliatalata-Scafati O. 1999. Antigungal N-feruloyl amides from roots of two *Allium* species. *Plant Biosyst.* **133**: 199-203.
- Ficker E, Tagliatalata M, Wible BA, Henly CM, Brown AM. 1994. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* **266**: 1068:1072.
- Federico R, Angelini R. 1991. Polyamine catabolism. In: Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. Slocum RD, Flores HE (Eds) CRC Press, Boca Raton, FL. 41-56.
- Flemetakis E, Efrose RC, Desbrosses G, Dimou M, Delis C, Aivalakis G, Udvardi MK, Katinakis P. 2004. Induction and spatial organization of polyamine biosynthesis during nodule development in *Lotus japonicus*. *MPMI.* **17**: 1283-1293.
- Flores HE. 1991. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In: The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. Slocum R, Flores HE (Eds). CRC Press, Boca Raton, FL. 214-225.
- Flowers TJ. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* **55**:307-319.
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR. 1977. The mechanisms of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**: 89-121.
- Franceschetti M, Hanfrey C, Scaramagli S, Torrigiani P, Bagni N, Burtin D, Michael AJ. 2001. Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *Biochem. J.* **353**: 403-409.
- Galloway GL, Malmberg RL, Price RA. 1998. Phylogenetic utility of the nuclear gene arginine decarboxylase: an example from Brassicaceae. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1312-1320.

- Galston AW, Kaur-Sawhney R, Altabella T, Tiburcio AF. 1997. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot. Acta* **110**: 197-207.
- Greenland AJ, Lewis DH. 1984. Amines in barley leaves infected with brown rust and their possible relevance to formation of "green-islands". *New Phytol.* **96**: 283-291.
- Groppa MD, Benavides MP, Tomaro ML. 2003. Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under calcium or copper stress. *Plant Sci.* **164**: 293-299.
- Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RA. 1998. The natural polyamine spermidine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:11140-11145.
- Hanfrey C, Franceschetti M, Mayer M, Mayer MJ, Jllingworth C, Michael AJ. 2002. Abrogation of upstream open reading frame-mediated translation control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *J. Biol. Chem.* **277**: 44131-44139.
- Hanzawa Y, Takahashi T, Michael AJ, Burtin D, Long D, Pineiro M, Coupland G, Komeda Y. 2000. ACAULIS5, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J.* **19**: 4248-4256.
- Hanzawa Y, Imai A, Michael AJ, Komeda Y, Takahashi T. 2002. Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **527**: 176-180.
- Hao YJ, Kitashiba H, Honda C, Nada K, Moriguchi T. 2005. Expression of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase genes in apple cells and stressed shoots. *J. Exp. Bot.* **56**: 1105-1115.
- Hasan R, Alam RK, Ali R. 1995. Polyamine induced Z-conformation of native calf thymus DNA. *FEBS Lett.* **368**: 27-30.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 463-499.
- Hashimoto T, Tamaki K, Susuki K, Yamada Y. 1998. Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant Cell Physiol.* **39**:73-79.

- Hatanaka T, Sano H, Kusano T. 1999. Molecular cloning and characterization of coffee cDNA encoding spermidine synthase. *Plant Sci.* **140**:161-168.
- Heby O. 1986. Putrescine, Spermidine and Spermine. *NIPS.* **1**:12-15.
- Heby O, Persson L. 1990. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 153-158.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agr. Exp. Sta. Cir.* **347**: 32.
- Hummel I, Gouesbet G, El Amrani A, Ainouche A, Couee I. 2004. Characterization of the two arginine decarboxylase (polyamine biosynthesis) paralogues of the endemic subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica* and analysis of their differential expression during development and response to environmental stress. *Gene* **342**:199-209.
- Hu WW, Gong H, Pua EG. 2005. Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-methionine decarboxylase genes from mustard (*Brassica juncea*). *Physiol. Plant.* **124**: 25-40.
- Igarashi K, Kashiwagi K. 2000. Polyamines: Mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**: 559-564.
- Ikeguchi Y, Bewley MC, Pegg AE. 2006. Aminopropyltransferases: function, structure and genetics. *J. Biochem.* **139**: 1-9.
- Imai R, Ali A, Pramanik HR, Nakaminami K, Sentoku N, Kato H. 2004a. A distinctive class of spermidine synthase is involved in chilling response in rice. *J. Plant Physiol.* **161**: 883-886.
- Imai A, Matsuyama T, Hanzawa Y, Akiyama T, Tamaoki M, Saji H, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Komeda Y, Takahashi T. 2004b. Spermidine synthase genes are essential for survival of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**: 1565-1573.
- Jiménez-Bremont JF, Camacho-Villasana YM, Cabrera-Ponce JL, Barba de la Rosa AP, Ochoa-Alejo N. 2004. Sequence comparison of plant ornithine decarboxylase reveals high homology and lack of introns. *Biol. Plant.* **48**: 193-198.

- Kakkar RK, Rai VK. 1993. Plant polyamines in flowering and fruit ripening. *Phytochemistry* **33**: 1281-1288.
- Kakkar RK, Nagar PK, Ahuja PS, Rai VK. 2000. Polyamines and plant morphogenesis. *Biol. Plant.* **43**: 1-11.
- Kakkar RK, Sawhney VK. 2002. Polyamine research in plants- a changing perspective. *Physiol. Plant.* **116**: 281-292.
- Kämper J, Reichmann M, Romeis T, Bölker M, Kahmann R. 1995. Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**:73-83.
- Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S. 2004. Over-expression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **45**: 712-722.
- Kauppinen L. 1995. Regulation of the human spermidine synthase mRNA translation by its 5'-untranslated region. *FEBS Lett.* **365**: 61-65.
- Kitashiba H, Hao Y-J, Honda C, Moriguchi T. 2005. Two types of spermine synthase gene: *MdACL5* and *MdSPMS* are differentially involved in apple fruit development and cell growth. *Gene* **361**: 101-111.
- Korolev S, Ikeguchi Y, Skarina T, Beasley S, Arrowsmith C, Edwards A, Joachimiak A, Pegg AE, Savchenko A. 2002. The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 27-31.
- Kozak M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger mRNAs. *Nucl. Acids Res.* **15**: 8125-8148.
- Krishnamurthy R, Bhagwat KA. 1989. Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. *Plant Physiol.* **91**:500-504.
- Kwak SH, Lee SH. 2001. The regulation of ornithine decarboxylase gene expression by sucrose and small upstream open reading frame in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell. Physiol.* **42**: 314-323.

- Kumar A, Taylor MA, Mad Arif SA, Davis HV. 1996. Potato plants expressing antisense and sense SAMDC transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant J.* **9**: 147-158.
- Kumar A, Altabella T, Taylor MA, Tiburcio AF. 1997. Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci.* **2**: 124-130.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformat.* **5**:150-163.
- Lee MM, Lee SH, Park KY. 1997. Characterization and expression of two members of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant Mol. Biol.* **34**: 371-382.
- Legocka J, Kluk A. 2005. Effect of salt and osmotic stress on changes in polyamine content and arginine decarboxylase activity in *Lupinus luteus* seedlings. *J. Plant Physiol.* **162**: 662-668.
- Leuthner B, Aichinger C, Oehmen E, Koopmann E, Muller O, Muller P, Kahmann R, Bolker M, Schreier PH. 2005. A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics* **272**: 639-50.
- Li X, Coffino P. 1992. Regulated degradation of ornithine decarboxylase requires interaction with the polyamine-inducible protein antizyme. *Mol. Cell Biol.* **12**: 3556-3562.
- Li X, Coffino P. 1993. Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by polyamine-inducible inhibitory protein. *Mol. Cell Biol.* **13**: 2377-2383.
- Li X, Coffino P. 1994. Distinct domains of antizyme required for binding and proteolysis of ornithine decarboxylase. *Mol. Cell Biol.* **14**: 87-92.
- Lindemose S, Nielsen PE, Mollegaard NE. 2005. Polyamines preferentially interact with bend adenine tracts in double-stranded DNA. *Nucl. Acids Res.* **33**: 1790-1803.

- Liu J, Jiang M-Y, Zhou Y-F, Liu Y-L. 2005. Production of polyamines is enhanced by endogenous abscisic acid in maize seedlings subjected to salt stress. *J. Int. Plant Biol.* **47**: 1326-1334.
- Lorković ZJ, Wieczorek-Kirk DA, Lambermon MHL, Filipowicz W. 2000. Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in Plant Sci.* **5**: 160-167.
- Lovaas E. 1997. Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv. Pharmacol.* **38**: 119-149.
- Mad Arif SA, Taylor MA, George LA, Butler AR, Burch LR, Davies HV, Stark MJR, Kumar A. 1994. Characterization of the S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene of potato. *Plant Mol. Biol.* **26**: 327-338.
- Magné C, Larher F. 1992. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Anal. Biochem.* **200**.
- Malmberg A. 1984. N-feruloylputrescine in infected potato tubers. *Acta Chemica Scandinavica B.* **38**: 153-155.
- Malmberg RL, Cellino ML. 1994. Arginine decarboxylase of oats is activated by enzymatic cleavage into two polypeptides. *J. Biol. Chem.* **28**: 2703-2706.
- Marcé M, Brown DS, Capell T, Figueras X, Tiburcio AF. 1995. Rapid high performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *J. Chromatogr. B.* **666**: 329-335.
- Marco F, Carrasco P. 2002. Expression of the pea S-adenosylmethionine decarboxylase gene is involved in developmental and environmental responses. *Planta* **214**: 641-647.
- Marini F, Betti L, Scaramagli S, Biondi S, Torrigiani P. 2001. Polyamine metabolism is upregulated in response to tobacco mosaic virus in hypersensitive, but not in susceptible, tobacco. *New Phytol.* **149**: 301-309.
- Martin-Tanguy J. 1985. The occurrence and possible functions of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regul.* **3**: 381-399.

- Martin-Tanguy J. 1997. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol. Plant.* **100**: 675-688.
- Martin-Tanguy J. 2001. Mechanism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul.* **34**: 135-148.
- Martin-Tanguy J, Martin C, Gallet M, Vernoy R. 1976. Sur de puissants inhibiteurs de multiplication du virus de la mosaïque de tabac. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences*. Paris, Serie D. **282**: 2231-2234.
- Martin-Tanguy J, Negrel J. 1987. Hydroxycinnamic acid amides, hypersensitivity, flowering and sexual organogenesis in plants. In: *Plant Molecular Biology*. Von Wettstein D, Chua NH (Eds). Plenum Publishing Corporation, New York. 253-263.
- Martínez-Espinosa AD, León-Ramírez CG, Singh N, Ruiz-Herrera J. 2003. Use of PCR to detect infection of differentially susceptible maize cultivars using *Ustilago maydis* strains of variable virulence. *Int. Microbiol.* **6**: 117-120.
- Masgrau C, Altabella T, Farràs R, Flores D, Thompson AJ, Besford RT, Tiburcio AF. 1997. Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant J.* **11**: 465-473.
- Matthews, HR. 1993. Polyamines, chromatin structure and transcription. *Bioessays* **15**: 561-566.
- Michael AJ, Furze JM, Rhodes MJ, Burtin D. 1996. Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA. *Biochem. J.* **314**: 241-248.
- Mitchell JL, Judd GG, Bareyal-Leyser A, Ling SY. 1994. Feedback repression of polyamines transport is mediated by antizyme in mammalian tissue-culture cells. *Biochem J.* **299**: 19-22.
- Mo H, Pua EC. 2002. Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. *Physiol. Plant.* **114**: 439-449.
- Moller SG, McPherson MJ. 1995. Molecular and functional studies of cooper amine oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 630S.

- Morgan JE, Blankenship JW, Matthews HR. 1987. Polyamines and acetylpolyamines increase the stability and alter the conformation of nucleosome core particles. *Biochemistry* **26**:3643-3649.
- Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A. 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* **360**: 597-599.
- Nam KH, Lee SH, Lee J. 1997. Differential expression of ADC mRNA during development and upon acidic stress in soybean (*Glycine max*) hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* **38**: 1156-1166.
- Negrel J, Valle JC, Martin C. 1984. Ornithine decarboxylase activity and the hypersensitive reaction of tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **23**: 2747-2751.
- Negrel J. 1989. The biosynthesis of cinnamoylputrescines in callus tissue cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **28**: 477-481.
- Panicot M, Minguet EG, Ferrando A, Alcázar R, Blázquez MA, Carbonell J, Altabella T, Koncz C, Tiburcio AF. 2002a. A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell.* **14**: 2539-2551.
- Panicot M, Masgrau C, Borrell A, Cordeiro A, Tiburcio AF, Altabella T. 2002b. Effects of putrescine accumulation in tobacco transgenic plants with different expression levels of oat arginine decarboxylase. *Plant Physiol.* **114**: 281-287.
- Park MH, Cooper HL, Folk JE. 1982. The biosynthesis of protein-bound hypusine [N epsilon-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine]. Lysine is the amino acid precursor and intermediate role of deoxyhypusine [N epsilon-(4-aminobutyl)lysine]. *J. Biol. Chem.* **257**:7217-7222.
- Perez-Amador MA, Carbonell J, Granell A. 1995. Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.) *Plant Mol. Biol.* **28**: 997-1009.
- Perez-Amador MA, Leon J, Green PJ, Carbonell J. 2002. Induction of the arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of

- polyamines in the wound response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **130**: 1454-1463.
- Pillai MA, Akiyama T. 2004. Differential expression of an S-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene involved in polyamine synthesis under low temperature stress in *japonica* and *indica* rice genotypes. *Mol. Gen. Genomics* **271**: 141-149.
- Pistocchi R, Bagni N, Creus JA. 1987. Polyamine uptake in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* **84**: 374-380.
- Prakash L, Prathapsenan G. 1988. Effect of NaCl salinity and putrescine on shoot growth, tissue ion concentration and yield of rice (*Oryza sativa*). *J. Agron. Crop. Sci.* **160**: 325-334.
- Primikiris NI, Roubelakis-Angelakis KA. 1999. Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta* **208**: 574-582.
- Posfai J, Bhaqwat AS, Posfai G, Roberts RJ. 1989. Predicted motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucl. Acids Res.* **17**:2421-2435.
- Poulin R, Lu L, Ackermann B, Bey P, Pegg AE. 1992. Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by difluormethylornithine. *J. Biol. Chem.* **267**: 150-158.
- Rastogi R, Dulson J, Rothstein SJ. 1993. Cloning of tomato arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. *Plant Physiol.* **103**: 829-834.
- Rea G, Laurenzi M, Tranquilli E, D'Ovidio R, Federico R, Angelini R. 1998. Developmentally and wound-regulated expression of the gene encoding a cell wall cooper amine oxidase in chickpea seedlings. *FEBS Lett.* **437**: 177-182.
- Rechsteiner M, Rogers SW. 1996. PEST sequences and regulation of proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 267-271.
- Reggiani R, Aurisaro N, Mattano M, Bertrani A. 1993. Influence of K⁺ ions on polyamine level in wheat seedlings. *J Plant Physiol.* **141**: 136-140.

- Roberts DR, Dumbroff EB, Thompson JE. 1986. Exogenous polyamines alters membrane fluidity in bean leaves-a basis for potential misinterpretation of their true physiological role. *Planta* **167**: 395-401.
- Rom E, Kahara C. 1994. Polyamines regulate the expression of ornithine decarboxylase antizyme in vitro by inducing ribosomal frame-shifting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 3959-3963.
- Roussos PA, Pontikis CA, Tsantili E. 2002. Root promoting compounds detected in olive knot extract in high quantities as a response to infection by the bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*. *Plant Science* **163**: 533-541.
- Ruiz-Herrera J, Martínez-Espinosa AD. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *Int. Microbiol.* **1**: 149-158.
- Ruiz-Herrera J, León-Ramírez C, Martínez-Espinosa AD. 2000. Morphogenesis and pathogenesis in *Ustilago maydis*. *Recent Res. Dev. Microbiol.* **4**: 585-598.
- Sairam RK, Tyagi A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr Sci.* **86**:407-421.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandmeier E, Hale TI, Christen P. 1994. Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylases. *Eur. J. Biochem.* **221**: 997-1002.
- Santa-Cruz A, Acosta M, Pérez-Alfocea F, Bolarin MC. 1997. Changes of free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultured and wild tomato species. *Physiol Plant.* **101**:341-346.
- Schnier J, Schwelberger HG, Smit-McBride Z, Kang HA, Hershey JW. 1991. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **11**: 3105-3114.
- Schröder G, Schröder J. 1995. cDNA from *Catharanthus roseus*, heterologous expression, identification of the proenzymes-processing site, evidence for

- the presence of both subunits in the active enzyme, and a conserved region in the 5'-mRNA leader. *Eur. J. Biochem.* **228**: 74-78.
- Schwartz M, Altman A, Cohen Y, Arzee T. 1986. Localization of ornithine decarboxylase and changes in polyamine content in root meristems of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **67**: 485-492.
- Scoccianti V, Torrigiani P, Bagni N. 1991. Occurrence of diamine oxidase activity in protoplasts and isolated mitochondria of *Helianthus tuberosus* tuber. *J. Plant Physiol.* **138**: 752-756.
- Shantz LM, Pegg AE. 1999. Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **31**: 107-122.
- Shi H, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK. 2003. Overexpression of the plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* **21**: 81-85.
- Simpson GG, Filipowicz W. 1996. Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanisms, regulation and sub-cellular organization of the spliceosomal machinery. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1-41.
- Slocum RD. 1991. Polyamine Biosynthesis in Plants. In: *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Slocum RD, Flores HE, (Eds). CRC Press. Boca Raton, FL. 23-40.
- Slocum RD, Flores HE. 1991. Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Slocum RD, Kaur-Sawhney R, Galston AW. 1984. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **235**: 283-303.
- Smirnov IV, Dimitri SI, Makarov VL. 1988. Polyamine-DNA interactions. Condensation of chromatin and naked DNA. *J Biomol. Struct. Dyn.* **5**:1149-1161.
- Smith TA, Wilshire G. 1975. Distribution of cadaverine and other amines in higher plants. *Phytochemistry* **14**: 2341-2346.

- Snetselaar KM, Mims CW. 1994. Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* **98**: 347-355.
- Tassoni A, Fornalè S, Bagni N. 2003. Putative ornithine decarboxylase activity in *Arabidopsis thaliana*: inhibition and intracellular localization. *Plant Physiol Biochem.* **41**: 871-875.
- Thomas T, Thomas TJ. 2001. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol. Life Sci.* **58**: 244-258.
- Tiburcio AF, Besford RT, Borrell A. 1994. Posttranslational regulation of arginine decarboxylase synthesis by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 445S.
- Tiburcio AF, Altabella T, Borrell A, Masgrau C. 1997. Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant.* **100**: 664-674.
- Torrigiani P, Serafini-Fracassini D, Biondi S, Bagni N. 1986. Evidence for subcellular localization of polyamines and their biosynthetic enzymes in plant cells. *J. Plant Physiol.* **124**: 23-26.
- Torrigiani P, Altamura MM, Pasqua G, Monacelli B, Serafini-Fracassini D, Bagni N. 1987. Free and conjugated polyamines during de novo floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco. *Plant Physiol.* **70**: 453-460.
- Torrigiani P, Rabiti AL, Bortolotti G, Betti L, Marini F, Canova A, Bagni N. 1997. Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytol.* **135**: 467-473.
- Trung-Nghia P, Bassie L, Safwat G, Thu-Hang P, Lepri O, Rocha P, Christou P, Capell T. 2003. Reduction in the endogenous arginine decarboxylase transcript levels in rice leads to depletion of the putrescine and spermidine pools with no concomitant changes in the expression of downstream genes in the polyamine biosynthetic pathway. *Planta* **218**: 125-34.
- Uehara Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Takahashi H, Matsui K, Ohme-Takagi M, Saitoh H, Terauchi R, Kusano T. 2005. Tobacco ZFT1, a transcriptional repressor with a Cys₂/His₂ type zinc finger motif that functions in spermine-signaling pathway. *Plant Mol Biol.* **59**:435-448.

- Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Igarashi Y, Seki M, Sekiguchi K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2003. Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* **26**: 1917-1926.
- Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Ito T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2004. *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**: 369-375.
- Usherwood PN. 2000. Natural and synthetic polyamines: modulators of signaling proteins. *Farmacology* **55**: 202-205.
- Von Röpenack E, Parr A, Schulze-Lefert P. 1998. Structural analysis and dynamics of soluble and cell wall bound barley phenolics and their role in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus. *J. Biol. Chem.* **273**: 9013-9022.
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF. 1997. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol.* **113**: 1009-1013.
- Walters DR, Wilson PWF, Shuttleton MA. 1985. Relative changes in levels of polyamines and activities of biosynthetic enzymes in barley infected with the powdery mildew fungus, *Erysiphe graminis* D. C. ex Merat f.sp. hordei Marchal. *New Phytol.* **101**: 695-705.
- Walters DR, Shuttleton MA. 1985. Polyamines in the roots of turnip infected with *Plasmodiophora brassicae* Wor. *New Phytol.* **100**: 209-214.
- Walters DR, Meurer-Grimes B, Rovira I. 2001. Antifungal activity of three spermidine conjugates. *FEMS Microbiol. Lett.* **10030**: 1-4.
- Walters DR, Cowley T, Mitchell A. 2002. Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *J. Exp. Bot.* **53**: 747-756.
- Walters DR. 2003. Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **64**: 97-107.
- Wang QM, Yuan GF, Sun HY, Zhao PQ, Lui Y, Guo DP. 2005. Molecular cloning and expression analysis of spermidine synthase gene during sex reversal induced by Ethrel in cucumber (*Cucumis sativus* L). *Plant Sci.* **169**: 768-775.

- Watson MB, Malmberg RL. 1996. Post-translational regulation of Arabidopsis arginine decarboxylase in response to potassium-deficiency stress. *Plant Physiol.* **111**: 1077-1083.
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**: 1101-1115.
- Wilson WA, Harrington SE, Woodman WL, Lee M, Sorrells ME, McCouch SR. 1999. Inferences of the genome structure of progenitor maize through comparative analysis of rice, maize and domesticated panicoids. *Genetics* **153**: 453-473.
- Xiong H, Stanley BA, Tekwani BL, Pegg AE. 1997. Processing of mammalian and plant S-adenosylmethionine decarboxylase proenzymes. *J. Biol Chem.* **272**: 28342-28348.
- Xu B, Sheehan MJ, Timko MP. 2004. Differential induction of ornithine decarboxylase (ODC) gene family members in transgenic tobacco (*Nicotiana tabaccum* L. cv. Bright Yellow 2) cell suspensions by methyl-jasmonate treatment. *Plant Growth Reg.* **44**: 101-116.
- Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y. 1998. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* **118**: 1213-1222.
- Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H. 2003. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol.* **132**:1973-1981.
- Yoda H, Hiroi Y, Sano H. 2006. Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol.* **142**: 193-206.
- Yoo TH, Park CJ, Ham BK, Kim KJ, Paek KH. 2004. Ornithine decarboxylase gene (CaODC1) is specifically induced during TMV-mediated but salicylate-independent resistance response in hot pepper. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1537-1542.

- Yoshida I, Yamagata H, Hirasawa E. 1999. Blue- and red-light regulation and circadian control of gene expression of S-adenosylmethionine decarboxylase in *Pharbitis nil*. *J. Exp. Bot.* **50**: 319-326.
- Zainal Z., Sajari R. and Ismail I. 2002. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding ornithine decarboxylase cDNA from chilli (*Capsicum annuum*). *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* **6**: 415–419.
- Zhang Z, Honda C, Kita M, Hu C, Nakayama M, Moriguchi T. 2003. Structure and expression of spermidine synthase genes in apple: two cDNAs are spatially and developmentally regulated through alternative splicing. *Mol. Gen. Genomics* **268**: 799-807.
- Zhu JK. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**: 66-71.
- Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 247-273.

ANEXO

1. AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DE ORNITINA DESCARBOXILASAS DE ASCOMICETOS FITOPATÓGENOS

El gen de la ornitina descarboxilasa (ODC) cataliza la etapa inicial en la síntesis de poliaminas, en la cual la putrescina es producida por descarboxilación de la ornitina. En base a las secuencias consenso características de ODC's de hongos, se diseñaron juegos de oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de la secuencia genómica de este gen en tres hongos fitopatógenos pertenecientes a la familia de los Pyrenomycetes (Ascomicota): *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Fusarium solani*. Además se aisló la secuencia de la ODC de un hongo patógeno de insectos, *Metarhizium anisopliae*. La secuenciación de estos fragmentos reveló una homología con una identidad entre el 37 y el 88% con otras *odc*'s de hongos. La comparación de la secuencia proteica por análisis tipo Clustal mostró la presencia de secuencias conservadas pertenecientes al sitio de unión del sustrato y el sitio de unión del cofactor (fosfato de piridoxal) en todas las secuencias aisladas. A nivel proteína, se observa una homología con una identidad del 68.3-81.9% entre las secuencias aisladas, mientras que con otros hongos Pyrenomycetes se observaron homologías del 68.6-72.9% (*Neurospora crassa*; orden Sordariales) y del 78.8-88.1% (*Fusarium graminearum*; orden Hypocreales).

GDNA 180643—30/5/2006—214067

DNA Sequence, 2006; 00(0): 1–6



FULL LENGTH RESEARCH PAPER

Cloning and sequence analysis of ornithine decarboxylase gene fragments from the *Ascomycota*

JUAN FRANCISCO JIMÉNEZ-BREMONT^{1,†}, MARGARITA RODRÍGUEZ-KESSLER^{1,‡},
RAUL RODRÍGUEZ-GUERRA^{2,‡}, CARLOS CORTEZ-PENAGOS^{3,¶}, JUAN CARLOS
TORRES-GUZMAN^{4,§}, & JUNE SIMPSON WILLIAMSON^{5,||}

¹División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa de San José 2055, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78210 San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico, ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío, Km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende, Apartado Postal 112, Celaya, Guanajuato, Mexico, ³Escuela de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tzintzuntzan 173, Apartado Postal, 58420 Morelia, Michoacán, Mexico, ⁴Instituto de Investigación en Biología Experimental Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Apartado Postal 187, 36000 Guanajuato, Guanajuato, Mexico, and ⁵Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV, Unidad Irapuato, Apartado Postal 629, 36500 Irapuato, Guanajuato, Mexico

(Received 23 January 2006)

Abstract

Ornithine decarboxylase (ODC; EC 4.1.1.17) catalyzes the initial step in the biosynthesis of polyamines, the conversion of ornithine to putrescine. Based on the most conserved regions of fungal ODC's, we designed and synthesized oligonucleotides to amplify homologous fragments of three important plant pathogenic Pyrenomyces fungi (*Ascomycota*), *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum lindemuthianum* and *Fusarium solani*, and one insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Cloning and sequencing of the amplified fragments revealed homologies of between 37 to 88% with other fungal ODC's. The predicted peptide sequences were compared by Clustal analysis and conserved sequences corresponding to the substrate and cofactor binding sites were identified. Comparative analyses of the ODC fragments isolated in this study, revealed high homology between them (68.3–81.1%) and also with other Pyrenomyces such as *Neurospora crassa* (order Sordariales; 68.6–72.9%) and *Fusarium graminearum* (order Hypocreales; 70.8–88.1%). Data obtained in this work revealed that these fungi constitute a compact group separated from other eukaryotic ODC's.

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Magnaporthe grisea*, *Metarhizium anisopliae*, ornithine decarboxylase

Database accession number: p27121, AAF35284, AAF34583, CAB56523

Introduction

Ornithine decarboxylase (ODC; EC. 4.1.1.17) catalyzes the conversion of ornithine to putrescine and is the first and rate-limiting step in polyamine biosynthesis in most organisms. In plants and some

bacteria a second mechanism for the synthesis of polyamines exists. This pathway involves the action of arginine decarboxylase (ADC) to produce agmatine (Tabor and Tabor 1984). Polyamines are polycations found to be essential for all organisms (Tabor and

Correspondence: J. F. Jiménez Bremont, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, 78210 San Luis Potosí, Mexico. Fax: 52 444 8342010. E-mail: jbremon@ipicyt.edu.mx

[†]Tel: 52 444 8342000. Fax: 52 444 8342010. E-mail: mrodriguez@ipicyt.edu.mx.

[‡]Tel: 52 461 6115323. Fax: 52 461 6115323. Ext. 123. E-mail: raulrdzg@yahoo.com.mx.

[¶]Tel: 52 443 3142809. Fax: 52 443 3142809. E-mail: neocccs@yahoo.com.

[§]Tel: 52 473 7320006. Fax: 52 473 7320006. E-mail: torguz@quijote.ugto.mx.

^{||}Tel: 52 462 6239667. Fax: 52 462 6239600. E-mail: jsimpson@ira.cinvestav.mx.

ISSN 1042-5179 print/ISSN 1029-2365 online © 2006 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/10425170600807009

2. GENERACIÓN DE UNA GENOTECA SUSTRACTIVA DE *Ustilago maydis* DURANTE LA TRANSICIÓN DIMORFICA *in vitro*

En este trabajo de tesis, el segundo análisis del metabolismo de poliaminas de maíz fue realizado en la interacción con el hongo *Ustilago maydis* (estrés biótico), por lo que nos planteamos estudiar al hongo en su forma filamentosa la cual es la forma patogénica. *U. maydis* es un excelente modelo para el estudio de interacciones planta-patógeno y dimorfismo. La inducción de la transición dimórfica *in vitro* por pH en células haploides de *U. maydis* ha sido ampliamente empleado para comprender los mecanismos que gobiernan este proceso diferenciativo. En este sentido, se realizó la construcción de una genoteca sustractiva de *U. maydis* durante la transición dimórfica *in vitro*, empleando el ARNm obtenido de células filamentosas crecidas a pH ácido como “tester” y el ARNm obtenido de células levaduriformes crecidas a pH neutro como “driver”. Se realizó un análisis tipo Northern Reverso transfiriendo las clonas producto de la hibridación sustractiva en membranas de nylon y se hibridaron con sondas marcadas no radioactivamente con 11-dUTP-Fluoresceína (F1-dUTP). De este ensayo se obtuvieron 80 clonas candidatos a expresarse diferencialmente durante el crecimiento micelial del hongo. Dentro de ellos, se aislaron secuencias involucradas en el metabolismo de carbohidratos, transportadores de péptidos, proteínas de unión a ARN, entre otras. El análisis de RT-PCR confirmó la expresión diferencial de al menos cinco transcritos los cuales se expresan en la etapa micelial. Dentro de ellos se encontró una secuencia con posible función de carbohidrato cinasa similar a YKL151C de *Saccharomyces cerevisiae*, un transportador de péptidos similar a los transportadores MTD1, una deshidrogenasa con dominios FAD/FMN, una proteína de unión a ARN y también una proteína inducida por concanamicina CipC. El papel de estos genes durante la transición dimórfica aun es desconocido. Sin embargo, la generación de mutantes por reemplazo del gen o bien sobre-expresantes sentido y antisentido, podrían generar información sobre la participación de estos genes en dimorfismo y posiblemente en patogénesis.

**IDENTIFICATION OF UPREGULATED GENES DURING THE *in vitro*
DIMORPHIC TRANSITION OF *Ustilago maydis***

¹Rodríguez-Kessler, M., ²Ruiz-Herrera, J., ³Gold, S., ¹Jiménez-Bremont J. F.

¹División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

²Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV, Unidad Irapuato, Irapuato, Guanajuato, México

³Department of Plant Pathology, University of Georgia, Athens, GA, USA

Abstract

Ustilago maydis is considered an excellent model for the study of plant-pathogen interactions and dimorphism. Induction of the dimorphic transition of haploid strains *in vitro* by pH has been extensively used to understand the mechanisms governing this differentiation process. In this sense, we generated a subtractive library of *U. maydis* during the *in vitro* dimorphic transition induced at acid pH, using the mRNA isolated from filamentous cells as tester and the mRNA isolated from budding cells grown at neutral pH as driver. Putative differentially expressed clones were applied to membranes and screened with Fluorescein-11-dUTP (F1-dUTP) labeled probes. Eighty putative filamentous up-regulated clones were obtained and sequenced. RT-PCR analysis confirmed the expression of at least five filamentous up-regulated genes including a putative carbohydrate kinase similar to *Saccharomyces cerevisiae* YKL151C, a putative oligopeptide transporter similar to MTD1 transporters, a putative FAD/FMN containing dehydrogenase, a putative RNA

binding protein and putative CipC induced protein. The role of these genes during the dimorphic transition of *U. maydis* is still unknown. Nevertheless the generation of mutants by gene replacement or mutants over-expressing these genes should provide further information on the regulation and participation of these genes in dimorphism and possibly pathogenesis.

Keywords: subtractive library, *Ustilago maydis*, dimorphism.

Introduction

Ustilago maydis, is an excellent model for the study of the relationships existing between dimorphic transitions and pathogenicity. The initiation of pathogenic development is characterized by a morphological transition (dimorphic switch) from non-pathogenic haploid yeast-like cells to a filamentous dikaryon capable of colonizing maize tissues, and the subsequent induction of large plant tumors, that at late stages of the infection fill with black teliospores (for review see Christensen 1963; Banuett 1992, 2002; Banuett and Herskowitz, 1996; Ruiz-Herrera and Martínez-Espinosa, 1998). In this sense, morphological transitions and pathogenic growth are closely related and are governed by two independent loci: *a* and *b*. The *a* locus controls cell fusion, and encodes pheromones and receptors, which sense the presence of pheromones of the opposite mating type (Bölker *et al.*, 1992). After mating, subsequent development of dikaryotic hypha requires the *b* loci, which is present in multiple alleles and encode the bE and bW homeodomain proteins. This locus dimerize in non allelic combinations and form an active transcription factor required for filamentous growth and pathogenicity (For Review see Basse and Steinberg, 2004 and references there in). In addition, regulation of the dimorphic switch and pathogenesis are

controlled by components of the cAMP and the MAPK pathways and also by effectors and regulators of both of these pathways (Andrews *et al.*, 2000; Dürrenberger *et al.*, 1998; Gold *et al.*, 1994; Gold *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 1999; Mayorga and Gold, 1999, 2001; Müller *et al.*, 1999, 2003).

Based on the importance of the filament development, on both the understanding of these morphological process and also because of its close correlation with pathogenesis, we looked forward the isolation of genes preferentially expressed in the filamentous as compared with the budding form of *U. maydis*. It has been established, that dimorphism of haploid strains can be induced by pH *in vitro* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995). In these sense, *U. maydis* strains grow in a yeast-like form when the initial pH of the medium is close to neutral (pH 7), and in a mycelial form when it is acid (pH 3). Induction of the dimorphic transition of haploid strains *in vitro* has been extensively used to understand the mechanisms governing this differentiation process. In order to comprehend even more these process we used suppressive subtractive hybridization (SSH) to obtain sequences more abundantly expressed in the filamentous than in the budding morphology. Identification of new genes involved in the process of dimorphism are critical for the full understanding of it and pathogenesis.

Materials and Methods

Strains and culture media

The FB2 (*a2b2*) haploid strain of *Ustilago maydis* (F. Banuett, University of California, San Francisco, USA) was used in this study. This strain was maintained at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 50% (v/v) glycerol. Recovered in YEPD liquid media (1% yeast extract, 1% peptone, 1% glucose), incubated at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 - 3 d in an orbital shaker (150 rpm) and used as inoculums for subsequent experiments.

Mycelial development in liquid culture

Both, budding and filamentous-like cells were obtained in synthetic media (Holliday, 1961) with an initial pH of 7.0 and 3.0 respectively, as described by Ruiz-Herrera *et al*, 1995. After 24 h of culture cells were recovered by centrifugation, frozen in liquid nitrogen and their total RNA was isolated as described bellow.

SSH library construction

For the SSH procedure, total RNA was isolated from *Ustilago maydis* cultures (budding or filamentous cells) using the Trizol reagent as recommended by the manufacturer's procedure (Invitrogen, Carlsbad, USA). RNA integrity was analyzed on a formaldehyde denaturing agarose/EtBr gel. Approximately, 500 μg of total RNA were used for poly A⁺ RNA isolation using the NucleoTrap mRNA Kit as described by the manufacturer (Macherey-Nagel, Germany). Generation of a library enriched for genes involved in mycelial development (pH 3.0), was performed with the PCR-Selected cDNA subtraction Kit from Clontech (Palo Alto, CA) following the manufacturer's instructions. The EST

fragments obtained from the library were cloned in TOPO-pCR4 (TA Cloning Kit Invitrogen, San Diego, CA, USA) and sequenced. *Escherichia coli* DH5 α were used for transformation, plasmid amplification and preparation following standard methodologies (Ausbel *et al.*, 1999).

Reverse Northern blot hybridizations

Putative differentially expressed clones were applied to membranes and screened with probes from filamentous and budding cell-derived RNAs. Ten microliters (2 μ g) of plasmids containing differentially expressed sequences were denatured by heating for 5 min in a boiling water bath and quick cooled. The denatured plasmids were applied to Hybond-N+ membranes (Amersham, Biosciences, Germany) using a 96-Well dot blot hybridization manifold (Apelex). Each membrane was UV-crosslinked and immediately prehybridized as described bellow. Fluorescein-11-dUTP (F1-dUTP) labeled probes for screening of multiple plasmid clones were prepared using the Gene Images Random Prime Labeling Kit (Amersham, Biosciences, Germany). For each probe 5 μ g of total RNA were isolated from budding and filamentous cultures as described previously, and digested with DNaseI (Invitrogen). First strand cDNA synthesis was performed using the SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR according to the manufacturer's suggestions (*Invitrogen*). Labelling of each probe (F1-dUTP) was performed in a total volume of 50 μ L containing: 10 μ L (30 ng aprox.) of single stranded cDNA, 10 μ L (5X stock solution) of the Nucleotide mix, 5 μ L random primers and 5 U/ μ L of enzyme solution (Klenow). The sample was denatured by heating for 5 min in a boiling water bath and quick cooled. The labeling reaction was incubated at 37 °C for 3 h.

The blot was prehybridized at 60 °C for 3 h in a buffer containing 5X SSC, 0.1% (w/v) SDS, 5% (w/v) dextran sulphate (Sigma) and 1 in 20 dilution liquid block (Amersham, Biosciences, Germany). Hybridization was for 14 h in the same solution containing the F1-dUTP-probe.

The blot was washed with the following stringency solutions: buffer 1 (1X SSC, 0.1% (w/v) SDS) and buffer 2 (0.5X SSC, 0.1% (w/v) SDS) at 60 °C. After stringency washes, signal detection was performed using an anti-fluorescein antibody conjugated with alkaline phosphatase(AP): Anti-Fluoresceine-AP, Fab fragments (Roche, Germany) and the NBT/BCIP (Roche, Germany) substrate yielding a dark-blue dye.

RT-PCR analysis

For RT-PCR analysis total RNA was isolated from 24 h *U. maydis* cultures (budding or filamentous cells) as described previously. After DNase I (*Invitrogen*) treatment, first strand cDNA synthesis was performed in a total volume of 30 µl using the SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR according to the manufacturer's suggestions (*Invitrogen*). Each reaction mixture contained 5 µg of total RNA, 0.5 mM dNTP mix, 0.5 µg Oligo-dT (12-18 mer) adapter primer, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol (DTT), 40 U of recombinant RNase inhibitor (RNaseOUT™) and 50 U of SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase. The RT reaction was carried out at 42 °C for 50 min. Control reactions without reverse transcriptase were performed simultaneously. One µl of the RT reaction was used as template for PCR assays as described below.

Different sets of oligonucleotides were designed to amplify each putative differentially expressed cDNA: CitC5 5'-atgggcttcaaggacggtga-3' sense and CitC3 5'-tcactttgtctcttcctaaggtac-3' (GenBank UM02708.1); K-car5 5'-atgtcaacatccgcagctccag-3' sense and K-car3 5'-tcaaagcaaagcctgtacatctcc-3' anti-sense (GenBank UM05844.1); 5MTD1 5'-atcgatctcaagcccaagacgg-3' sense and 3MTD1 5'-ttacccgaggcgccacca-3' anti-sense (GenBank UM04028.1); FAD5 5'-ttcacaatcgcttgctgcgca-3' sense and FAD3 5'-cagtgcacgtgctcttgct-3' anti-sense (GenBank UM05945.1); RRM5 5'-atgcagaagtgaatacaaccaa-3' sense and RRM3 5'-gcgcatcgccatcctcat-3' anti-sense (GenBank UM03084.1); PD5 5'-aggccagagaagagccgaag-3' sense and PD3 5'-agggccatctctcgcgca-3' anti-sense (GenBank UM00461.1); CipC5 5'-atgttcggattcgtaaccacgaa-3' sense and CipC3 5'-cgaccagcagtagccaactaa-3' anti-sense (GenBank UM03284.1); 5-Um007 5'-actatctcttctatccaccgtacgt-3' sense and 3-Um007 5'-ttacggatggcaaaggcgatc-3' anti-sense (GenBank UM00070.1); and 5VTC1 5'-atgtcgaccagcctctct-3' sense and 3VTC1 5'-ggcgttgaagcggaggatga-3' anti-sense (GenBank UM05595.1). As loading control the elongation factor EF1 α was used amplifying a 505 bp fragment with the following oligonucleotides: 5EF1 α 5'-tcgagaagttcgagaaggaggc-3' sense and 3EF1 α 5'-cgccgatctttagacatcctg-3' (Gen Bank XM_751978).

PCR amplifications were performed in 50 μ l reaction mixtures containing 1 μ l of the RT reaction product as template, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.2 μ M each primer and 2.5 U Taq polymerase (Invitrogen). The PCR amplification conditions for each gene were as follows: 5 min at 94 °C followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 64 °C (UM04028.1, UM05945.1, UM00070.1, UM05595.1

and EF1 α), at 60 °C (UM02708.1, UM05844.1, UM00461.1 and UM03284.1), at 59 °C (UM03084.1) and 60 s at 72 °C, except for UM03084.1 in which extension was performed for 120 s, followed by 72 °C for eight min. PCR products were electrophoretically separated in 1% (w/v) agarose gels. Quantification of products was performed by the image analysis program Quantity One (Bio-Rad). The relative amount of each was normalized to that of the EF1 α product.

DNA sequencing and analysis

Sequencing of 92 putatively differential expressed genes was conducted with double-stranded templates in an ABI PRISM 377 DNA automated sequencer (Perkin Elmer). BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> and http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/ustilago_maydis/Blast) searches of all the obtained sequences revealed the identity and possible function of each gene. Analysis of protein domains and functional sites were carried out using the InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) program. The EST sequences reported in this paper were deposited in the GenBank nucleotide sequence database under the Accession numbers XXX and XXX, respectively.

Results

Filament up-regulated cDNA library construction

Suppressive subtractive hybridization (SSH), was performed using the mRNA isolated from filamentous cells of the wild-type strain FB2 grown at acidic pH (3.0) as tester, and the mRNA isolated from budding cells grown at neutral pH as driver. The tester population contains the sequences of interest while the drive is used to remove sequences from genes

expressed in both conditions. After performing SSH and the PCR amplifications (see materials and methods), the population enriched for sequences up-regulated in the filamentous form was cloned in the pCR2.1 vector.

Three hundred and sixty white colonies were selected for further analysis and plasmid DNA isolation. EcoRI digestion indicated that most of the plasmids contained inserts greater than 50 bp, with an average size of 300 bp.

Identification of differentially expressed clones

Individual differential clones were identified by dot blotting plasmid DNA to duplicated membranes. These membranes were screened with Fluorescein-11-dUTP (F1-dUTP) labeled first-strand cDNA probes prepared from filamentous and budding cell-derived RNAs (Fig 1). After stringency washes, signal detection was performed using an anti-fluorescein antibody conjugated with alkaline phosphatase(AP): Anti-Fluoresceine-AP, Fab fragments and the NBT/BCIP substrate yielding a dark-blue dye. Clones that gave a filamentous/budding ration greater than two were chosen for further study.

Sequencing of the putative differential expressed sequences reveled clone duplication. So, identical clones were grouped into contigs. The identity and potential function of the putative proteins encoded by the genes, was assigned after search against the NCBI sequences database using the BLASTX algorithm. A maximum probability threshold for a sequence was set to an *E*-value of 10^{-5} . Using these criterion, 8 genes were assigned tentative functions, whereas one of the identified genes did not show similarity to any known gene (Table 1).

Differential expression of the identified clones

To confirm differential expression of clones identified as up-regulated in the filamentous form, RT-PCR analysis were performed. Specific oligonucleotides were designed against conserved sequences of each of the nine clones identified. PCR amplification of each gene were performed using 1 µl of the cDNA prepared from the filamentous and the budding cell-derived RNAs, respectively. As shown in Figure 2, contigs 3 and 7 were only expressed in the filamentous form. Contig 3, shares high sequence homology with a peptide transported protein (*mtd1*) of *Schizophyllum commune* (Lengeler and Kothe, 1999). This gene exhibits sexually induced transcript accumulation and was identified physically linked to the *a* locus that is under control of the mating-type genes in *S. commune*. The *mtd1* gene belongs to a novel family of peptide transporters (OPT-family) with at least twelve transmembrane structures. Gene disruption resulted in an extremely reduced growth of the dikaryon with slow aerial mycelium formation that could be complemented by addition of peptone or uracil. It is suggested that the *U. maydis* homologue might be involved in similar functions. On the other hand, contig 7, shares high sequence similarity with the CipC protein of *Aspergillus nidulans* (Concanamycin induced protein). This protein was isolated by proteome analysis in *A. nidulans* strains treated with Concanamycin A (Melin et al., 2002). This antibiotic acts as a vacuolar ATPase inhibitor and causes hyperbranching in *A. nidulans* and also in *Neurospora crassa* (Bowman et al., 1997). Up to date, the function of these protein is still unknown.

Contigs 2, 4 and 5 were up-regulated 2, 1.5 and 5-fold respectively in the filamentous form in comparison with the budding morphology. Contig 2, shares high sequence homology with a putative carbohydrate kinase (YKL151C) protein of *Saccharomyces cerevisiae* while

Contig 4, with a putative FAD/FMN-containing dehydrogenase of *Aspergillus oryza*. In some fungi, the mycelium cells possess an aerobic metabolism, in contrast with the yeast cells which present an anaerobic or fermentative metabolism. In *Paracoccidioides brasiliensis*, transcriptional profile analysis revealed the up-regulation of genes related to the citrate cycle and oxidative phosphorylation, including dehydrogenases and also carbohydrate kinases involved in the oxidative pentose phosphate pathway (Felipe *et al.*, 2005).

Contig 5, shares high sequence homology with a putative protein with RNA-recognition motif (RRM) of *Yarrowia lypolitica*. In a recent study it was demonstrated that RNA-binding proteins have important implications in the regulation of morphology and pathogenic development in *U. maydis* (Becht *et al.*, 2005).

Contig 6, shows no changes at the transcriptional level in both the filamentous and the budding morphology. This contig encodes a putative Prephenate dehydratase/chorismate mutase enzyme involved in the early steps of phenylalanine biosynthesis.

Interestingly, Contigs 8 and 9 are repressed in the filamentous form. Contig 8, encodes a putative unknown protein of *U. maydis*, while contig 9, shares high sequence similarity with the vacuolar transporter chaperone (VTC1) which has been also shown to act as an inhibitor of CDC42. The CDC42 gene encodes a small GTPase, which has been suggested to be involved in septation in *U. maydis* (Weinzierl *et al.*, 2002). We suggest that the down regulation of VTC1 in the filamentous cells allows CDC42 signalling and septation of filaments.

Although the isolated genes share similarity with other sequences and a putative function might be assigned, the precise role of these genes during the dimorphic transition of *U. maydis* is still unknown. The generation of mutants by gene replacement or mutants over-expressing

these genes should provide further information on the regulation and participation of these genes in dimorphism and possibly pathogenesis.

References

- Andrews DL, Egan JD, Mayorga ME, Gold SE. The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Molecular Plant Microbe Interaction*. **13**: 781-786, 2000.
- Banuett F. *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends in Genetics* **8**: 174-180, 1992.
- Banuett F, Herskowitz I. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965-2976, 1996.
- Banuett F. Pathogenic development in *Ustilago maydis*. A progression of morphological transitions that results in tumor formation and teliospore production. In: Osiewacz HD, ed. *Molecular biology of fungal development*. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 349-398, 2002.
- Becht P, Vollmeister E, Feldbrügge M. Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **4**: 121-133, 2005.
- Bölker M, Urban M, Kahnmann R. The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450, 1992.
- Bowmann EJ, O'Neill FJ, Bowmann BJ. Mutations of *pma-I*, the gene encoding the plasma membrane H⁺-ATPase of *Neurospora crassa*, suppress inhibition of growth by concanamycin A, a specific inhibitor of vacuolar ATPases. *J. Biol Chemistry* **272**: 14776-14786, 1997.
- Christensen JJ. *Corn smut caused by Ustilago maydis*. *Monograph 2*. St. Paul MN, USA: American Phytopathological Society, 1963.

- Dürrenberger F, Wong K, Konstad JW. Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Science* **95**: 5684-5689, 1998.
- Felipe MSS, Andrade RV, Arraes FVM, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FAG, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LMP, Andrade PA, Tavares AHFP, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, PB Genome Network, Pereira M, Jesuino RSA, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RF, Passos GAS, Almeida NF, Walter MEMT, Soares CMA, Carvalho MJA, Brígido MM. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *The Journal of Biological Chemistry*. Papers in Press. 2005.
- Gold S, Duncan G, Barret K, Kronstad J. cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Development* **8**: 2805-2816, 1994.
- Gold SE, Brogdon SM, Mayorga ME, Kronstad JW. The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* **9**: 1585-1594, 1997.
- Hartmann HA, Krüger J, Lottspeich F, Kahmann R. 1999. Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *Plant Cell* **11**: 1293-1306, 1999.
- Holliday R. The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res* **2**: 240-230, 1961.
- Lengeler KB, Kothe E. Mated: a putative peptide transporter of *Schizophyllum commune* expressed in dikaryons. *Current Genetics* **36**: 159-164, 1999.
- Mayorga ME, Gold SE. A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Molecular Microbiology* **34**: 485-497, 1999.

- Mayorga ME, Gold SE. The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Molecular Microbiology* **41**: 1365-1379, 2001.
- Melin P, Schnürer J, Wagner EGH. Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Molecular Genetics and Genomics* **267**: 695-702, 2002.
- Müller P, Aichinger C, Feldbrugge M, Kahmann R. The MAP kinase Kpp2 regulated mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **34**: 1007-1017, 1999.
- Müller P, Weinzierl G, Brachmann A, Feldbrügge M, Kahmann R. Mating and pathogenic development of the smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryotic Cell* **2**: 1187-1199, 2003.
- Ruiz-Herrera J, León CG, Guevara-Olvera L, Cárabez-Trejo A. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology* **141**: 695-703, 1995.
- Ruiz-Herrera J, Martínez-Espinosa AD. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology* **1**: 149-158.
- Weinzierl G, Leveleki L, Hassel A, Kost G, Wanner G, Bölker M. Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **45**: 219-231, 2002.

Legends to Figures

Fig.1 Screening of the filamentous form cDNA subtractive library for differentially expressed clones by reverse Northern blot. Three hundred and sixty white colonies were selected for the analysis using Fluorescein-11-dUTP (F1-dUTP) labeled first-strand cDNA probes prepared from both filamentous and budding cell-derived RNAs.

Fig. 2 RT-PCR analysis of unique sequences identified by SSH. Total RNA was obtained from budding form wild type FB2 (B) and from filamentous form wild type FB2 (F).

Table 1. Differential expressed sequences.

Figure 1

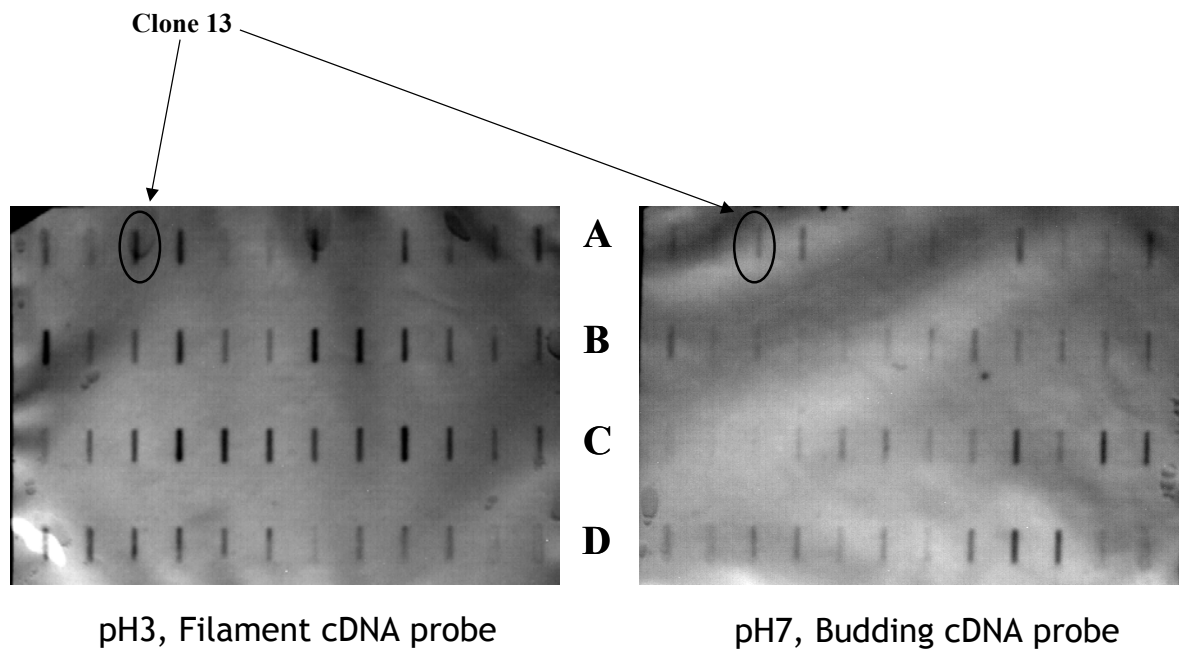


Figure 2

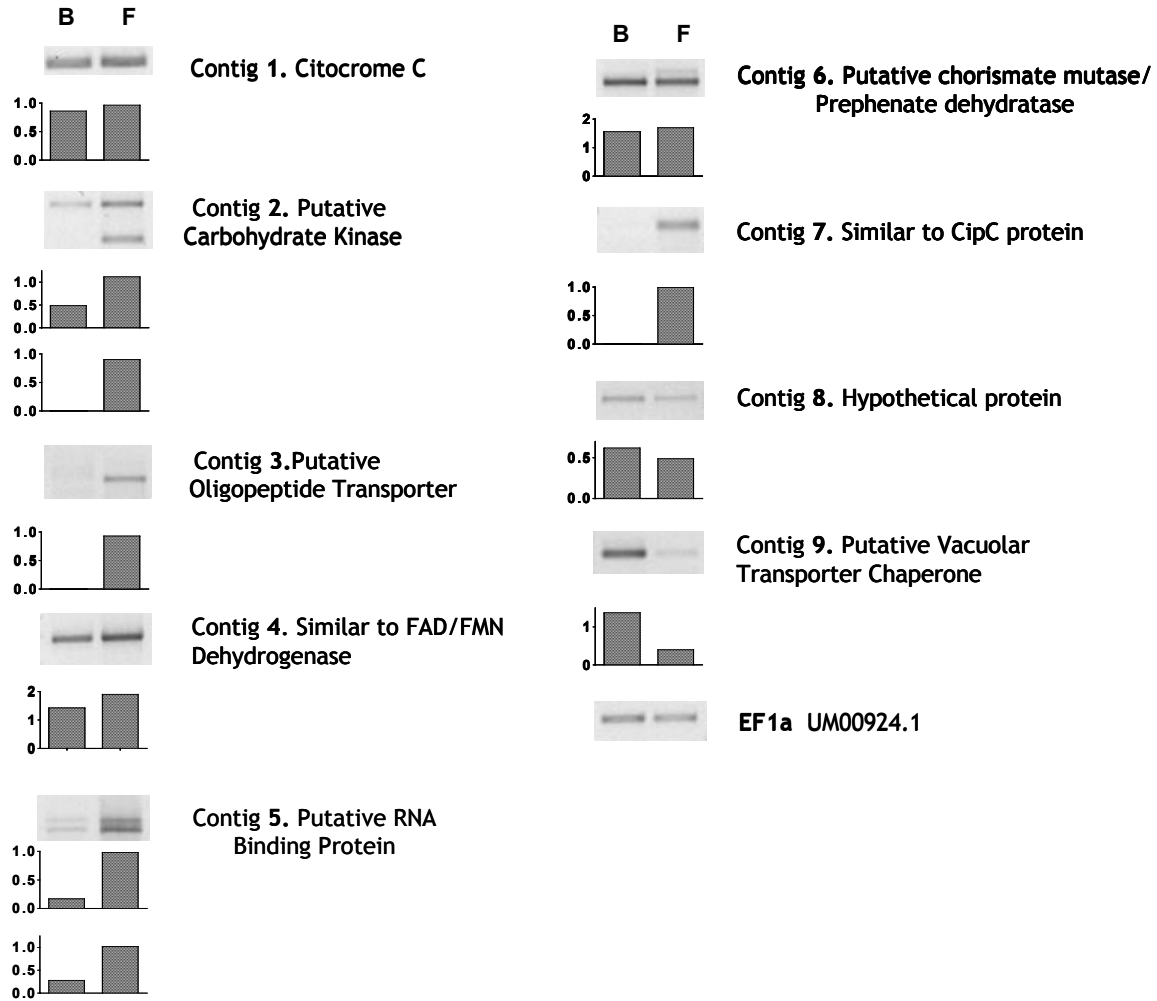


Table 1

Contig	<i>Ustilago maydis</i> database	Similarity to	E-value
1 (3, 45, 74,105, 247, 282)	Cytochrome C UM02708.1	Cytochrome C (<i>Ustilago maydis</i> XM753762)	1e-52
2 (38, 200, 226, 227, 529)	hypothetical protein UM05844.1	Carbohydrate kinase YKL151C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AAS56241)	9e-47
3 (26, 376, 435, 453, 587)	hypothetical protein UM04028.1	Oligopeptide transporter MTD1 (<i>Schizophyllum commune</i> AAF26618)	3e-120
4 (35, 232, 241, 256, 590, 610)	hypothetical protein UM05945.1	Putative FAD/FMN-containing dehydrogenases (<i>Aspergillus oryzae</i> BAE59609)	2e-87
5 (13, 33, 252)	hypothetical protein UM03084.1	Putative RNA recognition motif - RRM (<i>Yarrowia lipolytica</i> XP503927)	2e-36
6 (18, 82, 115, 269, 361, 532)	hypothetical protein UM00461.1	Chorismate mutase/ Prephenate dehydratase (<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> ZP01021711)	2e-13
7 (5)	hypothetical protein UM03284.1	CipC protein (<i>Emericella nidulans</i> CAC87272)	4e-11
8 (20, 354, 515)	hypothetical protein UM00070.1	hypothetical protein Unknown function (<i>Ustilago maydis</i> UM00070.1)	0.0
9 (21, 46, 56, 75, 78, 84, 254, 311, 312, 326, 350, 420, 516, 535, 586)	hypothetical protein UM05595.1	Vacuolar transporter chaperone-VTC1 negative regulator of CDC42 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NP010995)	2e-43